

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Departamento De Bioquímica Médica,**

**Biología Molecular E Inmunología**



**MODULACIÓN DE LXR $\alpha$  POR POLIFENOLES Y  
ÁCIDO OLEICO MEDIADA POR PROTEÍNAS QUINASAS  
EN CÉLULAS FAGOCÍTICAS HUMANAS**

**Memoria de Tesis Doctoral presentada para optar al grado de doctor por:**

**Francisco Javier Sáenz Coronilla**

**Directores de Tesis:**

**Dr. Francisco Sobrino Beneyto**

**Dra. Consuelo Santa María Pérez**

**Dr. Gonzalo Alba Jiménez**

**SEVILLA 2015**





**Dr. Francisco Sobrino Beneyto**, Doctor en Química, Catedrático del Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla; la **Dra. Consuelo Santa María Pérez**, Dra. en Farmacia y el **Dr. Gonzalo Alba Jiménez**, Doctor en Biología:

#### **CERTIFICAN**

Que **D. Francisco Javier Sáenz Coronilla**, Licenciado en Biología, ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación titulado: “**MODULACIÓN DE LXR $\alpha$  POR POLIFENOLES Y ÁCIDO OLEICO MEDIADA POR PROTEÍNAS QUINASAS EN CÉLULAS FAGOCÍTICAS HUMANAS**”, en el Departamento de Bioquímica Médica, Biología Molecular e Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla, reuniendo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Y para que conste a todos los efectos, firmamos el presente certificado en Sevilla, a 04 de Marzo de 2015.

Fdo.:

**Dr. Francisco Sobrino Beneyto**  
Director de tesis

Fdo.:

**Dra. Consuelo Santa María Pérez**  
Co-directora de tesis

Fdo.:

**Dr. Gonzalo Alba Jiménez**  
Co-director de tesis



# ÍNDICE



# ÍNDICE

---

## RESUMEN

## ABREVIATURAS

## INTRODUCCIÓN

### 1. Células objeto de estudio

- 1.1. Neutrófilos
- 1.2. Monocitos/macrófagos

### 1. Radicales libres de oxígeno (ROS)

- 1.1. Sistemas de defensa antioxidante
- 1.2. ROS como segundo mensajero

### 2. Vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs)

- 2.1. Activación de ERK1/2 MAPK.
- 2.2. Activación de p38 MAPK.

### 3. Sistema de la quinasa dependiente de la 5'-adenosil monofosfato (AMPK)

- 3.1. La estructura de la AMPK
- 3.2. La regulación de la AMPK
- 3.3. Las funciones de la AMPK

### 4. Receptores nucleares

- 5.1. Superfamilia de receptores nucleares
- 5.2. Estructura
- 5.3. Mecanismos de unión de los receptores nucleares a ADN
- 5.4. Mecanismos de activación y represión transcripcional

### 6. Receptores X hepáticos (Liver X receptor, LXR)

- 6.1. Principales funciones de LXR
- 6.2. Implicación de LXR en el metabolismo lipídico
- 6.3. LXR y aterosclerosis
- 6.4. LXR e inflamación
- 6.5. LXR e inmunidad innata
- 6.6. LXR e inmunidad adquirida

### 7. Curcumina

- 7.1. Agente antineoplásico
- 7.2. Efectos anti-oxidantes
- 7.3. Efectos anti-inflamatorios
- 7.4. Cardioprotección
- 7.5. Diabetes
- 7.6. Obesidad

### 8. Naringenina

- 8.1. Estructura y metabolismo
- 8.2. Efecto anti-inflamatorio
- 8.3. Metabolismo lipídico y cardioprotección
- 8.4. Función anti-oxidante

- 8.5. Efecto anti-tumoral
- 9. **Ácido oleico**
  - 9.1. Cardioprotección
  - 9.2. Inflamación
  - 9.3. Antineoplásico

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

- 1. Hipótesis
- 2. Objetivos

## **MATERIALES Y MÉTODO**

- 1. Reactivos
- 2. Normas éticas
- 3. Aislamiento de neutrófilos humanos
- 4. Cultivos celulares de línea
- 5. Obtención de macrófagos humanos
- 6. Cuantificación del número de células y análisis de la viabilidad celular
  - 6.1. Test de exclusión del azul tripán y cuantificación celular
  - 6.2. Medida de la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH)
- 7. Incubación de células
- 8. Medición de la peroxidación lipídica
- 9. Medida de la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS).
  - 9.1. Análisis de la producción de ROS (luminol)
  - 9.2. Análisis de la producción de ROS (Hidroetidina)
  - 9.3. Análisis de ROS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular (DCFDA)
- 10. Silenciamiento con ARN de interferencia
- 11. Obtención de proteínas celulares
  - 11.1. Aislamiento de proteínas totales
  - 11.2. Cuantificación de la concentración de proteínas
- 12. Análisis de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)
  - 12.1. Preparación de muestras
  - 12.2. Inmunoprecipitación
  - 12.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)
- 13. Transferencia “semi-seca” de proteínas a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF)
- 14. Análisis de proteínas por inmunodetección
  - 14.1. Incubación de las membranas de PVDF con anticuerpos
  - 14.2. Revelado de bandas inmunoreactivas mediante luminol.
  - 14.3. Eliminación de anticuerpos de una membrana (“stripping”).
  - 14.4. Cuantificación de los niveles de proteína detectados
- 15. Análisis de expresión de ARN mensajeros (ARNm) por “RT-PCR”

- 15.1. Obtención del ARN celular total
- 15.2. Cuantificación de la concentración de ARN.
- 15.3. Eliminación de la contaminación de ADN con ADNasa I
- 15.4. Transcripción inversa del ARN a ADN complementario (ADNc)
- 15.5. Amplificación del ADNc por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real.
- 15.6. Cuantificación de la expresión génica a partir de la PCR a tiempo real.
- 19. **Ensayo de migración celular**
- 20. **Tinción de lípidos neutros mediante tinción “Oil Red O”**
- 21. **Salida del colesterol**
- 22. **Detección de apoptosis celular**
  - 22.1. Medición de fragmentación de ADN
  - 22.2. Ensayo de Anexina V-IP
- 23. **Análisis estadístico**

## **RESULTADOS**

- 1. **Incremento en los niveles de ARNm de LXR $\alpha$  y sus genes diana inducidos por la curcumina y la naringenina**
- 2. **Incremento en los niveles de proteína LXR $\alpha$  inducido por curcumina y naringenina**
- 3. **Componente C disminuye la expresión de ARNm y los niveles de proteína LXR $\alpha$**
- 4. **La transfección con ARNsi específico de AMPK $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2 disminuye la expresión de los ARNm de LXR $\alpha$  y sus genes diana.**
- 5. **Incremento en los niveles de proteína AMPK fosforilada (AMPKp) inducida por TO901317, curcumina y naringenina**
- 6. **Incremento en los niveles de proteína AMPK fosforilada (AMPKp) inducida por TO901317, curcumina y naringenina**
- 7. **Inhibición por parte de TO901317, curcumina y naringenina de la migración de células THP-1 inducida por fMPL**
- 8. **Salida del colesterol inducida por TO901317, curcumina y naringenina**
- 9. **Efecto del ácido oleico sobre la expresión de los ARNm de LXR $\alpha$  y sus genes diana inducida por el TO901317 o el 22R-OH-colesterol en neutrófilos humanos**
- 10. **El ácido oleico induce un ligero estrés oxidativo en neutrófilos humanos**
- 11. **Efecto del ácido oleico sobre la expresión de LXR $\alpha$  y sus genes diana no está mediado por el aumento en los niveles de ROS**

**12. Efecto del AO sobre la migración celular, la activación de ERK1/2 y p38, y los niveles de lípidos en neutrófilos humanos**

**DISCUSIÓN**

- 1. Expresión de ARNm de LXR $\alpha$  y sus genes diana**
- 2. Expresión proteica de LXR $\alpha$**
- 3. Inhibición de la expresión de LXR $\alpha$** 
  - 3.1. Inhibición de la expresión de LXR $\alpha$  por el comp. C**
  - 3.2. Inhibición de la expresión de LXR $\alpha$  con ARNsi de AMPK $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2**
- 4. Estimulación de la fosforilación de AMPK**
- 5. Inhibición de la fosforilación de AMPK por el comp. C**
- 6. Variaciones en la producción de ROS**
- 7. Efecto de los tratamientos sobre la migración celular**
- 8. Incremento de la salida de colesterol**
- 9. Efectos del ácido oleico en neutrófilos humanos**

**CONCLUSIONES**

**BIBLIOGRAFÍA**

# **ABREVIATURAS**



## ABREVIATURAS

---

| <b>ABCs</b>                       | <b>Proteínas transportadoras de unión al ATP</b>                                   |
|-----------------------------------|--|
| <b>ACC</b>                        | Acetil Co-A carboxilasa  |
| <b>ACC1</b>                       | Acetil CoA carboxilasa   |
| <b>ADN</b>                        | Ácido desoxirribonucleico  |
| <b>ADP</b>                        | Adenosín difosfato   |
| <b>AFs</b>                        | Dominios de activación terminal  |
| <b>AMP</b>                        | Adenosín monofosfato   |
| <b>AMPK</b>                       | Proteína quinasa activada por AMP  |
| <b>AO</b>                         | Ácido oleico   |
| <b>Apo</b>                        | Apolipoproteína  |
| <b>ARN</b>                        | Ácido ribonucleico   |
| <b>ATP</b>                        | Adenosín trifosfato  |
| <b>Ca<sup>2+</sup></b>            | Ion calcio   |
| <b>CDs</b>                        | Clúster de diferenciación  |
| <b>CoA</b>                        | Coenzima A   |
| <b>COX</b>                        | Ciclooxigenasa   |
| <b>EEM</b>                        | Error estadístico medio  |
| <b>ERK1/2</b>                     | Quinasa extracelular regulada por señal  |
| <b>fMLP</b>                       | N-formil-metionil-leucil-fenilalanina  |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> | Peróxido de Hidrógeno  |
| <b>HDL</b>                        | Lipoproteínas de alta densidad   |
| <b>HMG-CoA</b>                    | 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA  |
| <b>HO-1</b>                       | Hemo oxigenasa-1   |
| <b>HRE</b>                        | Elementos de respuesta a hormonas  |
| <b>ILs</b>                        | Interleuquinas   |
| <b>JNKs</b>                       | Quinasas c-Jun N-terminal  |
| <b>LDL</b>                        | Lipoproteínas de baja densidad   |
| <b>LDLR</b>                       | Receptor de LDL  |
| <b>LKB1</b>                       | Quinasa de hígado B1   |
| <b>LPS</b>                        | Lipopolisacárido   |
| <b>LXREs</b>                      | Elementos de respuesta a LXR   |
| <b>LXRs</b>                       | Receptores hepáticos X   |
| <b>MAPKs</b>                      | Proteínas quinasas activadas por mitógenos   |
| <b>MUFAs</b>                      | Ácidos grasos monoinsaturados  |
| <b>NADPH</b>                      | Dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato reducido                              |
| <b>N-CoR</b>                      | Receptor nuclear co-repressor  |
| <b>NF-κB</b>                      | Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas |
| <b>NO</b>                         | Óxido nítrico  |
| <b>NOS</b>                        | Óxido nítrico sintasa  |
| <b>p38</b>                        | Proteínas quinasas activadas por p38   |

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| <b>PMA</b>                     | Forbol 12-miristato 13-acetato  |
| <b>PPARs</b>                   | Proliferadores de peroxisoma activados por receptores                             |
| <b>PUFAs</b>                   | Ácidos grasos poliinsaturados   |
| <b>ROS</b>                     | Especies reactivas de oxígeno   |
| <b>RXR</b>                     | Receptor retinoide X  |
| <b>SMRT</b>                    | Mediador de silenciamiento de ácido retinoico y receptores de la hormona tiroidea |
| <b>SREBP1-c</b>                | Proteínas de unión al elemento regulador de esteroides                            |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | Factor de necrosis tumoral $\alpha$   |
| <b>VEGF</b>                    | Factor de crecimiento endotelial vascular   |

# **RESUMEN**



## RESUMEN

---

Los receptores nucleares LXR (*Liver X receptors*) están implicados en la regulación de numerosos procesos fisiológicos, fundamentalmente la homeostasis del colesterol y ácidos grasos, y la expresión de genes implicados en la respuesta inflamatoria. Las enzimas quinasas son proteínas que también están comprometidas con el metabolismo energético (Ej.: AMPK) y la regulación de la respuesta inflamatoria (Ej.: p38 y ERK1/2), entre otras muchas funciones. La activación de las proteínas quinasas en células fagocíticas humanas mediante curcumina, naringenina y ácido oleico, indujo e incrementó (en el caso de los compuestos los fenólicos), la activación del receptor nuclear LXR $\alpha$ . Los niveles de ARNm de LXR $\alpha$  aumentaron en células fagocíticas estimuladas por el TO901317, la curcumina, la naringenina y el ácido oleico; al igual los niveles de expresión de ARNm de sus genes diana ABCA1, G1 y SREBP1c. Así mismo, se observó un aumento proporcional en los niveles de expresión proteica de LXR $\alpha$  en las células THP-1 diferencias con PMA. Estos cambios a nivel molecular modificaron distintas funciones celulares como son la migración celular, el transporte reverso del colesterol y el estado redox de la célula. La estimulación de LXR $\alpha$  por estos compuestos a través de las proteínas quinasas disminuyó la migración celular frente a estímulos quimiotácticos y promovió el transporte reverso del colesterol. Del mismo modo, se inhibió la producción de ROS en las células fagocíticas humanas tanto en sus niveles basales como en los producidos por la acción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Estas observaciones muestran la relación existente entre el receptor nuclear LXR $\alpha$  y proteínas con actividad quinasa como son la AMPK y las proteínas MAPK p38 y ERK1/2.

# **INTRODUCCIÓN**



## INTRODUCCIÓN

---

Los receptores LXR (*Liver X receptors*), pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares, la cual agrupa una serie de proteínas que regulan la expresión de genes implicados en diversos procesos fisiológicos. Estos receptores nucleares son capaces de regular de forma directa la transcripción génica actuando como factores de transcripción dependientes de ligando (Glass y Ogawa, 2006). Varios de los procesos fisiológicos que regulan los LXRs implican un gasto de energía, como la síntesis de ácidos grasos (Janowski y cols., 1996; Lehmann y cols., 1997).

Las proteínas con actividad quinasa son enzimas capaces de modificar otras proteínas, mediante fosforilación, y por tanto activándolas o desactivándolas. Ocupan un lugar central en la respuesta ante una señal química que llegue a la célula, sirviendo de puente entre un segundo mensajero y las respuestas celulares a un determinado estímulo. La enzima AMPK es una enzima que controla el metabolismo de la glucosa y de los lípidos (Carling, 2004; Hardie, 2004). Por su parte p38 y ERK1/2 son enzimas implicadas en el control de la expresión de genes, el metabolismo celular y funciones del citoesqueleto, contribuyendo a la regulación de procesos celulares tan complejos como la migración, la diferenciación o la supervivencia celular (Berridge y cols., 2012).

La curcumina es un producto de origen natural usado durante cientos de años en la medicina tradicional asiática para aliviar numerosas dolencias. Una de sus propiedades es la reducción del colesterol, por ejemplo, mejorando los síntomas en conejos con aterosclerosis (Ramirez-Tortosa y cols., 1999). También es capaz de activar a la enzima AMPK, inhibiendo la síntesis de ácidos grasos en células de carcinoma hepático (Kim y cols., 2009). La naringenina es un flavonoide presente en alimentos de origen vegetal, como son los cítricos (Franke y cols., 2005), desempeñan un papel esencial en la protección frente a fenómenos de daño oxidativo (Mershiba y cols., 2013) y tienen efectos terapéuticos en numerosas patologías como la aterosclerosis o el cáncer (Knekt y cols., 2002). Además, la naringenina es capaz de estimular la entrada de glucosa en el músculo esquelético activando la enzima AMPK (Zygmunt y cols., 2010). El ácido oleico es un producto de gran interés nutricional en la dieta mediterránea. Se le conocen propiedades anti-aterogénicas pudiendo mantener y/o aumentar los niveles de colesterol HDL y disminuir los niveles plasmáticos de colesterol LDL (Kien 2014).

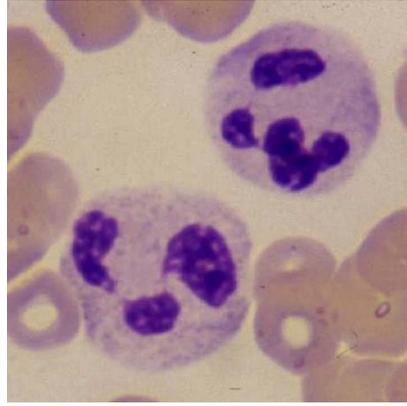
## 1. Células objeto de estudio

Los neutrófilos y monocitos/macrófagos son las principales células implicadas en la respuesta inmunitaria. Fueron descubiertas por Elie Metchnikoff cuando introdujo espinas de las rosas en larvas estrellas de mar y encontró que varias células mesodérmicas se acumulan en el sitio de la punción (Segal, A.W., 2005). Además de formar parte del sistema inmune, están implicadas en la regulación del metabolismo de los ácidos grasos y de la eliminación del colesterol, median en la respuesta fagocítica y en la inflamatoria.

### 1.1. Los neutrófilos

Los neutrófilos son leucocitos polimorfonucleares, componentes esenciales del sistema inmune natural. Son las principales células fagocíticas encontradas en sangre periférica; correspondiéndose con un 50-70% del total de células de la serie blanca (Lakshman, R. y Finn, A., 2001). Se les considera la primera línea de defensa contra infecciones bacterianas y fúngicas. En individuos sanos, cada 24 horas se liberan desde la médula ósea más de  $1 \times 10^9$  neutrófilos por kilogramo de peso corporal (Hong, C. y cols., 2012). Morfológicamente, los neutrófilos tienen un diámetro de 10–20  $\mu\text{m}$  y son visible al microscopio óptico con tinción de Giemsa (figura 1).

Muestran un citoplasma con un retículo endoplásmico muy pequeño, con pocas mitocondrias, inclusiones de glucógeno y gran cantidad de gránulos que ocupan la totalidad del citoplasma, en la periferia de la membrana existe una banda de filamentos de actina, responsable de la capacidad quimiotáctica de estas células. Los gránulos cumplen un importante papel para potenciar la digestión y la actividad microbicida, ya que interrumpen las superficies bacterianas aniónicas volviéndolas más permeables y degradando los factores de virulencia (Klebanoff S, J, y cols., 2013).



**Figura 1. Neutrófilos humanos visualizados al microscopio óptico.** Neutrófilos humanos procedentes de extracción de sangre periférica teñidos con Giemsa y observados al microscopio óptico.

Los neutrófilos contienen un potente arsenal de mecanismos antimicrobianos que incluyen proteinasas y péptidos catiónicos. Además, ellos producen grandes cantidades de ROS (*Reactive oxygen species*) y especies reactivas del nitrógeno a través de la actividad de sistemas generadores de sustancias oxidantes como la NADPH oxidasa (Sheppard, 2005) y la óxido nítrico sintetasa (Gebbska y cols., 2005). Durante la ingestión de patógenos, los ROS generados en la membrana son liberados dentro del fagosoma, donde se combinan rápidamente con proteínas y lípidos, oxidándolos. También pueden ser liberados en el citosol donde alteran el estado redox de la célula y oxidan componentes celulares modificando su función. Los neutrófilos pueden liberar el contenido de los gránulos al exterior formando la llamada trampa extracelular de los neutrófilos, la cual degrada los factores virulentos, se une y mata a las bacterias que están en el medio extracelular (Brinkmann y cols., 2004). Pero ocasionalmente a pesar de los controles de este proceso, la liberación al medio extracelular de potentes componentes citotóxicos pueden llevar al daño de nuestro propio tejido y esto puede ocasionar enfermedades (Moraes y cols., 2006).

Cuando los receptores de la superficie celular del neutrófilo detectan un gradiente de concentración de un agente quimiotáctico, la célula se dirige hacia su fuente. La interacción entre el factor quimiotáctico y su receptor desencadena una serie coordinada de eventos bioquímicos que incluyen cambios en el potencial transmembrana, flujo de iones a través de la membrana plasmática y aumento en la utilización de la glucosa y del consumo de oxígeno. La composición fosfolipídica de la membrana se altera y el ácido araquidónico se metaboliza, dando origen a una serie de compuestos biológicamente

activos y productos intermedios (Morales y cols., 2006). Estas células secretan mayoritariamente la IL-8, aunque también son capaces de sintetizar entre otras IL-1 $\beta$ , IL-12, VEGF (*Vascular endothelial growth factor*), proteína inflamatoria de macrófagos- $\alpha/\beta$  e IP-10 (Scapini y cols., 2000) y mediadores lipídicos como el factor activador de plaquetas (PAF) (Stafforini, D.M. y cols., 2003) que junto con la 15 deoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J<sub>2</sub> (15dPGJ<sub>2</sub>) son capaces de aumentar las respuestas de los neutrófilos a la estimulación por otros agonistas (efecto de "priming").

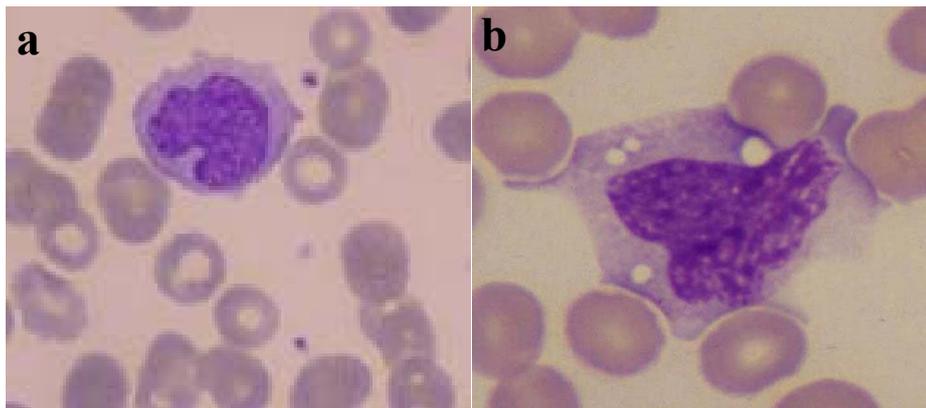
Los neutrófilos participan en el desarrollo de varias enfermedades autoinmunes e inflamatorias, incluyendo la artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, enfermedades anafilácticas y enfermedades vasculares y metabólicas, tales como la trombosis, resistencia a la insulina y aterosclerosis (Futosi, K. y cols., 2013). Con respecto a esta última, los neutrófilos pueden desempeñar un papel importante en la patogénesis, dada su capacidad para responder a oxisteroles y moléculas exógenas, especialmente en condiciones pro-inflamatorias (Smoak K y cols., 2008).

## **1.2. Los monocitos/macrófagos**

Los monocitos, al igual que los neutrófilos, se encuentran circulando en el torrente sanguíneo, aunque son menos numerosos, entre 500-1000/mm<sup>3</sup> de sangre, tienen una vida media más larga, aproximadamente 1-3 días y su tamaño es de aproximadamente 18  $\mu$ m (figura 2). Por estímulos quimiotácticos y por medio de la interacción entre las moléculas de adhesión y los ligandos en el endotelio vascular, comienzan a migrar entre las 24 y 48 horas del inicio de la inflamación aguda. Cuando los monocitos alcanzan el tejido extravascular se transforman en macrófagos, aumentan su tamaño, se alarga su vida media y adquieren una capacidad mayor de fagocitosis y mayor contenido de enzimas lisosomales que los monocitos. Los macrófagos se encuentran en la mayoría de los tejidos conjuntivos, en órganos como el hígado (células de Kupfer), bazo y ganglios linfáticos (histiocitos sinusoidales), sistema nervioso central (microglías) y pulmones (macrófagos alveolares) (Gordon y Taylor, 2005).

La capacidad fagocítica de los macrófagos es un proceso importante en la defensa contra la infección y la regeneración después del daño tisular. Por su capacidad microbiostática y microbicida actúan como filtros para microorganismos, células senescentes y células apoptóticas, realizando una función importante en la homeostasis

tisular. Sin embargo, el papel de los macrófagos en el mantenimiento de la homeostasis inmune no se limita a la fagocitosis. Estas células también pueden actuar en la presentación de antígeno, producción de citoquinas, regulación de la activación de linfocitos T, inducción y resolución de la inflamación, y en la regeneración tisular (Kiss y cols., 2013). En respuesta a citoquinas, secretan un amplio espectro de productos biológicamente activos como proteasas ácidas y neutras, citoquinas, quimoquinas, ROS, NO y metabolitos del ácido araquidónico (Gordon y Taylor, 2005).



**Figura 2. Células fagocíticas humanas visualizados al microscopio óptico.** Monocitos (a) y macrófagos (b) humanos procedentes de buffy-coat teñidos con Giemsa y observados al microscopio óptico.

La heterogeneidad fenotípica y funcional de los macrófagos depende principalmente de la diversidad del microambiente en el que ellos residen. Señales tales como citoquinas, moléculas derivadas de patógenos y mediadores lipídicos marcan dos extremos de activación de los macrófagos, creando macrófagos activados por la vía clásica (M1) y por la vía alternativa (M2). Las citoquinas tipo  $T_H1$ , como son el interferón gamma ( $IFN-\gamma$ ) y el  $TNF-\alpha$  (*Tumor necrosis factor  $\alpha$* ), o el LPS bacteriano (*Lipopolysaccharide*), induce la activación clásica del macrófago M1, caracterizado por un fenotipo pro-inflamatorio. Los macrófagos M1 son productores eficientes de ROS, intermediarios de nitrógeno y citoquinas ( $IL-1\beta$  y  $TNF-\alpha$ ). Las citoquinas tipo  $T_H2$ , como  $IL-4$  e  $IL-13$  son capaces de inducir la activación alternativa del macrófago M2, caracterizada por la actividad biosintética y propiedades anti-inflamatorias favoreciendo la remodelación y regeneración tisular (Kiss y cols., 2013). Los cambios en el medio lipídico extracelular modifica el metabolismo lipídico intracelular. La acumulación lipídica en los macrófagos lleva a la formación de células espumosas, un paso inicial crucial durante la aterosclerosis. El colesterol y otros lípidos acumulados son capaces de

inducir una respuesta inflamatoria a través de mecanismos dependientes e independientes del receptor tipo Toll (TLR, *Toll like receptor*). Es decir, diferentes desórdenes metabólicos afectan la homeostasis inmune y viceversa, por ejemplo, la resistencia a la insulina inducida por obesidad y la aterosclerosis están asociadas estrechamente con la inflamación crónica (Kiss y cols., 2013).

El ambiente inflamatorio en las placas ateroscleróticas podría influir en la transformación de macrófagos M2 a macrófagos M1, que luego asumen el papel de la inducción, el mantenimiento y la perpetuación de la respuesta inflamatoria a través de la secreción de mediadores pro-inflamatorios. Sorprendentemente, los macrófagos M2 humanos, que también se caracterizan por la expresión de CD206, CD163 (*Cluster of differentiation*) y la IL-10, también secretan citoquinas pro-inflamatorias en presencia de la proteína C reactiva, lo que indica una conversión de macrófagos M2 a los M1, promoviendo así el desarrollo de la placa aterosclerótica a etapas más avanzadas. Además, la oxidación de las moléculas LDL (LDLox) ejerce un efecto citotóxico sobre los macrófagos M2 humanos a diferencia de los macrófagos M1, que son más resistentes a la lipotoxicidad por LDLox, lo que sugiere que la LDLox podría contribuir a la activación de macrófagos M1 y muerte de los macrófagos M2. A pesar de esta evidencia, el papel que desempeñan los macrófagos M1 y M2 en la aterosclerosis siguen siendo inciertos y complejos (Chávez-Sánchez y cols., 2014).

## 2. Radicales libres de oxígeno (ROS)

Un radical libre (RL) se define como cualquier especie química, ya sea atómica o molecular, capaz de existir independientemente, que contenga uno o más electrones desapareados (que ocupan por sí mismos un orbital molecular o atómico), ya sea por ganancia o pérdida de un electrón de un no radical o por la ruptura hemolítica de una molécula (Cadenas, 1989). Las especies reactivas de oxígeno (ROS) tales como superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y los radicales hidroxilo ( $OH^\cdot$ ) son subproductos metabólicos, que se producen de forma natural en todos los organismos que viven un estilo de vida aeróbica. Se producen constantemente durante la transferencia de electrones en la cadena respiratoria (Dröse y Brandt, 2012), por

enzimas tales como la NADPH oxidasa (NOX) (Lambeth y cols., 2004; Nauseef y cols., 2008) y en orgánulos como los peroxisomas (Gabaldón y cols., 2010).

La existencia de niveles bajos de ROS afecta negativamente al crecimiento y desarrollo celulares y a la diferenciación (D'Autréaux y Toledano, 2007; Ray y cols., 2012; Winterbourn y cols., 2015). Por el contrario, niveles altos de ROS pueden causar modificaciones oxidativas irreversibles de macromoléculas, incluyendo los lípidos, el ADN y proteínas (Imlay y cols., 2013), algo que ilustra la importancia de los ROS como segundos mensajeros capaces de controlar los procesos metabólicos y las vías de señalización (Figura 3) (Knoefler y cols., 2014). El mantenimiento de la homeostasis redox requiere un esfuerzo celular conjunto, que implica la expresión de diferentes enzimas desintoxicantes de ROS (superóxido dismutasa y catalasa), oxidorreductasas de tiorredoxina (TRX) y sistemas glutaredoxina (GRX); sistemas de regeneración de NADPH tales como la nicotinamida nucleótido transhidrogenasa, y la producción del pequeño tripéptido redox, glutatión (GSH) (Winterbourn y cols., 2013). Juntos, estos sistemas mantienen proteínas citosólicas tioles reducidas y protegen a las células contra la acumulación de tóxicos oxidantes (D'Autréaux y Toledano, 2007; Masip y cols., 2006).

Las células fagocíticas como neutrófilos y macrófagos activados pueden producir grandes cantidades de  $O_2^{\cdot-}$  y sus derivados a través de la isoforma fagocítica de la NOX. La producción masiva de ROS en un ambiente inflamatorio se llama "estallido oxidativo" y juega un papel vital en la primera línea de defensa contra los patógenos (Dröge, 2002).

Sin embargo, la producción de ROS por la NOX juega un papel fundamental en la regulación de las cascadas de señalización intracelulares en varios tipos de células no fagocíticas como fibroblastos, células endoteliales y miocitos cardíacos (Dröge, 2002).

Los ROS tienen importantes características para ser moléculas mensajeras intracelulares: son moléculas ubicuas, pequeñas, de fácil difusión y pueden sintetizarse de manera rápida. En los neutrófilos, el principal RL producido es el anión  $O_2^{\cdot-}$  por la NOX, formada por dos proteínas de membrana, gp91<sup>phox</sup> (Nox2) y p22<sup>phox</sup>, y diferentes subunidades citoplasmáticas reguladoras; p67<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup> y Rac, una proteína G (Berridge, 2012). El anión  $O_2^{\cdot-}$  es dismutado por la superóxido dismutasa (SOD) a

peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). La catalasa degrada el ( $H_2O_2$ ) a agua y oxígeno (Figura 3).

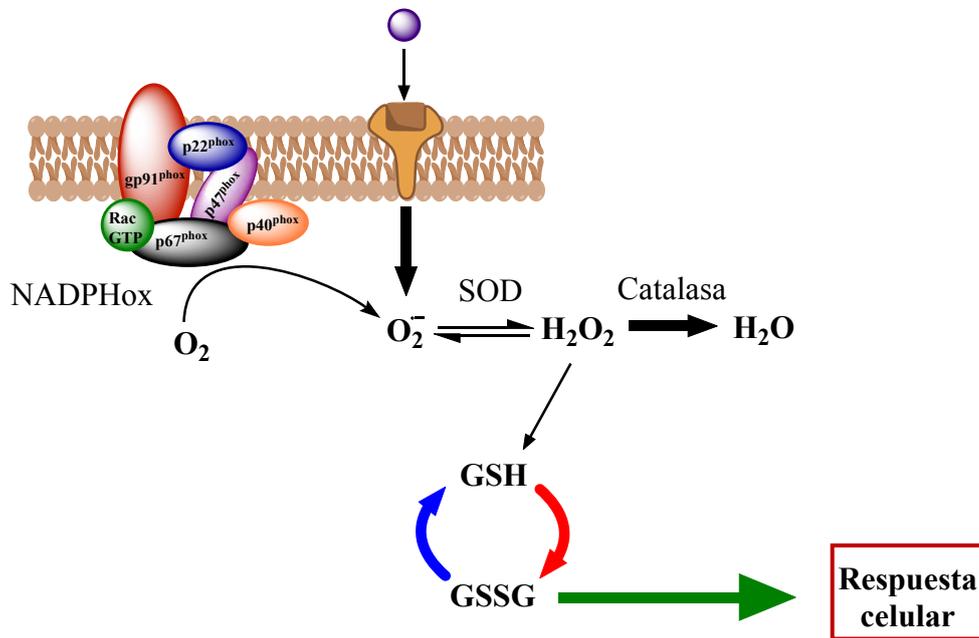


Figura 3. Señalización redox y estructura de NADPH oxidasa

## 2.1. Sistemas de defensa antioxidante

Las células de un organismo, y especialmente las células fagocíticas, disponen de diversos sistemas de defensa enzimático que eliminan rápidamente los ROS y así protegerse del daño oxidativo, tales como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa, el sistema de la glutatión peroxidasa y la hemo-oxigenasa (HO-1), permitiendo con ello un control riguroso de sus concentraciones (Jonsson y cols., 2013). La SOD cataliza la dismutación del  $O_2^{\cdot-}$  a  $H_2O_2$  y  $O_2$ , y la catalasa se encarga de destruir el  $H_2O_2$  transformándolo en  $H_2O$  y  $O_2$  (Berridge y cols., 2012). El GSH es el elemento central de muchos sistemas detoxificadores. Es una molécula que contiene un grupo sulfhidrilo que la hace idónea para atenuar el efecto de los oxidantes. La glutatión peroxidasa (GPx) utiliza el poder reductor del GSH para convertir  $H_2O_2$  en agua y la glutatión reductasa, encargada de regenerar el GSH consumido (Berridge y cols., 2012). La HO es una proteína inducible de 32-kDa que está distribuida ubicuamente. En condiciones fisiológicas las células presentan niveles indetectables de HO pero la presencia de su

sustrato (grupo hemo) o de numerosos estímulos de estrés (ej. shock térmico, luz ultravioleta, metales pesados, lipopolisacárido, NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) inducen fuertemente su expresión. La HO es un enzima antioxidante que añade una molécula de oxígeno en el anillo de la porfirina del grupo hemo produciendo la degradación de este grupo. El resultado es la liberación de cantidades equimolares de monóxido de carbono (CO), biliverdina e ion ferroso (Fe<sup>2+</sup>). La biliverdina es rápidamente metabolizada a bilirrubina por la biliverdina reductasa y el hierro es rápidamente secuestrado por la ferritina (Levonen, 2008).

Las moléculas antioxidantes (o más propiamente, reductoras) neutralizan los RL por medio de la donación de un electrón, y la cadena de reacciones termina con productos estables. El esquema muestra la reacción general de un antioxidante (AH) con un RL (ROO<sup>·</sup>) produciendo dos moléculas estables (Flora, 2007).



Un desequilibrio en la homeostasis del sistema redox puede deberse a una sobreproducción de ROS o por una deficiencia en los sistemas antioxidantes, lo cual puede inducir la muerte celular. Sin embargo, si el desequilibrio no alcanza un nivel potencialmente letal, el estrés oxidativo produce variaciones en la fisiología celular al actuar sobre las vías de traducción de señales (Berridge y cols., 2012).

## 2.2. ROS como segundo mensajero

Las células han desarrollado un sofisticado mecanismo de señalización intracelular basado en cambios localizados del estado de oxidación de proteínas específicas. Muchos tipos de células no fagocíticas son capaces de producir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en respuesta a diferentes estímulos extracelulares, tales como citoquinas, neurotransmisores, factores de crecimiento y hormonas peptídicas (Thannickal y Fanburg, 2000).

De todos los ROS que normalmente se producen en los tejidos el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> parece ser el más importante en términos de señalización. Los radicales hidroxilos (<sup>·</sup>OH) son demasiados reactivos para actuar como moléculas mensajeras y el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>) tiene una vida media muy corta. Sin embargo el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es un oxidante moderado, de mayor vida media que los anteriores y con alta permeabilidad celular (Thannickal y

Fanburg, 2000). El  $H_2O_2$  se genera rápidamente después de un estímulo extracelular y se puede eliminar fácilmente por numerosos mecanismos (Reth, 2002). Se puede generar en respuesta a varios estímulos, incluyendo citoquinas y factores de crecimiento y está implicado en procesos biológicos de regulación tan diversos como la activación celular inmune y la remodelación vascular en mamíferos (Bienert y cols., 2006).

La diferencia entre el  $H_2O_2$  como productor de estrés oxidativo o como molécula de señalización es muy importante. Es posible que a bajas concentraciones entre 1 y 700 nM, el  $H_2O_2$  difunda dentro de las células, y reaccione específica y rápidamente con un número limitado de moléculas antes de ser reducido por los sistemas antioxidantes. De esta manera, se puede transmitir la información concerniente a la presencia de  $H_2O_2$  a otras proteínas en la célula (Bienert y cols., 2006). Aunque el  $H_2O_2$  difunde libremente a través de la membrana plasmática (Antunes y Cadenas, 2000), cuando se aplica  $H_2O_2$  a células cultivadas, se establece rápidamente un gradiente a través de la membrana que origina una concentración intracelular de 7 a 10 veces inferior a la de la extracelular (Bienert y cols., 2006). Existen evidencias que sugieren que el  $H_2O_2$  podría entrar en la célula a través de canales de acuaporinas específicos en la membrana plasmática (Henzler y Steudle, 2000).

Un par de buenos ejemplos son los efectos que tienen los ROS sobre dos MAPKs como son las proteínas p38 y ERK1/2.

### **3. Vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs)**

Las MAPKs (*Mitogen-activated protein kinase*) son una superfamilia de proteínas con actividad quinasa Ser/Thr. En células de mamífero se han caracterizado al menos cuatro grupos principales (Seeger y Krebs, 1995). Poseen la capacidad de percibir estímulos extracelulares y originar respuestas celulares específicas. La superfamilia de MAPKs se compone de tres vías de señalización principales y distintas: la proteína ERK (*Extracellular signal-regulated kinase*), la JNK/SAPK (*c-Jun N-terminal kinases/Stress-activated protein kinases*) y la familia de las quinasas p38 (Figura 4) (Cowan y Storey, 2003). La activación de las MAPKs en respuesta a estímulos externos controla la expresión de genes, el metabolismo celular y funciones del citoesqueleto, contribuyendo a la regulación de procesos celulares tan complejos como la migración,

mitogénesis, la diferenciación o la supervivencia celular. Además pueden ser activadas por condiciones de estrés del entorno, como choque osmótico, irradiación o lesiones en el ADN. (Berridge y cols., 2012).

### 3.1. Activación de ERK1/2 MAPK.

La proteína ERK responde principalmente a factores de crecimiento y mitógenos, estimulando así las respuestas transcripcionales en el núcleo. ERK1 (p-44) y ERK2 (p-42), las mejor estudiadas del grupo, se activan por MAPK/ERK quinasas (MEK) 1 y MEK2, que fosforilan en el motivo Thr-Glu-Tyr (Cobb y Goldsmith, 1995). Las MEKs, a su vez, se activan por c-Raf, una MAPKKK de esta vía de señalización (Moodie y Wolfman, 1994). Tras la translocación al núcleo, las ERKs son responsables de la fosforilación de múltiples sustratos, dependiendo del estímulo inicial. Estos incluyen activadores de la transcripción como la p90 RSK (*Ribosomal S6 kinase*) (Frodin y Gammeltoft, 1999), la proteína quinasa activada por MAPK-1, MAPKAP-K2/3, la fosfolipasa A2 (PLA<sub>2</sub>) así como factores de transcripción (C-FOS, C-JUN, ATF-2 o ELK-1) receptores de factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y los receptores de estrógeno (Figura 4) (Denhardt, 1996). Generalmente, la activación de una vía de señalización de ERK tiene un papel en la mediación de la división celular, la migración y la supervivencia. ERK1/2 y MEK1/2 también se activan durante el ejercicio muscular y pueden proporcionar un nexo de unión entre el ejercicio y los cambios en la composición de la adaptación del músculo esquelético (Widegren et al., 2000).

### 3.2. Activación de p38 MAPK.

Este subgrupo de las MAPK comprende a cuatro miembros de Thr/Tyr quinasas de 38 KDa, de ahí su nombre. Estas isoformas son conocidas como p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  y p38 $\delta$ . Se activan por condiciones de estrés en el entorno celular (Berridge y cols., 2012) y también por citoquinas inflamatorias, insulina o factores de crecimiento (New y Han, 1998; Morrison y Davis, 2003). Las quinasas que actúan sobre p38 incluyen las MKKs 3 y 6 con efectos sobre las diferentes isoformas de p38 (Chan-Hui y Weaver, 1998). Estas MKKs son a su vez activadas por otras MKKs, por MLKs y ASK1/2. Los principales sustratos de las p38 MAPK son las quinasas MAPKAP-K2 y 3, PRAK y MSK y los factores de transcripción ELK-1, NFAT2 y ATF-2 (Figura 4).

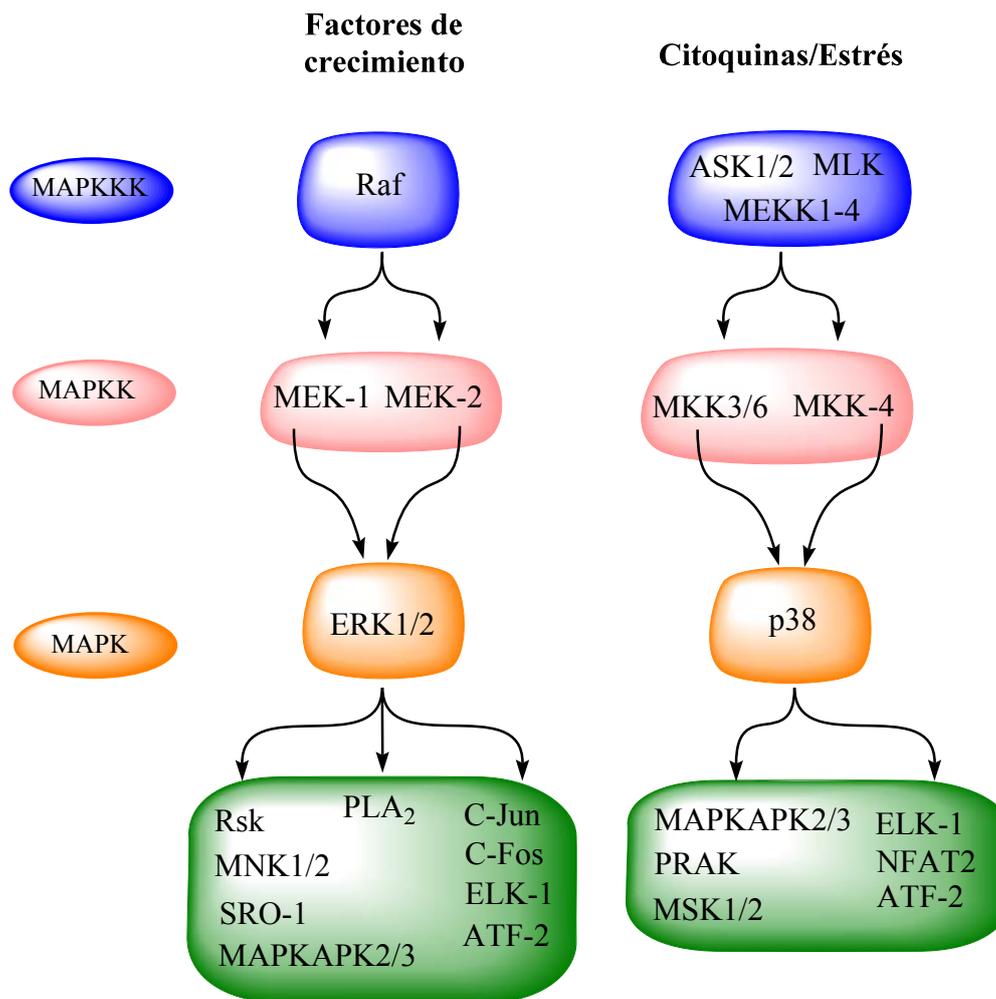


Figura 4. Cascada de activación de las MAPKs.

#### 4. Sistema de la quinasa dependiente de la 5'-adenosil monofosfato (AMPK)

La primera vez que se describió el sistema AMPK (*AMP-Activated Protein Kinase*) fue en dos artículos independientes publicados en 1973. En ellos se definían dos fracciones proteicas que en ausencia de ATP eran capaces de inactivar dos enzimas metabólicas claves, la ACC1 (*Acetyl-CoA carboxylase*), involucrada en la síntesis de ácidos grasos (AGs) (Carlson y Kim, 1973) y HMG-CoA reductasa (*3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase*), involucrada en la síntesis del colesterol (Beg y cols., 1973). Pero fue en 1987 cuando se descubrió que estas dos enzimas eran la misma quinasa (Carling y cols., 1987). Al año siguiente recibió el nombre de AMPK (Sim y Hardie, 1988).

La AMPK es la enzima encargada de la regulación última del metabolismo energético en las células eucariotas. Actúa como sensor de nutrientes y de energía para mantener la homeostasis energética celular (Hardie 2012). La AMPK en mamíferos tiene homólogos en todos los organismos eucariotas (Steinberg y Kemp, 2009) como SNF1P, homólogo de la AMPK en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Wang y cols., 2001).

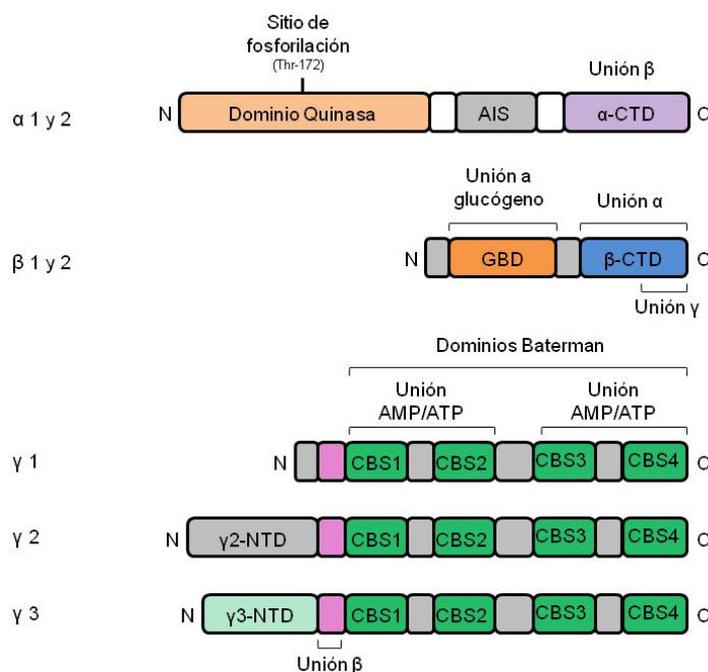
Uno de los mecanismos para la detección de niveles de energía celular implica la activación alostérica de la actividad de la quinasa de AMPK, en condiciones en las que las demandas de energía celular aumentan o cuando se disminuye la disponibilidad de combustible, el ATP intracelular se reduce y se elevan los niveles de AMP. Por tanto, el AMP activa alostericamente a la AMPK (Ji y cols., 2010). Además de la activación alostérica, la actividad de AMPK también puede ser regulada por un mecanismo que implica la modificación covalente mediante fosforilación por otras moléculas tales como la quinasa de hígado B1 (LKB1, *liver kinase B1*) y calmodulina dependiente de la proteína quinasa (CaMK, *Calmodulin-dependent protein kinase*) (Steinberg y Kemp, 2009). Hasta ahora, se han encontrado numerosos estímulos que pueden inducir la activación de AMPK. A nivel del organismo, la actividad de la enzima también se encuentra bajo el control de hormonas y citoquinas, tales como la adiponectina y la leptina (Fay y cols., 2009).

#### 4.1. Estructura de la AMPK

La AMPK es una proteína quinasa heterotrimérica que consiste en una subunidad catalítica ( $\alpha$ ) y dos subunidades no catalíticas o reguladoras  $\beta$  y  $\gamma$  (Dyck, J. R., y cols., 1996) (Figura 3). En los mamíferos, cada subunidad de AMPK tiene múltiples isoformas,  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ , y  $\gamma 3$  (Cheung, P. C., y cols., 2000), lo que sugiere que múltiples complejos heterotriméricos pueden existir en diferentes tejidos y desempeñar diferentes funciones.

La AMPK tiene estructura heterotrimérica con tres subunidades, una catalítica ( $\alpha$ ) y dos no catalíticas ( $\beta$  y  $\gamma$ ) (Crute y cols. 1998). Hay siete genes que codifican las diferentes isoformas en mamíferos, es decir, dos de la isoforma  $\alpha$  ( $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ ), dos de  $\beta$  ( $\beta 1$  y  $\beta 2$ ), y tres de  $\gamma$  ( $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$  y  $\gamma 3$ ). Aunque puede haber algunas combinaciones preferentes, las 12 combinaciones heterotriméricas pueden estar formadas por la co-expresión de las tres subunidades. Las subunidades son generalmente inestables

individualmente en ausencia de las otras subunidades, esto puede ser una característica útil cuando cualquier subunidad está sobre expresada, actuando como un mutante dominante, sustituyendo la subunidad expresada de forma endógena al competir por la unión con las otras dos. (Hawley y cols., 2010).



**Figura 5. Diagrama esquemático de la estructura de las distintas isoformas de las subunidades de la AMPK.** Adaptado de Hardie, 2007.

La subunidad  $\alpha$  comprende un dominio quinasa NH<sub>2</sub>-terminal seguido por una secuencia de autoinhibición (AIS, *Auto-inhibitory sequence*) y un dominio de interacción con la subunidad. La subunidad  $\beta$  contiene dos elementos caracterizados, una molécula en medio del dominio de unión a glucógeno (GBD) y una secuencia de unión a la subunidad COOH-terminal responsable de la unión de  $\beta$  y  $\gamma$ . La subunidad  $\gamma$  consta de cuatro secuencias repetidas en tándem llamadas motivos CBS (*Cystathionine  $\beta$ -synthase*) (Bateman A.1997 y Iseli y cols., 2005) (figura 3). Cada uno de los dominios CBS se une a una molécula de AMP (Scott y cols., 2004). La mutación en estos dominios reduce la unión de AMP a la enzima y la activación de esta por el AMP (Scott y cols., 2004). Los dominios Bateman son capaces también de unirse al ATP, pero con una afinidad menor que al AMP (Scott y cols., 2004). Esto explica por qué las altas concentraciones de ATP impiden la activación de la AMPK por la AMP (Corton y cols., 1995). El tándem tiene un alto grado de cooperatividad, sugiriendo que el segundo

dominio Bateman es inaccesible hasta que una molécula del AMP se ha unido al primero (Scott y cols., 2004). Esto incrementa la sensibilidad del sistema a pequeños cambios en la concentración del AMP.

#### 4.2. Regulación de la AMPK

Uno de los puntos de regulación de la AMPK es mediado por la 5'-AMP. Primero el 5'-AMP se une a la AMPK produciendo un cambio conformacional que produce la activación de la enzima unas 5 veces (Carling y cols., 1987). Además, el 5'-AMP tiene otra función en la regulación de la AMPK, que es promover su fosforilación en un residuo específico de treonina de la subunidad  $\alpha$  en la posición 172 (Thr172) (Hawley y cols., 1996). Esta fosforilación es producida por una quinasa que ha sido identificada como un complejo entre LKB1 y dos subunidades accesorias, llamadas proteína-adaptadora relacionada con la proteína quinasa de Ser/Thr 20 (*Serine/threonine-protein kinase 20*) formando un complejo llamado STRAD (*Ste20-related adaptor protein*) y la proteína de ratón 25- $\alpha$  (*mouse protein 25- $\alpha$* , MO25) (Hawley y cols., 2003). La fosforilación de esta treonina produce, al menos, una activación 100 veces mayor (Scott y cols., 2002), siendo por ello desde un aspecto cuantitativo más importante que la regulación alostérica. El complejo del LKB1 no es activado directamente por el 5'-AMP, sino que la unión de la molécula de 5'-AMP a la AMPK, hace a esta última mejor sustrato para la LKB1 (Hawley y cols., 2003), mientras que al mismo tiempo hace a la enzima peor sustrato para la fosfatasa que desfosforila dicha treonina (Davies y cols., 1995).

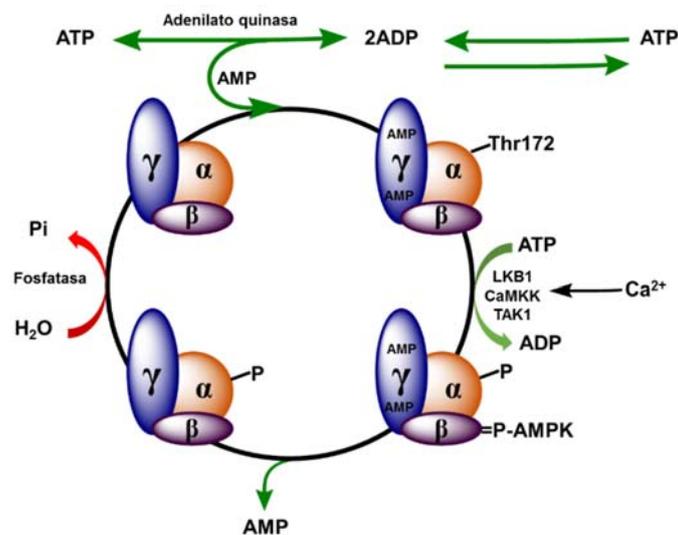
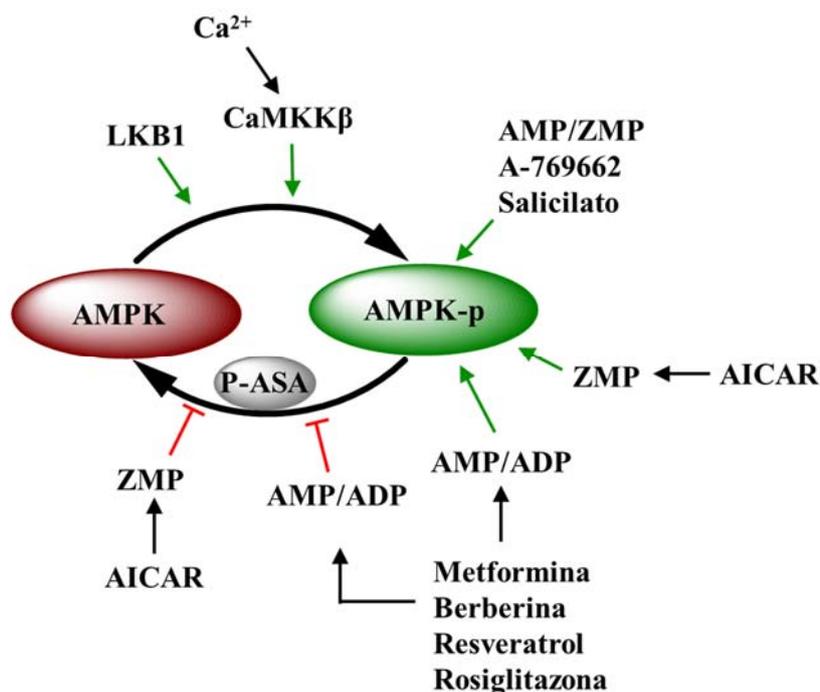


Figura 6. Elementos de la regulación de la fosforilación y desfosforilación de la AMPK.

Estos tres efectos de la 5'-AMP sobre la activación de la AMPK hacen al sistema muy sensible a pequeños cambios en la concentración de 5'-AMP. Además, estos tres efectos son antagonizados por altas concentraciones de ATP. Otras investigaciones han identificado quinasas que pueden activar a la AMPK, como la quinasa 1 activada por TGF $\beta$  (TAK1, *transforming growth factor (TGF)-activated kinase 1*). Esta quinasa fue originalmente identificada como una quinasa/quinasa/quinasa de las MAPK (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase* MAPKKK) (Momcilovic y cols., 2006). Se han descrito dos quinasas dependientes de calmodulina capaces de activar a la AMPK, las CaMKK $\alpha$  y  $\beta$  (Hawley y cols., 2005; Hurley y cols., 2005; Woods y cols., 2005). Esta relación permite que señales que activan el incremento de Ca<sup>2+</sup> intracelular sean capaces de activar a la AMPK en ausencia de un incremento en la concentración de 5'-AMP. Esto podría ser un mecanismo de anticipación a una gran demanda de ATP, ya que incrementos citosólicos de Ca<sup>2+</sup> suelen iniciar procesos que requieren un consumo elevado de ATP. A diferencia de la LKB1, la expresión de las CaMKKs son más restringida, sobre todo la CaMKK $\alpha$ , que aparece principalmente en tejido neural. La CaMKK $\beta$  aparece en más tipos celulares como son células endoteliales y hematopoyéticas. Recientemente ha sido descrito que la vía de las CaMKKs activa a la AMPK en respuesta a estímulos como la trombina en células endoteliales, y la estimulación del receptor de las células T en estas células (Stahmann y cols., 2006; Tamás y cols., 2006) (figura 4).



**Figura 7. Regulación de la AMPK por fármacos.** Además de la activación clásica por LKB1 y concentraciones de Ca<sup>2+</sup>, la AMPK puede ser activada por metformina y rosiglitazona, que aumentan el ratio AMP/ATP o ADP/ATP. También por los compuestos derivados de plantas como son el resveratrol y la berberina. El AICAR, un fármaco usado en el tratamiento contra la diabetes, es fosforilado a ZMP, un análogo al AMP, de modo que activa a la AMPK. El A-769662 y el salicilato activan la AMPK uniéndose directamente a la subunidad reguladora β1.

### 4.3. Funciones de la AMPK

En general, la estimulación de la AMPK produce la activación de vías catabólicas (producción de ATP), y la inhibición de vías anabólicas (consumo de ATP) (figura 5). Ambas funciones tienen un efecto rápido por medio de fosforilaciones directas en las enzimas metabólicas, y por efectos a largo término vía regulación de la transcripción. Básicamente, en el estrés metabólico, ya sea por una inhibición de la producción de ATP o por un aumento en el consumo de ATP, se produce un aumento del ratio ADP/ATP, y por medio de la adenilato quinasa, se produce un aumento en el ratio AMP/ATP, lo que conduce a la activación de la AMPK. La AMPK puede ser activada por inhibidores metabólicos que inhiben la producción de ATP, tales como, la oligomicina, antimicina A, azida o el dinitrofenol (Corton y cols., 1994; Hawley y cols., 2002; Witters y cols., 1991), o por isquemia (Kudo y cols., 1995), o por hipoxia (Marsin y cols., 2000). Sin embargo, el hecho fisiológico que activa a la AMPK es la contracción del músculo esquelético en el ejercicio físico (Fujii y cols., 2000; Winder y

Hardie, 1996; Wojtaszewski y cols., 2000). Una vez activada, la AMPK realiza varias funciones según la diana de la enzima. Uno de los efectos claves de la AMPK es su capacidad para estimular la captación de la glucosa en el músculo, por el incremento de la translocación a la membrana del transportador de glucosa GLUT4 (*Glucose transporter type 4*) (Kurth-Kraczek y cols., 1999). Otros estudios han demostrado que la AMPK puede regular también la transcripción de genes involucrados en el catabolismo, como por ejemplo el incremento de la expresión de GLUT4 (Zheng y cols., 2001). La AMPK también puede afectar sobre el crecimiento celular y la proliferación, de tal forma que la activación de la AMPK produce la inhibición del crecimiento de células cancerígenas. Ello se verifica porque causa la fosforilación de la proteína supresora de tumores p53 (*Tumor suppressor p53*) en la Serina 15, produciendo la acumulación de p53 y de los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas, p21 y p27, y ello contribuye a la detención del ciclo celular (Imamura y cols., 2001; Rattan y cols., 2005). Hay una diana de la AMPK que puede ser particularmente importante en el sistema circulatorio, la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS, *Endothelial nitric oxide synthase*). La fosforilación de la Serina 1117 en la eNOS produce un incremento de la Vmax de la enzima y su sensibilidad a Ca<sup>2+</sup> y calmodulina (Chen y cols., 1999). El efecto clásico del NO es ser relajante del músculo liso vascular, por lo que es un mecanismo que incrementa el flujo sanguíneo en los tejidos hipóxicos. Esto es corroborado por otros estudios que muestran que la activación de la AMPK en células endoteliales de aorta humanas produce una fosforilación en la Serina 1117 de eNOS y un incremento en la producción de NO (Morrow y cols., 2003). Las principales proteínas dianas de la AMPK y su efecto en sus funciones son expresados en la tabla 1.

| Proteína diana                            | Efecto en su función            | Vía                                       | Tejido                           | Efecto en la vía   |
|---|---------------------------------|---|----------------------------------|--|
| <b>Metabolismo lipídico</b>               |                                 |   |                                  |  |
| ACC1                                      | ↓ actividad                     | Síntesis ac. grasos                       | Todas la células ?               | ↓ Sint. ac. grasos   |
| ACC2                                      | ↓ actividad                     | Oxidación ac. grasos                      | Músculo e hígado                 | ↑ Oxidación ac. grasos   |
| HMGR                                      | ↓ actividad                     | Síntesis isoprenoides                     | Hígado                           | ↓ Sint. colesterol   |
| HSL                                       | ↓ actividad                     | Lipólisis                                 | Tejido adiposos                  | ↓ Lipólisis  |
| <b>Metabolismo de carbohidratos</b>       |                                 |   |                                  |  |
| AS160                                     | ↓ Rab-GAP ?                     | GLUT4                                     | Músculo                          | ↑ Captación glucosa  |
| Sint. glucógeno                           | ↓ actividad                     | Sint. glucógeno                           | Músculo                          | ↓ Sint. glucógeno  |
| PFK2 (cardiaca)                           | ↓ actividad                     | Glucólisis                                | Corazón                          | ↑ Glucólisis   |
| PFK2 (inducible)                          | ↓ actividad                     | Glucólisis                                | Monocitos                        | ↑ Glucólisis   |
| <b>Metabolismo proteico</b>               |                                 |   |                                  |  |
| EF2K                                      | ↑ actividad                     | Sint. proteínas                           | Todas la células ?               | ↓ Elongación traducción  |
|   |                                 |   | Todas la células ?               | ↓ Iniciación traducción<br>↓ Crecimiento celular<br>↓ Sint. proteína |
| <b>Señalización celular</b>               |                                 |   |                                  |  |
| eNOS                                      | ↑ actividad                     | Producción NO                             | Cél. endoteliales                | ↑ NO, ↑ flujo sanguíneo  |
| IRS1                                      | ↑ PI3K                          | Señalización insulina                     | Todas la células ?               | ↑ Señalización insulina  |
| <b>Transcripción</b>                      |                                 |   |                                  |  |
| p300                                      | ↓ Interacción                   | Expresión génica                          | Todas la células ?               | ↓ Transcripción por receptor nuclear                                 |
| HNF4- $\alpha$                            | ↓ Unión al ADN<br>↑ Degradación | Expresión génica                          | Hígado y otros                   | ↓ Transcripción  |
| ChREBP                                    | ↓ Unión al ADN                  | Expresión génica                          | Hígado                           | ↓ Transcripción de genes lipogénicos                                 |
| TORC2                                     | ↑ Translocación citoplásmica    | Expresión génica<br>Localización          | Hígado                           | ↓ Transcripción de genes gluconeogénico                              |
| <b>Transporte iónico / balance iónico</b> |                                 |   |                                  |  |
| CFTR                                      | ↓ apertura de canales           | Transporte iónico<br>Secreción de fluidos | Vía aérea<br>Epitelio intestinal | ↓ Transporte iónico<br>↓ Secreción de fluidos                        |

**Tabla 1. Proteínas dianas de la fosforilación de la AMPK.** En esta tabla se muestran las proteínas diana de AMPK, su efecto sobre estas, la vía sobre la que actúa y su posible efecto.

## 5. Receptores nucleares

### 5.1. Superfamilia de receptores nucleares

Los receptores nucleares son miembros de una gran superfamilia de factores de transcripción de unión a ADN, relacionados evolutivamente y que regulan múltiples procesos involucrados en numerosos fenómenos fisiológicos (Chambon, 2005; Laudet, 1997). Esta superfamilia está compuesta por 48 miembros en humanos, 21 en *Drosophila* y más de 270 en *Caenorhabditis elegans* y son exclusivos de metazoos (Castrillo y Tontonoz, 2004; Escriva y cols., 1998). La mayoría de los primeros receptores nucleares fueron clonados a partir de humanos entre los años 1985 y 1987, estos receptores posteriormente definieron la superfamilia de receptores de esteroides y de hormonas tiroideas, como se llamó originalmente a la familia receptores nucleares (Evans, 1988).



La disponibilidad de ligandos supone uno de los factores determinantes y limitantes de la actividad de los receptores nucleares. Las actividades de los receptores de hormonas esteroideas y de los receptores huérfanos adoptados están controladas por pequeñas moléculas hidrófobas. En el caso de los receptores de hormonas tiroideas y esteroideas, los ligandos naturales son las hormonas clásicas producidas por los órganos endocrinos (Evans, 1988).

A diferencia de las hormonas para receptores de superficie celular, las hormonas lipófilas pueden atravesar la membrana plasmática de las células hasta el interior donde los receptores nucleares transducen las señales de glucocorticoides, mineralocorticoides, esteroides sexuales (estrógenos, progesterona, y andrógenos), hormonas tiroideas y vitamina D3 (Olefsky, 2001).

## 5.2. Estructura de los receptores nucleares

Los receptores nucleares están formados por dominios modulares, incluyendo una variable amino terminal del dominio de activación, conocida como función de activación 1 (*Activation function 1*, AF-1), un dominio de unión de ADN (*DNA Binding domain*, DBD) altamente conservado y un dominio de unión a ligando (*Ligand binding domain*, LDB) carboxilo terminal también muy conservado que reconoce ligandos hormonales y no hormonales específicos que dirigen la especificidad de la respuesta biológica; además de un segundo dominio de activación terminal AF-2 (*Activation function 2*, AF-2) (Evans, 1988) (figura 5).

Las regiones DBD median en la unión específica de monómeros de receptores nucleares, homodímeros y heterodímeros a elementos de respuesta de ADN en el promotor del gen diana (Glass y Ogawa, 2006). Mientras los dominios DBDs contienen dos motivos de unión a Zinc muy conservados y responsable de la localización nuclear, los LBDs poseen mayor variabilidad y consta de 12 hélices alfa que crean un bolsillo hidrofóbico que puede unirse a un ligando específico para cada receptor (AF-2) (Sladek, 2011). El dominio AF-2 media el desplazamiento de co-represores y el reclutamiento de co-activadores. Los agonistas químicamente no polares naturales o sintéticos y antagonistas de los receptores pasan libremente a través de la bicapa lipídica de la membrana celular y la interacción ligando-receptor específico conduce a cambios alostéricos. En una forma simplificada, co-represores complejos unidos a receptores

nucleares no ligados, inactivos se sustituyen con co-activador complejos en la presencia de ligandos de activación para activar la cascada de señalización (Nagy y cols., 2012).

Los receptores nucleares se unen a elementos de respuesta específicos de ADN en las regiones reguladoras de los genes y modulan su transcripción en respuesta a la unión del ligando mediante el reclutamiento de moléculas co-reguladores que posteriormente modifican la cromatina en contacto con la maquinaria de transcripción constitutiva (Gronemeyer y cols., 2004).

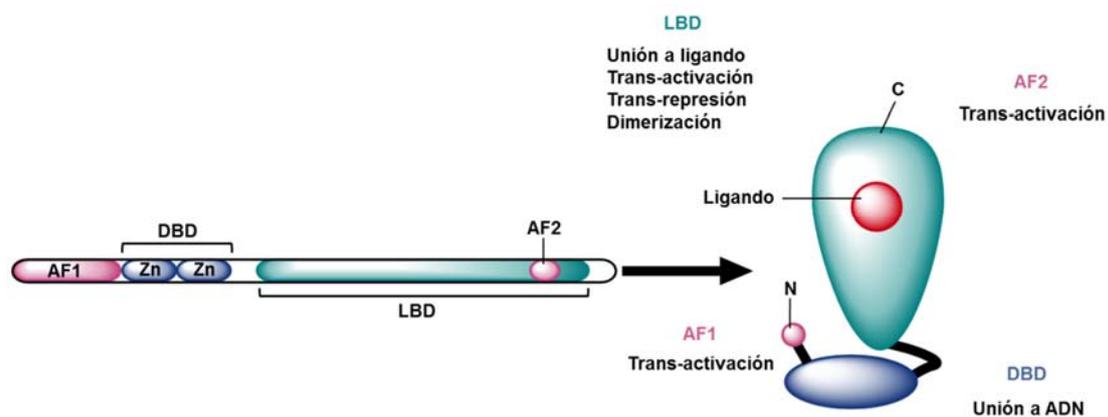


Figura 9. Estructuras primaria y terciaria de los receptores nucleares

### 5.3. Mecanismos de unión de los receptores nucleares a ADN.

Los receptores nucleares se unen como homodímeros a secuencias específicas de ADN, llamados elementos de respuesta a hormonas (HRE, *hormone response element*) (Germain y cols., 2006). Los receptores de hormonas esteroides, como el receptor de estrógenos, son sintetizados como formas inactivas que se asocian con complejos de proteínas de choque térmico (HSP, *Heat shock protein*) en el citoplasma (Pratt and Toft, 1997). En el caso de los receptores de estrógenos, la unión de la hormona al receptor induce la disociación de estos complejos, la entrada en el núcleo y su unión a los HRE (Glass y Ogawa, 2006). Todos los receptores nucleares reconocen el mismo motivo central de ADN, 5'-A/G-GGTCA-3' (Germain y cols., 2003).

La composición de los HRE determina qué tipo de receptor nuclear puede unirse a ellos. Se componen típicamente de dos secuencias hexaméricas organizadas como una repetición directa, palindrómica, de las que cada una contacta con el DBD de uno de los receptores que forman el homodímero, de manera que cada miembro contacta con el

ADN de manera simétrica. Cada secuencia hexamérica es reconocida por un receptor, determinando la especificidad para la unión de los distintos receptores nucleares, como el de las hormonas esteroideas (Roemer y cols., 2006).

Por el contrario, la mayoría de los receptores huérfanos adoptados, como es el LXR, se unen a sus genes diana formando heterodímeros con RXR. Los HRE para estos receptores normalmente constan de dos secuencias de reconocimiento dispuestas en el mismo sentido, y se denominan repeticiones directas (DR). La secuencia y el número de bases que separan los dos motivos determinan la especificidad de la unión de distintos heterodímeros y homodímeros (Pawlak y cols., 2012). Por ejemplo, los heterodímeros de los receptores nucleares PPAR (*Peroxisome proliferator-activated receptor*) y RXR se unen preferentemente a repeticiones directas separadas por una base (DR-1), mientras que los heterodímeros LXR-RXR se unen a repeticiones separadas por cuatro bases (DR-4) (Glass y Ogawa, 2006).

#### **5.4. Mecanismos de activación y represión transcripcional.**

Los receptores nucleares pueden regular positiva y negativamente la expresión de genes por tres mecanismos principales (figura 6): trans-activación dependiente de ligando, represión activa independiente de ligando, y trans-represión dependiente de ligando (Glass y Ogawa, 2006).

La unión ligando-receptor a su HRE puede activar la transcripción de genes diana de forma directa (proceso conocido como trans-activación dependiente de ligando), que implica el reclutamiento de complejos co-activadores. Aunque por lo general no se unen directamente al ADN, estos co-activadores se asocian con proteínas activadoras unidas a ADN que son requeridas para el proceso de activación transcripcional (Ding y cols., 1998). Además, los co-activadores poseen la actividad enzimática necesaria para la remodelación de cromatina, modificación de histonas específicas y el reclutamiento de la ARN polimerasa II, por ejemplo; actividad de remodelación nucleosomal (*Nucleosome remodelling activity*, NRA), actividad histona acetil-transferasa (*Histone acetyl-transferase*, HAT) y la actividad de la histona metil-transferasa (*Activity and histone methyl-transferase*, HMT).

La unión del ligando induce cambios conformacionales en los receptores nucleares y promueve su asociación con un grupo de proteínas nucleares, incluyendo los co-activadores de receptores de esteroides SRC-1/p160, TIF-2/GRIP-1 y CBP/p300 que

funcionan como co-activadores de la transcripción; el receptor de la proteína de interacción RIP-140 (*Receptor-interacting protein 140*) que puede funcionar como un co-activador y también como un co-represor (Sugawara y cols., 2001); y los factores de intermediario transcripcional 1 (TIF-1, *Transcriptional intermediary factor 1*), SMRT (*Silencing mediator of retinoid acid and thyroid-hormone receptors*) y N-CoR (*Nuclear-receptor co-repressor*) que son co-represores (Chen y Evans, 1995; Hörlein y cols., 1995).

Los co-activadores interactúan con la región AF-2 del LDB (figura 6). La región AF-2 es una hélice  $\alpha$  corta, y la unión del ligando la estabiliza creando un sitio de unión de alta afinidad para proteínas co-activadoras que contienen la secuencia consenso LXXLL (Heery y cols., 1997). Estos complejos funcionan como intermediarios necesarios para el reclutamiento de la enzima ARN polimerasa-II (Glass and Ogawa, 2006; Glass and Rosenfeld, 2000). Los co-activadores tienen la función de transmitir la información proporcionada por los factores de transcripción unidos a las regiones reguladoras de los genes. De este modo, conectan la información que aportan los factores de transcripción con las cascadas de señalización asociadas.

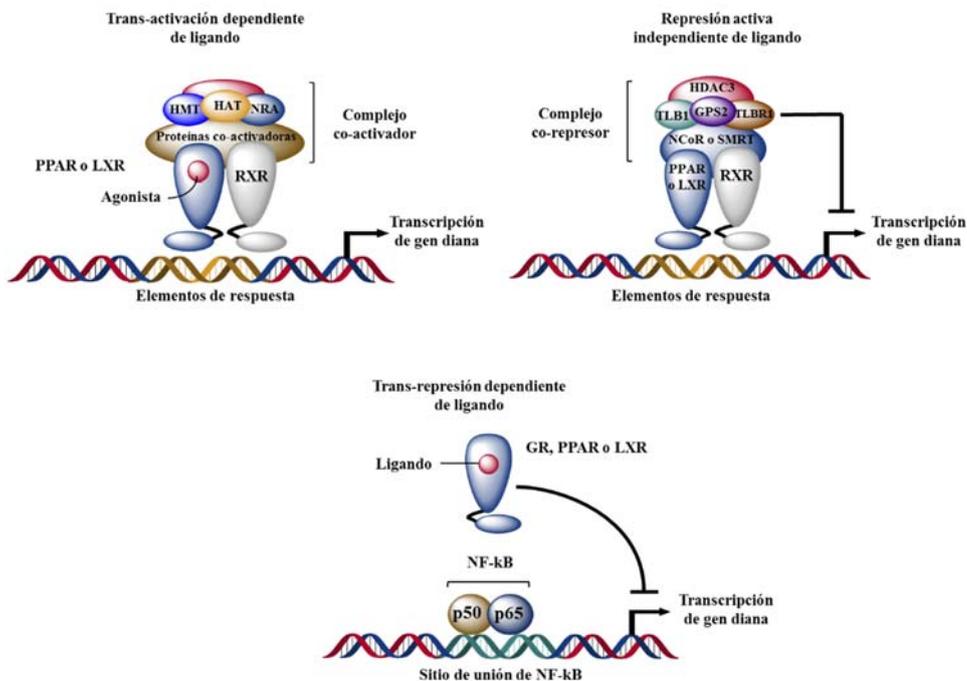


Figura 10. Mecanismos de activación y represión transcripcional.

Muchos receptores nucleares, incluyendo LXR, se pueden unir a genes diana en ausencia de ligando y, en este estado, reprimen de forma activa la transcripción (fenómeno conocido como represión activa) (Glass y Ogawa, 2006). Esta función represora es consecuencia del reclutamiento de complejos co-represores, que actúan como antagonistas de los co-activadores. El número de co-activadores y co-represores (o co-reguladores) de receptores nucleares descritos es muy (Rosenfeld y cols., 2006; Malik y Roeder, 2005; Perissi y Rosenfeld, 2005). En presencia de ligandos activadores, los co-represores son reemplazados por co-activadores, lo que resulta en la activación de la transcripción. Dentro del grupo de los co-represores, N-CoR y SMRT son los dos que mejor se conocen (Chen and Evans, 1995; Horlein y cols., 1995). N-CoR y SMRT interaccionan con receptores que no están unidos a ligando a través de motivos hidrofóbicos relacionados con los motivos LXXLL que se encuentran en muchos co-activadores (Hu y cols., 2003). En ausencia de ligando, N-CoR y SMRT se encuentran formando complejos con numerosas proteínas, entre las que se incluyen enzimas modificadoras de la cromatina, como las de-acetilinas de histonas (HDAC, *Histone De-Acetylases*) e histona metil-transferasas (HMT, *Histone methyltransferase*) (Perissi y cols., 1999; Yoon y cols., 2003; Mottis y cols., 2013).

## 6. LXR: Isoformas, ligandos y distribución

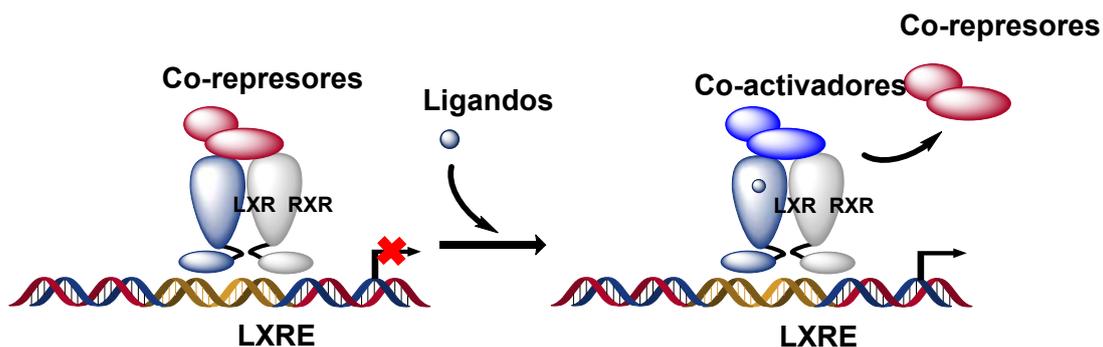
La subfamilia de receptores nucleares LXR contiene dos miembros, LXR $\alpha$  y LXR $\beta$  (NR1H3 y NR1H2 respectivamente). Pertenecen al grupo de receptores nucleares huérfanos adoptados. Contienen los dominios funcionales comunes a la mayoría de los receptores nucleares, incluyendo los dominios DBDs, AF-1 y AF-2. Los heterodímeros LXR/RXR se unen a LXRE (*LXR Response Element*) que contienen la secuencia AGGTCA separados por cuatro nucleótidos (DR-4) (Glass y Ogawa, 2006).

Los dominios de unión al ligando de LXR $\alpha$  y LXR $\beta$  poseen una alta similitud de secuencias y parecen ser activadas por ligandos endógenos similares (Castrillo y Tontonoz, 2004). Han sido estudiadas tres variantes de LXR $\alpha$ , cuya forma más abundante y activa es la variante LXR $\alpha$ 1, que está presente en todos los tejidos que expresan LXR $\alpha$ . LXR $\alpha$ 2 se expresa principalmente en testículos de humano y líneas celulares de cáncer, y carece de los primeros 45 aminoácidos presentes en LXR $\alpha$ 1. LXR $\alpha$ 3 se genera a través de un recorte alternativo en el sitio 3' en el exón 6 y la

eliminación de 50 aminoácidos dentro del su LBD. LXR $\alpha$ 3 se expresa en pulmón humano, tiroides, bazo y líneas celulares de cáncer. (Laurencikiene y Rydén, 2012). A su vez, LXR $\beta$  se expresa en la mayoría de los tejidos (Repa y Mangelsdorf, 2000).

Los LXRs pueden ser activados por colesterol o por otros metabolitos modificados, denominados oxisteroles, como el 22-(R)-hidroxicolesterol, 24-(S)-hidroxicolesterol, 27-hidroxicolesterol y 24-(S)-, 25-epoxicolesterol. Se unen a estos receptores e inducen la actividad transcripcional de LXR a concentraciones fisiológicas (Janowski y cols., 1996; Lehmann y cols., 1997). Estos derivados del colesterol están presentes en los complejos lipídicos que forman las LDL (*Low density lipoprotein*) y se acumulan en los tejidos a concentraciones capaces de activar los receptores in vivo (Lehmann y cols., 1997). La vía de LXR también puede ser activada por agonistas sintéticos tales como GW3965 y TO901317, así como por ligandos de RXR, como el ácido 9-cis-retinoico (Calkin y Tontonoz, 2012).

En ausencia de ligando, se mantiene la interacción de LXR/RXR con los co-represores, reprimiendo la actividad transcripcional de genes diana. La unión de los ligandos a LXR produce un cambio conformacional, que facilita el desplazamiento del complejo co-represor y la asociación de co-activadores, que facilitan la transcripción de genes diana (figura 9) (Li y Glass, 2004). La activación por parte de ligandos de LXR también inhibe la transcripción de determinados genes por parte de promotores que no contienen LXRE, a través de un mecanismo de trans-represión (Glass y Rosenfeld, 2000). El modelo actual para la activación de LXR postula que el heterodímero LXR-RXR se une a LXREs de genes diana de LXR en asociación con co-represores como SMRT y N-CoR. Después de la unión del ligando, los co-represores son liberados y los co-activadores son reclutados, promoviendo la transcripción de los genes diana (Calkin y Tontonoz, 2012).



**Figura 11. Mecanismo de acción de LXR unido a RXR.** El ligando de LXR al unirse al receptor libera los co-represores y se unen los co-activadores al complejo LXR/RXR, desinhibiéndose así la transcripción.

### 6.1. Principales funciones de LXR

Los receptores LXR poseen numerosas funciones en el organismo. Las más conocidas son la regulación de una serie de genes implicados en el metabolismo del colesterol, tanto en su síntesis como en su eliminación desde el interior celular. Pero además, estos receptores tienen otras funciones fisiológicas como la de inhibir la expresión de una serie de genes implicados en la producción de sustancias inflamatorias o la regulación de genes implicados en la respuesta inmunitaria del organismo.

| Función  | Genes diana  |
|--|--|
| <i>Transporte reverso de colesterol</i>            | <b>ABCA1</b> Salida<br><b>ABCG1</b> Salida y transporte  |
| <i>Transporte de colesterol y su modulación</i>    | <b>CETP</b> Modulación de la composición de lipoproteínas<br><b>APOA</b> Transporte  |
| <i>Entrada del colesterol</i>                      | <b>IDOL</b> Degradación del receptor de lipoproteínas  |
| <i>Absorción y excreción</i>                       | <b>ABCA1</b> Salida<br><b>ABCG5</b> Salida<br><b>ABCG8</b> Salida  |
| <i>Regulación de ácidos grasos y triglicéridos</i> | <b>SREBP1C</b> Síntesis ácidos grasos y triglicéridos  |
| <i>Metabolismo de los ácidos biliares</i>          | <b>CYP7A1</b> Conversión de colesterol a ácidos biliares   |
| <i>Metabolismo de la glucosa</i>                   | <b>GLUT4</b> Entrada de glucosa estimulada por insulina  |
| <i>Respuesta inmune e inflamación</i>              | <b>AIM</b> Inhibición de apoptosis inducida por LDL-ox<br><b>ARG2</b> Efectos anti-inflamatorios<br><b>VEGFA</b> Neoangiogénesis<br><b>MERTK</b> Fagocitosis |
| <i>Biología del adipocito</i>                      | <b>APOD</b> Transporte de lípidos<br><b>SPOT14</b> Síntesis ácidos grasos y lipogénesis  |

**Tabla 2. Genes diana de LXR y sus funciones.** Modificado de Calkin y Tontonoz, 2012.

## 6.2. Implicación de LXR en el metabolismo lipídico

Posteriormente, se desarrollaron potentes ligandos sintéticos capaces de activar estos receptores de manera muy específica y eficaz (Collins y cols., 2002) como el compuesto GW3965 (desarrollado por la casa comercial *Glaxo Wellcome*), el compuesto LG268 (desarrollado por la casa comercial *Ligand Pharmaceuticals*), y el compuesto TO901317 (desarrollado por la casa comercial *Tularik*). Los ligandos GW3965 y TO901317 son específicos de los receptores LXR, y el compuesto LG268 actúa como activador de los receptores RXR.

Existen muchas evidencias que sostienen la teoría de que los receptores LXR funcionan como sensores de colesterol en el organismo. La identificación inicial de los oxisteroles como ligandos fisiológicos de LXR supuso una primera aproximación del papel de estos receptores en el metabolismo del colesterol (Janowski y cols., 1996) (Lehmann y cols., 1997). Esta hipótesis fue confirmada tras los resultados obtenidos en estudios realizados en ratones  $LXR\alpha^{-/}$ , al observarse una marcada acumulación de ésteres de colesterol en el hígado de estos ratones tras ser sometidos a una dieta rica en colesterol (Peet y cols., 1998). Este fenotipo permitió identificar la enzima Cyp7a1 (citocromo P450, familia 7, subfamilia A, polipéptido 1), enzima limitante de la síntesis de ácidos biliares por la vía clásica, Cyp7a1 en una drástica reducción de la conversión de colesterol en ácidos biliares, y la subsiguiente acumulación hepática de ésteres de colesterol en el hígado.

El análisis posterior de la expresión de genes en células procedentes de ratones deficientes en los receptores LXR, y estudios in vitro usando células tratadas con los ligandos sintéticos de LXR, reveló que estos receptores juegan un papel importante en el control del metabolismo del colesterol y la homeostasis lipídica (Peet y cols., 1998; Schultz y cols., 2000). Estos estudios han permitido identificar varios genes diana de LXR, implicados en el mecanismo de transporte reverso de colesterol, en el que el exceso de colesterol es transferido en partículas HDL (*High-Density Lipoproteins*, lipoproteínas de alta densidad), desde las células periféricas hacia el hígado para su excreción en la bilis. De forma más precisa, se han identificado como dianas de LXR a diferentes miembros de la familia de genes que codifican transportadores de membrana ABC (*ATP binding cassette*), relacionándose con la capacidad de los ligandos de LXR

para elevar los niveles plasmáticos de HDL e inhibir la absorción intestinal de colesterol (figura 8).

Un miembro de esta familia particularmente bien caracterizado es ABCA1 (Venkateswaran y cols., 2000a). En este trabajo se postuló que la carga de una célula con esteroides supone un mecanismo que activa los receptores LXR para que, a través de ABCA1, se rebaja esa concentración lipídica. Pera y colaboradores establecieron que los heterodímeros LXR/RXR son reguladores clave de la expresión de ABCA1 in vivo, y mostraron que la activación dependiente de ligando de LXR inhibe la absorción intestinal de colesterol (Repa y cols., 2000). También se identificó un elemento de respuesta a LXR en el promotor del gen de ABCA1 (Costet y cols., 2000). Schwartz y colaboradores demostraron que la expresión de ARNm de ABCA1 se induce en macrófagos en respuesta a la carga lipídica, y que la expresión y activación de LXR estimula la eliminación de colesterol mediada por Apo A1 (*Apolipoprotein A1*) (Schwartz y cols., 2000). La capacidad de los ligandos de LXR para aumentar los niveles de colesterol HDL en ratones coincide con la conocida función de ABCA1 en el transporte reverso de colesterol (Venkateswaran y cols., 2000). Además, los ratones LXR $\alpha\beta^{-/-}$  desarrollan esplenomegalia y acumulan células espumosas en múltiples tejidos periféricos, un fenotipo muy similar al de los ratones ABCA1 $^{-/-}$  (Schuster y cols., 2002; Tangirala y cols., 2002).

También se han identificado como genes diana de LXR otros transportadores ABC, como ABCG1 (Kennedy y cols., 2001; Sabol y cols., 2005; Venkateswaran y cols., 2000b), ABCG5 y ABCG8 (Berge y cols., 2002; Repa y cols., 2002). De forma similar a ABCA1, la expresión de ABCG1 se induce fuertemente por la carga de colesterol de los macrófagos. En cuanto a ABCG5 y ABCG8, existen estudios que demuestran que la inducción dependiente de LXR de ABCG5 y ABCG8 limita la absorción intestinal de colesterol. Además, la inducción hepática de estos transportadores promueve la excreción de colesterol en la bilis.

Otro gen diana de LXR importante en la homeostasis de colesterol es Apo E. Al contrario que ABCA1, la regulación de Apo E por LXR es específica de tejido y sólo ocurre en macrófagos y adipocitos (Laffitte y cols., 2001). Apo E media el aclaramiento hepático de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, *very-low-density lipoprotein*) y quilomicrones, y puede actuar como un aceptor extracelular de colesterol en el mecanismo de eliminación mediado por ABCA1 (Curtiss y Boisvert, 2000). Así, LXR

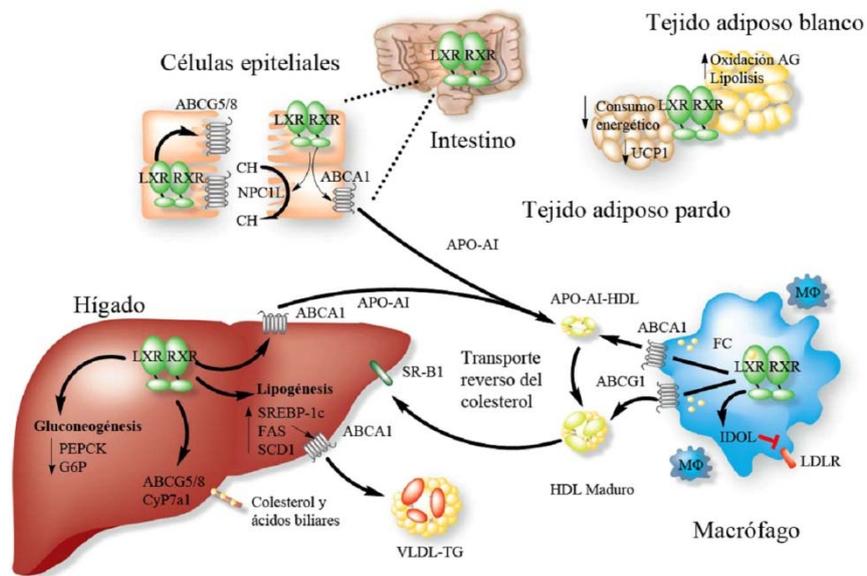
induce la expresión de múltiples lipoproteínas que pueden actuar como aceptores de colesterol (figura 8). LXR regula también positivamente diversas enzimas relacionadas con la remodelación de lipoproteínas, incluyendo la lipoproteína lipasa (LPL), la proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP, *Cholesterol Ester Transfer Protein*) y la proteína transportadora de fosfolípidos (PLTP, *Phospholipid Transfer Protein*). Es probable que algunas de las acciones de los agonistas de LXR sobre los niveles de HDL y VLDL estén implicadas en el control de estas enzimas remodelantes de lipoproteínas (Repa y Mangelsdorf, 2000; Tontonoz y Mangelsdorf, 2003).

Además de su capacidad para regular el metabolismo de colesterol, los receptores LXR también están implicados en la lipogénesis hepática. El tratamiento de ratones con agonistas sintéticos de LXR eleva los niveles de triglicéridos circulantes y su acumulación en el hígado, un efecto que supone un gran obstáculo para el desarrollo de estos compuestos como fármacos aplicables humanos (Joseph y cols., 2002a; Schultz y cols., 2000). La actividad lipogénica de LXR se traduce en un aumento de la expresión del principal regulador de la lipogénesis hepática SREBP1-c (*Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c*) (Horton y cols., 2002; Repa y cols., 2000), así como la inducción de la sintasa de ácidos grasos (FAS, *Fatty acid synthase*) (Joseph y cols., 2002), la carboxilasa acil-CoA y la desaturasa esterol-CoA 1 (Tontonoz y Mangelsdorf, 2003).

Los receptores LXR también intervienen en el control de la expresión de genes implicados en el metabolismo de la glucosa. Existen trabajos que demuestran que el agonista de LXR TO901317 mejora la sensibilidad a la insulina en ratas resistentes a la hormona insulina (Cao y cols., 2003). Laffitte y colaboradores recogieron que el agonista GW3965 mejora la tolerancia a la glucosa en ratones alimentados con una dieta alta en grasa (Laffitte y cols., 2003). Tomados en conjunto, estos resultados sugieren una regulación coordinada de genes implicados en el metabolismo de la glucosa en varios tipos celulares. La activación de LXR en el hígado permite el aumento de expresión de glucoquinasas, y la disminución de la expresión de genes relacionados con la gluconeogénesis hepática. En el tejido adiposo, la activación de LXR permite la inducción transcripcional del transportador de glucosa sensible a la insulina GLUT 4 (*Glucose transporter type 4*) (Dalen y cols., 2003; Laffitte y cols., 2003).

### 6.3. LXR y aterosclerosis

La aterosclerosis es una enfermedad caracterizada por alteraciones en el metabolismo lipídico, que degeneran en el desarrollo de un estado inflamatorio crónico dentro de la pared arterial. En base a los datos expuestos en el apartado anterior, puede plantearse que la capacidad de los receptores LXR para incrementar el transporte reverso de colesterol mediado por ABCA1 y atenuar la respuesta inflamatoria en los macrófagos podría ser beneficiosa. Los estudios con ganancia o pérdida de función indican que la activación de LXR tiene potentes efectos anti-aterogénicos. Así, el tratamiento de ratones propensos a aterosclerosis Apo E<sup>-/-</sup> y LDLR<sup>-/-</sup> (*LDL receptor*) con un ligando sintético de LXR disminuyó al 50% el tamaño de la lesión ateromatosa (Joseph y cols., 2002b). En este trabajo se observó cómo en muestras de aortas de ratones tratados con el ligando o se indujo la expresión de ABCA2 y ABCG1, mientras que la expresión de genes inflamatorios se vio reprimida, lo que revela la existencia de un mecanismo dual anti-aterogénico beneficiosos. Por el contrario, la pérdida de la expresión de los receptores LXR en progenitores hematopoyéticos en macrófagos, realizada mediante el trasplante de médula ósea de ratones LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup> en ratones Apo E<sup>-/-</sup> o LDLR<sup>-/-</sup>, se tradujo en un marcado incremento del tamaño de la lesión (Tangirala y cols., 2002). El estudio llevado a cabo por Levin y colaboradores ha establecido que el tratamiento de ratones LDLR<sup>-/-</sup> con un agonista de LXR reduce el tamaño de las lesiones preexistentes, y esta reducción es dependiente de la actividad de LXR en macrófagos (Levin y cols., 2005). Estos estudios confirman que LXR supone un importante mecanismo homeostático en el macrófago, que ayuda a proteger contra el exceso de colesterol, y apuntan a que LXR supone un blanco atractivo para el tratamiento de la enfermedad cardiovascular.



**Figura 12. Mecanismo de acción de LXR sobre el metabolismo del colesterol.** Modificado de Calkin y Tontonoz, 2012.

#### 6.4. LXR e inflamación

Como se comentó en el apartado anterior, la aterosclerosis es reconocida como una enfermedad inflamatoria crónica, así como un desorden del metabolismo lipídico. Diversos estudios han explorado el papel de LXR en los mecanismos inflamatorios en el macrófago. Existe una relación recíproca entre el metabolismo lipídico y la expresión de genes inflamatorios en macrófagos activados tratados con ligandos de LXR. Los agonistas de LXR inhiben la expresión de una serie de genes relacionados con la inflamación y la respuesta inmune innata (Castrillo y cols., 2003a; Joseph y cols., 2003) (Figura 9). Por ejemplo, la inducción de los genes inflamatorios iNOS (*Inducible Nitric Oxide Synthase*), COX-2 (*Cyclooxygenase-2*), IL-6, la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1, *Monocyte chemoattractant protein-1*) y la metaloproteínasa de matriz 9 (MMP-9, *Matrix Metalloproteinase 9*) en respuesta a patógenos bacterianos y a citoquinas pro-inflamatorias es inhibida por la activación de LXR. Además, se observa una represión de la expresión de genes inflamatorios por LXR en macrófagos de ratones de genotipo salvaje (*Wild Type*, WT),  $LXR\alpha^{-/-}$  pero se encuentra suprimida en los tipo

LXR $\alpha\beta^{-/-}$  (figura 8). Estos resultados indican que ambas Isoformas de LXR poseen actividad anti-inflamatoria.

La inhibición de la señalización inflamatoria por parte de LXR no se limita a macrófagos aislados, sino que también se ha observado in vivo. Se han establecido tres modelos de inflamación en el ratón para explorar el potencial utilidad de los agonistas de LXR como agentes anti-inflamatorios: La respuesta séptica inducida por LPS, la dermatitis alérgica de contacto e irritante, la inflamación crónica aterogénica. En el primer modelo, la inyección intraperitoneal de LPS, desencadena una respuesta sistémica exacerbada en ratones LXR $\alpha\beta^{-/-}$ , que se midió a través de los niveles de citoquinas y la expresión de genes inflamatorios en el hígado (Joseph y cols., 2003). En el segundo modelo, se observó que los agonistas de LXR reducen de forma drástica la respuesta inflamatoria en modelos de inflamación cutánea inducida por el 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) y en la dermatitis alérgica inducida por oxazolona (Fowler y cols., 2003; Joseph y cols., 2003). Finalmente, en el tercer modelo, se apreció que la administración del agonista sintético de LXR redujo la expresión de genes inflamatorios, como MMP-9, en el contexto de la inflamación crónica ateromatosa en ratones hipercolesterolémicos Apo E $^{-/-}$  y LDLR $^{-/-}$  (Joseph y cols., 2003; Terasaka y cols., 2005). Todas estas observaciones sugieren que los agonistas de LXR podrían ejercer estos efectos anti-aterogénicos no sólo promoviendo la eliminación de colesterol, sino también actuando como limitantes de la producción de mediadores inflamatorios en la pared arterial. Además, esto sugiere que la represión dependiente de LXR de la expresión de genes inflamatorios podría ser útil para controlar el exceso de inflamación que tiene lugar en una gran variedad de enfermedades.

### 6.5. LXR e inmunidad innata

Estudios recientes indican una nueva función de los receptores LXR en la respuesta inmune innata. Los ratones que carecen de los receptores LXR son muy susceptibles al patógeno intracelular *Listeria monocytogenes* y *Mycobacterium tuberculosis* (Joseph y cols., 2004). El trasplante de médula ósea de ratones LXR $\alpha\beta^{-/-}$  en ratones WT supuso un incremento de la carga bacteriana, mientras que el trasplante de médula ósea WT en ratones LXR $\alpha\beta^{-/-}$  revirtió completamente la susceptibilidad a la infección por *L. monocytogenes*. Esto sugiere que los ratones LXR $\alpha\beta^{-/-}$  presentan una respuesta inmune

innata alterada. Además, esta incapacidad de los ratones  $LXR\alpha\beta^{-/-}$  para generar una respuesta adecuada frente a infección se correlacionó con niveles elevados de apoptosis de macrófagos.

Este incremento de la susceptibilidad de los macrófagos  $LXR\alpha\beta^{-/-}$  frente a la apoptosis inducida por patógenos se debe a la pérdida de regulación del gen anti-apoptótico (AIM, *Apoptosis inhibitor macrophage*) por  $LXR\alpha$ , primer gen diana selectivo de una isoforma de LXR que se ha descrito hasta la fecha. De forma similar, la activación de los heterodímeros LXR/RXR por los ligandos sintéticos y naturales inhibe la apoptosis de los macrófagos en respuesta a un estímulo apoptótico (como cicloheximida) y a la infección con *Bacillus anthracis*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* (Valledor y cols., 2004). Esto se atribuye a la inducción de AIM y otros factores anti-apoptóticos, así como a la inhibición de una serie de genes pro-apoptóticos. La regulación selectiva de AIM por  $LXR\alpha$  durante la infección sugiere que esta isoforma podría tener funciones únicas en la inmunidad innata.

Resultados recientes de nuestro laboratorio, han revelado la importancia de la señalización de LXR en la eliminación de las células apoptóticas por parte de las células fagocíticas, y el mantenimiento de la tolerancia inmunitaria (Alonso-González y cols., 2009). La retirada efectiva de las células apoptóticas por los macrófagos es esencial para la homeostasis inmune. Los mecanismos transcripcionales que permiten a los macrófagos percibir y responder a las células apoptóticas están muy poco definidos. Este trabajo demuestra que la retirada de las células apoptóticas activa LXR e induce la expresión de Mer, un receptor de tirosina quinasa crítico para la fagocitosis (Alonso-González y cols., 2009). Los macrófagos deficientes en LXR mostraron un defecto selectivo en la fagocitosis de células apoptóticas y una respuesta pro-inflamatoria anómala. Como consecuencia de estos defectos, los ratones que carecen de los receptores LXR manifestaron un fallo en el desarrollo de la tolerancia inmunológica y desarrollaron auto-anticuerpos y glomerulonefritis autoinmune. Además, el tratamiento de ratones con un agonista de LXR produjo una disminución de la progresión de la enfermedad en un modelo de ratón con problemas de autoinmunidad tipo lupus. Así, la activación de LXR por células apoptóticas promovió su propia eliminación y la supresión de los mecanismo inflamatorios.

## 6.6. LXR en la inmunidad adquirida

Además de su importancia en las células del sistema inmune innato, evidencias recientes sugieren la existencia de una relación entre el metabolismo de los esteroides, los receptores LXR y la respuesta inmune adaptativa (Zelcer y Tontonoz, 2006). Una importante característica de la inmunidad adaptativa es la capacidad de los linfocitos antígeno-específicos para desencadenar una rápida y extensa proliferación en respuesta a un cambio antigénico. Se ha descrito que la disponibilidad intracelular de esteroides está regulada dinámicamente durante la activación de los linfocitos, y que es probable que la respuesta transcripcional y el control del ciclo celular en linfocitos T estén mediados por la regulación recíproca de los programas transcripcionales de SREBP y LXR (Bensinger y cols., 2008). El análisis de cultivos primarios de linfocitos estableció que la activación de LXR beta por ligandos fisiológicos o farmacológicos disminuye la capacidad proliferativa de los linfocitos T, al promover la salida de colesterol y limitar así el contenido de esteroides de las células. De este modo, la pérdida genética de LXR beta rescata a las células del efecto inhibitorio de los agonistas de LXR y potencia la expansión linfocitaria. Los efectos de LXR en la proliferación celular se deben al control del metabolismo celular del colesterol a través del transportador ABCG1 (Bensinger y cols., 2008). La capacidad de las rutas metabólicas de colesterol reguladas por LXR para modular la expansión linfocitaria revela un nuevo mecanismo de señalización regulador de la función de los linfocitos T y la respuesta inmune adquirida.

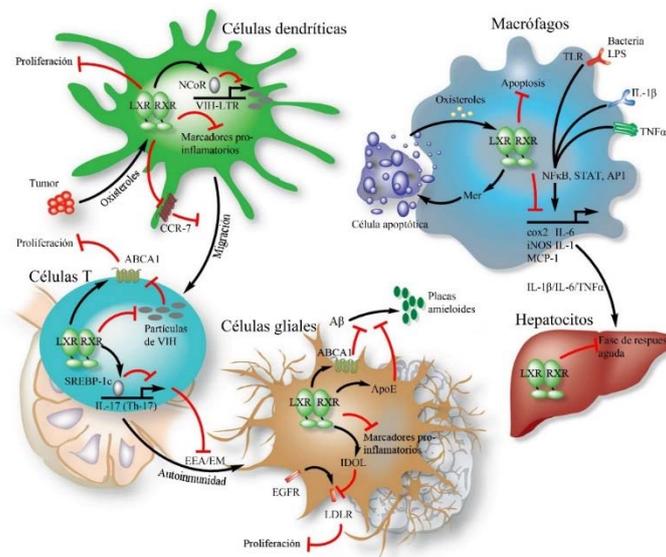


Figura 13. Mecanismo de acción de LXR y la respuesta inmunitaria. Modificado de Calkin y Tontonoz, 2012.

La trans-represión dependiente de ligando consiste en la inhibición de la activación de promotores por parte de otras clases de factores de transcripción de forma dependiente de ligando. El ejemplo mejor conocido son los receptores de glucocorticoides que, tras ser activados por glucocorticoides, son capaces de inhibir la activación de genes de respuesta inflamatoria al interferir con la actividad de los factores de transcripción AP-1 (*Activator Protein-1*) y NF- $\kappa$ B (*Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) (Auphan y cols., 1995; Barnes, 1998). Esta actividad trans-represora es promotor-específica, pero no parece que esté implicada la unión del receptor nuclear al ADN. Por ejemplo, el receptor de glucocorticoides parece reprimir promotores diana por sus interacciones con otras proteínas, en lugar de deberse a la unión a HRE. Este mecanismo molecular puede ser el responsable de la acción antiinflamatoria de la glucocorticoides como la dexametasona (Reichardt y cols., 2001), así como de agonistas de PPAR y LXR (Ogawa y cols., 2005; Pascual y cols., 2005).

## 7. Curcumina

La curcumina, es un polifenol hidrófobo que se obtiene a partir del rizoma de la planta *Curcuma longa* L. (familia Zingiberácea). Ha sido utilizada en la medicina popular asiática desde hace cientos de años para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y otras afecciones (Goel y cols., 2008; Maheshwari y cols., 2006). Además de la curcumina existen otros curcuminoides como la demetoxicurcumina y la bis-desmetoxicurcumina (Shehzad y cols., 2012).

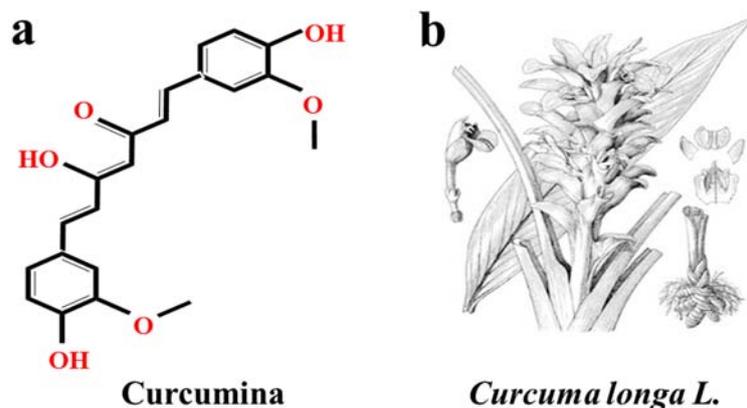


Figura 14. Estructura química de la curcumina y planta de procedencia.

Posee una potente actividad anti-cancerígena, anti-oxidante, anti-inflamatoria y cardioprotectora (Gupta y cols., 2012). Se ha demostrado que los efectos moleculares de la curcumina están mediados por factores de transcripción, incluyendo NF- $\kappa$ B, PPAR- $\gamma$  y al transductor de señales y activador de la transcripción (STAT, *Signal transduction and transcription*); enzimas tales como la COX-2, iNOS y MAPKs; citoquinas inflamatorias tales como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL -6, MCP-1 y factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF, *Epidermal growth factor*) y el factor de crecimiento hepático (HGF, *Hepatocyte Growth Factor*) (Goel y cols., 2008).

### **7.1. Agente antineoplásico**

También se han realizado estudios sobre su capacidad pro-oxidante. En numerosas publicaciones se habla de su capacidad para inducir estrés oxidativo en diversos tipos de células y tejidos tumorales. En línea celular HSG, procedente de carcinoma humano de glándula submandibular la curcumina aumentó la producción de ROS de forma significativa (Atsumi y cols., 2007). Otro ejemplo es que el estrés oxidativo inducido por la curcumina promueve la muerte de las células HUT-78, que son células T procedentes de linfoma cutáneo (Khan y cols., 2012).

### **7.2. Efectos anti-oxidantes**

La curcumina es un potente inhibidor de enzimas generadoras de oxígeno reactivas, tales como lipoxigenasa/ciclooxigenasa, xantina deshidrogenasa/oxidasa, y la óxido nítrico sintasa inducible (Lin, 2004). Para estudiar la capacidad de la curcumina para disminuir la producción de ROS intracelular se midió la producción de ROS intracelular mediante la técnica de la DCF-DA. Se usaron siete concentraciones diferentes de curcumina (0,0-4,0  $\mu$ M). En ausencia de la curcumina, el hidropéroxido incrementó fluorescencia a causa de la DCF. La adición de la curcumina disminuyó gradualmente la intensidad de fluorescencia intracelular que fue suprimida por completo a una concentración de 4,0  $\mu$ M (Barzegar y Moosavi-Movahedi, 2011).

### **7.3. Efectos anti-inflamatorios**

En numerosos estudios in vitro e in vivo la curcumina ha demostrado poseer una gran capacidad anti-inflamatoria. En adipocitos de ratón sometidos a una dieta alta en grasas, la curcumina atenúa la estimulación de la respuesta inflamatoria inducida por

esta dieta, inhibiendo los niveles de expresión de NF-kB (tanto en lisados de células enteras como en el extracto nuclear) y activando la vía de señalización de JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) (Shao y cols., 2012). En otro estudio *in vivo*, ratones infectados por *Helicobacter pylori* y tratados con curcumina, se logró disminuir drásticamente la expresión de los mediadores inflamatorios (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-9, IL-10, IL-23a, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ), restaurando sus niveles de expresión a los de los ratones no infectados (Santos y cols., 2015).

#### 7.4. Cardioprotección

Un ejemplo de la actividad cardioprotectora de la curcumina es su capacidad para inhibir a la actividad acetilasa del factor p300/CBP durante la hipertrofia en las células de miocardio. La hipertrofia en células de miocardio es la respuesta que tienen los cardiomiocitos a la hipertensión arterial, la cardiopatía valvular o la cardiomiopatía hipertrófica familiar. La hipertrofia se define como un aumento en el tamaño de los cardiomiocitos, el aumento de la síntesis de proteínas y una organización superior de la sarcómera (Katanasaka y cols., 2013). El co-activador p300 es una proteína con actividad acetilasa que a menudo facilita las uniones proteína-proteína y proteína-ADN implicadas en el aumento de la transcripción de genes (Eckner y cols., 1994). Este co-activador acetila factores de transcripción como GATA, que pertenecen a una familia de proteínas caracterizadas por su capacidad de unión a la secuencia de ADN "GATA" (Guanina, Adenina, Timidina, Adenina) (Ko y Engel, 1993). Concretamente el factor de transcripción GATA-4 juega un papel crítico en el control del desarrollo del corazón y de la hipertrofia cardíaca ya que es necesario para la activación transcripcional de genes en el tejido cardíaco (Dai y Markham, 2001). Se ha observado en estudios con ratones que p300 acetila al factor de transcripción GATA-4 lo que aumenta la afinidad por el ADN causando una sobre expresión de genes durante la hipertrofia de células de miocardio lo que ocasionar un fallo cardíaco. (Yanazume y cols., 2003). La curcumina inhibe la actividad acetilasa de p300 sobre GATA-4 impidiendo que se una a la secuencia de ADN y así inhibiendo la sobre expresión de genes en el tejido cardíaco (Katanasaka y cols., 2013).

## 7.5. Diabetes

La curcumina aumenta la actividad de AMPK y suprime la de ACC incrementando la fosforilación de estas enzimas (Kim y cols., 2009). La curcumina también induce la expresión del receptor  $\gamma$  del peroxisoma activado por el proliferador (PPAR $\gamma$ ) dando como resultado la regulación diferencial de la expresión de la proteína de unión a elemento regulador de esteroides (SREBPs), es decir, el incremento de la expresión de SREBP-1 y la disminución de la expresión de SREBP-2. La baja en la expresión de SREBP-2 suprime la expresión del gen de LDLR, que conduce a la reducción en la endocitosis de LDL procedente de plasma y en el nivel de colesterol celular en las células estrelladas hepáticas. La sobre regulación de SREBP-1 proporciona un bucle de retroalimentación positiva y facilita, a su vez, la expresión de PPAR $\gamma$ . En modelos animales de diabetes, la curcumina es capaz de mitigar las nefropatías causadas por la diabetes inhibiendo NF- $\kappa$ B y la endotelina-1 a través de la p300 (Weisberg y cols., 2008; Chen y cols., 2010).

## 7.6. Obesidad

La administración terapéutica de curcumina en la dieta a ratones *ob/ob* (obesos) ocasiona una pérdida significativa de peso y un aumento en la masa de tejido no graso (Weisberg y cols., 2008). La inhibición de la transcripción de las proteínas clave que participan en la formación de tejido adiposo podría explicar la pérdida de peso y la disminución de tejido adiposo que se observa en ratones C57/BL sustentados con curcumina (Ejaz y cols., 2009). En estudios anteriores también se ha observado una reducción en los niveles de citoquinas pro-inflamatorias y de proteína C reactiva, junto con una mayor pérdida de peso (Corbi y cols., 2002; Ziccardi y cols., 2002). Evidencias a partir de estudios *in vitro* e *in vivo* en ratones a los que se les aportaba una dieta con alto contenido en grasa demostró que la suplementación con curcumina puede aumentar la tasa metabólica basal, lo que contribuye a un mayor gasto de energía y pérdida de peso (Ejaz y cols., 2009). La pérdida de peso corporal y el aumento en el porcentaje de tejido no graso son extremadamente beneficiosos para la disminución de la resistencia a insulina y la mejora de la salud cardiovascular en personas obesas (Ejaz y cols., 2009; Weisberg y cols., 2008). En enfermedades como la obesidad, la administración de curcumina en la dieta mejora la glucemia de ratones C57BL/6J diabéticos inducidos por una dieta elevada en grasas y en ratones *ob/ob*, también conduce a aumentos en la adiponectina y la disminución de NF- $\kappa$ B hepática y de los marcadores de inflamación

hepáticos (Chiu y cols., 2009). Por lo tanto, hay evidencias que sugieren que, además de su efecto sobre el metabolismo de los lípidos, disminuyendo la síntesis de triglicéridos y aumentando la oxidación de AGs, la curcumina también puede reducir el peso corporal mediante el aumento de la tasa metabólica basal y la liberación de algunas citoquinas (Alappat y Awad, 2010).

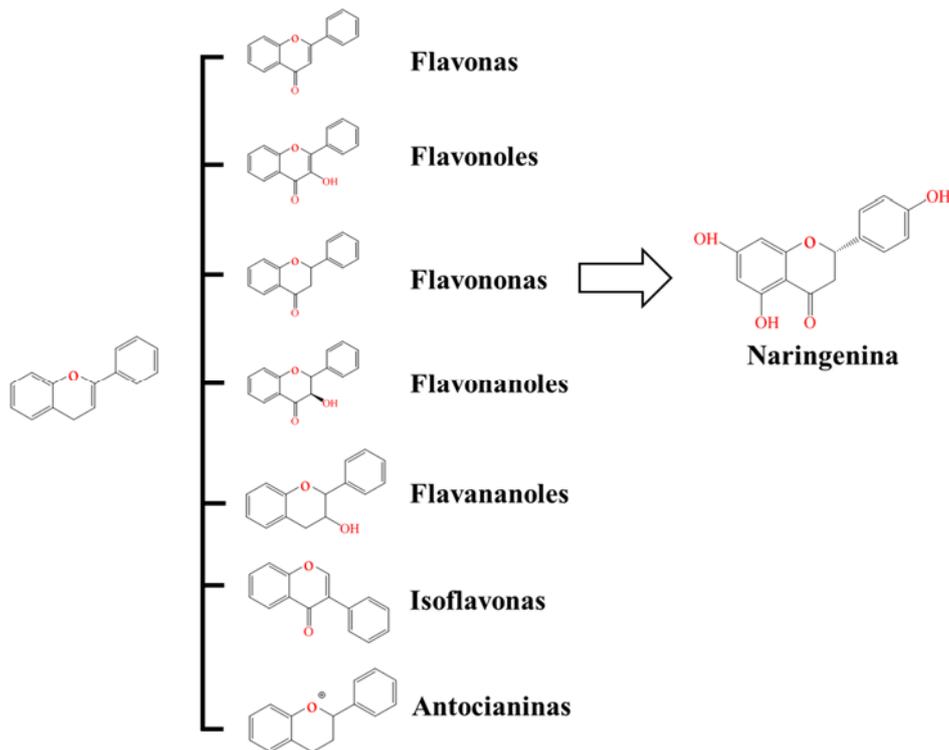
## 8. Naringenina

La naringenina es un flavonoide presente en alimentos de origen vegetal, como son los cítricos (Franke y cols., 2005). Los flavonoides son compuestos polifenólicos y solubles en agua resultantes del metabolismo secundario de las plantas (Winkel-Shirley, 2001). Contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante (Havsteen, 1983). Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a fenómenos de daño oxidativo (Mershiba y cols., 2013) y tienen efectos terapéuticos en numerosas patologías, incluyendo la isquémica, la aterosclerosis o cáncer (Knekt y cols., 2002).

### 8.1. Estructura y metabolismo

La estructura de los flavonoides se compone de dos anillos fusionados (un anillo aromático y uno heterocíclico) conectados con otro anillo aromático a través de un puente enlace carbono-carbono. Sobre la base de esa estructura de esqueleto molecular y los grupos hidroxilos, los flavonoides pueden ser subdivididos en varios subgrupos (Ververidis y cols., 2007):

La naringenina es una flavonona que es la forma aglicona de la naringina, que es la forma en la que los flavonoides de los cítricos pueden ser absorbidos por el lumen del intestino (Nielsen y cols., 2006). Principalmente está presente en los cítricos como la naranja, el limón o el pomelo (Felgines y cols., 2000). Los restos de azúcar de la naringenina pueden ser hidrolizados por las enzimas intestinales (por ejemplo,  $\beta$ -glucosidasa) (Day y cols., 1998) o por la microflora (Bokkenheuser y cols., 1987) del colon para liberar la naringenina.



**Figura 15. Diferentes tipos de flavonoides y estructura de la naringenina.** Los flavonoides son moléculas con tres anillos aromáticos. Existen siete tipos diferentes, y la naringenina pertenece a la categoría de las flavononas.

## 8.2. Efecto anti-inflamatorio

La naringenina es capaz de inhibir la respuesta inflamatoria. Esta inhibición puede ser por tres vías diferentes:

- Inhibiendo la respuesta inflamatoria inducida por LPS, a través de la inhibición de la fosforilación de las serinas 67 y 73 en el factor de transcripción AP-1 (*Activator Protein-1*) en macrófagos (Park y cols., 2012) lo que implica la inhibición de la COX-2 (Iwamura y cols., 2010).
- Inhibición de la secreción de citoquinas por linfocitos CD4 (Nie y cols., 2012).
- Inhibición de la unión NF- $\kappa$ B y la consiguiente reducción en la expresión de citoquinas estimuladas por este factor de transcripción (Sabarinathan y cols., 2011).

## 8.3. Metabolismo lipídico y cardioprotección

La naringenina mejora la hiperlipidemia, aumentando la oxidación de AGs hepáticos y la inhibición de la lipogénesis mediada por SREBP-1c tanto en hígado como en tejido muscular (Mulvihill y cols., 2009). Los ratones homocigotos deficientes para LDLR y

alimentados con una dieta occidental rica en grasas, adquirirían dislipidemia, resistencia a la insulina y una mayor probabilidad de desarrollar aterosclerosis (Merat y cols., 1999). Estos ratones tratados con naringenina en la dieta disminuían la dislipidemia, la hiperinsulinemia y la obesidad, lo que facilita la prevención de la aterosclerosis (Mulvihill y cols., 2010).

Además es capaz de regular la secreción de Apo B en células HepG2, posiblemente a través de la inhibición de la síntesis de los ésteres de colesterol (Wilcox y cols., 2001) y por la inhibición de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa y la acil coenzima A: colesterol O-aciltransferasa en ratas (Bok y cols., 1999).

#### **8.4. Función anti-oxidante**

La naringenina, al igual que otros muchos flavonoides, posee actividad anti-oxidante. Fue capaz de propiciar un efecto protector contra la nefrotoxicidad ocasionada por la gentamicina (un antibiótico) en ratas de experimentación. Las ratas tratadas sólo con naringenina o con gentamicina y naringenina presentaban niveles más bajos de creatinina sérica, malonaldehído en tejido de riñón, óxido nítrico, IL-8 y de actividad glutatión peroxidasa, todos indicadores de estrés oxidativo e inflamación. (Fouad y cols., 2014). Otras flavononas, como la hesperidina, también poseen propiedades antioxidantes en células de carcinoma sinovial SW982 (Choi y Lee, 2010). La naringenina, y la quercitina, son capaces de disminuir la producción de ROS en neutrófilos humanos estimulados con PMA (*Phorbol 12-myristate 13-acetate*) (Nishimura y cols., 2013). Otros muchos flavonoides tienen actividad anti-oxidante, dependiendo de su capacidad de retirar oxígeno reactivo especialmente en forma de aniones superóxidos, radicales hidroxilos, peróxidos lipídicos o hidroperóxidos. De esta manera bloquean la acción deletérea de dichas sustancias sobre las células (Bors y cols., 1990).

#### **8.5. Efecto anti-tumoral**

Un número creciente de sustancias naturales se han identificado como moduladoras del proceso de carcinogénesis; entre ellas se encuentran los flavonoides que han demostrado poseer efectos anti-mutagénicos y anti-carcinogénicos. Diversos datos

experimentales han demostrado la acción anti-proliferativa y anti-carcinogénica, así como el papel de agente quimiopreventivo de los flavonoides. Hay estudios *in vivo* en los que se observa que la administración oral de la naringenina a ratones C57BL6/N inoculados con células de melanoma B16-F10 reduce el número de metástasis pulmonares (Lentini y cols., 2007). En estudios *in vitro* con células de carcinoma hepidermoide humano (A431), la naringenina induce la muerte celular programa (apoptosis) al inducir la generación de ROS, activando así la vía de las caspasas (Ahamad y cols., 2014).

También hay ejemplos en los que el tratamiento conjunto de curcumina y naringenina tuvo efectos anti-tumorales. A ratones albinos suizos se les implantaron por vía intraperitoneal células de carcinoma de Ehrlich seguido de la administración de dosis orales de naringenina y curcumina, ya fuera individualmente o en combinación. Además de una evidente reducción en el número total de células, se observó que estos fármacos mostraron ser compuestos anti-angiogénicos y anti-proliferativos eficaces al inhibir el VEGF, subunidad  $\alpha$  del factor 1 inducible por hipoxia (Hif1 $\alpha$ , *Hypoxia-Inducible Factor 1- $\alpha$* ), la proteína de choque térmico 90 (Hsp90, *Heat Shock Protein*) y la fosforilación de la proteína quinasa B (Akt, *Protein Kinase B*) (Anand y cols., 2012).

## 9. Ácido oleico

El ácido oleico (18:1 cis 9, 18:1n9, o  $\omega$ -9) es un ácido graso monoinsaturado de gran interés nutricional debido a su prevalencia en la dieta Mediterránea. El aceite de oliva contiene un 72% de ácido oleico, en ello se diferencia de otros aceites de origen vegetal, que contienen principalmente AGs poliinsaturados como el ácido linoleico. El ácido oleico al ser monoinsaturado es menos susceptible de oxidación y contribuye a la alta estabilidad del aceite de oliva (Owen, 2000).

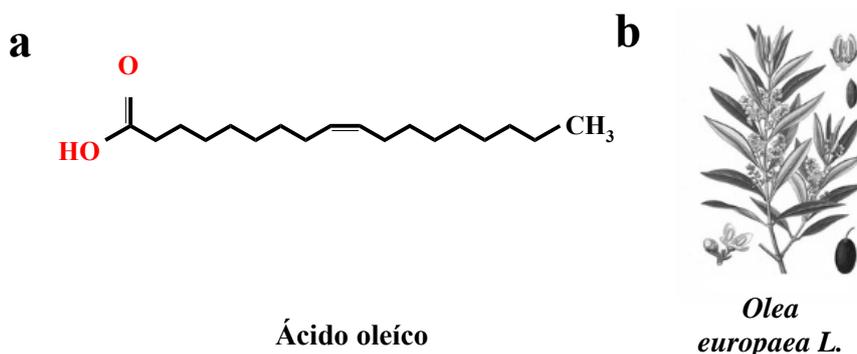


Figura 16. Estructura química del ácido oleico y planta de procedencia.

Además de ser un componente de la dieta, el AO (*Oleic acid*) se libera en la sangre por la conversión endógena de estearato, que es el componente más importante de los AGs libres en plasma (Dobrzyn y col., 2012; Hidalgo y cols., 2011). La concentración en sangre es alrededor de 914 mg/l (Glaser y cols., 2010).

### 9.1. Cardioprotección

Se ha descrito que los AGs saturados incrementan los niveles en sangre de colesterol total, colesterol LDL, y que los monoinsaturados y poliinsaturados reducen el colesterol LDL. Además de los niveles de lípidos en plasma, hay factores importantes en el desarrollo de la aterosclerosis tales como la modificación oxidativa. La hipótesis actual sobre el inicio de la aterosclerosis postula que las lipoproteínas LDL modificadas u oxidadas son reconocidas por el receptor CD46 del macrófago, el cual posteriormente se transforma en célula espumosa (Nicolisi, 2004).

Al ácido oleico se le atribuyen propiedades anti-aterogénicas (Carluccio, 1999). El oleico mantiene y/o puede aumentar los niveles de colesterol HDL y disminuir los niveles plasmáticos de colesterol LDL (Kien, 2014).

### 9.2. Inflamación

El papel exacto del ácido oleico en la inflamación tisular es aún una incógnita y hay numerosas publicaciones con resultados opuestos. Mientras que algunos autores han descrito que el AO tiene capacidad para reducir la inflamación provocada por agentes pro-oxidantes, tales como citoquinas, lipopolisacárido (LPS) o ésteres de forbol (Harvey y cols., 2010; Soumura y cols., 2010; Oh y cols., 2009; de Lima-Salgado y cols., 2011; Fito y cols., 2002), otros proponen que el AO actúa como una molécula pro-inflamatoria mediante la generación de ROS, la fosforilación de MAPKs y/o la activación de la proteína quinasa C (PKC, *Protein kinase C*) (Hidalgo y cols., 2011; Lamers y cols., 2011; Santos y cols., 2011; Greene y cols., 2001). En resumen, hay dos funciones opuestas del AO en una gran variedad de células y estados metabólicos.

### 9.3. Antineoplásico

Los estudios epidemiológicos atribuyen un papel protector al ácido oleico frente a determinados tipos de cáncer. Sin embargo, el conocimiento del mecanismo por el cual ejerce estos efectos es escaso. Numerosos estudios atribuyen un papel inhibidor de la proliferación de células tumorales al ácido oleico. Entre los mecanismos de acción, se encuentran su capacidad para suprimir la expresión de erbB-2 (*Erythroblastosis oncogene B*), un oncogén bien conocido por su implicación en la etiología, progresión y metástasis de distintos tipos de cáncer. Además, el ácido oleico podría jugar un papel en la activación de la señalización de calcio intracelular. El ácido oleico puede inducir apoptosis en células tumorales describiéndose como mecanismos implicados la producción de intracelular de especies reactivas o la activación de la actividad caspasa 3 (Trichopoulou, 2000). Por otro lado se ha descrito un papel citoprotector del AO asociado a una restauración en el balance de proteínas anti-apoptótica/pro-apoptótica en células pancreáticas AR42J (Ahn, 2013).

# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

### 1. Hipótesis

La activación de los receptores LXR conlleva a un aumento de la lipogénesis hepática y a un aumento de los niveles de triglicéridos circulantes, factores de riesgo vascular, debido a la inducción de SREBP1c. Este hecho supone un obstáculo importante en el desarrollo de estrategias farmacológicas para el uso de activadores de LXR como agentes terapéuticos. Existe un enfoque alternativo, por el cual se module post-transduccionalmente al receptor LXR mediante fosforilación, como ha sido descrito para otros receptores nucleares. Existe una conexión entre la activación de proteínas con actividad quinasa y el aumento de la transcripción de LXR (y de otros factores de transcripción) en células circulantes humanas, aunque los mecanismos bioquímicos subyacentes están aún por descifrar. Esta propuesta se fundamenta en observaciones preliminares, aún no publicadas, que indican que la activación de la AMPK por AICAR y el 5'-AMP, conlleva a una estimulación de la transcripción del LXR y de otros factores nucleares en células circulantes humanas (macrófagos y neutrófilos) y a un incremento de la expresión de proteínas esenciales para el transporte reverso del colesterol en estas células por un aumento de los transportadores ABCA1. Asimismo, hemos observado una menor producción de linfoquinas en estas células después de la activación de la AMPK.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo general**

El objetivo general de esta tesis doctoral es analizar el posible efecto de la fosforilación de proteínas quinasas sobre la expresión y regulación de LXR y sus genes diana (ABCA1, ABCG1 y SREBP1c). Se han empleado como agentes activadores de la AMPK dos compuestos fenólicos, la curcumina y la naringenina. Se ha estudiado también el efecto del ácido oleico, componente esencial de la dieta mediterránea, sobre la expresión de LXR y sus genes diana (ABCA1, ABCG1 y SREBP1c) y su relación con el efecto hipocolesterémico atribuido a esta molécula.

### **2.2. Objetivos específicos**

1. Identificar las vías de señalización que conllevan a la activación de LXR y sus genes diana (ABCA1 y G1, SREBP1c), mediado por la activación de proteínas quinasas (AMPK, p38 y ERK1/2) en células circulantes humanas (neutrófilos) y macrófagos procedentes de monocitos de línea celular humana (THP-1).
2. Estudiar el efecto de los agonistas de LXR sobre la actividad de la AMPK y viceversa.
3. Evaluar la funcionalidad biológica de los datos obtenidos en los procesos de transcripción, midiendo:
  - Expresión de los ABCs y SREBP1c como parámetros de la activación del LXR.
  - Variaciones en los niveles de ROS en células tratadas con los diferentes compuestos.
  - Medición del flujo reverso de colesterol en las células.
4. Analizar la influencia de la activación de LXR, a través de fosforilación de proteínas quinasas, sobre la respuesta inflamatoria.
5. Estudiar los efectos que provoca la activación de las proteínas quinasas en la liberación de ROS.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**



## MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 1. Reactivos

2-β-mercaptoetanol (Fluka, Sigma-Aldrich, Madrid, España).

3-amino-1,2,4-triazol (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

ADNasa I (Invitrogen, Barcelona, España).

Albúmina de suero bovino (*Bovine Serum Albumin*, BSA) (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Anti-ERK 1/2 (New England Biolabs, Beverly, MA, EEUU).

Anti-GAPDH (Chemicon International, Inc, Temecula, CA, EEUU).

Anti-IgG de conejo, ratón o cabra conjugados a peroxidasa (anti-IgG-HRP) (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Anti-JNK 1/2 (Santa Cruz, CA, EEUU).

Anti-p-ERK 1/2 (Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>) (New England Biolabs, Beverly, MA, EEUU).

Anti-p-JNK 1/2 (Thr<sup>183</sup>/Tyr<sup>185</sup>) (Santa Cruz, CA, EEUU).

Anti-p-p38MAPK (Thr<sup>180</sup>/Tyr<sup>182</sup>) (New England Biolabs, Beverly, MA, EEUU).

A-Sefarosa (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Azul de bromofenol (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Cloroformo: isoamilalcohol (dilución 49:1) (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Coomassie Brilliant Blue G-250 (Merck, Darmstadt, Alemania).

Dextrano (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia).

2,7-diclorohidrofluoresceína diacetato (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

dNTPs (Promega, Madison, WI, EEUU).

Etanol absoluto (Merck, Darmstadt, Alemania).

Ficoll-Paque (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia).

Fijador (Kodak Co., Paris, Francia).

Fenol (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Glicerol (Química de Montcada SA, Madrid, España).

Peróxido de hidrógeno H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Isopropanol (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Inhibidor de ribonucleasa Rnasin (Promega, Madison, WI, EEUU).

Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Paisley, UK)

Luminol (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Marcador de peso molecular (PCR Markers) (Promega, Madison, WI, EEUU).

Marcador de peso molecular (BIO-RAD, Ritchmond, EEUU).

Medio mínimo Opti-MEM (Invitrogen, Paisley, UK)

MG132 (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Metanol absoluto (Merck, Darmstadt, Alemania).

NADH (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

NADPH (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

NaN<sub>3</sub> (Merck, Dannstadt, Alemania).

NaOH 1M (Panreac, Madrid, España).

N-ethymaleimide (NEM) (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP) (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Nonidet p40 (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

o-Phthalaldehyde (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Oil Red O (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Papel de filtro reforzado (BIO-RAD, Ritchmond, EEUU).

Partenolide (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Películas fotográficas (Kodak-X-Omat, Rochester, EEUU).

Peroxidasa (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Piruvato sódico (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Madrid, España).

Probenecid (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Revelador (Kodak Co., Paris, Francia).

Rojo fenol (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Suero fetal bovino (*Fetal Bovine Serum*, FBS) (Lonza, Walkersville, MD, USA).

Tampón de carga (Blue/orange 6x Loading Dye) (Promega, Madison, WI, EEUU).

Transcriptasa inversa M-MLV-RT (Promega, Madison, WI, EEUU).

Tubos de sangre heparinizados (Becton-Dickinson, Plymouth, Reino Unido).

Tween-20 (Merck, Darmstadt, Alemania).

Xantina (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Xantina oxidasa (Boehringer Mannheim, Alemania).

## **2. Normas éticas**

La sangre venosa periférica se extrae de voluntarios sanos siguiendo los protocolos estandarizados aprobados por el Comité de Ética en Investigación del Hospital Virgen Macarena, Universidad de Sevilla. El presente estudio cumple con los requisitos para la experimentación en seres humanos, que se refiere específicamente a la extracción de sangre anónima de muestras de voluntarios sanos, cuyo consentimiento fue verbal, y, además, cumple con la legislación española y europea en general en vigor, según el informe de ética correspondiente emitida por la Universidad de Sevilla. El Comité de Ética de la Universidad aprobó el uso de un protocolo de consentimiento verbal con el objetivo de facilitar el procedimiento de obtención de la muestra y la gestión, tan pronto como sus proveedores se mantuvieron anónimos en todo momento. La extracción de las muestras de sangre siguió un protocolo hospitalario rutinario, y en el cual se solicitó el consentimiento verbal simple de pacientes en nuestro hospital. La sangre obtenida fue utilizada únicamente para fines de investigación. Las medidas adoptadas para documentar el proceso que incluye la manipulación de datos fueron estrictamente mantenidas en el anonimato y por el cual nuestro grupo no tuvo ni tiene acceso a los datos de los pacientes no relacionados con nuestro estudio. La investigación se diseñó y llevó a cabo de acuerdo con los principios éticos para las investigaciones médicas como se indica en la Declaración de Helsinki.

## **3. Aislamiento de neutrófilos humanos**

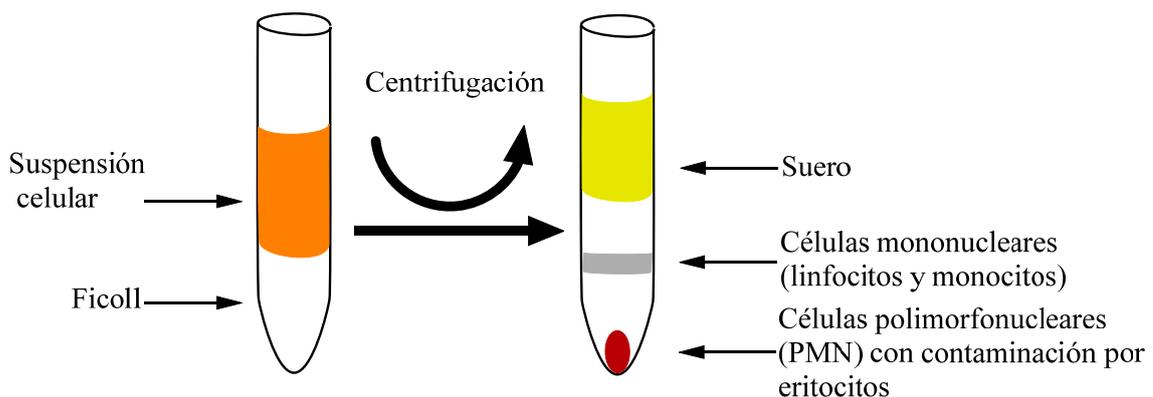
Los neutrófilos se obtuvieron a partir de sangre de sujetos sanos en el Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla. El criterio para la selección de sujetos fue el no estar bajo algún proceso infeccioso. Tal extracción de sangre fue aprobada por el comité ético del Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla. Antes de la misma, cada sujeto dio su consentimiento informado.

### ***Soluciones:***

- Solución de dextrano al 10%, disuelto en ClNa al 0.9%
- ClNa al 0.9% y al 1.8%
- Tampón fosfato salino (PBS): 10 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  a pH 7.4 y 150 mM de ClNa.

### ***Procedimiento:***

La sangre de los pacientes fue obtenida por venipuntura al vacío en tubos heparinizados. En los tubos, la sangre se mezcla con una solución de dextrano (0.7% de concentración final) y se deja reposar durante 45-60 min en posición vertical. Pasado este tiempo, se extrae la suspensión formada en la fase superior con pipeta “Pasteur” y se vierte en tubos que contienen una solución de Ficoll-Paque, en una proporción 1:2 de Ficoll: sangre. La suspensión debe añadirse cuidadosamente para evitar que se mezcle con el Ficoll-Paque. Después, las muestras se centrifugan a 1,200 x g durante 20 min a 4°C, con freno suave para permitir la correcta formación del gradiente, obteniéndose las fracciones mostradas en la Figura 18. Se extraen de los tubos las fases superiores, (de arriba a abajo: suero, anillo linfocitario y Ficoll) accediendo así al precipitado, compuesto por neutrófilos y eritrocitos. Éste se somete a un choque hipotónico para eliminar los eritrocitos: los precipitados se resuspenden en 5 ml de agua destilada y desionizada (H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>). Pasados unos 20 seg, se añaden otros 5 ml de ClNa al 1.8% que devuelven la solución a una concentración isotónica (Carballo y cols., 1999). Las suspensiones celulares obtenidas se centrifugan a 400 x g durante 5 min a 4°C. Los precipitados resultantes se someten a dos procesos de lavado por resuspensión en 10 ml de PBS y centrifugación a 400 x g durante 5 min a 4°C. Finalmente, los precipitados conseguidos, que corresponden a neutrófilos humanos, se resuspenden en el medio de cultivo apropiado. En otros trabajos de nuestro grupo se ha verificado por técnicas de citometría de flujo que el 90-95 % de las células obtenidas corresponden a neutrófilos.



**Figura: 17. Obtención de neutrófilos humanos de sangre periférica**

#### **4. Obtención de macrófagos humanos**

Los monocitos fueron obtenidos de preparaciones buffy-coat obtenidos del Centro Regional de Transfusiones sanguíneas de Sevilla- Huelva y Banco de Tejidos.

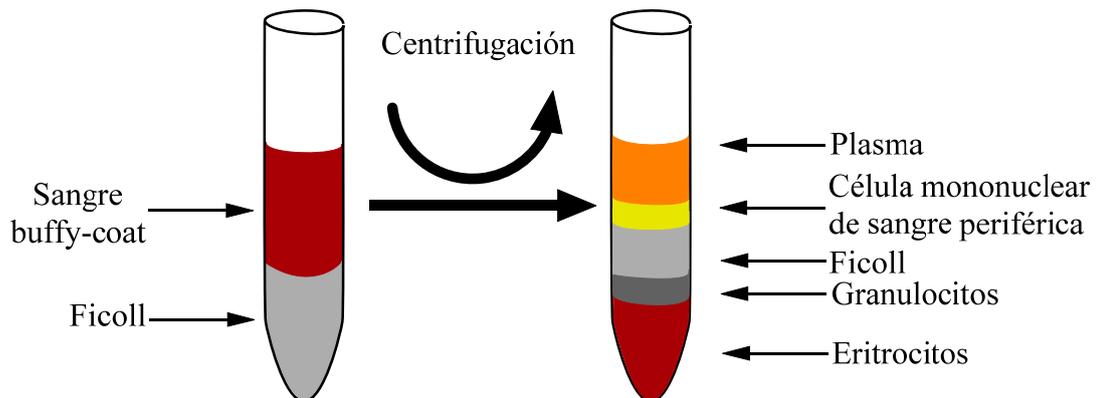
**Soluciones:**

– Tampón fosfato salino (PBS): 10 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  a pH 7.4 y 150 mM de  $\text{ClNa}$ .

– Solución BSA 4 mg/ml en PBS.

**Procedimiento:**

La sangre diluida se distribuye, con pipeta Pasteur en tubos de fondo cónico de 50 ml sobre una solución de Ficoll-Hypaque en una proporción 1:2 (15 ml de ficoll y 30 ml de sangre). La dilución debe añadirse cuidadosamente para evitar que se mezcle con el Ficoll-Hypaque. Las muestras se centrifugan a  $1,600 \times g$  durante 20 min a  $4^\circ\text{C}$ , obteniéndose las fracciones que se muestran en la Figura 19. El anillo formado en la interfase del gradiente, que contiene las células mononucleares (linfocitos y monocitos) se recoge con pipeta Pasteur de vidrio y se coloca en un tubo cónico. Seguidamente se añade BSA/PBS hasta completar un volumen de 50 ml y se centrifugan a  $400 \times g$  a  $4^\circ\text{C}$ , durante 10 min.



**Figura: 18. Obtención de monocitos humanos de buffy-coat**

El precipitado se lava otra vez con BSA/PBS como en el paso anterior. Las células mononucleares obtenidas se resuspenden en medio de cultivo y se incuban a  $37^\circ\text{C}$  durante 1 hora en cajas de Petri pequeñas (5 ml/placa) de la marca Falcon (Corning, New York, USA). Pasado este tiempo, se aspira el medio de cultivo con las células en suspensión y se descartan. Los monocitos, que permanecen adheridos se lavan 2 veces con PBS atemperado, y se les añade medio de cultivo completo para realizar los tratamientos.

## 5. Cultivos celulares de línea

Trabajamos con las líneas celulares RAW 264.7 de ratón y THP-1 de humano (ATCC, Virginia, USA). Ambas líneas se mantuvieron en cultivo con medio de cultivo completo: RPMI 1640 suplementado con FBS al 10% (v/v), 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y 2.5 µg/ml de anfotericina B (Bio Media, Boussens, Francia). Todas las líneas se mantuvieron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

## 6. Cuantificación del número de células y análisis de la viabilidad celular

### 6.1. Test de exclusión del Azul Tripán y cuantificación celular

La viabilidad de las células obtenidas se analiza mediante el test de exclusión con Azul Tripán. El Azul Tripán es un colorante que penetra en células rotas, con pérdida de la integridad de su membrana, apareciendo éstas teñidas de azul al microscopio.

#### *Procedimiento:*

La solución de azul tripán se prepara al 0.4% en NaCl al 0.9%. Para la cuantificación celular, se toma una alícuota de la suspensión celular y se diluye 1:10 en tampón PBS. Después, en un tubo de 1.5 ml se mezclan 80 µl de PBS, 10 µl de solución de azul tripán y 10 µl de la suspensión celular, y se incuba durante 1 min. A continuación se toman 10 µl de esta mezcla y se depositan sobre una cámara de Neubauer 0.00025 mm<sup>2</sup> (Superior, Alemania). En el microscopio óptico (a 40X de aumento) se cuentan las células localizadas en las zonas de 4x4 cuadrículas. Para calcular el número de células y el porcentaje de viabilidad celular se aplican las siguientes fórmulas:

$$\text{n}^\circ \text{ células/ml} = \text{media de células contadas} \times 10^4 \times \text{dilución (10 en nuestro caso)}.$$

$$\% \text{ viabilidad} = (\text{células no teñidas/células totales}) \times 100$$

## 6.2. Medida de la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH)

Las células no viables incrementan la permeabilidad de su membrana plasmática a enzimas intracelulares, que son liberadas al medio extracelular. El cociente entre la actividad de estas enzimas en el medio extracelular y la actividad total de las mismas (actividad en intra y extracelular) es un índice de la viabilidad celular. En esta técnica de medida de la lactato deshidrogenada (LDH) lo que mediremos será la oxidación de la NADH por la LDH (Marino, 1993).



### *Soluciones:*

- Tampón de análisis: Tris-HCl 1 M pH 8 con EDTA 5 mM

### *Procedimiento:*

En una cubeta de espectrofotómetro añadimos 100 µl de tampón de análisis, 20 µl de NADH 10 mM, 20 µl del sobrenadante celular y 760 µl de H<sub>2</sub>O. Se atemperó a 37°C, y se inicia la reacción con 100 µl de piruvato sódico 10 mM. Se mide la absorbancia durante 10 minutos en un espectrofotómetro (Perkin-Elmer Hispania, Barcelona, España) a 37°C a una longitud de onda de 340 nm. En todos los experimentos de la presente tesis la viabilidad celular osciló entre el 95-98%.

## 7. Incubación de células

### *Medios de cultivo:*

– Medio de cultivo completo: RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 10% (v/v), 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y 2.5 µg/ml de anfotericina B (Bio Media, Boussens, Francia).

– Medio Krebs-Ringer-HEPES (KR-HEPES): 25 mM de HEPES a pH 7.4, 118 mM de ClNa, 4.75 mM de KCl, 1.25 mM de CaCl<sub>2</sub>, 1.18 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.18 mM de MgSO<sub>4</sub> y 10 mM de glucosa.

***Procedimiento:***

En todos los experimentos, salvo donde se indica, las células fueron incubadas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> en medio de cultivo completo a una concentración de 1x10<sup>7</sup> células/ml.

**8. Medición de la peroxidación lipídica**

Para medir la peroxidación lipídica se empleó el sistema del hierro/ascorbato modificado por la acción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, usando el malondialdehído (MDA) como marcador.

***Soluciones:***

- Solución FeSO<sub>4</sub> 0,1 mM
- Solución Ascorbato 1 mM
- Peróxido de hidrógeno H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1 mM
- Malondialdehído (MDA)

***Procedimiento:***

Los neutrófilos fueron incubados con OA durante 5 h. Posteriormente, se añadió ya sea 0,1 mM de FeSO<sub>4</sub>, 1 mM ascorbato más 0,1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o 50 mM de FeSO<sub>4</sub>, 0,5 mM de ascorbato y 50 nM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y las células se incubaron durante 1 h a 37°C. La cantidad de MDA formado durante la reacción se cuantificó espectrofotométricamente usando un método colorimétrico. La peroxidación lipídica se expresó como moles de MDA formado por mg de proteína celular.

**9. Medida de la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS).**

Los niveles del anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) de los ROS y del peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) se han analizado por cinco métodos diferentes. Cada uno con su especificidad particular para localizar y analizar el tipo de ROS producido.

**9.1. Análisis de la producción de ROS (luminol)**

Los niveles de O<sub>2</sub><sup>-</sup> se analizan mediante el método basado en el luminol. Esta molécula difunde libremente a través de las membranas celulares y reacciona con los ROS produciendo luminiscencia (El Bekay y cols., 2003).

***Soluciones:***

- Medio KR-HEPES.

***Procedimiento:***

Las células se resuspenden en medio KR-HEPES a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml y se incuban a  $37^\circ\text{C}$  durante 5 min. Después, se añade  $15 \mu\text{M}$  de luminol y  $2 \mu\text{g/ml}$  de peroxidasa. Se realiza una lectura basal de luminiscencia durante 5 min, usando un luminómetro BioOrbit 1250 (BioOrbit, Turku, Finlandia). Posteriormente, se añaden los distintos agentes a estudiar y se mide la producción de ROS en base a los incrementos de luminiscencia a  $37^\circ\text{C}$ .

**9.2. Análisis de la producción de ROS (Hidroetidina)**

La hidroetidina es un reactivo oxidado intracelularmente por radicales de oxígeno para producir bromuro de etidio, el cual se une fuertemente al ADN emitiendo una fluorescencia de color rojo fuerte.

***Soluciones:***

- Medio KR-HEPES.

***Procedimiento:***

Las células se resuspenden en medio KR-HEPES a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml y  $2 \text{ mM}$  de hidroetidina. Se preincuban a  $37^\circ\text{C}$  durante 5 min. Después, se añaden los tratamientos y se mide la producción de ROS usando longitudes de onda de excitación/emisión de  $550 \text{ nm}/615 \text{ nm}$  en el equipo Victor<sub>2</sub> Wallac 1420 (Perkin-Elmer).

**9.3. Análisis de ROS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular (DCFDA)**

El nivel de peróxidos intracelulares, se usa como indicador del estado redox intracelular, se determinó mediante el método basado en la fluorescencia del 2,7-diclorohidrofluoresceína diacetato (DCFDA). DCFH-DA es un compuesto no polar que es convertido en un derivado polar no fluorescente impermeable a la membrana (DCFH) por esterasas celulares después de la incorporación a las células. La DCFH es oxidada rápidamente a 2',7' diclorofluoresceína (DCF) fluorescente por el peróxido de hidrógeno intracelular.

***Soluciones:***

- Tampón de análisis: medio KR-HEPES completado con  $2.5 \text{ mM}$  probenecid.

### ***Procedimiento:***

Las células se resuspenden, a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml, en un tampón de análisis que contiene probenecid (inhibidor del transporte de aniones a través de membrana) y 2.5 mM de 3-amino-1,2,4-triazol para inhibir las potentes catalasas intracelulares (Nicholls, 1962). A continuación se añade 2.5  $\mu$ M de DCFDA y las células se incuban a 37°C durante 1 h en oscuridad. Tras este periodo, las células se lavan dos veces con tampón de análisis y se resuspenden nuevamente en 1 ml de este tampón. La emisión de la DCF oxidada atrapada en las células pretratadas con o sin estímulos se midió usando un citómetro de flujo (FC500; Becton-Dickinson, Mountain View, CA, USA). Los datos se analizaron usando el programa FlowJo.

## **10. Silenciamiento con ARN de interferencia**

Para la inhibición de la expresión de determinadas proteínas se utiliza la técnica del silenciamiento con ARN de silenciamiento (ARNsi). Los ARNsi son una herramienta de silenciamiento post-transcripcional de genes específicos, muy utilizada para estudiar el efecto que produce inhibir la expresión de una proteína específica. Para ello, se transfectan las células con oligonucleótidos de un número bajo de pares de bases que se unen al ARN mensajero específico, produciendo así su degradación (Fire y cols., 1998). Los ARNi utilizados fueron comprados a SCBT (Dallas, Texas, USA). Se comprobó en la base de datos del genoma humano mediante el programa BLAST, que los oligonucleótidos comprados no afectaban a otros genes del genoma. Como control de las transfecciones se usó una mezcla de oligonucleótidos comercial llamada Control siRNA-A (SCBT) que no afecta a la expresión de ningún gen del genoma humano.

### ***Soluciones:***

- Solución de PMA 80 nM (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Tampón fosfato salino (PBS): 10 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  a pH 7.4 y 150 mM de ClNa.

### ***Procedimiento:***

Sembramos  $5 \times 10^6$  células por pocillo en una placa P-6 con medio completo suplementado con PMA 80 nM para diferenciarlas las células. Transcurridas 72 horas, retiramos el medio y lavamos con PBS (2 veces) los pocillos. Posteriormente, añadimos medio mínimo Opti-MEM y dejamos en incubación 12 horas. Se prepara una dilución

de los oligonucleótidos del gene a silenciar en medio Opti-MEM y se incuba durante 20 minutos a temperatura ambiente con una mezcla de este mismo medio y lipofectamina 2000. Pasado ese tiempo, se retiró el medio de transfección y lavamos con PBS (2 veces) y añadimos 1 ml de Opti-MEM, la dilución de oligonucleótidos y los controles a los pocillos y dejamos en incubación entre 8 y 12 horas. Transcurrido ese período de tiempo añadimos medio completo atemperado con el doble de PBS y penicilina/estreptomicina, y dejamos incubando 24 horas. Tras ese tiempo, añadimos los tratamientos y recogemos las células mediante rascado para su posterior lisis y análisis.

## **11. Obtención de proteínas celulares**

### **11.1. Aislamiento de proteínas totales**

#### ***Soluciones de lisis:***

- Tampón de lisis en experimentos sobre fosforilación de p38MAPK y niveles de GAPDH: 20 mM de Tris-HCl a pH 7.4, 2 mM de EDTA, 50 mM de DTT, 50 mM de NaF, 1% de Nonidet-P40, 1% de Triton X-100, 3 mM de diisopropil fluorofosfato, 10 µg/ml de leupeptina, 10 µg/ml de aprotinina, 10 µg/ml de inhibidor de tripsina, 10 µg/ml de TPCK, 10 µg/ml de captopril, 1mM de benzimidina, 1 mM de PMSF, 10 mM de iodoacetamida, 2 mM de ortovanadato sódico y 100 µM de óxido de fenilarsina (PAO).

- Tampón de lisis en experimentos sobre fosforilación de ERK 1/2 y JNK 1/2: 20 mM de Tris-HCl pH 7.4, 50 mM de β-mercaptoethanol, 2 mM de EDTA, 25 mM de NaF, 1% de Nonidet p-40, 1% de Triton X-100, 10 µg/ml de leupeptina, 10 µg/ml de aprotinina, 10 µg/ml de inhibidor de tripsina, 10 µg/ml de TPCK, 10 µg/ml de captopril, 1mM de benzimidina, 1 mM de PMSF, 10 mM de iodoacetamida, 2 mM de ortovanadato sódico y 100 µM de óxido de fenilarsina (PAO).

- Tampón de lisis en experimentos sobre expresión de HO-1: 50 mM de Tris-HCl a pH 7.4, 10 mM de EDTA, 50 mM de NaF, 10% de glicerol, 1% de Triton X-100, 10 µg/ml de leupeptina, 10 µg/ml de aprotinina, 10 µg/ml de inhibidor de tripsina, 10 µg/ml de TPCK, 10 µg/ml de captopril, 1mM de benzimidina, 1 mM de PMSF, 10 mM de iodoacetamida, 2 mM de ortovanadato sódico y 100 µM de óxido de fenilarsina (PAO).

#### ***Procedimiento:***

Las células se centrifugan a 400 x g durante 5 min a 4°C. Los precipitados celulares se lavan dos veces por resuspensión en 1 ml de PBS frío, seguido de una centrifugación a 400 x g durante 5 min a 4°C. Seguidamente, los precipitados celulares obtenidos se resuspenden en la solución de lisis apropiada (10 µl por cada 1x10<sup>6</sup> células) y se mantienen en hielo durante 30 min, agitando cada 5 min. Después, las muestras se lisan mediante ultrasonidos, en hielo, tres veces a 12 microns durante 2 seg. Las suspensiones resultantes se centrifugan a 12,000 x g durante 5 min a 4°C. Los sobrenadantes obtenidos, que corresponden a las proteínas celulares totales, se dividen en dos fracciones: una alícuota se utiliza para cuantificar la concentración de proteínas, y el resto se usa en las técnicas de análisis de proteínas (ver sección 15).

### **11.2. Cuantificación de la concentración de proteínas**

Se basa en el método diseñado por Bradford (Bradford, 1976). Este método se fundamenta en el desplazamiento de la longitud de onda máxima de absorción, de 465 a 595 nm, que experimenta el azul de Coomassie G-250 cuando se une a proteínas. La cuantificación de la medida colorimétrica necesariamente debe referirse a una recta de calibrado, obtenida a partir de unas concentraciones conocidas de proteínas. El contenido proteico del extracto problema se calcula por interpolación en dicha recta.

#### ***Soluciones:***

– Reactivo Bradford: 10 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 disueltos en 5 ml de etanol al 95%, 10 ml de ácido ortofosfórico al 85% y H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> hasta completar un volumen de 100 ml.

#### ***Procedimiento:***

El único reactivo que se emplea para esa técnica es el reactivo de Bradford. El calibrado se realiza a partir de una disolución de BSA de 0.1 µg/ml, mediante el siguiente protocolo. En pocillos rotulados como B, 1, 2, 3, 4, y 5, de una microplaca de 96 pocillos, se añaden por duplicado las cantidades indicadas a continuación:

|                     | B      | 1      | 2      | 3      | 4      | 5      |
|---------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| BSA (0.1 µg/ml)     | -      | 5 µl   | 10 µl  | 15 µl  | 20 µl  | 25 µl  |
| R. Bradford         | 200 µl |
| H <sub>2</sub> O dd | 50 µl  | 45 µl  | 40 µl  | 35 µl  | 30 µl  | 25 µl  |
| [prot] µg/250 µl    |        | 0.5    | 1.0    | 1.5    | 2.0    | 2.5    |

**Tabla 3. Condiciones para la realización de la curva de calibrado**

Se agita suavemente y se espera el desarrollo del color, durante 5-10 min a temperatura ambiente. Se mide la absorbancia a 595 nm frente al blanco, y se representa gráficamente la absorbancia (media de los duplicados) a 595 nm frente a la concentración final de proteína. Se representa la ecuación de la recta y se calcula la pendiente “a” de la misma.

Para cuantificar el contenido proteico del extracto celular se toman 2 µl del mismo y se diluyen en un tubo 1.5 ml hasta 20 µl con H<sub>2</sub>O dd (dilución 1:10). En esta dilución se cuantifica el contenido de proteínas, como sigue: en pocillos de una microplaca de 96 pocillos se añade (por duplicado) 198 µl de reactivo de Bradford, 50 µl de H<sub>2</sub>O dd y 2 µl de extracto celular diluido. Se agita suavemente y se espera el desarrollo del color durante 5-10 minutos. Se mide la absorbancia a 595 nm. Se interpolan los datos obtenidos en la recta de calibrado, obteniéndose los resultados a partir de la siguiente fórmula:

$$\frac{\bar{X}_{\text{absorbancia}_{595} \text{ muestradiluida}} - \bar{X}_{\text{absorbancia}_{595} \text{ blanco}}}{\text{pendiente recta "a"}}$$

Por último, sólo falta multiplicar los resultados por el factor de dilución del extracto (10 en nuestro caso) y dividirlo entre el número de µl añadidos en el pocillo (2 en nuestro caso). De esta forma obtenemos la concentración de proteínas expresada en µg/µl.

## 12. Análisis de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

### 12.1. Preparación de muestras

#### *Soluciones:*

– Tampón de carga “Laemmli” (x4): 62.5 mM de Tris-HCl a pH 6.8, 10% de glicerol, 2% de SDS, 0.001% de azul de bromofenol y 5% de 2-β-mercaptoetanol.

#### *Procedimiento:*

Las muestras se mezclan con tampón de carga Laemmli de la siguiente forma: al volumen de la muestra se le añade 1/3 de ese volumen en tampón de carga Laemmli (x4). Después, las muestras se incuban a 95°C durante 5 min para reducir los enlaces disulfuro entre las subunidades. Las muestras se centrifugan a 12,000 x g durante 5 min a 4°C, precipitando así los restos no disueltos (ADN, membranas, etc...). Finalmente, las muestras se conservan a –80°C hasta su uso.

### 12.2. Inmunoprecipitación

La inmunoprecipitación de proteínas está realizada tal como se describe en (Carballo y cols., 1999).

#### *Soluciones:*

- Tampón de lisis: 50mM Tris-HCl a pH 7.4, 300 mM de NaCl, 5 mM de EDTA, 1 % de tritón X-100, 10 µg/ml de leupeptina, 10 µg/ml de aprotinina, 10 µg/ml de inhibidor de tripsina, 10 µg/ml de TPCK, 10 µg/ml de captopril, 1mM de benzimidina, 1 mM de PMSF, 10 mM de iodoacetamida, y 100 µM de óxido de fenilarsina (PAO).

- Tampón de unión al anticuerpo: 80 mM de Tris-HCl a pH 7.5, 200 mM de KCl, 4 mM de EDTA, 4 mM de DTT, 0.4 % de NP-40, 10 µg/ml de leupeptina, 10 µg/ml de aprotinina, 10 µg/ml de inhibidor de tripsina, 10 µg/ml de TPCK, 10 µg/ml de captopril, 1mM de benzimidina, 1 mM de PMSF, 10 mM de iodoacetamida, y 100 µM de óxido de fenilarsina (PAO).

#### *Procedimiento:*

Después del tratamiento, las células fueron recogidas por un pulso de centrifugación y lisadas en 250 µl de tampón de lisis, dejándolas en hielo durante 30 min, agitando cada 5 min. Las muestras se lisan mediante ultrasonidos, en hielo, tres veces a 12 microns durante 2 seg. Después, las muestras se centrifugan a 10,000 x g durante 5 min a 4°C. A 200 µl de sobrenadante se le añade 200 µl de tampón de unión al anticuerpo y

2 µg de anticuerpo, y se deja incubar a 4°C en agitación durante toda la noche. Después, se añade 40 µl de A-Sepharosa y se deja en agitación otras 4 h. a 4°C. Se centrifuga a 10,000 x g durante 5 min y se lavan los precipitados con tampón de lisis 2 o 3 veces. Finalmente, se le añade al precipitado 30 µl de tampón de carga Laemmli (1X) y se continúa con la electroforesis de forma habitual. Los complejos inmunes se lavaron cinco veces con tampón de lisis frío y las proteínas se extrajeron calentando hasta llegar al punto de ebullición en tampón Laemli (1X). Después de la electroforesis y la transferencia, las membranas se incubaron con los anticuerpos para fosfoserina o para LXR como se indica.

### **12.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)**

El sistema empleado es una electroforesis discontinua, que utiliza dos tipos de geles: un gel concentrador (de poros grandes) en la zona superior y un gel separador (de poros pequeños) en la zona inferior. La concentración de acrilamida del gel separador depende del peso molecular de la proteína a analizar: Así, gel separador al 7.5%, en los experimentos con proteínas con mayor peso molecular; gel separador al 10%, en los experimentos con proteínas de peso medio, como en la fosforilación de MAPKs y gel separador al 12.5%, en los experimentos con proteínas de menor peso.

#### ***Soluciones:***

– Gel separador de acrilamida al 7.5%: 2.5 ml de acrilamida:bis-acrilamida (29.2:0.8), 4.4 ml de H<sub>2</sub>O, 2.5 ml de Tris-HCl 1.5 M a pH 8.8, 100 µl de SDS al 10%, 50 µl de persulfato amónico al 10%, 5 µl de TEMED.

– Gel separador de acrilamida al 10%: 3.3 ml de acrilamida:bis-acrilamida (29.2:0.8), 3.5 ml de H<sub>2</sub>O, 2.5 ml de Tris-HCl 1.5 M a pH 8.8, 100 µl de SDS al 10%, 50 µl de persulfato amónico al 10%, 5 µl de TEMED.

– Gel separador de acrilamida al 12.5%: 4.16 ml de acrilamida:bis-acrilamida (29.2:0.8), 2.73 ml de H<sub>2</sub>O, 2.5 ml de Tris-HCl 1.5 M a pH 8.8, 100 µl de SDS al 10%, 50 µl de persulfato amónico al 10%, 5 µl de TEMED.

– Gel concentrador: 430 µl de acrilamida:bis-acrilamida (29.2:0.8), 1.88 ml de H<sub>2</sub>O, 830 µl de Tris-HCl 0.5 M a pH 6.8, 33 µl de SDS al 10%, 16 µl de persulfato amónico al 10%, 3.3 µl de TEMED.

– Tampón de electroforesis: 25 mM de Tris-HCl a pH 8.3, 192 mM de glicina y SDS al 0.1%.

***Procedimiento:***

Los geles se prepararon utilizando el Miniprotean II de Bio-Rad. Para ello, primero se prepara la solución separadora dejándola polimerizar en el sistema. Para evitar el efecto inhibitor del oxígeno atmosférico sobre la polimerización se añade 1 o 2 ml de mezcla 1:1 de agua-isobutanol sobre la solución. Una vez polimerizado, se elimina el agua-isobutanol, se lava varias veces con agua y se añade sobre el gel la solución del gel concentrador, en el cual se construyen los pocillos para las muestras con un peine que se coloca antes de la polimerización y que se retiraba tras esta. Una vez preparados, los geles se introducen en una cubeta llena de tampón de electroforesis. Después, las muestras se depositan en cada pocillo del gel concentrador, cargando la misma cantidad de proteínas (50-80 µg). También en uno de los pocillos se carga una solución comercial con una mezcla de proteínas conocidas (como marcador de peso molecular). Seguidamente, los geles se someten a una corriente eléctrica con voltaje constante de 100-150V durante 1 o 2 h. La electroforesis se detiene cuando el frente de desplazamiento se sitúa aproximadamente a 5 mm del límite inferior del gel.

**13. Transferencia “semi-seca” de proteínas a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF)**

Las transferencias se realizan por el método conocido como “semi-seco”. El voltaje y la duración de la transferencia depende del peso molecular de la proteína a analizar: 10-15 V durante 35-45 min.

***Soluciones:***

- Tampón de transferencia: 25 mM de Tris base, 192 mM de glicina y metanol al 20%.

***Procedimiento:***

En primer lugar las membranas de PVDF se activan por incubación en metanol absoluto durante 30 seg. Después, las membranas junto con los otros elementos necesarios para la transferencia (gel de electroforesis y papeles de filtro) se incuban en tampón de transferencia durante 5-10 min. Siguiendo las instrucciones del fabricante,

los distintos elementos se ensamblan en el dispositivo de transferencia, evitando la formación de burbujas de aire. La transferencia se inicia con la aplicación de una corriente eléctrica con voltaje constante. Una vez completada y siguiendo el protocolo de detección rápida de proteínas descrito por Mansfield, las membranas se lavan dos veces en H<sub>2</sub>O durante 5 min para eliminar el exceso de sales. A continuación, las membranas se incuban en metanol absoluto durante 30 seg y se secan a temperatura ambiente durante 1-2 h. o bien a 37°C durante 30 min.

#### 14. Análisis de proteínas por inmunodetección

##### 14.1. Incubación de las membranas de PVDF con anticuerpos

###### *Soluciones:*

- Solución para anticuerpos específicos o primarios: PBS suplementado con 0.5% de BSA y 0.02% de Tween-20.

- Solución para anticuerpos secundarios: PBS suplementado con 0.5% de caseína.

###### *Procedimiento:*

Las membranas se incuban a 4°C durante toda una noche o a temperatura ambiente durante 1 o varias horas (según tabla) con el anticuerpo específico, o primario, a la dilución apropiada. Tras este periodo se lavan tres veces en PBS durante 5 min. Después, las membranas se incuban a temperatura ambiente durante el tiempo correspondiente (según la Tabla 4) con el anticuerpo secundario correspondiente (conejo, ratón o cabra). A continuación se repiten los lavados en PBS.

| Anticuerpo | Origen | Dilución | Incubación        | Dilución 2° | Incubación 2° |
|------------|--------|----------|-------------------|-------------|---------------|
| p-ERK 1/2  | conejo | 1:1000   | toda la noche 4°C | 1:3000      | 1 h           |
| ERK 1/2    | conejo | 1:1000   | toda la noche 4°C | 1:3000      | 1 h           |
| p-p38MAPK  | conejo | 1:2000   | 5 h               | 1:10000     | 1 h           |
| p-AMPK     | conejo | 1:1000   | toda la noche 4°C | 1:2000      | 1 h           |
| HO-1       | conejo | 1:1000   | toda la noche 4°C | 1:10000     | 30 min        |
| GAPDH      | ratón  | 1:5000   | 30 min            | 1:20000     | 30 min        |
| β-actina   | conejo | 1:1000   | 2 h               | 1:10000     | 1 h           |

**Tabla 4. Condiciones de incubación con los anticuerpos.**

#### **14.2.Revelado de bandas inmunoreactivas mediante luminol.**

Esta técnica es similar a la usada por el método ECL de Amersham. La técnica se basa en la formación de un producto quimioluminiscente, derivado del luminol, cuando este reacciona con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en una reacción catalizada por la peroxidasa. Se usa el 4-iodofenol (4-IP) como amplificador de la reacción.

##### ***Soluciones:***

– Solución sustrato: 10 mM de Tris-HCl a pH 8.5, 2.25 mM de luminol, 0.45 mM de 4-iodofenol y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.015%.

– Solución de ácido acético al 1%.

El 4-iodofenol se disuelve en 5 ml de 10 mM Tris-HCl, pH 8.3. Para ello hay que agitarlo de 15 a 30 minutos hasta que se diluya completamente. El luminol (4 mg) se disuelve en 50 µl de NaOH 1N y luego se completa hasta 5 ml con 10 mM Tris-HCl, pH 8.3. Como precaución hay que evitar la exposición del luminol a la luz. Se mezclan 5 ml del 4-IP, con 5 ml de luminol y 5 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%. La membrana se incuba en la solución preparada, durante 1 min a temperatura ambiente. Se elimina el exceso de solución de la membrana, se coloca entre un papel de filtro y plástico y se expone a una película de rayos X. Tras un periodo de exposición de 1 a 5 min, se extraen las películas y se revelan incubándolas en una solución de revelado, ácido acético al 1%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y solución fijadora, consecutivamente.

#### **14.3.Eliminación de anticuerpos de una membrana (“stripping”).**

En algunos experimentos una misma membrana se utiliza para detectar dos proteínas distintas. Por ejemplo, usando un anticuerpo que reconoce a una proteína que no varía su expresión con los tratamientos usados, y que por tanto sirve como control de carga (GAPDH), o una misma proteína en dos formas distintas. En este caso, cuando los anticuerpos primarios que reconocen nuestras proteínas dianas tienen en común la misma fuente, es decir, los dos proceden de ratón o de conejo, es necesario que antes de la incubación con el nuevo anticuerpo se elimine el primer anticuerpo utilizado.

##### ***Soluciones:***

– Tampón de limpieza (“stripping”): 62.5 mM de Tris-HCl a pH 6.8, SDS al 2% y 100 mM de 2-β-mercaptoetanol.

### ***Procedimiento:***

Las membranas se lavan tres veces en PBS durante 10 min. Después, se incuban a 37°C durante 30-45 min en tampón de limpieza (“stripping”) (62.5 mM de Tris-HCl a pH 6.8, 2 mM de EDTA, 100 mM de 2-β-mercaptoetanol). Tras este periodo, las membranas se vuelven a lavar en PBS, se incuban en metanol absoluto durante 30 seg y se secan a temperatura ambiente durante 1-2 h o a 37°C durante 30 min. A continuación, las membranas se incuban con los anticuerpos apropiados y se realiza el análisis de quimioluminiscencia para detectar las bandas específicas (como se ha indicado anteriormente).

#### **14.4. Cuantificación de los niveles de proteína detectados**

Los niveles relativos de proteína, obtenidos por inmunodetección, se cuantificaron por densitometría. Para ello, las películas fotográficas se someten a un escáner y las densidades relativas de cada una de las bandas se analizaban utilizando el programa Scion Image. Los valores, expresados en unidades relativas, representan la media ± E.S.M. de los niveles de la proteína normalizados a valores de un control (GAPDH) de al menos tres experimentos independientes.

## **15. Análisis de expresión de ARN mensajeros (ARNm) por “RT-PCR”**

### **15.1. Obtención del ARN celular total**

La extracción del ARN debe hacerse en las máximas condiciones de esterilidad y ausencia de ARNasas. El H<sub>2</sub>Odd utilizada en todo el proceso de aislamiento de ARN debe ser tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) y autoclavada. El DEPC es utilizado como potente inhibidor de ARNasas. Se prepara diluyéndolo al 0.1% en H<sub>2</sub>Odd durante 12 h y en agitación. A continuación se autoclava la solución con el fin de destruir el DEPC, que a la temperatura y presión de la autoclave se degrada a dióxido de carbono y etanol, ambos productos muy volátiles. Todas las soluciones que estén en contacto con el ARN se preparan en H<sub>2</sub>Odd-DEPC. También todo el material que se utilice será exclusivo para el aislamiento del ARN y lavado con H<sub>2</sub>Odd-DEPC, y los reactivos deberán ser de uso exclusivo para Biología Molecular y estar libre de ARNasas.

El ARN total de las células se aísla utilizando el método descrito por Chomczynski y cols. (Chomczynski y Sacchi, 1987).

***Soluciones:***

- Tampón fosfato salino (PBS).
- Solución de extracción: 4 M de isotiocianato de guanidinio a pH 7.0, 25 mM de citrato sódico, 0.5% de N-lauril-sarcosil y 100 mM de 2-β-mercaptoetanol.
- Acetato sódico 2 M a pH 4.0.
- Solución de cloroformo:isoamilalcohol (dilución 49:1)
- Etanol al 75%.

***Procedimiento:***

Las células se recogen y centrifugan a 400 x g durante 5 min a 4°C. Los precipitados se lavan dos veces resuspendiéndolos en 1 ml de PBS frío y posterior centrifugación a 400 x g durante 5 min a 4°C. Seguidamente, los precipitados celulares obtenidos se resuspenden en 500 µl de solución de extracción y se añaden, seguidamente, 50 µl de acetato sódico 2 M, 500 µl de fenol y 100 µl de solución de cloroformo: isoamilalcohol. Entonces, las muestras se agitan vigorosamente durante 1 min y se mantienen a 4°C durante 20 min. Tras este periodo, las muestras se centrifugan a 13,000 x g durante 20 min a 4°C. Después, las fases superiores de los gradientes formados se extraen y colocan en tubos limpios, donde se diluyen con isopropanol a -20°C (en una relación 1:1) y se incuban a -20°C durante 30 min. Tras este periodo, se centrifugan a 13,000 x g durante 10 min a 4°C. Los precipitados obtenidos nuevamente se resuspenden en 300 µl de solución de extracción, se diluyen con isopropanol a -20°C (1:1) y se incuban a -20°C durante 30 min. Después, se centrifugan a 13,000 x g durante 10 min a 4°C. Seguidamente, los precipitados se disuelven con 500 µl de etanol al 75% a -20°C, se agitan y se dejan a temperatura ambiente durante 10 min. Seguidamente se centrifugan a 13,000 x g durante 10 min a 4°C. Tras descartar los sobrenadantes, las muestras se secan en un liofilizador durante 5-10 min a 37°C y se disuelven en 60 µl de H<sub>2</sub>O dd DEPC 0.1% por calentamiento a 68°C durante 5 min. Las muestras obtenidas, que corresponden a ARN celular total, se dividen en dos fracciones: una alícuota se utiliza para cuantificar la concentración de ARN por espectrofotometría, y el resto se usa para el análisis de expresión del ARNm.

## **15.2. Cuantificación de la concentración de ARN.**

### ***Procedimiento:***

La concentración de ARN de las muestras se cuantifica midiendo en un espectrofotómetro la absorbancia ( $A$ ) a una longitud de onda de 260 nm, y a 280 nm, empleando la siguiente fórmula:

$$[\text{ARN}] (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 44.19 \times \text{dilución}$$

La pureza de las muestras se estima por la relación  $A_{260}/A_{280}$ , considerándose correcto un valor entre 1.9 y 2.0.

## **15.3. Eliminación de la contaminación de ADN con ADNasa I**

Este es un punto crucial en la extracción de ARN ya que cualquier contaminación con ADN produciría resultados erróneos en la amplificación por PCR. La ADNasa I digiere cadenas simples y dobles de ADN.

### ***Soluciones:***

- Tampón de reacción de ADNasa I: 200 mM Tris-HCl pH 8.4, 20 mM de  $\text{MgCl}_2$  y 500 mM de KCl.
- 25 mM de EDTA pH 8.

### ***Procedimiento:***

Se añade 8  $\mu\text{l}$  de muestra de ARN diluida en  $\text{H}_2\text{O}$  dd DEPC 0.1% con 1  $\mu\text{l}$  de ADNasa I 1 U/ $\mu\text{l}$  y 1  $\mu\text{l}$  de tampón de reacción de la ADNasa I y se incuba durante 15 min a temperatura ambiente. Después se añade 1  $\mu\text{l}$  de EDTA 25 mM, para inactivar la ADNasa I, y se incuba durante 10 min a 65°C.

## **15.4. Transcripción inversa del ARN a ADN complementario (ADNc)**

### ***Soluciones:***

- Mezcla de reacción: 100 U de transcriptasa inversa M-MLV-RT (Promega), 1 mM de cada uno de los cuatro nucleótidos, 2.5  $\mu\text{M}$  de cebadores aleatorios, 1 mM de DTT y 20 U de inhibidor de ribonucleasa Rnasin (Promega).

### ***Procedimiento:***

Las muestras se diluyen a razón de 2  $\mu\text{g}$  de ARN en 24  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  dd. Se preparan tubos con 24  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  dd y sin ARN para utilizarlos como los blancos de la reacción.

Muestras y blanco se incuban a 68°C durante 5 min, y se enfrían rápidamente a 4°C, para así eliminar estructuras secundarias. A continuación se les añaden 16 µl de mezcla de reacción y se incuban a 37°C durante 1 h. Tras este periodo, el resultado en las muestras corresponde al ADNc.

### **15.5. Amplificación del ADNc por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real.**

#### ***Soluciones:***

- Mezcla maestra de Power SYBR Green conteniendo: SYBR® Green, ADN polimerasa (AmpliTaQ Gold®), dNTPs con una combinación dUTP/dTTP, fluorescencia de referencia (Rox) y componentes del tampón optimizado.

- Cebadores específicos (directo y reverso) 300 nM cada uno.

- Muestras de ADNc; 100 ng por condición.

La reacción de amplificación se realiza en un termociclador ABI Prism 7300 (Applied-Biosystems, California, EEUU).

#### ***Procedimiento:***

Se lleva a cabo por triplicado en placas de 96 pocillos, en un volumen final de 50 µl para cada réplica, usando el kit comercial “QuantiTect SYBR Green PCR”. Para ello, en cada pocillo se mezclan; 4 µl de ADNc (cuya concentración debe ser de 2.5 ng/ml) con 5 pmoles de cada cebador, 25 µl de SYBR Green máster-mix comercial (contiene la Taq polimerasa, el tampón de reacción, los dNTPs y el SYBR Green) y el resto de H<sub>2</sub>O libre de RNAasas.

Las condiciones de amplificación usadas en el termociclador fueron:

|                                      |   |           |
|--------------------------------------|---|-----------|
| 10 minutos/95° C                     | } | 40 ciclos |
| 15 segundos / 95° C                  |   |           |
| 1 minuto/ 60° C                      |   |           |
| 20 minutos/ 60 → 95° C (disociación) |   |           |

Los cebadores utilizados para amplificar los genes que se indican y los tamaños de banda obtenidos tras la amplificación fueron los siguientes:

| GEN                                       | SECUENCIA                     |
|---|-------------------------------|
| <b>LXR<math>\alpha</math> directo:</b>    | 3' AAGCCCTGCATGCCTACGT 5'     |
| <b>LXR<math>\alpha</math> reverso:</b>    | 5' TGCAGACGCAGTGCAAACA 3'     |
| <b>LXR<math>\beta</math> directo:</b>     | 3' TCGTGGACTTCGCTAAGCAA 5'    |
| <b>LXR<math>\beta</math> reverso:</b>     | 5' GCAGCATGATCTCGATAGTGGA 3'  |
| <b><math>\beta</math> actina directo:</b> | 3' CCAGCTCACCATGGATGATG 5'    |
| <b><math>\beta</math> actina reverso:</b> | 5' ATGCCGGAGCCGTTGTC 3'       |
| <b>ABCA1 directo:</b>                     | 3' CCCTGTGGAATGTACCTATGTG 5'  |
| <b>ABCA1 reverso:</b>                     | 5' GAGGTGTCCCAAAGATGCAA 3'    |
| <b>ABCG1 directo:</b>                     | 3' CAGTCGCTCCTTAGCACCA 5'     |
| <b>ABCG1 reverso:</b>                     | 5' TCCATGCTCGGACTCTCTG 3'     |
| <b>SREBP1c directo:</b>                   | 3' TCAGCGAGGCGGCTTTGGAGCAG 5' |
| <b>SREBP1c reverso:</b>                   | 5' CATGTCTTCGATGTCGGTCAG 3'   |
| <b>HO-1 directo:</b>                      | 3'AGAGCCTGCAGCCCTCTCAGA-5'    |
| <b>HO-1 reverso:</b>                      | 5'-TGGAGAGGAGCAGTCATATG-3'    |

**Tabla 5. Cebadores usados para la PCR semi-cuantitativa.**

### **15.6. Cuantificación de la expresión génica a partir de la PCR a tiempo real.**

Para la cuantificación relativa de la expresión génica se usa el valor  $C_T$ , que representa el primer ciclo de PCR en el que se detecta una fluorescencia cuyo valor es 10 veces superior a la desviación estándar del ruido de fondo basal.

#### ***Procedimiento:***

A la media de los valores  $C_T$  de cada condición experimental de nuestro gen problema se le sustrae la media de los valores  $C_T$  de cada condición experimental de nuestro gen interno (en nuestro caso el del  $\beta$ -actina), obteniéndose unos valores que se denominan  $\Delta C_T$ . A continuación se calculan los valores  $\Delta\Delta C_T$ , que se obtienen al restar a un calibrador (que en nuestro caso consideramos el valor  $\Delta C_T$  de las células sin estimular) cada uno de los valores  $\Delta C_T$  obtenidos anteriormente. Por último basta sólo emplear la fórmula  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  y representar los valores obtenidos.

## **16. Ensayo de migración celular**

La migración celular es una prueba que mide el tránsito de células a través de una membrana porosa, estimulado por quimioatrayentes.

### ***Procedimiento:***

Se evalúa en cámaras de migración de 6.5 mm de diámetro, con tamaño de poro de membrana de 5 y 8  $\mu\text{m}$  Costar Transwell 3421 (Corning, New York, USA). Los quimioatrayentes se depositan en el compartimiento inferior en un volumen final de 0,6 ml de medio RPMI 1640 y las placas se precalientan a 37°C. A continuación, se depositan 0,1 ml de medio que contiene  $1 \times 10^6$  células sobre cada membrana porosa colocada sobre la solución quimioatrayente. Las cámaras cargadas se incuban durante 2 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. En pocillos separados adicionales, se añaden el mismo número de células en el compartimiento inferior y se utilizan como controles que representan el 100% de la migración. Al final del periodo de incubación, se recogen y se centrifugan las células que hayan emigrado a la parte inferior de la cámara. Después de la tinción con anticuerpos monoclonales para CD16 conjugado con FITC (Immunotech, Marsella, Francia), las células se fijan con paraformaldehído al 1% y, finalmente, se analizan por citometría de flujo. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  SEM de tres experimentos separados y se expresan como el porcentaje de células totales inicialmente añadidos a cada cámara.

## **17. Tinción de lípidos neutros mediante tinción “Oil Red O”**

Es un método de tinción de lípidos modificado de Li y cols. (Li y cols., 2013).

### ***Procedimiento:***

Las células se fijan con formaldehído al 2%, luego se lavan con isopropanol al 60% y se tiñeron con solución de aceite O rojo recién preparada durante 1 h a 37°C. Finalmente, las células se lavan con H<sub>2</sub>O y se analizan al microscópico óptico para su posterior fotografía.

## 18. Salida del colesterol

Los ensayos se realizan como en Wong y cols., 2007 con algunas modificaciones. Para medir la salida de colesterol de un célula usaremos colesterol tritiado ( $^3\text{H}$ ). Bajo ciertas condiciones, una célula pueda aumentar o disminuir la salida de colesterol desde su interior hasta el medio. Esa diferencia existente se puede cuantificar para conocer la cantidad de colesterol eliminado por la célula. La salida de colesterol está mediada en macrófagos por los transportadores de colesterol ABCA1 principalmente. Usaremos Apo A1 como aceptor extracelular de colesterol. Trabajamos con las líneas celulares RAW 264.7 (macrófagos de ratón) y THP1 (monocitos diferenciados a macrófagos con PMA).

### ***Soluciones:***

- Solución de PMA 80 nM (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Colesterol Tritiado ( $^3\text{H}$ ) (Perkin Elmer, Madrid, España)
- Apolipoproteína A1 (Apo A1) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Solución de NaOH 0.2 M
- Líquido de centelleo (Perkin Elmer, Madrid, España)

### ***Procedimiento:***

Sembramos  $5 \times 10^5$  cells/pocillo en placas P-6 y las incubamos en medio completo suplementado con colesterol tritiado  $^3\text{H}$  1  $\mu\text{Ci/ml}$  y PMA 80 nM durante 72h. Pasado ese tiempo, lavamos con PBS atemperado (2 veces) y añadimos medio de cultivo sin FBS, con BSA 0.2% y colesterol tritiado  $^3\text{H}$  1  $\mu\text{Ci/ml}$ , suplementado con los tratamientos e incubamos durante 24h. Transcurrido ese tiempo, añadimos 2 mg/ml de Apo A1 por condición y dejamos incubando 12 horas más. Posteriormente, recogemos 200  $\mu\text{l}$  de sobrenadante, se centrifuga a 14.000 x g durante 2 min y se determina su radiactividad por recuento de centelleo líquido. Por otra parte, lavamos las células con PBS (2 veces) y las lisamos por choque osmótico mediante 0.2 M de NaOH. La radiactividad total se determina por centelleo líquido en el contador Wallac 1450 MicroBeta TriLux (Perkin Elmer, Madrid, España). La salida o entrada de colesterol se mide mediante la diferencia entre las cuentas en el sobrenadante y el lisado celular. Cada ensayo se realiza por triplicado.

## **19. Detección de apoptosis celular**

### **19.1. Medición de fragmentación de ADN**

La apoptosis medida como la fragmentación del ADN se analiza usando el kit de detección de muerte celular ELISA<sup>plus</sup> de Roche Applied Science (Barcelona, Spain), siguiendo las instrucciones del fabricante. Como control positivo, las células se tratan con estaurosporina.

### **19.2. Ensayo de Anexina V-IP**

Se usó un kit de Anexina V e ioduro de propio (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) para cuantificar la posible apoptosis producida por los compuestos utilizados mediante citometría de flujo con un citómetro FC 500 (Beckman Coulter, Inc, USA).

## **20. Análisis estadístico**

Los niveles de ARNm medidos por PCR real-time se expresan como veces inducción relativa a las células no tratadas (media  $\pm$  error estándar de la media (E.S.M) de un mínimo de tres experimentos independientes realizados con resultados similares. Los niveles de proteínas medidos de Western blots se expresan en unidades arbitrarias. Los resultados fueron estadísticamente analizados usando el programa Statgraphics Plus 5.0 (Manugistic Inc., Rockville, MD). El test de Student o el ANOVA “one-way” son los que se usan para hacer las comparaciones entre grupos. Los valores se expresan como la media  $\pm$  error estándar de la media (E.S.M).

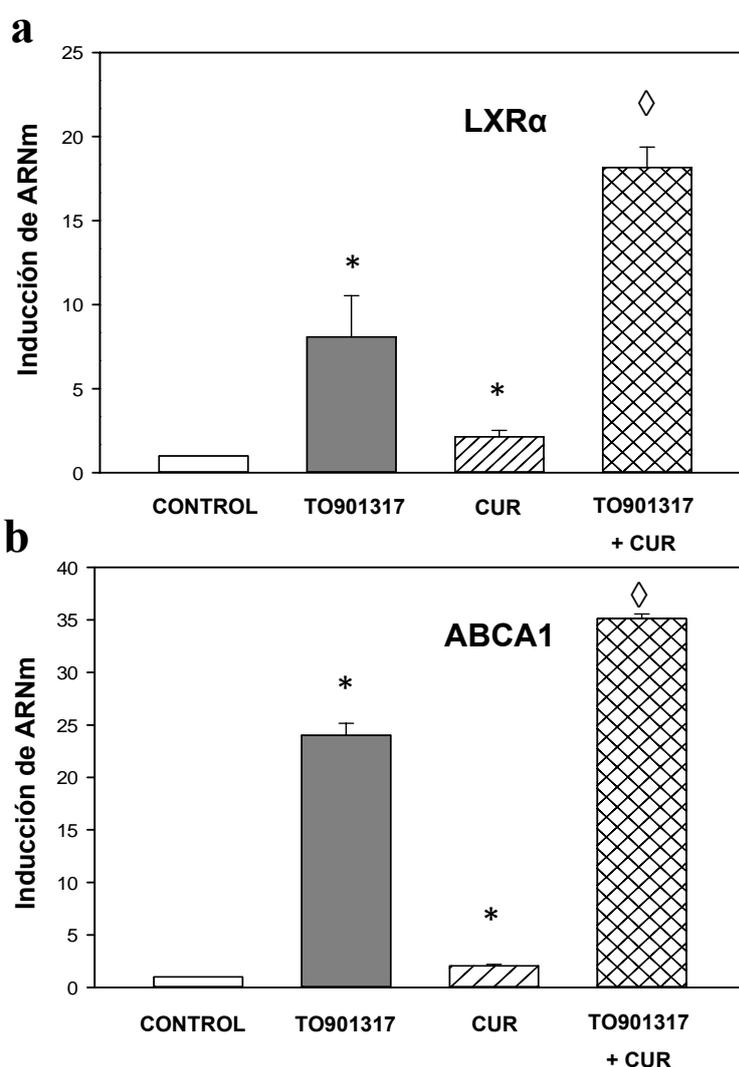
# **RESULTADOS**



## RESULTADOS

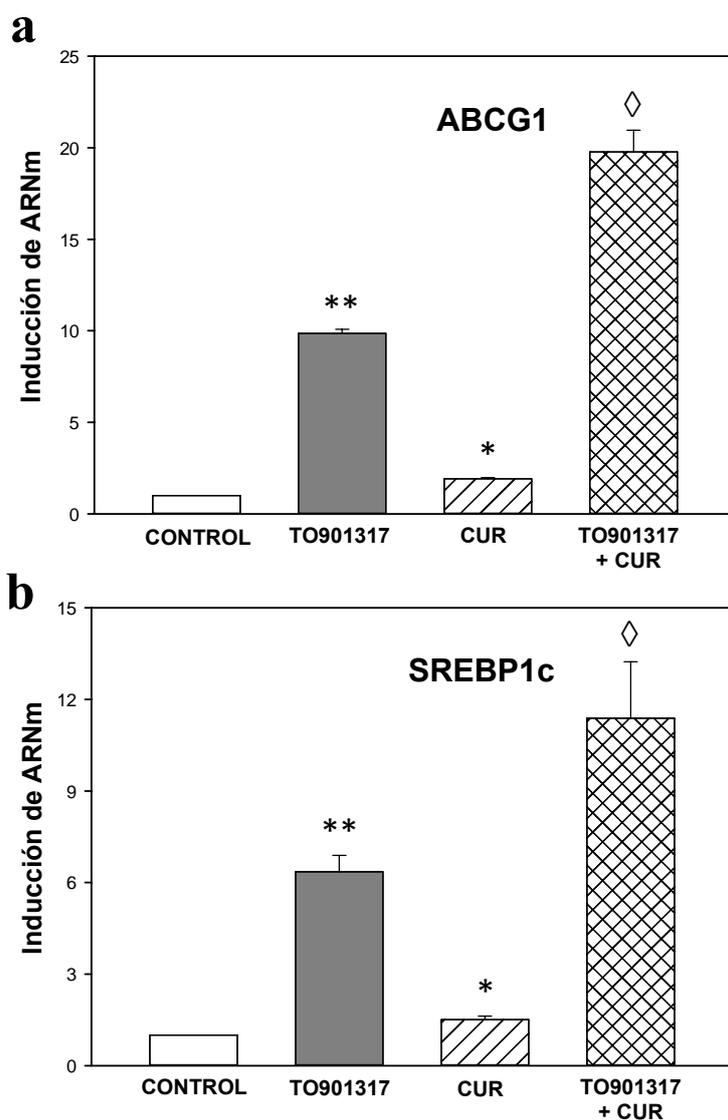
### 1. Incremento en los niveles de ARNm de LXR $\alpha$ y sus genes diana inducidos por la curcumina y la naringenina

Para analizar los efectos de los tratamientos con TO901317, curcumina y naringenina sobre la expresión de LXR $\alpha$  y sus genes diana en células THP-1, diferenciadas o no con PMA, se aisló el ARN mensajero y se analizó por PCR semi-cuantitativa. Las variaciones en la expresión de A se compararon con la expresión de un gen endógeno.



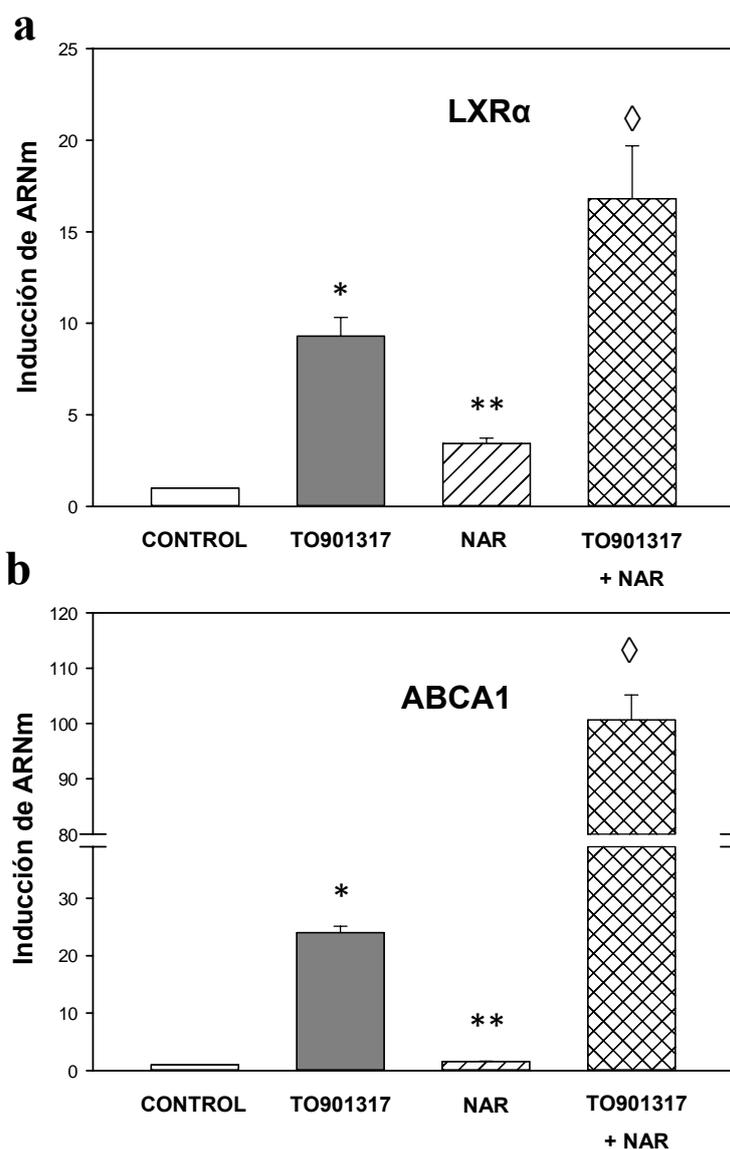
**Figura 15.** La expresión de los genes LXR $\alpha$  y ABCA1 es inducida y potenciada por la curcumina en células THP-1 sin diferenciar. Las células fueron tratadas con 80 nM de PMA e incubadas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 72 horas. Posteriormente se trataron con TO901317 (1  $\mu$ M) y curcumina (5  $\mu$ M) durante 20 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Finalmente fueron analizados los niveles de expresión de ARNm mediante PCR a tiempo real, según la metodología descrita en materiales y métodos. Los resultados representan la media de las veces de inducción de expresión de ARNm  $\pm$  E.E.M., n=6. Significación estadística \* p  $\leq$  0,05 vs control;  $\diamond$  p  $\leq$  0,05 vs TO901317.

El TO901317, conocido agonista del LXR $\alpha$ , produce un incremento de la expresión de LXR $\alpha$  y todos sus genes diana en macrófagos en tratamientos durante 20 horas (Calkin y Tontonoz, 2012). La curcumina también aumenta la expresión de LXR $\alpha$  y sus genes diana (ABC-A1, G1 y SREBP-1c) al menos dos veces, comparado con las células THP-1 sin tratar. Aunque este incremento es menor que el producido por el TO901317, resulta ser estadísticamente significativo comparado con el control.

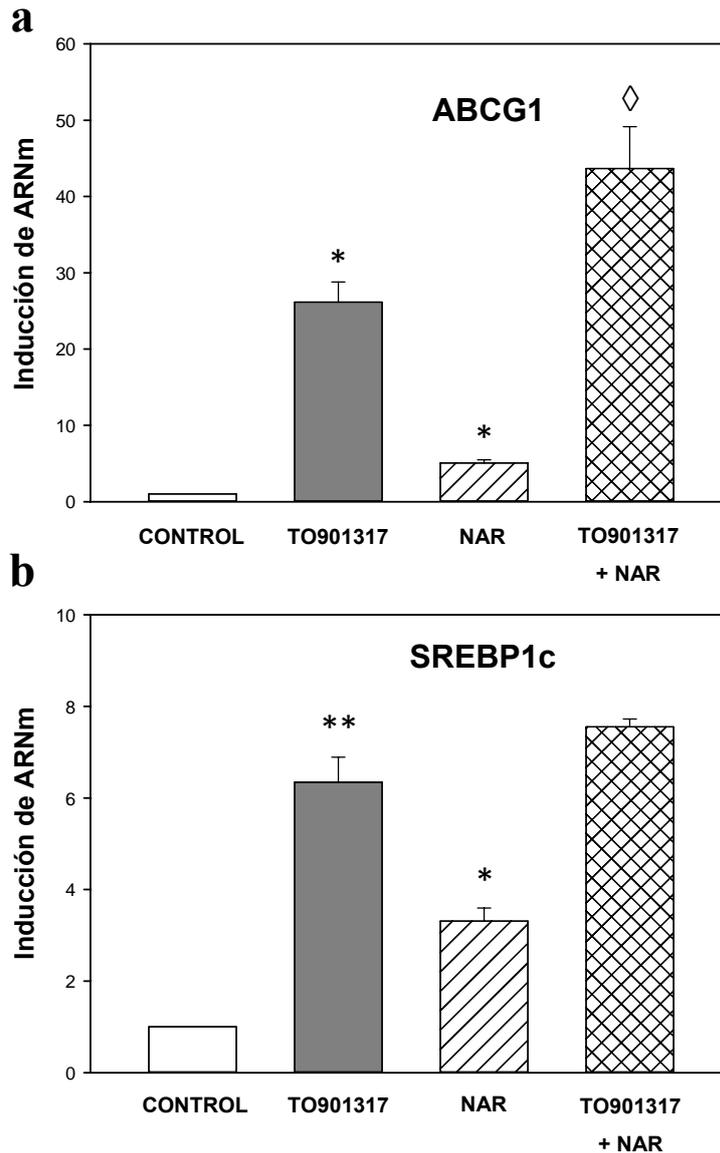


**Figura 16.** La expresión de los genes ABC-G1 y SREBP-1c es inducida y potenciada por la curcumina en células THP-1 sin diferenciar. Las células fueron tratadas con 80 nM de PMA e incubadas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 72 horas. Posteriormente se trataron con TO901317 (1  $\mu$ M) y curcumina (5  $\mu$ M) durante 20 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Finalmente fueron analizados los niveles de expresión de ARNm mediante PCR a tiempo real, según la metodología descrita en materiales y métodos. Los resultados representan la media de las veces de inducción de expresión de ARNm  $\pm$  E.E.M., n=6. Significación estadística \* p  $\leq$  0,05 y \*\* p  $\leq$  0.001 vs control; ◇ p  $\leq$  0,05 vs TO901317.

Por otro lado, en las células tratadas conjuntamente con curcumina y TO9031317 se produce un efecto sinérgico, de modo que el incremento en la expresión es al menos el doble, en todos los genes estudiados, en comparación con las células tratadas únicamente con TO90317 (Figuras 16 y 17).



**Figura 17. La expresión de los genes LXRα y ABCA1 es inducida y potenciada por la naringenina en células THP-1 sin diferenciar.** Las células fueron tratadas con 80 nM de PMA e incubadas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 72 horas. Posteriormente se trataron con TO901317 (1 μM) y naringenina (100 μM) durante 20 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Finalmente fueron analizados los niveles de expresión de ARNm mediante PCR a tiempo real, según la metodología descrita en materiales y método. Los resultados representan la media de las veces de inducción de expresión de ARNm ± E.E.M., n=6. Significación estadística \* p ≤ 0,05 y \*\* p ≤ 0.001 vs control; ◇ p ≤ 0,05 vs TO901317.



**Figura 18. La expresión de los genes ABC-G1 y SREBP-1c es inducida y potenciada por la naringenina en células THP-1 sin diferenciar.** Las células fueron tratadas con 80 nM de PMA e incubadas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 72 horas. Posteriormente se trataron con TO901317 (1 μM) y naringenina (100 μM) durante 20 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Finalmente fueron analizados los niveles de expresión de ARNm mediante PCR a tiempo real, según la metodología descrita en materiales y método. Los resultados representan la media de las veces de inducción de expresión de ARNm ± E.E.M., n=6. Significación estadística \* p ≤ 0,05 y \*\* p ≤ 0,001 vs control.

La naringenina, también aumenta la expresión de LXRα y sus genes diana (ABC-A1, G1 y SREBP-1c) como se puede observar en las figuras X y X. El tratamiento con 100 μM de naringenina durante 20 horas aumenta hasta tres veces más la expresión de LXRα y sus genes diana que en las células control.

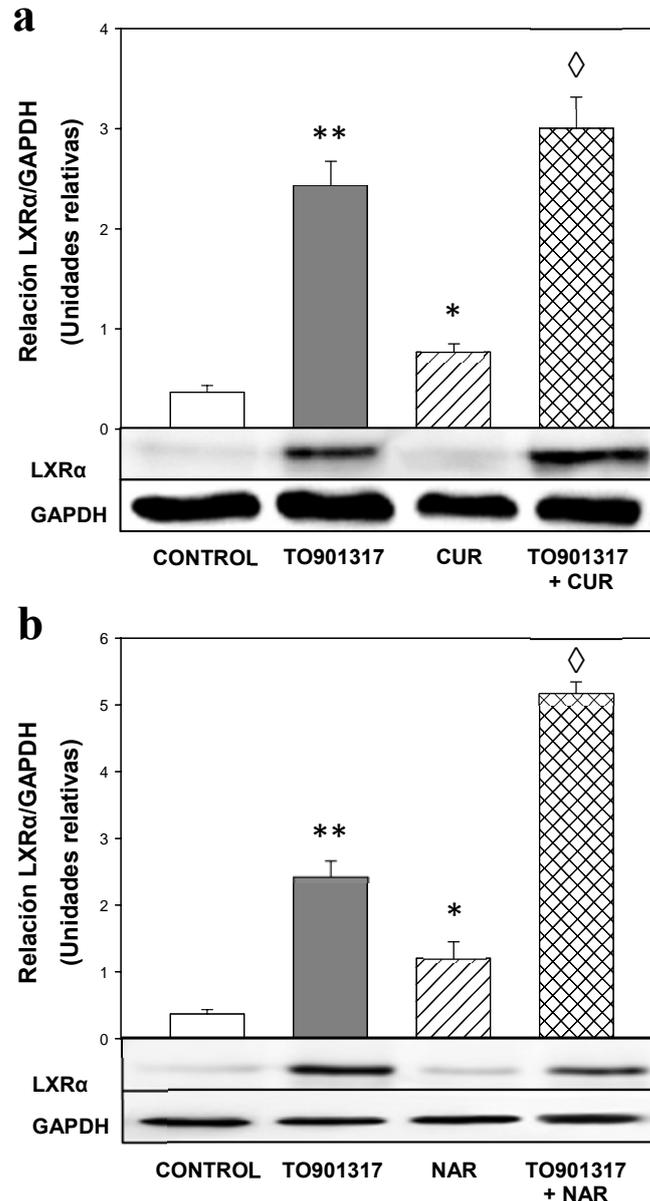
Cuando medimos la expresión de estos mismos genes en tratamientos conjuntos del agonista de LXR $\alpha$  (TO901317) y la naringenina, se observa cómo se produce un efecto sinérgico, ya que la expresión de los mensajeros aumenta más del doble comparándolo con la expresión de esos mismos genes en células tratadas sólo con TO901317. Sólo en el caso de la expresión de SREBP-1c, el aumento en los niveles de mensajero de las células tratadas con TO901317 y naringenina no es significativo respecto a las células tratadas con el agonista sintético de LXR $\alpha$  (figura 18b).

Resulta muy llamativo el efecto que tiene el tratamiento conjunto de TO901317 y curcumina o naringenina sobre la expresión de los transportadores ABC-A1 y ABC-G1 ya que este aumento de la expresión alcanza hasta cien veces más que el de las células sin tratar en el caso de las células estimuladas con el agonista de LXR $\alpha$  y la naringenina (Figura 4b).

El aumento en la expresión de los mensajeros producido en células estimuladas con naringenina es mayor que el producido en las células tratadas con curcumina. Además el incremento de ARNm de LXR $\alpha$  y sus genes diana en las células tratadas con TO901317 y naringenina es mayor que el de las células tratadas con TO901317 y curcumina.

## 2. Incremento en los niveles de proteína LXR $\alpha$ inducido por curcumina y naringenina

Para corroborar los resultados obtenidos a nivel de ARNm de LXR $\alpha$  en células THP-1 se analizó la expresión proteica de dicho receptor. el TO901317 es un agonista de LXR $\alpha$  ya que aumentan los niveles de ARNm y de proteína LXR $\alpha$  (Wong y cols., 2008).



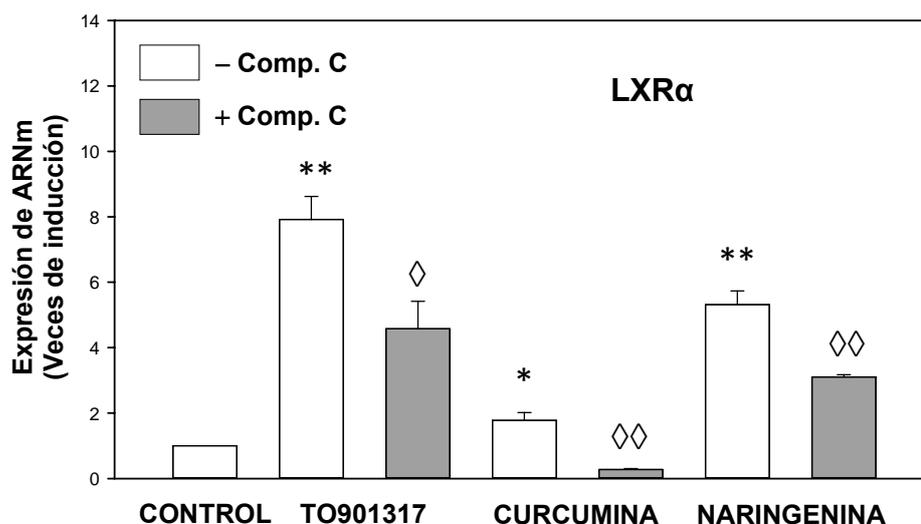
**Figura 19. Los tratamientos con curcumina y naringenina aumentan los niveles de expresión de LXR $\alpha$  en células THP-1.** Células THP-1 tratadas con PMA 80 nM fueron incubadas durante 72 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente fueron tratadas durante 18 horas con TO901317 1  $\mu$ M, curcumina 5  $\mu$ M (a) y naringenina 100  $\mu$ M (b). Finalmente las células fueron lisadas y los niveles de proteína LXR $\alpha$  y GAPDH (proteína endógena) analizados mediante inmunodetección. Los resultados representan la media de los niveles de proteína  $\pm$  E.E.M., n=6. Significación estadística \*  $p \leq 0,05$  y \*\*  $p \leq 0,001$  vs control;  $\diamond$   $p \leq 0,05$  vs TO901317. Los western blot mostrados son representativos de 6 experimentos independientes.

Las células THP-1 diferenciadas con PMA y tratadas con curcumina durante 18 horas vieron aumentando sus niveles relativos de expresión proteica de LXR $\alpha$  (figura 5a). Este aumento en la cantidad de proteína LXR $\alpha$  van en concordancia con los obtenidos a nivel de ARNm en los que se observaba como el tratamiento con curcumina aumentaba los niveles de ARNm del receptor nuclear (figura 1a). Igualmente, las células que fueron tratadas conjuntamente con TO901317 y curcumina experimentaron un aumento en los niveles relativos de LXR $\alpha$  aún mayor que las tratadas sólo con el agonista sintético o con el polifenol, lo que también va en consonancia con los resultados obtenidos a nivel de ARNm observados anteriormente (figura 1a).

Los tratamientos con naringenina también indujeron un aumento en los niveles relativos de proteína LXR $\alpha$ , en comparación con las células que no fueron tratadas con naringenina (figura 5b). Las células tratadas conjuntamente con TO901317 y naringenina durante 18 horas, mostraron un mayor nivel relativo de proteína LXR $\alpha$  que las células que solamente fueron tratadas con TO901317 o con el flavonoide. Estos resultados vienen a confirmar los obtenidos al medir el nivel de expresión del ARNm de LXR $\alpha$  (figura 3a).

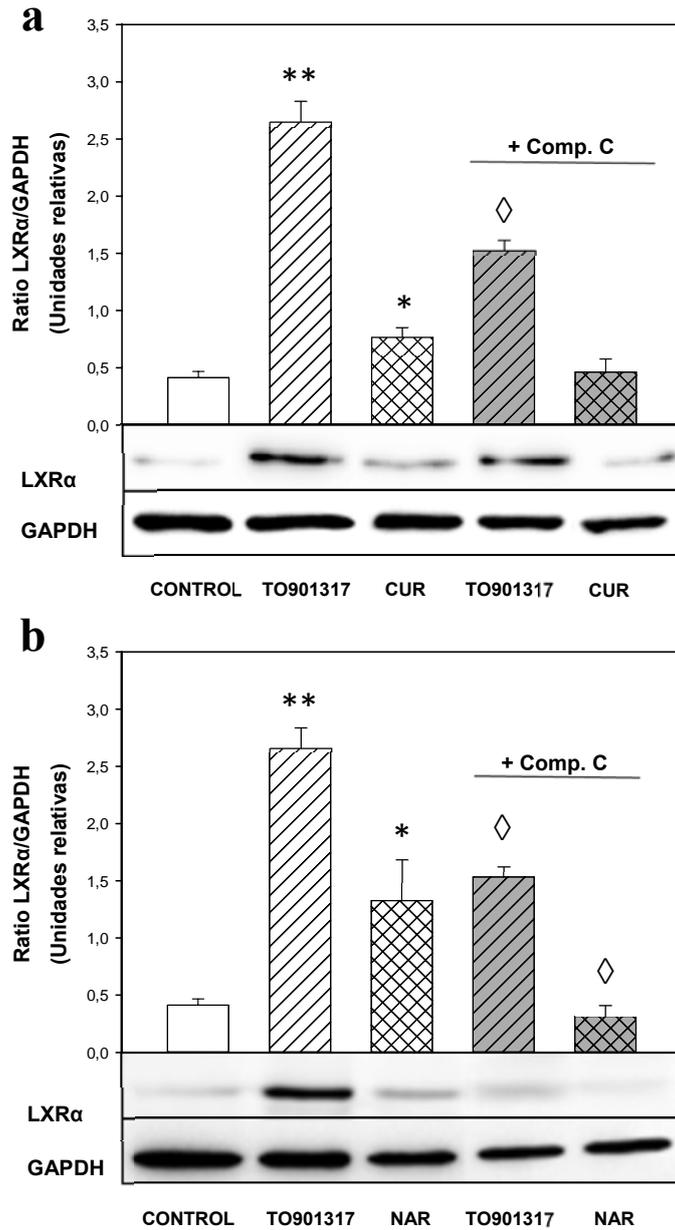
### **3. Componente C disminuye la expresión de ARNm y los niveles de proteína LXR $\alpha$**

El estado metabólico de la célula y de un organismo en sí está regulado por la acción de la enzima AMPK (Hardie y cols., 2012). En este sentido la influencia de la enzima reguladora del metabolismo energético es a nivel de fosforilaciones y desfosforilaciones de otras enzimas (Fay y cols., 2009). Para conocer si la actividad de la AMPK está relacionada con la regulación de LXR $\alpha$  y sus genes diana, además de usar activadores de la AMPK (naringenina y curcumina) usamos el componente C (comp. C), un inhibidor de la fosforilación de la subunidad  $\alpha$  de la AMPK (Zou y cols., 2001). Los siguientes experimentos se diseñaron para conocer si células tratadas con componente C se veían afectadas en su expresión de ARNm y nivel de proteínas.



**Figura 20. Inhibición inducida por el componente C de la expresión de ARNm de LXR $\alpha$  en células THP-1.** Células THP-1 fueron diferenciadas con 80 nM de PMA a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 72 horas. Posteriormente se trataron con TO901317 (1  $\mu$ M), curcumina (5  $\mu$ M) y naringenina (100  $\mu$ M) durante 20 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Otras células fueron tratadas con los mismos compuestos junto con el componente C (5  $\mu$ M) durante 20 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Finalmente fueron analizados los niveles de expresión de ARNm de LXR $\alpha$  mediante PCR a tiempo real, según la metodología descrita en materiales y métodos. Los resultados representan la media de las veces de inducción de expresión de ARNm  $\pm$  E.E.M., n=6. Significación estadística \*  $p \leq 0,05$  y \*\*  $p \leq 0,001$  vs control;  $\diamond$   $p \leq 0,05$  y  $\diamond\diamond$   $p \leq 0,01$  vs - Comp. C.

Como se observa en la figura 20, los niveles de expresión de ARNm de LXR $\alpha$  en las células THP-1 diferenciadas con PMA y tratadas con TO901317, curcumina y naringenina son similares a los resultados obtenidos con anterioridad en la sección 1 de resultados. Las células presentan un aumento en la expresión de ARNm de LXR $\alpha$  cuando son tratadas con TO901317 (1  $\mu$ M), curcumina (5  $\mu$ M) y naringenina (100  $\mu$ M) comparadas con el control de células sin tratamiento.



**Figura 21. Inhibición inducida por el componente C de la expresión de ARNm de LXRα en células THP-1.** Células THP-1 fueron diferenciadas con 80 nM de PMA a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 72 horas. Posteriormente se trataron con TO901317 (1 μM), curcumina (5 μM) y naringenina (100 μM) durante 20 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Otras células fueron tratadas con los mismos compuestos junto al componente C (5 μM) durante 20 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Finalmente fueron analizados los niveles de expresión de ARNm de LXRα mediante PCR a tiempo real, según la metodología descrita en materiales y métodos. Los resultados representan la media de las veces de inducción de expresión de ARNm ± E.E.M., n=6. Significación estadística \* p ≤ 0,05 y \*\* p ≤ 0,001 vs control; ◇ p ≤ 0,05 y ◇◇ p ≤ 0,01 vs - Comp. C.

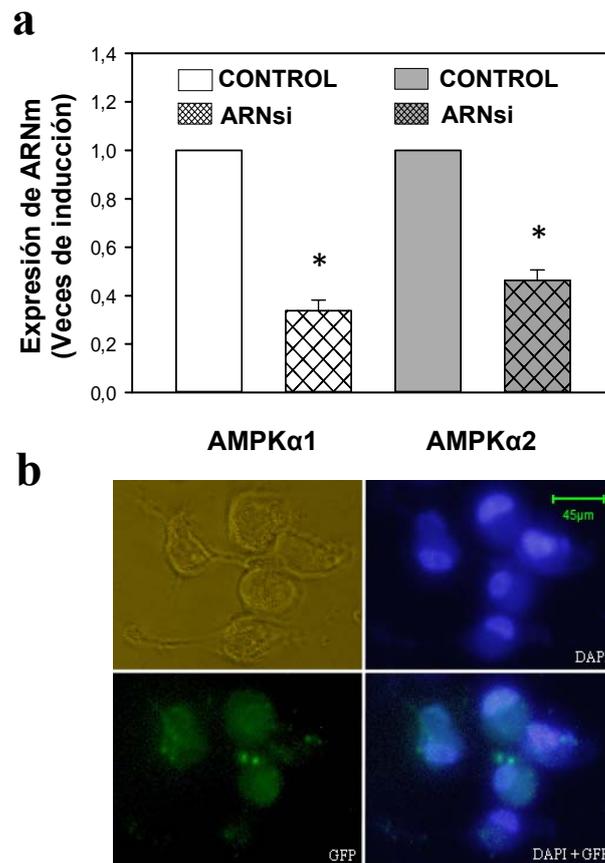
Las células que fueron tratadas con TO901317, curcumina o naringenina conjuntamente con el comp. C disminuyeron sus niveles de expresión de ARNm de LXR $\alpha$ . En el caso de las células estimuladas con curcumina y comp. C, la disminución fue tan evidente que los niveles de expresión de ARNm de LXR $\alpha$  estuvieron por debajo de los valores del control (figura 20).

A nivel proteico, este aumento en el nivel de expresión de ARNm de LXR $\alpha$  se tradujo en un aumento en los niveles de proteína final. Como se observa en la figura 21, las células THP-1 diferenciadas con PMA y tratadas con 1  $\mu$ M de TO901317 aumentaron la cantidad de proteína LXR $\alpha$ . La curcumina también produjo un aumento en los niveles de proteína LXR $\alpha$  (figura 21a) al igual que la naringenina (figura 21b).

Respecto a las células incubadas con comp. C, éste ocasionó una disminución en la cantidad de proteína producida por el agonista sintético de LXR $\alpha$ , disminuyendo su efecto. Las células estimuladas con curcumina y naringenina también disminuyeron su nivel de proteína LXR $\alpha$  al ser tratadas con 5  $\mu$ M de comp. C. En el caso de la naringenina, el efecto activador de esta fue revertido totalmente hasta niveles similares al control (figura 21b).

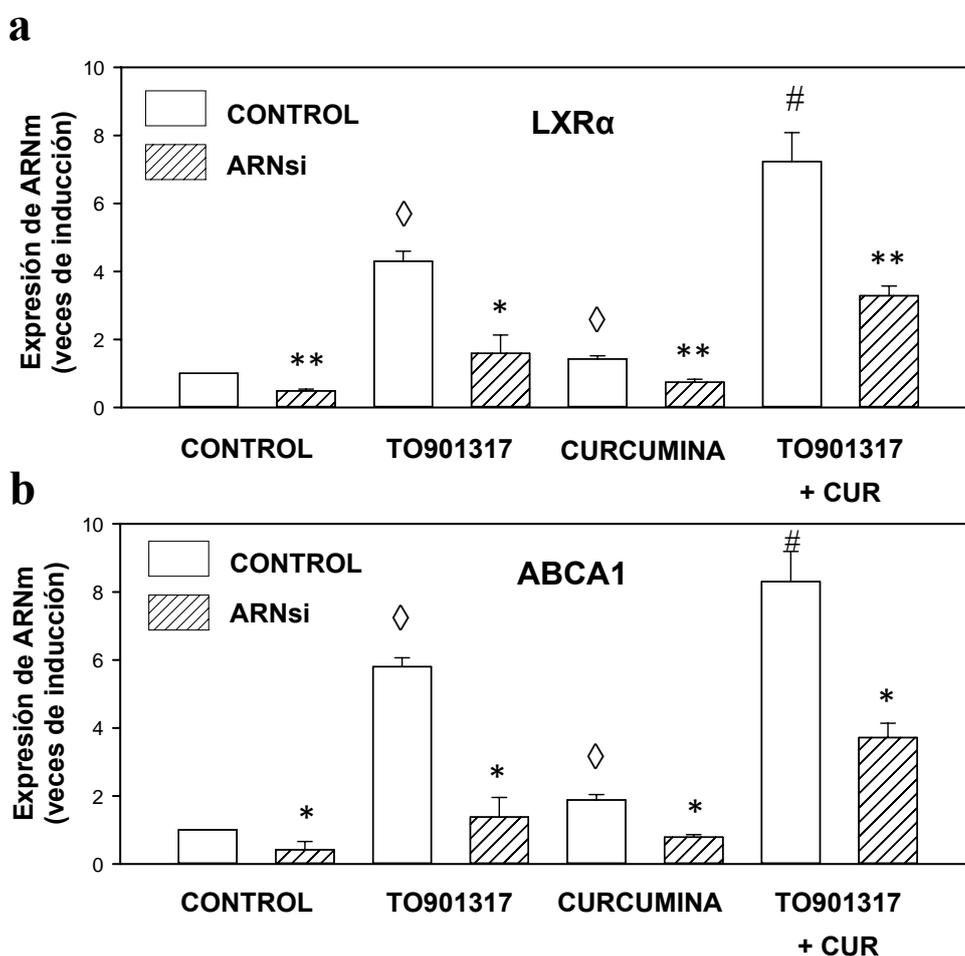
#### 4. La transfección con ARNsi específico de AMPK $\alpha$ 1 y $\alpha$ 2 disminuye la expresión de los ARNm de LXR $\alpha$ y sus genes diana

Para seguir elucidando la relación entre la enzima AMPK y los receptores nucleares LXR $\alpha$  además del uso de activadores de la enzima (curcumina y naringenina) e inhibidores de la fosforilación de la misma (componente C) se estudió el efecto del silenciamiento de la expresión de los ARNm que codifican las subunidades catalíticas  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2 de la AMPK.



**Figura 22. Inhibición de la expresión de las subunidades  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2 de AMPK en células THP-1 diferenciadas con PMA.** Las células THP-1 diferenciadas con 80 nM de PMA durante 72 horas fueron incubadas con medio mínimo durante 12 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Pasado ese tiempo fueron expuestas a una mezcla de los ARN de silenciamiento de las subunidades  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2 de AMPK (o ARN control de silenciamiento) y lipofectamina durante 20 minutos a temperatura ambiente. a) Los niveles de expresión de ARNm fueron analizados mediante PCR a tiempo real, según la metodología descrita en materiales y métodos. Los resultados representan la media de las veces de inducción de expresión de ARNm  $\pm$  E.E.M., n=6. Significación estadística \*  $p \leq 0,001$  control vs ARNsi. b) Se tomaron imágenes de microscopía de fluorescencia mediante tinción con DAPI y GFP ligado al ARNsi para comprobar su internalización. Estas imágenes son representativas de 3 experimentos diferentes.

Las células THP-1 diferenciadas con PMA y tratadas con ARN de silenciamiento (ARNsi) presentaron una menor expresión en los niveles de ARNm de AMPK $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2 que las células que fueron tratadas con el ARN control de silenciamiento (ARNcontrol) (figura 22a). En la figura 22b se aprecia como el RNAsi marcado con GFP entro en las células, considerándose la transfección exitosa.



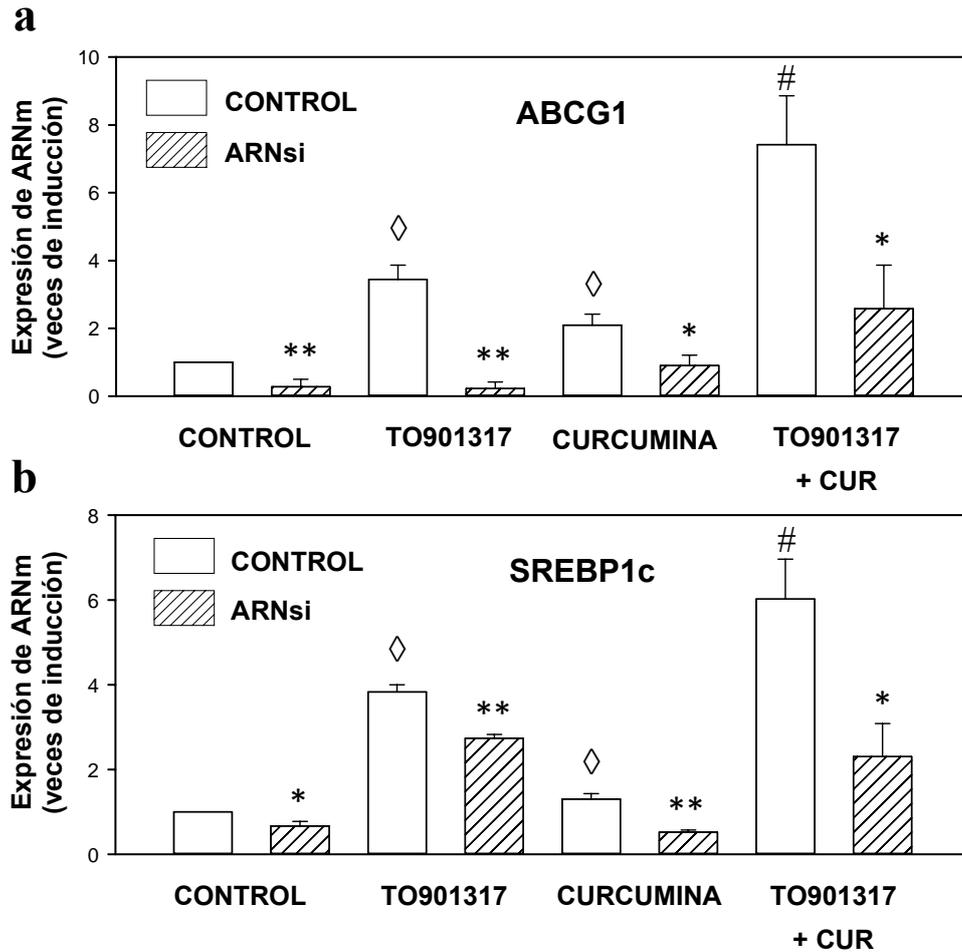
**Figura 23. Inhibición de la expresión de LXR $\alpha$  y ABCA1 por el silenciamiento de las subunidades  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2 de AMPK en células THP-1 diferenciadas con PMA.** Las células THP-1 diferenciadas con 80 nM de PMA durante 72 horas fueron incubadas con medio mínimo durante 12 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Pasado ese tiempo fueron expuestas a una mezcla de ARN de silenciamiento de las subunidades  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2 de AMPK (o ARN control de silenciamiento) y lipofectamina durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se trataron con 1  $\mu$ M de TO901317 y 5  $\mu$ M de curcumina durante 20 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Finalmente fueron analizados los niveles de expresión de ARNm de LXR $\alpha$  (a) y ABCA1 (b) mediante PCR a tiempo real, según la metodología descrita en materiales y métodos. Los resultados representan la media de las veces de inducción de expresión de ARNm  $\pm$  E.E.M., n=6. Significación estadística \* p  $\leq$  0,05 y \*\* p  $\leq$  0,001 vs ARNcontrol; ◇ p  $\leq$  0,001 vs control; # p  $\leq$  0,05 vs TO901317.

Las células que fueron tratadas con ARNcontrol y estimuladas con TO901317 (1  $\mu$ M) o curcumina (5  $\mu$ M) tuvieron incrementos en la expresión de ARNm de LXR $\alpha$  y ABCA1 similares a los observados anteriormente en la sección 1 de los resultados. Las células tratadas con TO901317 o curcumina incrementaron la expresión de ARNm de LXR $\alpha$  y ABCA1 en comparación con las células no estimuladas. Las células tratadas conjuntamente con el agonista sintético y el polifenol presentaron una mayor expresión de ARNm de LXR $\alpha$  y ABCA1 que las que sólo estuvieron en presencia de uno de esos compuestos (figura 23).

En las células en las que se utilizó el ARNsi de las subunidades  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2 de la AMPK, vieron disminuida la expresión de ARNm de LXR $\alpha$  y ABCA1 en comparación con las células que en las que se usó el ARNcontrol. Este efecto se observó también en las células que fueron tratadas conjuntamente con TO901317 (1  $\mu$ M) y curcumina (5  $\mu$ M) durante 20 horas (figura 23).

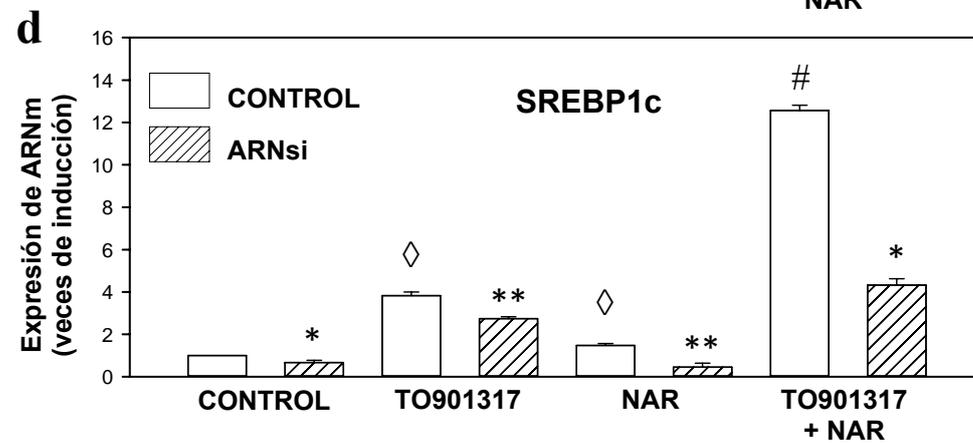
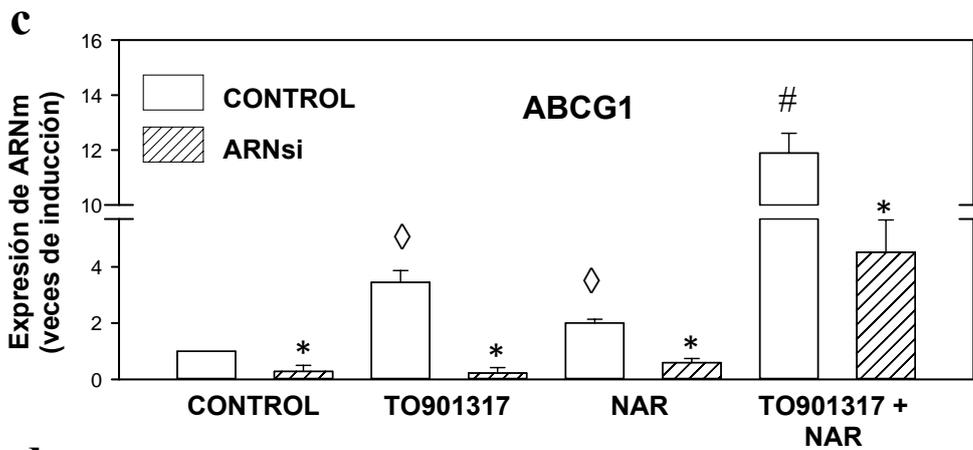
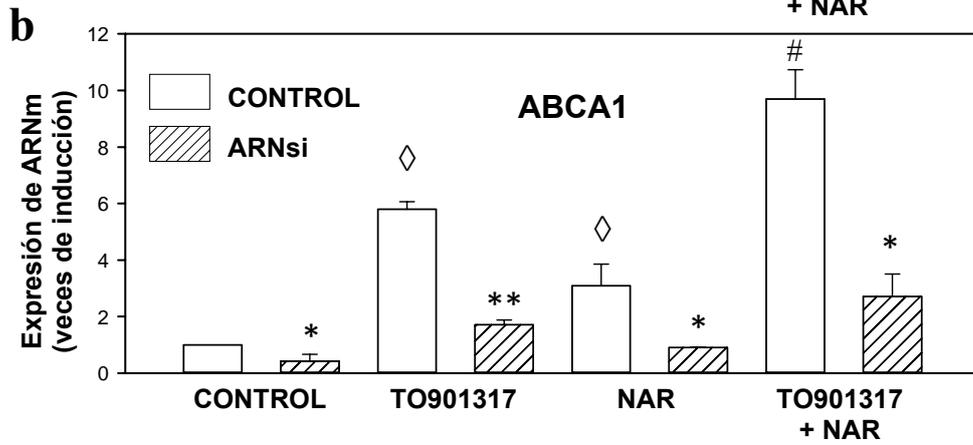
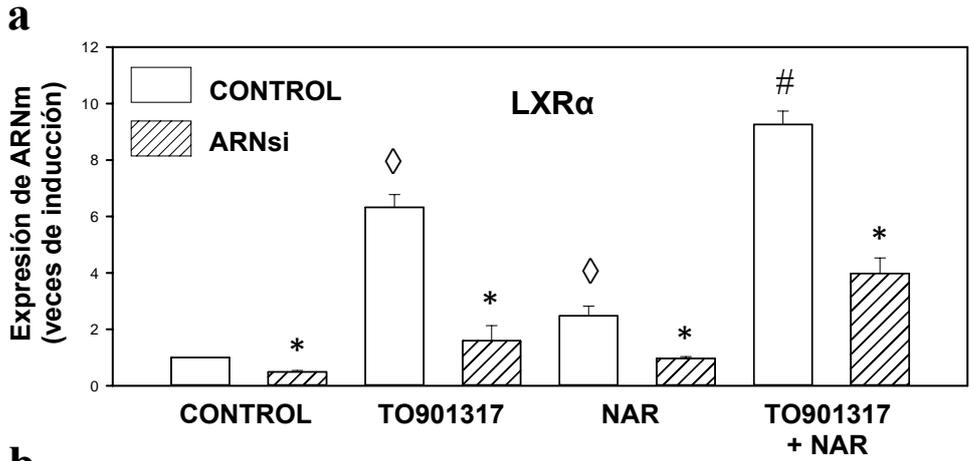
Respecto a los niveles de expresión de ABCG1 y SREBP1c, las células que no fueron tratadas con ARNsi y si fueron estimuladas con TO901317 (1  $\mu$ M) y curcumina (5  $\mu$ M), mostraron incrementos en la expresión de ARNm de los citados genes, al igual que lo observado con anterioridad (x,x). Las células estimuladas con TO901317 y curcumina incrementaron la expresión de ARNm de ABCG1 y SREBP1c, en comparación con las células no tratadas. Las células que fueron tratadas conjuntamente con el agonista sintético y el polifenol presentan una mayor expresión de ARNm de ABCG1 y SREBP1c que las que sólo se trataron con uno de esos compuestos (figura 24).

De igual forma las células tratadas con el ARNsi sufrieron una disminución de la expresión de ARNm de ABCG1 y SREBP1c en comparación con las células que fueron tratadas con el ARNcontrol (figura 9). Las células que además se estimularon con TO901317 (1  $\mu$ M) y curcumina (5  $\mu$ M) durante 20 horas presentaron una menor expresión de ARNm de ABCG1 y SREBP1c que las no silenciadas y tratadas con ambos compuestos (figura 24).



**Figura 24. Inhibición de la expresión de ABCG1 y SREBP1c por el silenciamiento de las subunidades  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  de AMPK en células THP-1 diferenciadas con PMA.** Las células THP-1 diferenciadas con 80 nM de PMA durante 72 horas fueron incubadas con medio mínimo durante 12 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Pasado ese tiempo fueron expuestas a una mezcla de ARN de silenciamiento de las subunidades  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  de AMPK (o ARN control de silenciamiento) y lipofectamina durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se trataron con 1  $\mu$ M de TO901317 y 5  $\mu$ M de curcumina durante 20 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Finalmente fueron analizados los niveles de expresión de ARNm de ABCG1 (a) y SREBP1c (b) mediante PCR a tiempo real, según la metodología descrita en materiales y métodos. Los resultados representan la media de las veces de inducción de expresión de ARNm  $\pm$  E.E.M., n=6. Significación estadística \*  $p \leq 0,05$  y \*\*  $p \leq 0,001$  vs ARNcontrol; ◇  $p \leq 0,001$  vs control; #

Posteriormente se realizaron la misma serie de experimentos en las mismas condiciones para dilucidar si las células THP-1 tratadas con ARNsi de AMPK $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  se veían afectada en la expresión de los ARNm de LXR $\alpha$  y sus genes diana (ABCA1, ABCG1 y SREBP1c) frente a los tratamientos con 100  $\mu$ M de naringenina.



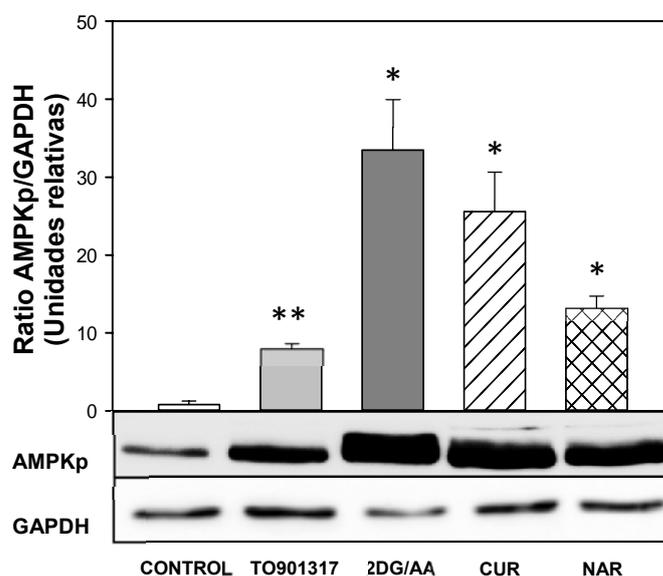
**Figura 25. Inhibición de la expresión de ARNm de LXR $\alpha$  y sus genes diana por el silenciamiento de las subunidades  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2 de AMPK en células THP-1 diferenciadas con PMA.** Las células THP-1 diferenciadas con 80 nM de PMA durante 72 horas fueron incubadas con medio mínimo durante 12 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Pasado ese tiempo fueron expuestas a una mezcla de ARNsi de las subunidades  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2 de AMPK (o ARNcontrol) y lipofectamina durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se trataron con 1  $\mu$ M de TO901317 y 100  $\mu$ M de naringenina durante 20 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Finalmente fueron analizados los niveles de expresión de ARNm de LXR $\alpha$  (a), ABCA1 (b), ABCG1 (c) y SREBP1c (d) mediante PCR a tiempo real, según la metodología descrita en materiales y métodos. Los resultados representan la media de las veces de inducción de expresión de ARNm  $\pm$  E.E.M., n=6. Significación estadística \*  $p \leq 0,05$  y \*  $p \leq 0,001$  vs ARNcontrol;  $\diamond p \leq 0,01$  y  $\diamond\diamond p \leq 0,001$  vs control; #  $p \leq 0,05$  y ##  $p \leq 0,001$  vs TO901317.

Las células que fueron tratadas con ARNcontrol y estimuladas con TO901317 (1  $\mu$ M) y naringenina (100  $\mu$ M) tuvieron incrementos en la expresión de los ARNm de LXR $\alpha$  y sus genes diana, al igual que lo observado en la sección 1 de resultados. Las células estimuladas con TO901317 y naringenina incrementaron la expresión de ARNm de LXR $\alpha$ , ABCA1, ABCG1 y SREBP1c en comparación con las células sin estimular. También las células en presencia del agonista sintético y el flavonoide presentaron una mayor expresión de ARNm de LXR $\alpha$  y sus genes diana que las que sólo fueron tratadas con uno de estos dos compuestos (figura 25).

Las células tratadas con ARNsi vieron disminuidos los niveles de expresión de ARNm de LXR $\alpha$ , ABCA1, ABCG1 y SREBP1c en comparación con las células que estuvieron en presencia del ARNcontrol. Este efecto se observó también en las células que fueron tratadas conjuntamente con TO901317 y naringenina durante 20 horas (figura 25).

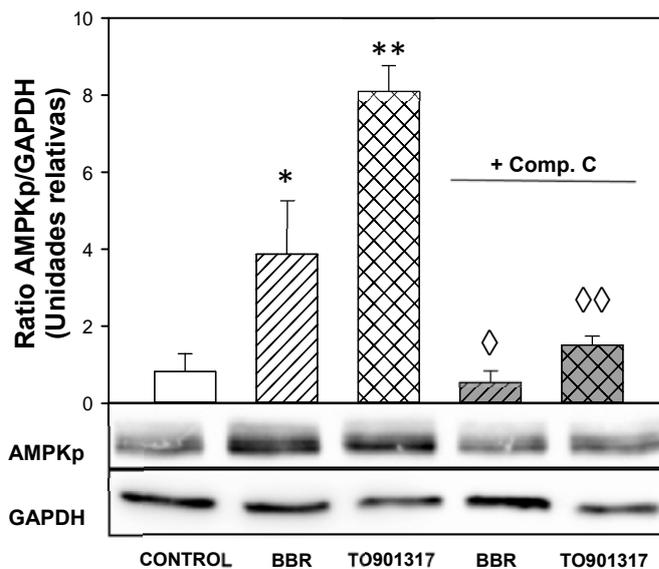
## 5. Incremento en los niveles de proteína AMPK fosforilada (AMPKp) inducida por TO901317, curcumina y naringenina

La actividad fosforilasa de la enzima AMPK puede ser inducida por diversos factores endógenos, como el aumento del ratio ADP/ATP, que puede ser ocasionado por una depleción de ATP inducido por 2-desoxiglucosa (2DG) y actinomicina A (AA) (Ji y col., 2010) o por la acción de ciertas moléculas como la berberina (BBR) (Lee y cols., 2006). A su vez también puede ser inhibida por el componente C (Zou y cols., 2001). Para elucidar la relación de LXR $\alpha$  con la enzima AMPK decidimos usar un activador clásico de LXR $\alpha$  como es el TO901317 y observar sus efectos sobre la fosforilación de AMPK.



**Figura 26. Aumento de los niveles de proteína AMPKp en células THP-1.** Células THP-1 diferenciadas con 80 nM de PMA durante 72 horas fueron incubadas con TO901317 (1  $\mu$ M), 2DG/AA (5 mM/ 2  $\mu$ M), curcumina (5  $\mu$ M) y naringenina (100  $\mu$ M) durante 45 minutos a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Posteriormente las células fueron lisadas y los niveles de proteína AMPKp y GAPDH (proteína endógena) se analizaron mediante inmunodetección. Los resultados representan la media de los niveles de proteína  $\pm$  E.E.M., n=6. Significación estadística \* p  $\leq$  0,05 y \*\* p  $\leq$  0,001 vs control. El western blot mostrado es representativo de 6 experimentos independientes.

Como se observa en la figura 26, la depleción de ATP inducida por la acción de la 2-desoxiglucosa (5 mM) y la actinomicina A (2  $\mu$ M) provoca un aumento de la fosforilación de AMPK. También se observa como la curcumina y la naringenina aumentan la fosforilación de AMPK, como ya han descrito Kim y cols., 2009 y Zygmunt y cols., 2010. Cabe destacar que estas dos moléculas fueron capaces de estimular la expresión proteica de LXR $\alpha$  (x.x.). Finalmente se observó como el agonista



**Figura 27. Efecto del comp. C sobre los niveles de proteína AMPKp en células THP-1.** Células THP-1 diferenciadas con 80 nM de PMA durante 72 horas fueron posteriormente incubadas con berberina (25  $\mu$ M), TO901317 (1  $\mu$ M) y comp. C (5  $\mu$ M) durante 45 minutos a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Pasado ese tiempo, las células fueron lisadas y los niveles de proteína AMPKp y GAPDH (proteína endógena) se analizaron mediante inmunodetección. Los resultados representan la media de los niveles de proteína  $\pm$  E.E.M., n=6. Significación estadística \*  $p \leq 0,05$  y \*\*  $p \leq 0,001$  vs control; ◇  $p \leq 0,05$  y ◇◇  $p \leq 0,001$  vs sin Comp. C. El western blot mostrado es representativo de 6 experimentos independientes.

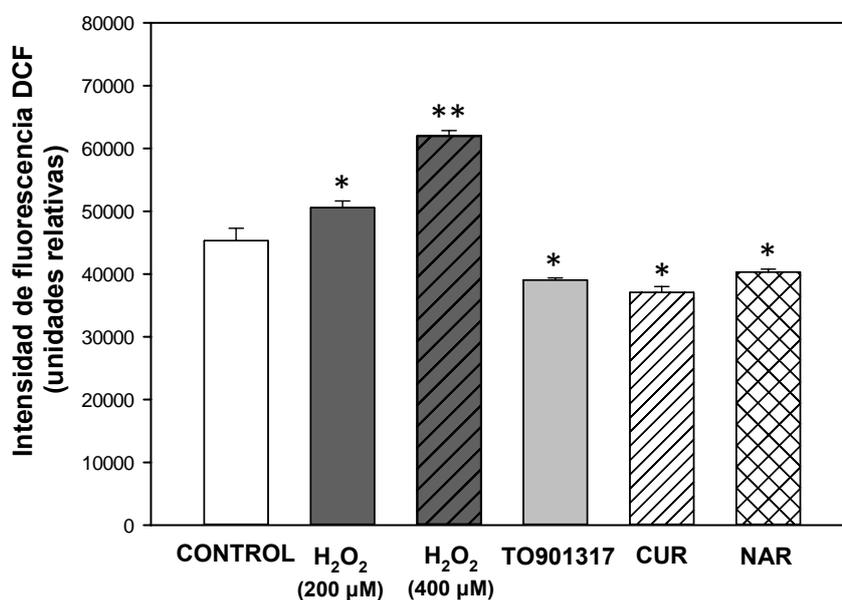
sintético de LXR $\alpha$ , el TO901317, fue capaz de inducir la fosforilación de la enzima AMPK.

La figura 27 muestra como las células THP-1 diferenciadas con PMA y tratadas con berberina (25  $\mu$ M) indujeron un aumento en la cantidad de AMPKp en comparación con el control. También se observó como 1  $\mu$ M de TO901317 producía un incremento aún mayor en la fosforilación de la enzima AMPK que la propia berberina. Al igual que en la sección x.x observamos como el comp. C era capaz de disminuir los efectos activadores sobre la expresión de ARNm de LXR $\alpha$ , en esta ocasión revierte la activación inducida por 25  $\mu$ M de berberina sobre la fosforilación de la AMPK y es capaz de disminuir la producida por el TO901317 significativamente.

## 6. Efecto sobre la producción de ROS de los tratamientos con curcumina, naringenina y TO901317 en macrófagos THP-1

Como se ha mencionado anteriormente (capítulo X.X), la curcumina y la naringenina poseen efectos anti-oxidantes, aunque dependiendo del tipo celular y de la dosis, la naringenina puede producir el efecto contrario (Lin y cols., 2009). Es bien conocido que la activación de LXR $\alpha$  por parte del agonista sintético TO901317 induce una disminución en los niveles de ROS producidos en neutrófilos humanos (Alba y cols., 2012 y Reyes-Quiroz y cols., 2014).

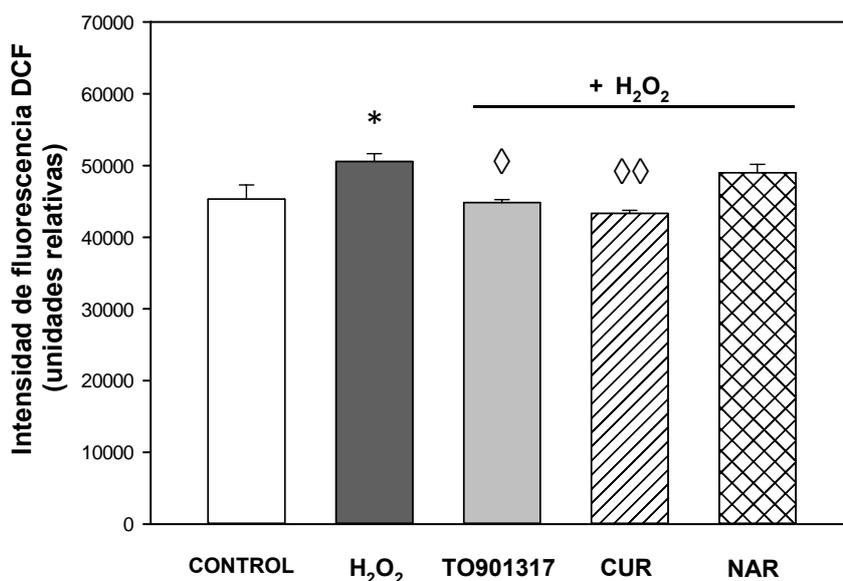
El siguiente experimento se diseñó para evaluar la capacidad anti-oxidante o pro-oxidante de la curcumina y la naringenina en células THP-1 diferenciadas con PMA. Se midió la concentración de ROS de manera indirecta observando la fluorescencia emitida por la descomposición de la DCF-DA en su producto fluorescente en presencia de ROS.



**Figura 28. Efecto del TO901317, curcumina y naringenina sobre la producción de ROS en células THP-1 diferenciadas.** Las células THP-1 diferenciadas con 80 nM de PMA e incubadas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> durante 72 horas fueron tratadas posteriormente con TO901317 (1 μM), curcumina (5 μM) y naringenina (100 μM) durante 20 horas. Finalmente las células se incubaron con DCF-DA durante 45 minutos y se procedió a medir la producción de ROS por fluorometría. Se usaron dos concentraciones diferentes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200 y 400 μM) para estimular la producción de ROS. Los resultados obtenidos representan la media de intensidad de fluorescencia  $\pm$  E.E.M., n=6. Significancia estadística \*  $p \leq 0,05$  y \*\*  $p < 0,001$  vs control.

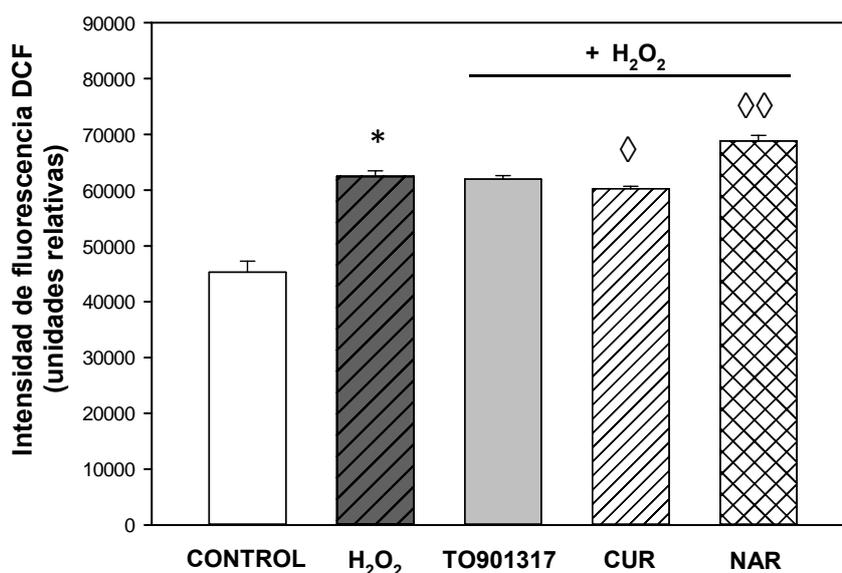
Las células estimuladas con 200 y 400  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  aumentan la fluorescencia emitida debido a que producen ROS. Las células tratadas con TO901317, curcumina y naringenina producían menor cantidad de ROS tras 20 horas de tratamiento que las células control (Figura 28).

A continuación las células THP-1 diferenciadas con PMA fueron estimuladas con 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . En la figura 15 se muestran las variaciones en los niveles de ROS de las células tratadas con TO901317, curcumina y naringenina, estimuladas con 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Se observa que las células tratadas con TO901317 y curcumina sufren menor estrés oxidativos que las únicamente estimuladas con 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . En las células tratadas con naringenina y estimuladas con 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se observa una ligera disminución en la producción de ROS, aunque no fue estadísticamente significativa.



**Figura 29. Efecto del TO901317, curcumina y naringenina sobre la producción de ROS en células THP-1 diferenciadas y estimuladas con 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .** Las células THP-1 diferenciadas con 80 nM de PMA e incubadas a 37°C y 5%  $\text{CO}_2$  durante 72 horas fueron tratadas posteriormente con TO901317 (1  $\mu\text{M}$ ), curcumina (5  $\mu\text{M}$ ) y naringenina (100  $\mu\text{M}$ ) durante 20 horas. Pasado ese tiempo fueron incubadas con DCF-DA durante 45 minutos y estimuladas con 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Finalmente se procedió a medir la producción de ROS por fluorimetría. Los resultados obtenidos representan la media de intensidad de fluorescencia  $\pm$  E.E.M., n=6. Significancia estadística \*  $p \leq 0,05$  vs control; ◇  $p \leq 0,05$  y ◇◇  $p \leq 0,001$  vs  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

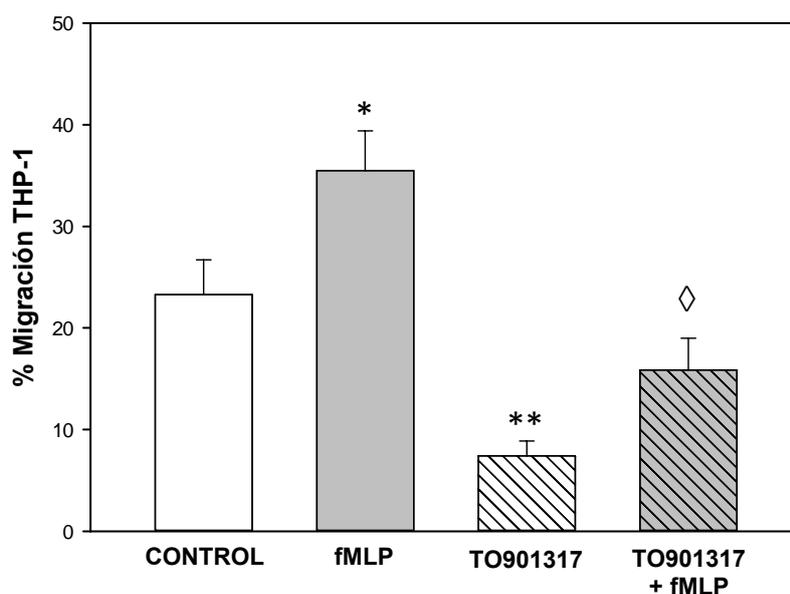
En los siguientes experimentos se quiso comprobar si este efecto protector de estas moléculas sobre la producción de ROS se mantenía a altas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En la figura 30 se observa que las células tratadas con TO901317 y estimuladas con 400 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, no presentan diferencias con las estimuladas únicamente con 400 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Las células tratadas con curcumina y estimuladas con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sufren menor estrés oxidativo que las células que solamente fueron estimuladas con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por el contrario, las células tratadas con naringenina y estimuladas con 400 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> soportan un mayor estrés oxidativo que las sólo estimuladas con el peróxido de hidrógeno.



**Figura 30. Efecto del TO901317, curcumina y naringenina sobre la producción de ROS en células THP-1 diferenciadas y estimuladas con 400 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Las células THP-1 diferenciadas con 80 nM de PMA e incubadas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> durante 72 horas fueron tratadas posteriormente con TO901317 (1 μM), curcumina (5 μM) y naringenina (100 μM) durante 20 horas. Pasado ese tiempo fueron incubadas con DCF-DA durante 45 minutos y estimuladas con 400 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Finalmente se procedió a medir la producción de ROS por fluorimetría. Los resultados obtenidos representan la media de intensidad de fluorescencia ± E.E.M., n=6. Significancia estadística \* p ≤ 0,001 vs control; ◇ ≤ p 0,05 y ◇◇ p ≤ 0,001 vs 400 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

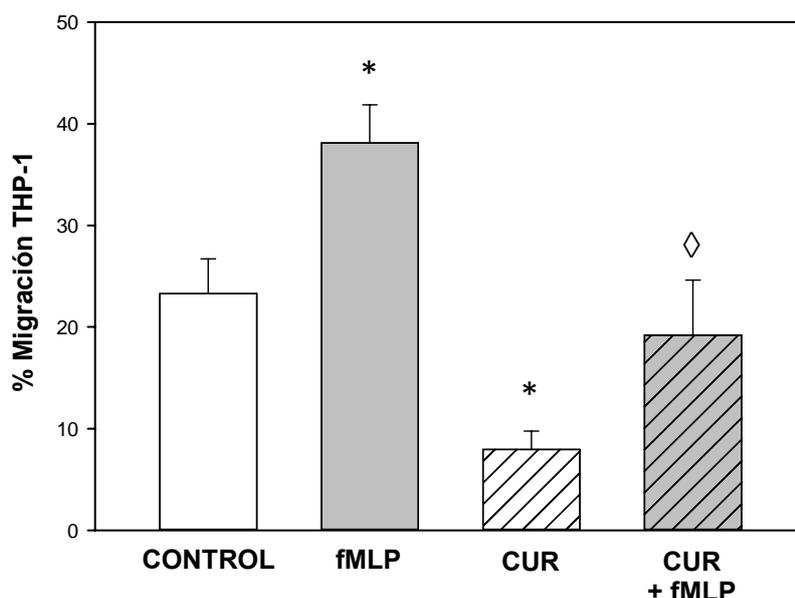
## 7. Inhibición por parte de TO901317, curcumina y naringenina de la migración de células THP-1 inducida por fMPL

En anteriores estudios realizados por nuestro grupo de investigación se demostró que el TO901317 tiene una gran capacidad para inhibir la migración celular en neutrófilos humanos (Alba y cols., 2012; Reyes-Quiroz y cols., 2014). A continuación se estudió el efecto sobre la migración del agonista de LXR $\alpha$  y de los fitoquímicos, curcumina y naringenina, en células THP-1 diferenciadas con PMA.



**Figura 31. Migración de células THP-1 inhibida por el agonista sintético de LXR $\alpha$  TO901317.** Las células THP-1 no diferenciadas fueron incubadas durante 20 horas con 1  $\mu$ M de TO90317 a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente se sembraron 1x10<sup>6</sup> células por condición y se hicieron migrar a través de una membrana porosa de policarbonato de 8  $\mu$ m de diámetro durante 18 horas incubadas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se usó como agente quimioatrayente 200 nM de fMPL. Estos datos son el resultado de 3 experimentos independientes y por duplicado cada uno de ellos, representados como la media  $\pm$  E.E.M. Significación estadística \*  $p \leq 0,05$  y \*\*  $p \leq 0,01$  vs control; ◇  $p \leq 0,05$  vs fMPL.

Como se observa en la figura 31, las células tratadas durante 20 horas con TO901317 migraron menos que las no tratadas con este agonista de LXR $\alpha$ , produciendo una disminución en torno al 68% en la migración celular respecto del control, pasando de un 23,2%  $\pm$  3,4 a un 7,4%  $\pm$  1,44 del total de células migradas. Esas mismas células tratadas con TO901317 e inducidas con fMLP, migraron un aproximadamente un 57% menos que las células igualmente inducidas con el péptido quimiotáctico pero sin tratamiento de 20 horas con el TO901317. Pasaron de un 35,5%  $\pm$  3,9 a un 15,8%  $\pm$  3,1 del total de células migradas.

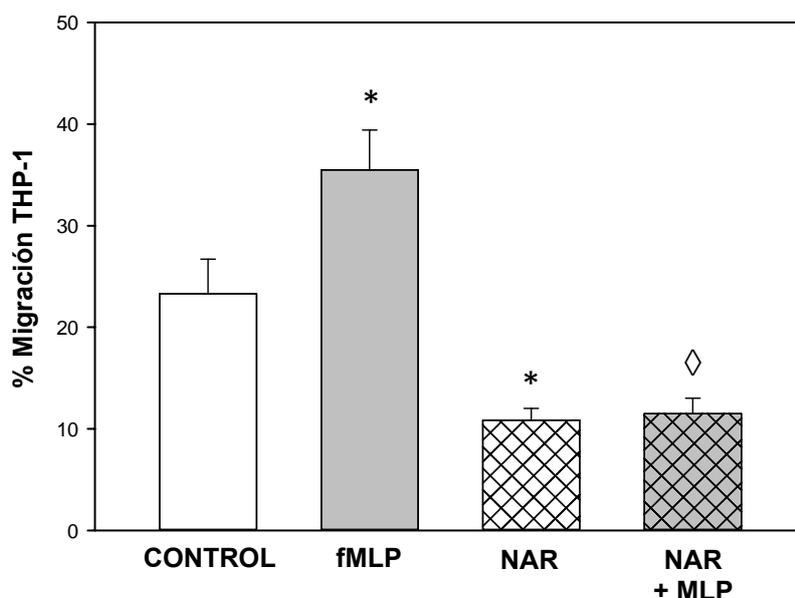


**Figura 32. Migración de células THP-1 inhibida por la curcumina.** Las células THP-1 no diferenciadas fueron incubadas durante 20 horas con 5  $\mu$ M de curcumina a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente se sembraron 1x10<sup>6</sup> células por condición y se hicieron migrar a través de una membrana porosa de policarbonato de 8  $\mu$ m de diámetro durante 18 horas incubadas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se usó como agente quimioatrayente 200 nM de fMLP. Estos datos son el resultado de 3 experimentos independientes y por duplicado cada uno de ellos, representados como la media  $\pm$  E.E.M. Significación estadística \*  $p \leq 0,05$  vs control y  $\diamond p \leq 0,05$  vs fMLP.

Por otro lado, como se puede observar en la figura 32, los experimentos con curcumina revelaron que induce un efecto similar sobre la migración de las THP-1 al del TO901317, disminuyendo la migración basal (la no inducida por fMLP) un 65% respecto al control, pasando de un 23,2%  $\pm$  3,4 de células migradas a un 7,9%  $\pm$  1,8. Respecto a las células estimuladas con fMLP y tratadas con curcumina, las células

migran un 50% menos que las inducidas sólo por el péptido quimiotáctico, pasando de un  $38,1\% \pm 3,7$  de células migradas a un  $19,2\% \pm 5,4$ .

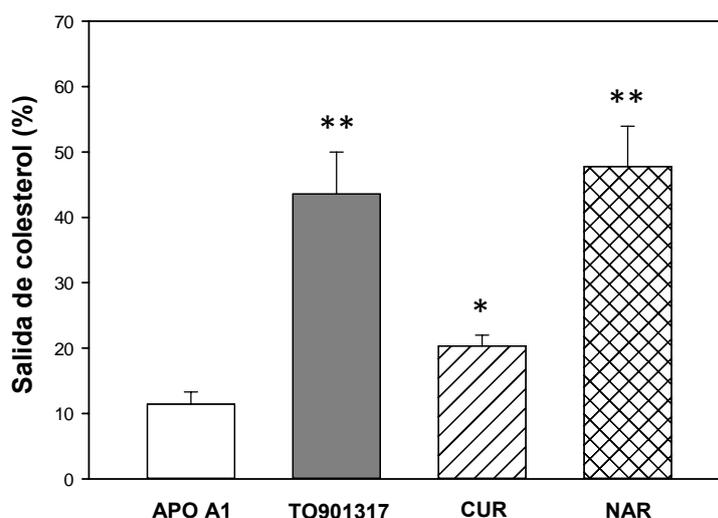
Finalmente, la naringenina disminuyó la migración basal en torno a un 53%. Este descenso fue más pronunciado que el producido por el TO903117 y la curcumina, pasando de un  $23,2\% \pm 3,4$  de células migradas, a un  $10,8\% \pm 1,6$  de migración celular total. Respecto a las células inducidas con fMLP y tratadas durante 20 horas con naringenina, la cual produjo un mayor efecto que los otros dos compuestos citados anteriormente, ya que la migración por quimiotaxis pasó de un  $35,5\% \pm 3,9$  de células estimuladas por fMLP, a un  $11,5\% \pm 1,5$  del total de células migradas, lo que supone una disminución del alrededor de un 67% con respecto a las células estimuladas por el agente quimiotáctico (Figura 33).



**Figura 33. Migración de células THP-1 inhibida por la naringenina.** Las células THP-1 no diferenciadas fueron incubadas durante 20 horas con  $100 \mu\text{M}$  de naringenina a  $37^\circ\text{C}$  y  $5\% \text{CO}_2$ . Posteriormente se sembraron  $1 \times 10^6$  células por condición y se hicieron migrar a través de una membrana porosa de policarbonato de  $8 \mu\text{m}$  de diámetro durante 18 horas incubadas a  $37^\circ\text{C}$  y  $5\%$  de  $\text{CO}_2$ . Se usó como agente quimioatrayente  $200 \text{nM}$  de fMLP. Estos datos son el resultado de 3 experimentos independientes y por duplicado cada uno de ellos, representados como media  $\pm$  E.E.M. Significación estadística \*  $p \leq 0,05$  vs control y  $\diamond p \leq 0,05$  vs fMLP.

## 8. Salida del colesterol inducida por TO901317, curcumina y naringenina

Con los resultados anteriormente descritos sobre la estimulación de LXR $\alpha$  y sus genes diana nos cuestionamos su posible funcionalidad biológica. La salida del colesterol está mediado por la acción de los transportadores ABCA1 y G1, teniendo a Apo A1 como aceptor de colesterol en el exterior celular (Tontonoz y Mangelsdorf, 2003). Realizamos el estudio del flujo de colesterol en células THP-1 siguiendo el protocolo de Wong y cols., 2007 y Low H y cols., 2012.



**Figura 34. Salida de colesterol mediada por TO901317, curcumina y naringenina.** Las células THP-1 fueron diferenciadas con PMA 80 nM y tratadas con 1  $\mu$ Ci/ml de colesterol tritado durante 72 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Transcurrido ese tiempo añadimos medio de cultivo con suero de albumina bovina y dejamos 12 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> nuevamente. Posteriormente, sustituimos el medio de cultivo por otro suplementado con suero fetal bovino (5%) y añadimos TO901317 (1  $\mu$ M), curcumina (5  $\mu$ M) y naringenina (100  $\mu$ M) dejando incubar durante 20 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Finalmente la radiactividad emitida se evalúa mediante un contador beta. Los valores expresados son la media  $\pm$  E.E.M. de la diferencia entre las cuentas medidas en el sobrenadante y el lisado celular, n=9. Significación estadística \*  $p \leq 0,05$  y \*\*  $p \leq 0,001$  vs control.

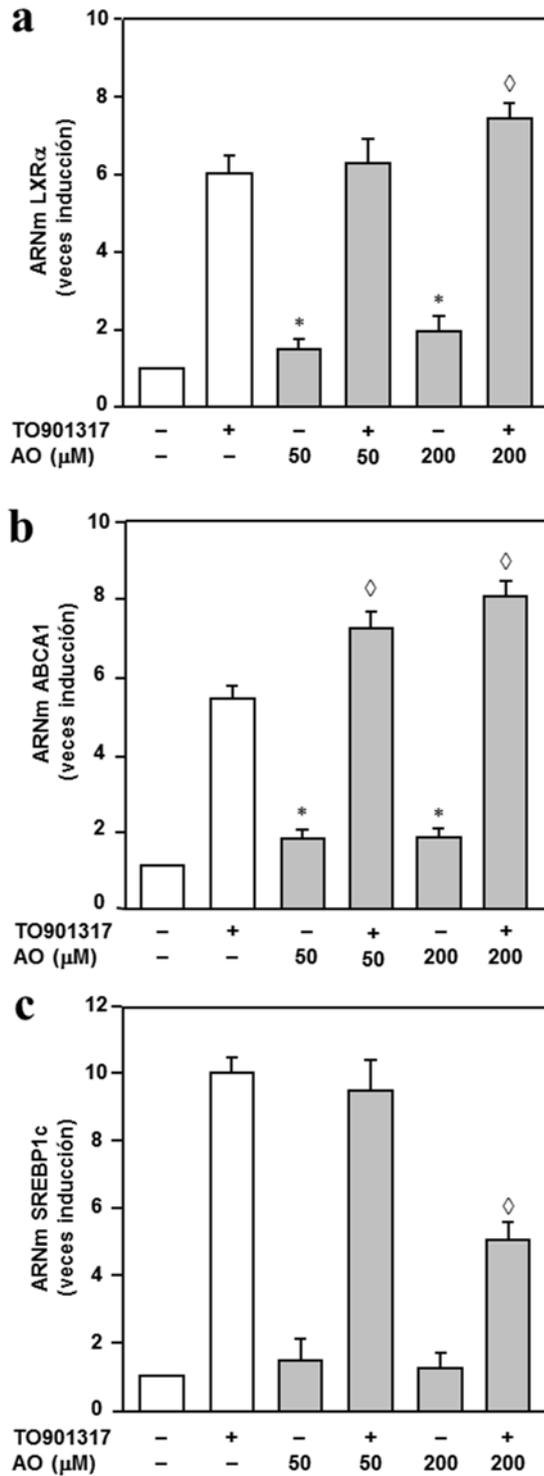
Valoramos si los tratamientos lograban inducir el flujo reverso de colesterol desde el interior al exterior celular. Se cuantificó la salida de colesterol marcado radiactivamente, mediada por la Apo A1. El control se refiere a la salida de colesterol de forma constitutiva debida a la presencia de Apo A1 en el medio. Como se puede observar en la figura 34 el agonista sintético de LXR, el TO901317 (control positivo), induce la salida de colesterol en las células THP-1 diferenciadas con PMA, en comparación con el control.

La curcumina induce la salida de colesterol, en comparación con el control, pero este incremento es menor que el que se observa con el TO901317. El agonista sintético de LXR induce la salida de colesterol más de un  $43,5\% \pm 6,4$  y la curcumina un  $20,3\% \pm 1,6$ . Ello coincide con los resultados a nivel de la transcripción del mensajero, ya que la curcumina por sí sola induce el aumento de la expresión del LXR y de los transportadores ABC-A1 y G1 como se observa en la figura 22.

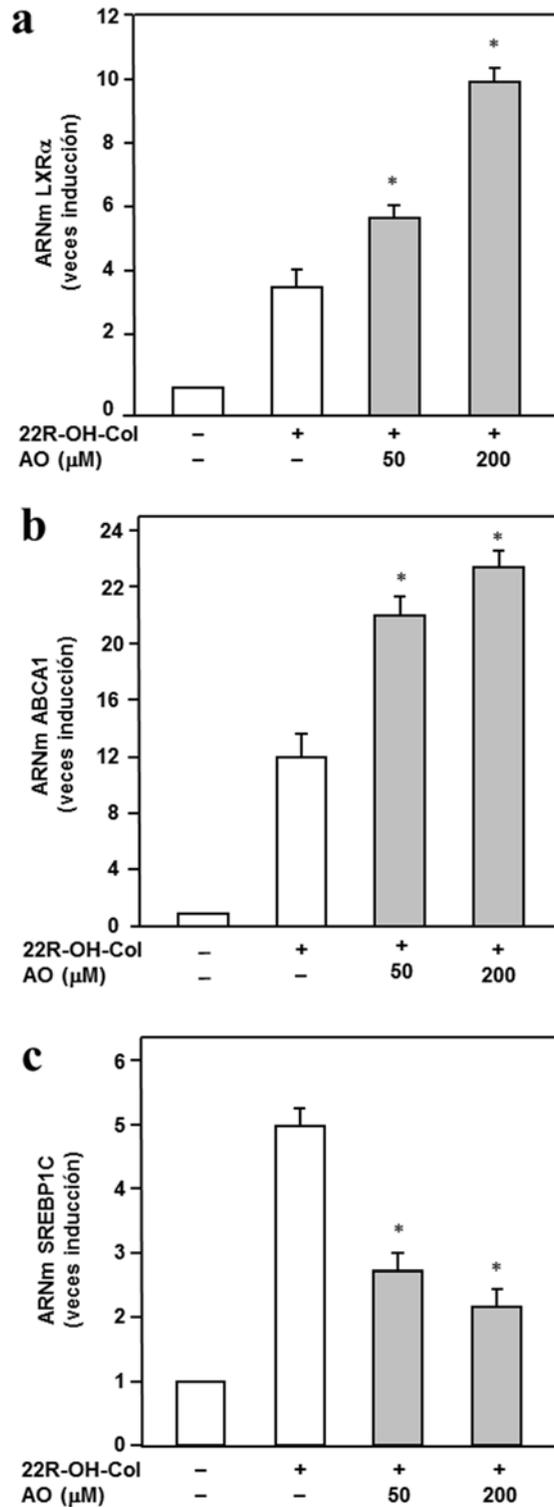
Por su parte, la naringenina induce el transporte reverso de colesterol a un nivel similar al producido por el TO901317. El flavonoide es capaz de inducir la salida de colesterol un  $47,7\% \pm 6,1$ . Este resultado está en concordancia con lo observado a niveles de transcripción del mensajero y nivel de proteínas (x.x y x.x).

## **9. Efecto del ácido oleico sobre la expresión de los ARNm de LXR $\alpha$ y sus genes diana inducida por el TO901317 o el 22R-OH-colesterol en neutrófilos humanos**

La transcripción de LXR $\alpha$  y sus genes diana (ABCA1 y SREBP1c) fue inducida por su ligando sintético (TO901317) o ligando natural (22R-OH-colesterol) en neutrófilos humanos. Las figuras 1a y 1b ilustran como 50  $\mu$ M ó 200  $\mu$ M de AO inducen ligeramente por sí mismo la expresión de los ARNm de LXR $\alpha$  y ABCA1. El AO potenció el efecto del TO901317 sobre la inducción del LXR $\alpha$  a una concentración de 200  $\mu$ M. En el caso de la expresión de ABCA1, el efecto inductor se observó a la concentración de 50  $\mu$ M de AO, siendo máxima a la concentración de 200  $\mu$ M. El AO no tuvo efecto por sí mismo sobre la transcripción de SREBP1c. El AO a 200  $\mu$ M (pero no a 50  $\mu$ M) disminuyó el efecto sobre la transcripción de SREBP1c inducida por el ligando (Figura 1c). Al usar el 22R-OH-colesterol junto con el AO se obtuvieron resultados similares que con el TO901317, aumentando la expresión de LXR $\alpha$  y de ABCA1, y disminuyendo la transcripción de ARNm en SREBP1c (Figura 2a, b y c). La diferencia principal entre los resultados obtenidos con los distintos ligandos es que a la dosis de 50  $\mu$ M de AO, se observaba el efecto potenciador sobre la expresión de LXR $\alpha$  o inhibidor sobre la expresión de SREBP inducidas por el ligando natural 22R-colesterol.



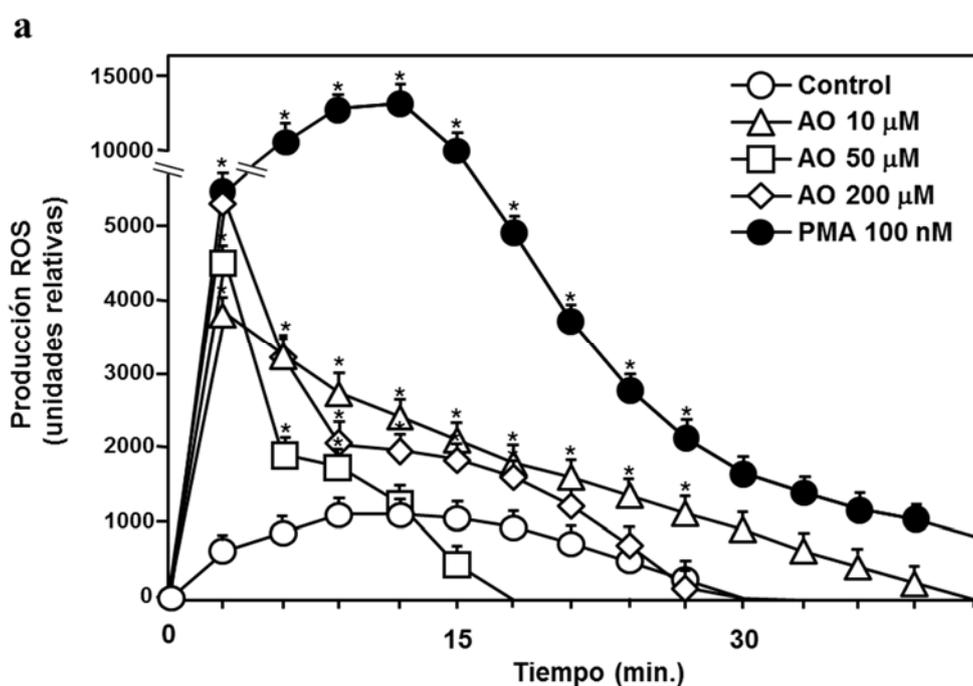
**Figura 1. Efecto del AO sobre la inducción producida por el TO901317 en la expresión de ARNm de LXR $\alpha$  y sus genes diana en neutrófilos humanos.** Las células se incubaron 1 hora a 37°C con o sin 50 ó 200  $\mu$ M de AO. Posteriormente se añadió 1  $\mu$ M de TO901317 y se cultivaron durante 5 horas más. Finalmente fueron analizados los niveles de expresión de ARNm mediante PCR a tiempo real, según la metodología descrita en materiales y métodos. Los resultados representan la media de las veces de inducción de expresión de ARNm  $\pm$  E.E.M., n=6. Significación estadística \*  $p \leq 0,01$  AO estimulado vs AO no estimulado;  $\diamond p \leq 0,01$  AO estimulado y tratado con TO901317 vs AO no estimulado y tratado con TO901317.



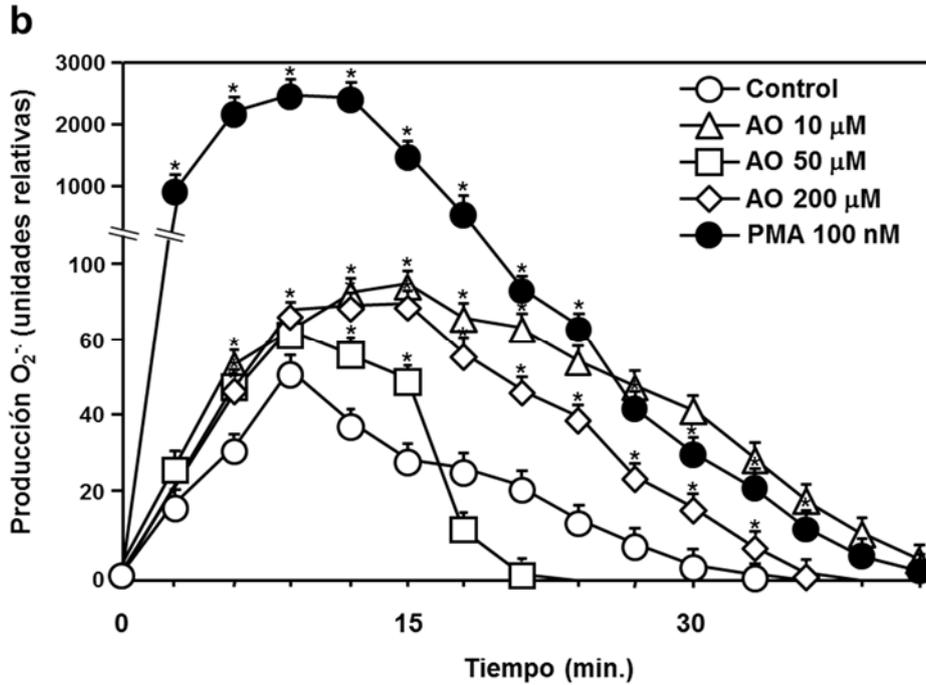
**Figura 2. Efecto del AO sobre la inducción producida por el 22R-OH-colesterol en la expresión de ARNm de LXRα y sus genes diana en neutrófilos humanos.** Las células se incubaron 1 hora a 37°C con o sin 50 ó 200 μM de AO. Posteriormente se añadió 1 μM de 22R-OH-colesterol y se cultivaron durante 5 horas más. Finalmente fueron analizados los niveles de expresión de ARNm mediante PCR a tiempo real, según la metodología descrita en materiales y métodos. Los resultados representan la media de las veces de inducción de expresión de ARNm ± E.E.M., n=6. Significación estadística \*  $p \leq 0,01$  AO estimulado y tratado con 22R-OH-col vs AO no estimulado y tratado con 22R-OH-col.

## 10. El ácido oleico induce un ligero estrés oxidativo en neutrófilos humanos

Recientemente se ha descubierto que el AO induce la producción de anión superóxido en neutrófilos bovinos (Hidalgo y cols., 2011). Los siguientes experimentos fueron diseñados para someter a ensayo si el AO pudo modificar la producción de ROS (Figura 3) y  $O_2^-$  (Figura 4) en neutrófilos humanos. En ambos casos, el AO (10-200  $\mu$ M) indujo una rápida producción de ROS, alcanzando valores máximos aproximadamente a los 3 minutos (producción de ROS) ó 9 minutos (producción de  $O_2^-$ ) después de la adición de AO. La concentración de ROS disminuyó rápidamente y después de 30-45 minutos los valores fueron similares a los de las células control. El aumento de la producción de ROS por el AO fue leve en comparación por el provocado por el PMA, que fue aproximadamente de 10- o 20-veces superior (Figura 3 o 4, respectivamente).

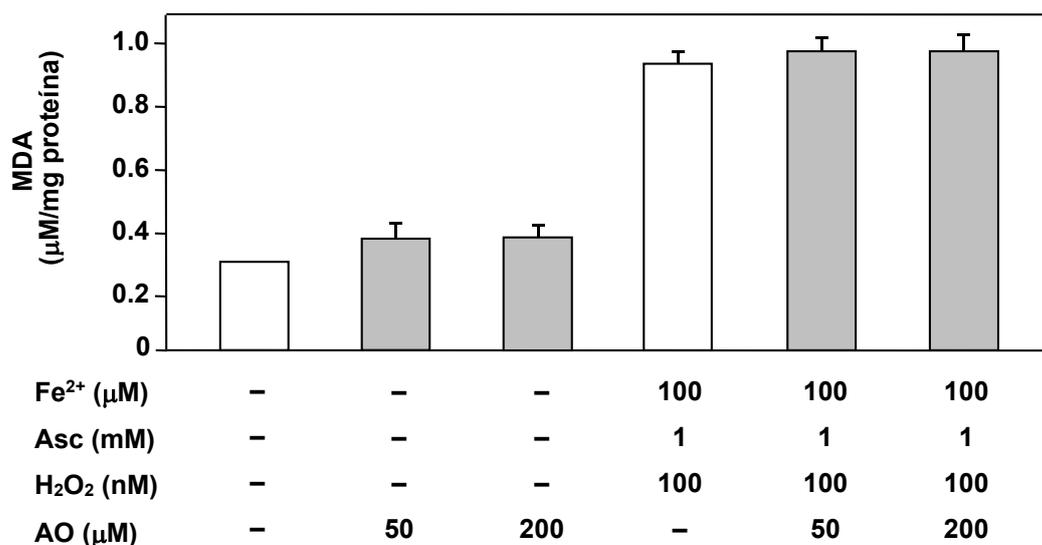


**Figura 3. Efecto del AO en la producción de ROS.** Los neutrófilos fueron incubados con 10 mg/ml de peroxidasa de rábano (HRP) y 40  $\mu$ M de luminol durante 5 minutos a 37 °C. A continuación, se añadió 10, 50 ó 200  $\mu$ M de AO y se midió la producción de ROS en un analizador de luminiscencia. Los resultados representan la media de la producción de ROS  $\pm$  E.E.M., n=3. Significación estadística \*  $p \leq 0,01$  AO estimulado vs AO no estimulado.

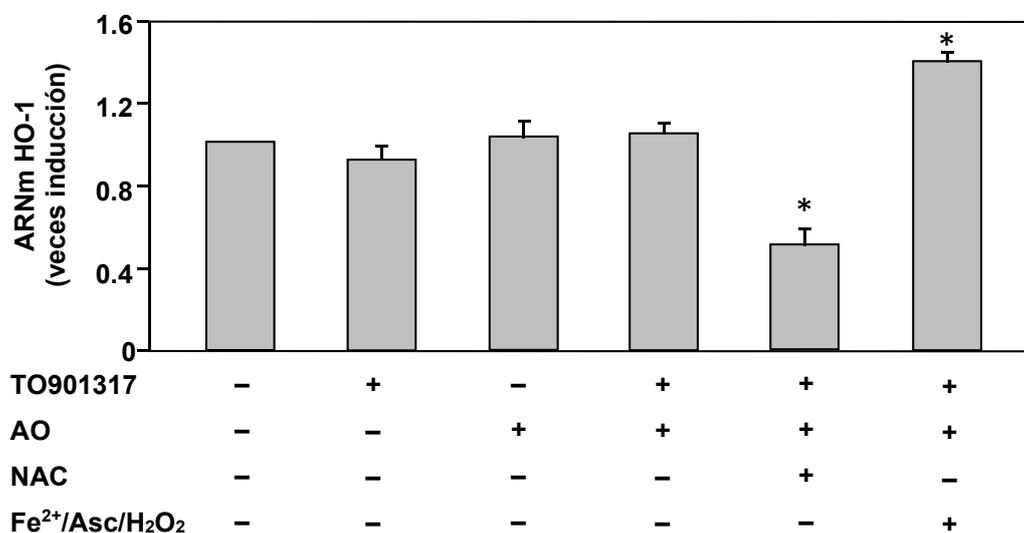


**Figura 4. Efecto del AO en la producción de ROS.** Los neutrófilos fueron incubados con 10 mg/ml de peroxidasa de rábano (HRP) y 40  $\mu\text{M}$  de lucigenina durante 5 minutos a 37 °C. A continuación, se añadió 10, 50 ó 200  $\mu\text{M}$  de AO y se midió la producción de ROS en un analizador de luminiscencia. Los resultados representan la media de la producción de ROS  $\pm$  E.E.M., n=3. Significación estadística \*  $p \leq 0,01$  AO estimulado vs AO no estimulado.

A continuación se evaluó el posible efecto de los ROS sobre la peroxidación de lípidos mediada por el AO. El AO no indujo la peroxidación lipídica por sí mismo, y tampoco aumentó la producida por una combinación de  $\text{Fe}_2\text{SO}_4$ , ascorbato y  $\text{H}_2\text{O}_2$  a ninguna de las dos concentraciones estudiadas (Figura 5). Además, para evaluar el posible daño celular debido a la producción de ROS inducida por AO se analizó su efecto sobre la expresión génica de la hemoxigenasa-1 (HO-1), un marcador bien conocido de lesión citotóxica. Se encontró que el AO no tuvo ningún efecto sobre la expresión de ARNm de HO-1 (*Heme oxygenase 1*) en neutrófilos humanos (Figura 6).



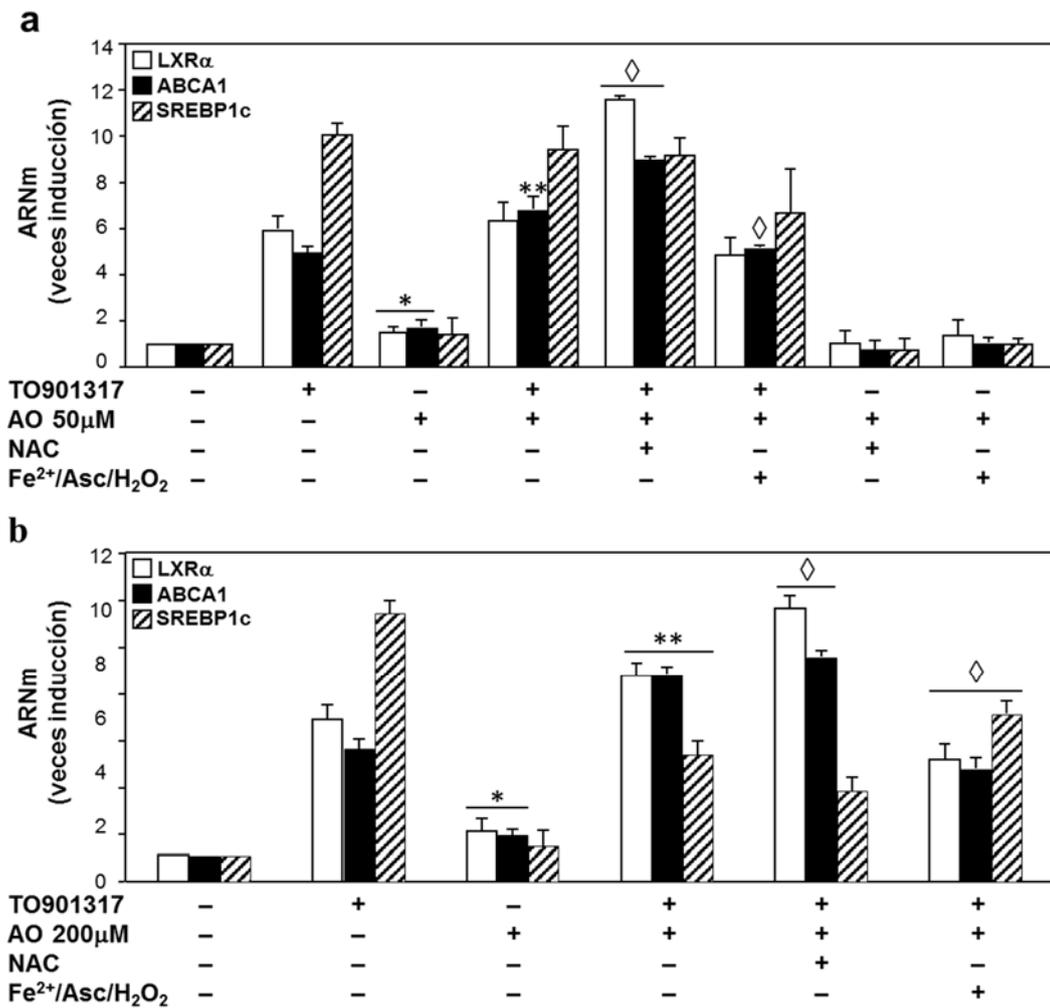
**Figura 5. Efecto del AO sobre la peroxidación lipídica en neutrófilos humanos.** Se analizó el efecto protector del AO frente a la capacidad pro-oxidante del FeSO<sub>4</sub> más ascorbato y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los neutrófilos se pre-incubaron en presencia de 50 ó 200 µM de AO durante 4 horas. Pasado ese tiempo se añadieron a las células FeSO<sub>4</sub> más ascorbato y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a las concentraciones indicadas y se cultivaron durante 1 hora. Finalmente se midieron los niveles de malonaldehído (MDA). Estos datos representan la media de los valores de concentración de MDA ± E.E.M., n=3.



**Figura 6. Efecto del AO sobre la expresión ARNm de HO-1 en neutrófilos humanos.** Las células se incubaron a 37°C con o sin 1 mM de NAC, y con FeSO<sub>4</sub> más ascorbato y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 min. Pasado ese tiempo se añadió 50 µM de AO a las células y se incubaron durante 1 hora. Finalmente, se añadió 1 µM de TO901317 y se dejaron durante 5 horas a 37°C. Los niveles de expresión de ARNm se analizaron mediante PCR a tiempo real, según la metodología descrita en materiales y métodos. Los resultados representan la media de las veces de inducción de expresión de ARNm ± E.E.M., n=3. Significación estadística \* p ≤ 0,01 NAC o Fe<sup>2+</sup>/Asc/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y estimulado con TO901317 y AO vs sin NAC o Fe<sup>2+</sup>/Asc/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y estimulado por TO901317 y AO.

## **11. Efecto del ácido oleico sobre la expresión de LXR $\alpha$ y sus genes diana no está mediado por el aumento en los niveles de ROS**

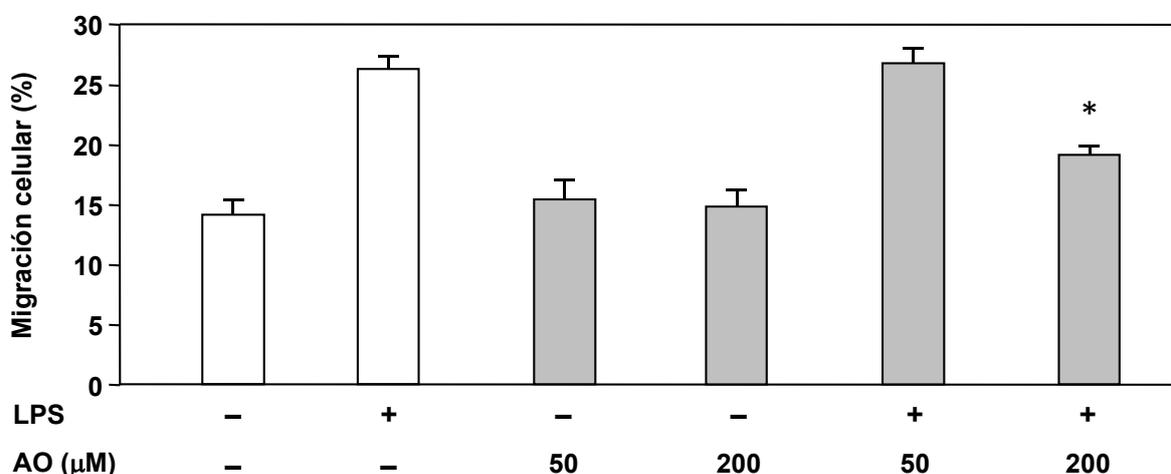
A continuación, se estudió si el ligero aumento en los ROS producido por el AO se relaciona con el incremento de los niveles de ARNm de LXR $\alpha$  y sus genes diana en neutrófilos. El siguiente experimento se diseñó utilizando N-acetilcisteína (NAC) como agente reductor, y el sistema ascorbato/Fe<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como agente pro-oxidante. La presencia de NAC estimuló la transcripción de LXR $\alpha$  en los neutrófilos que se incubaron posteriormente con TO901317 y 50  $\mu$ M de AO. Por el contrario, la combinación de Fe<sup>2+</sup>/ascorbato/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no tuvo ningún efecto significativo sobre la transcripción génica del LXR $\alpha$  inducida por AO y TO901317 (Figura 7a). El efecto del NAC sobre la transcripción ABCA1 fue similar, aunque menos pronunciado que en la expresión de LXR $\alpha$ . Sin embargo, la combinación de los tres oxidantes disminuyó la expresión de ABCA1. Por otra parte, ni el NAC, ni el ascorbato/Fe<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tuvieron ningún efecto sobre la síntesis de ARNm de SREBP1c inducida por el AO y el TO901317 (Figura 7a). Cuando las células se incubaron con 200  $\mu$ M de AO, los efectos observados con el NAC (Figura 7b) fueron similares a los observados con 50  $\mu$ M de AO para todos los genes, excepto para SREBP1c, cuyos niveles de expresión de ARNm fueron menores. Por otro lado, la combinación de agentes pro-oxidantes pudo revertir el efecto de 200  $\mu$ M de AO.



**Figura 7. Efecto del AO sobre la expresión ARNm de LXRα y sus genes diana en neutrófilos humanos.** Las células se incubaron con 1 mM de N-acetilcisteína (NAC) o 0,1 mM de FeSO<sub>4</sub> a 37°C durante 1 hora. Luego se añadió 50 μM (a) ó 200 μM (b) de AO durante 1 hora, y posteriormente las células se estimularon o no con 1 μM de TO901317 durante 5 horas más. Finalmente fueron analizados los niveles de expresión de ARNm mediante PCR a tiempo real, según la metodología descrita en materiales y métodos. Los resultados representan la media de las veces de inducción de expresión de ARNm ± E.E.M., n=3. Significación estadística \*  $p \leq 0.01$ , AO no estimulado vs AO estimulado; ◇  $p \leq 0,01$  AO estimulado y tratado con TO901317 vs AO estimulado y no tratado con TO901317; #  $p \leq 0,01$  TO901317 estimulado y tratados con AO y NAC o FeSO<sub>4</sub> vs sin tratar con antioxidantes o pro-oxidante.

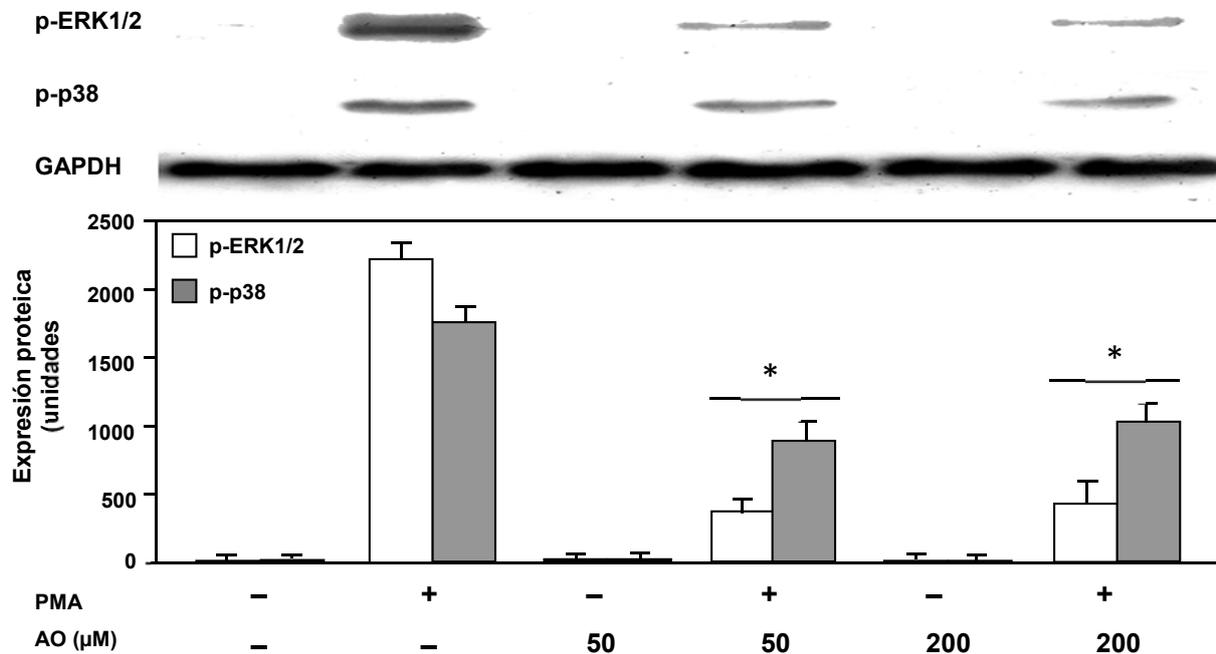
## 12. Efecto del AO sobre la migración celular, la activación de ERK1/2 y p38, y los niveles de lípidos en neutrófilos humanos

También se estudió si el tratamiento con AO alteraba la respuesta inflamatoria en neutrófilos humanos. Se evaluó si el AO era capaz de alterar la respuesta transmigratoria inducida por el LPS, un conocido inductor de la trans migración de neutrófilos (Konrad y cols., 2012). El AO (50 ó 200  $\mu\text{M}$ ) no tuvo efecto por sí mismo para alterar la capacidad migratoria de estas células, pero curiosamente una preincubación de los neutrófilos con 200  $\mu\text{M}$  de AO redujo la migración inducida por LPS (Figura 8).



**Figura 8. Efecto del AO sobre la migración de los neutrófilos humanos.** Los neutrófilos fueron incubados con 50 o 200  $\mu\text{M}$  de AO durante 5 horas a 37°C. Posteriormente se añadió 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de LPS durante 1 hora más. Las células que habían migrado hacia el compartimiento inferior de cámaras fueron recogidas, marcadas con anticuerpos fluorescentes anti-CD16 y analizadas por citometría de flujo. Estos datos son el resultado de 3 experimentos independientes y por duplicado cada uno de ellos, representados como la media  $\pm$  E.E.M. Significación estadística \*  $p \leq 0,01$  LPS y tratada con AO vs LPS no tratadas con AO.

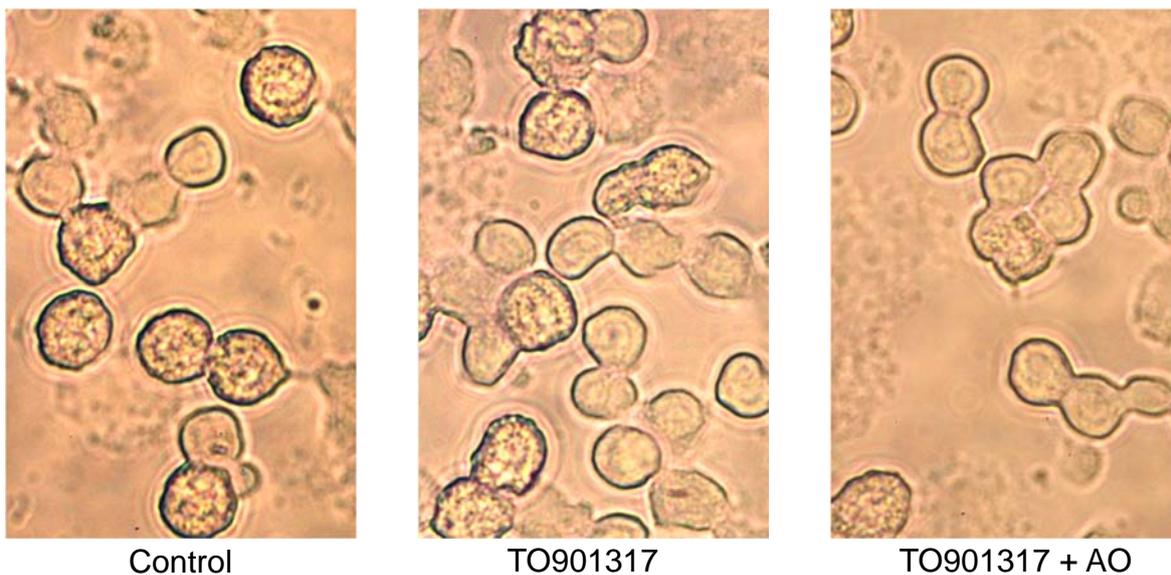
Otros marcadores de inflamación son proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) de las cuales cabe destacar ERK1/2 y p38 (Doddareddy y cols., 2012). En neutrófilos humanos tratados con AO (50 ó 200  $\mu\text{M}$ ) durante 3 horas, se encontró que el efecto activador del PMA sobre la fosforilación de ERK1/2 y p38 disminuyó drásticamente (Figura 9), mientras que el AO no tuvo ningún efecto por sí mismo en la fosforilación de estas MAPKs (Figura 9).



**Figura 9. Efecto del AO sobre la activación de ERK1/2 y p38 en neutrófilos humanos.** Las células se incubaron con 50 ó 200 μM de AO durante 5 horas a 37°C. Después, se añadieron 100 nM de PMA durante otros 5 min. Posteriormente las células fueron lisadas y los niveles de proteína fosforilada de ERK1/2 (p-ERK1/2), MAPK p38 (p-p38) y GAPDH (proteína endógena) se analizaron mediante inmunodetección. Los resultados representan la media de los niveles de proteína ± E.E.M., n=3. Significación estadística \*  $p \leq 0,01$  PMA y tratada con AO vs PMA no tratadas con AO.

### 13. Efecto del AO sobre el transporte reverso del colesterol

Por último, se evaluó si el AO era capaz de alterar los niveles de lípidos en neutrófilos humanos. Con este fin, se analizó la salida del colesterol mediante el protocolo de tinción con Oil Red O. Los neutrófilos se incubaron con 16  $\mu\text{g/ml}$  de colesterol durante 4 horas y posteriormente las células fueron tratadas con 1  $\mu\text{M}$  de TO901317 y/o 200  $\mu\text{M}$  de AO en presencia de 7  $\mu\text{g/ml}$  de Apo A1, que se requiere para que ABCA1 dirige el flujo de colesterol al exterior celular. Como se muestra en la figura 10, el TO901317 disminuyó los niveles de lípidos intracelulares y el AO potenció



**Figura 10. Efecto del AO sobre los niveles de lípidos intracelulares en neutrófilos humanos.** Las células se incubaron a 37°C con o sin AO (200  $\mu\text{M}$ ) durante 1 hora. Después, se añadió, o no, 1  $\mu\text{M}$  de TO901317 durante 5 horas antes de ser teñidas con Oil red-O para visualizar las gotas de lípidos intracelulares. Esta imagen es representativa de tres experimentos diferentes con similares resultados. dicho efecto.

# **DISCUSIÓN**



## DISCUSIÓN

---

El propósito de esta tesis es demostrar la hipótesis planteada por nuestro grupo de investigación, además de por otros grupos, que sugiere una alternativa a la regulación de LXR $\alpha$  y sus genes diana de forma post-transduccional, además de la conocida regulación transcripcional (Calkin y Tontonoz, 2012). La regulación propuesta es una fosforilación sobre más de una Serina en distintos motivos de LXR $\alpha$  y mediada por distintas quinasas (Alba y cols., 2012). La fosforilación sobre Serina es capaz de modular la actividad transcripcional de LXR (Torra y cols., 2008). Por otro lado, es bien sabido que la Serina 198 de LXR es un sitio consenso para la fosforilación de las MAPKs (Chen y cols., 2006).

Varios de los procesos fisiológicos regulados por los LXRs implican un gasto de energía, como la síntesis de ácidos grasos (Janowskiy cols., 1996). La AMPK es una enzima que controla el metabolismo de la glucosa y de los lípidos (Carling, 2004; Hardie, 2004) debido a lo cual decidimos tomarla como posible regulador de la actividad de LXR $\alpha$ . Las proteínas p38 y ERK1/2 se eligieron como posibles moduladores de la fosforilación sobre LXR $\alpha$ .

Se valoraron los posibles efectos moleculares de distintos compuesto de origen vegetal con efectos beneficiosos para la salud (curcumina, naringenina y ácido oleico) sobre la expresión de LXR $\alpha$  y sus genes diana. La curcumina posee la capacidad de inhibir la síntesis de ácidos grasos en células de carcinoma hepático a través de la activación de la enzima AMPK (Kim y cols., 2009). La naringenina desempeña un papel esencial en la protección frente a fenómenos de daño oxidativo (Mershiba y cols., 2013) y tienen efectos terapéuticos en numerosas patologías como la aterosclerosis o el cáncer (Knekty cols., 2002). El ácido oleico posee propiedad anti-aterogénicas, siendo capaz de mantener y/o puede aumentar los niveles de colesterol HDL y disminuir los niveles plasmáticos de colesterol LDL (Kien, 2014).

Usamos el receptor nuclear LXR como diana debido a su implicación en la homeostasis del colesterol y la respuesta inflamatoria. Nos centramos en la isoforma  $\alpha$  como diana de nuestras moléculas ya que es susceptible de ser inducida en humanos. El estudio lo realizamos en neutrófilos humanos y células THP-1 ya que representan un buen modelo para poder estudiar *in vitro* la capacidad anti-aterogénica de los productos usados como posibles activadores de LXR $\alpha$ .

## 1. Expresión de ARNm de LXR $\alpha$ y sus genes diana

Los tratamientos con TO901317 en cultivos de células THP-1 incrementaron los niveles de ARNm de LXR $\alpha$  y sus genes diana ABCA1, G1 y SREBP1c. Estos resultados están en consonancia con los descritos por nuestro grupo de investigación en otros tipos celulares tales como neutrófilos y macrófagos (Reyes-Quiroz y cols., 2014; Alba y cols., 2012). Igualmente concuerdan con los descritos por otros autores en macrófagos (Ma y cols., 2014), en células 3T3-L1, (Ross y cols., 2002) y en células de la retina (Yang y cols., 2014).

La curcumina también aumentó los niveles de ARNm de LXR $\alpha$ , ABCA1, G1 y SREBP1c. Existen pocos estudios sobre la capacidad de la curcumina de modificar la expresión de ARNm de LXR $\alpha$  y sus genes diana. Se ha descrito un aumento de la expresión de LXR $\alpha$  y ABCA1 en adipocitos (Dong y cols., 2011) y de ABCA1 en cerebro Tian y cols. (2013). En macrófagos se ha descrito tanto un aumento en la expresión de LXR $\alpha$ , ABCA1 y del receptor SR-BI (Liv, 2014) como una disminución en la expresión de LXR $\beta$  y ABCA1 (Huwait y cols., 2011). Es importante resaltar el efecto sinérgico ejercido por el TO901317 y la curcumina sobre la expresión de ARNm de LXR $\alpha$  y sus genes diana. Este hecho no se ha descrito con anterioridad.

El tratamiento de células THP-1 con naringenina produjo igualmente un incremento en los niveles de ARNm de LXR $\alpha$ , ABCA1, G1 y SREBP1c. La naringenina tiene actividad tipo agonista de LXR en macrófagos cultivados (Borradaile y cols., 2003). Se ha descrito una disminución en la cantidad de ARNm de LXR $\alpha$ , ABCA1 y G1 en una línea celular de hepatocito (Goldwasser y cols., 2010). Al igual que ocurre con la curcumina hemos observado una potenciación en la expresión de los genes estudiados tras el tratamiento conjunto de la naringenina y el TO901317.

Se han descrito efectos sinérgicos del TO901317 con otro flavonoide, la genisteína, sobre la expresión de ARNm de los ABCG5 en hepatocitos de ratón (González-Granillo y cols., 2012) y de otro compuesto natural con estructura fenólica, el resveratrol, sobre la expresión de ARNm de ABCA1 y SREBP1c en tejido hepático murino (Gao y Liu, 2013).

## 2. Expresión proteica de LXR $\alpha$

En las células incubadas con TO901317, curcumina y naringenina, los niveles de proteína aumentaron de manera paralela a los ARNm. Este aumento en la expresión de proteína LXR $\alpha$  inducida por el TO901317 ha sido observado previamente por nuestro grupo en neutrófilos y macrófagos (Reyes-Quiroz y cols., 2014; Alba y cols., 2012). También se ha descrito en monocitos humanos de sangre periférica (May cols., 2014), hepatocitos de embriones de pollo (Talukdar y Hillgartner, 2006) y en células de glándula sebácea SZ95 (Hong y cols., 2008).

El tratamiento con curcumina produjo igualmente un aumento en la expresión de LXR $\alpha$ . Se ha descrito resultados similares en células RAW 264.7 y células THP-1 (Liu y cols., 2014) y en y línea celular J774.A1 (Zhao y cols., 2012).

La naringenina produjo un aumento en la expresión de LXR $\alpha$ . Se ha descrito que la hesperitina, de estructura flavonoides al igual que la naringenina, aumenta la actividad de LXR $\alpha$  y ABCA1 y la expresión de ARNm del transportador en células THP-1 (Iio y cols., 2012). La cianidina, otro flavonoide muy común también en verduras y frutas, incrementa la expresión de ARNm de LXR y ABCA1, G5 y SREBP1c en células HepG2 (Jia y cols., 2013). A su vez, el efecto sinérgico del tratamiento conjunto de TO901317 y curcumina o con naringenina, también se vio reflejado a nivel proteico aumentando los niveles de proteína LXR $\alpha$  en las células THP-1 tratadas.

## 3. Estimulación de la fosforilación de AMPK

Se ha descrito que la curcumina y naringenina y el TO901317 activan a la enzima AMPK en distintos tipos celulares. Nosotros comprobamos que en células THP-1 tratadas con TO901317 aumentó el nivel de fosforilación de la enzima AMPK (AMPKp). Estos resultados contrastan con los obtenidos por Kim y cols.(2012) que comprobaron cómo el tratamiento con colesterol sulfato (un activador de ROR $\alpha$ ) en células HepG2 disminuyó los niveles de ARNm de LXR $\alpha$  y SREBP-1c, a la vez que se produjo un incremento de los niveles de AMPKp. El incremento en la expresión de LXR $\alpha$  que se produce al tratar estas mismas células con TO901317, fue revertido por el colesterol sulfato de forma dependiente de la concentración (Kim y cols., 2012). Sin embargo, la administración del agonista sintético de LXR $\alpha$  en condiciones de elevada

concentración de glucosa indujo una mejora en los niveles de AMPKp en células progenitoras endoteliales (Li y cols., 2012).

Lo mismo ocurrió con las células THP-1 tratadas con curcumina. La capacidad de activar a la enzima AMPK por parte de la curcumina ya fue descrita por Kim y cols., en células Hep3B humanas y H4IIE de ratón (Kim y cols., 2009). La administración de curcumina redujo la producción de ROS y aumentó de la producción de NO en las células endoteliales a través de la vía de AMPK/UCP2. La incubación con 10  $\mu$ M de curcumina durante 12 horas promovido la fosforilación de la enzima AMPK y el aumento de los niveles de eNOS-p y UCP2 en células endoteliales de rata (Pu y cols., 2013). La curcumina activa la vía de señalización de AMPK en las células de adenocarcinoma de pulmón A549 (Xiao y cols., 2013). También hay autores que consideran que la curcumina disminuye la activación de la vía de la AMPK y PKC en células THP-1 estimuladas con PMA (Cao y cols., 2014).

La naringenina también induce la fosforilación de la enzima AMPK en células THP-1. Se ha descrito que este flavonoides es capaz de aumentar la entrada de glucosa en el músculo esquelético a través de la activación de la AMPK (Zygmunt y cols., 2010). Además, extractos de la planta *Citrus junos*, la cual contiene gran cantidad de flavonoides, entre ellos la naringenina, fue capaz de incrementar los niveles de AMPKp en células de mioblasto de ratón (C2C12) (Kim y cols., 2013).

#### **4. Inhibición de la fosforilación de AMPK por el comp. C**

El comp. C es un inhibidor de la fosforilación de la enzima AMPK (Steimber y Kemp, 2009). Las células que fueron tratadas con TO901317, curcumina o naringenina, y también con comp. C, mostraron una disminución de la fosforilación de la enzima AMPK. El comp. C inhibió el efecto protector del TO901317 sobre las células progenitoras endoteliales en presencia de altas concentraciones de glucosa (Li y cols., 2012). Además bloqueó la activación de señalización de AMPK aumentados por la cúrcuma en las células de adenocarcinoma de pulmón (Xiao y cols., 2013) y también disminuyó los niveles de AMPKp en células de mioblasto de ratón inducidos por la naringenina (Kim y cols., 2013).

## 5. Inhibición de la expresión de LXR $\alpha$ con el comp. C

A continuación usamos el inhibidor de la actividad de la AMPK, el componente C, para comprobar si la inhibición de la función de esta enzima afecta a la expresión de ARNm y de proteína de LXR $\alpha$ . El comp. C es capaz de disminuir la expresión de ARNm de LXR $\alpha$ , y sus genes diana, en células THP-1 estimuladas con TO901317, curcumina y naringenina. Esta disminución en el nivel de ARNm se vio reflejada a nivel proteico, ya que igualmente se apreció una disminución en el nivel de proteína LXR $\alpha$  en las células tratadas previamente con su agonista sintético (TO901317), la curcumina o la naringenina, y con el inhibidor de la AMPK (comp. C). Se ha descrito que el comp. C inhibe la expresión de ARNm del transportador ABCG5 en hepatocitos de ratón (González-Granillo y cols., 2012). La enzima AMPK está implicada en la posible regulación post-transcripcional de LXR $\alpha$  y sus genes diana como por ejemplo la protevna SREBP1c, mediante la fosforilación de su Ser-372 de este factor de transcripción (Li y cols., 2001). Esta relación con SREBP1c se confirma ya que el comp. C revierte la posible inhibición de la enzima AMPK sobre dicho promotor (Yang y cols., 2009). Por otro lado, se conoce que el comp. C junto con el TO901317 aumenta la expresión de ARNm de SREBP1c en hepatocitos de ratón (González-Granillo y cols., 2012). Además el uso del agonista sintético del LXR $\alpha$  disminuyó los niveles de AMPKp en tejido adiposo blanco de ratones C57BL/6, pero sin embargo no afectó al nivel de fosforilación de esta enzima en el hígado de estos mismos ratones (Zheng y cols., 2014). Esta dualidad en el modo en el que se relacionan el receptor nuclear LXR $\alpha$  y la enzima AMPK se observó en un estudio de Hwahng y cols (2009). En el que se concluye que la enzima AMPK fosforila un residuo de Thr de LXR $\alpha$ , lo que ocasiona su inactivación; pero por otro lado, la activación de la AMPK inhibe a mTOR (*Mammalian target of rapamycin*), lo que ocasiona que la enzima S6K1 (*Ribosomalprotein S6 kinase beta-1*) se active y fosforile al receptor nuclear LXR $\alpha$  en una Ser lo que ocasiona su activación.

## 6. Inhibición de la expresión de LXR $\alpha$ con el ARNsi de AMPK $\alpha$ 1 y $\alpha$ 2

Además de usar un inhibidor de la enzima AMPK (comp. C), se realizaron experimentos con ARN de silenciamiento de las dos isoformas de la subunidad catalítica  $\alpha$ de la AMPK, las subunidades  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2. Al inhibir la capacidad catalítica de la

enzima AMPK, la expresión de LXR $\alpha$  y sus genes diana se vio disminuida tanto en las células estimuladas con el agonista sintético del LXR $\alpha$  (TO901317), como con la curcumina y la naringenina (Figuras 23, 24 y 25). El hecho de que el silenciamiento de la subunidad  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  de la AMPK disminuyera la expresión de LXR fue observado por Wan y sus colaboradores en macrófagos procedentes de buffy-coat, de tal modo que al usar un ARN de interferencia específico para la subunidad  $\alpha 1$  de la AMPK, los niveles de AMPKp y LXR $\beta$  disminuyeron drásticamente, a pesar de su estimulación con un agonista de la enzima AMPK como es la metformina (Wan y cols., 2013).

## 7. Producción de ROS

Al tratar con TO901317, curcumina o naringenina las células THP-1 diferenciadas con PMA, se observó que la producción de ROS medida según la liberación de DCF, era menor que la producida por las células no tratadas (Figura 28). Al inducir a estas células a una situación de estrés oxidativo mediante la administración de 200 y 400  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y tratarlas con el agonista sintético de LXR $\alpha$ , se observó como la producción de ROS siguió siendo significativamente menor que la de las células sin tratar (Figura 29). Lo mismo ocurrió al tratar las células con curcumina (Figura 29). Por el contrario, las células cuya producción de ROS fue estimulada con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (200 y 400  $\mu\text{M}$ ) y tratadas con naringenina, aumentaron su producción de ROS, en comparación con las células sin tratar. Se ha descrito que la estimulación de LXR $\alpha$  inhibe la producción de especies reactivas de oxígeno. Gong y colaboradores diseñaron ratones *knock-in* que expresaban de forma constitutiva LXR $\alpha$  en tejido pulmonar y observaron como al tratar los ratones con TO901317 aumentaba la expresión de genes que codifican enzimas con actividad antioxidante (Gong y cols., 2009). Recientemente nuestro grupo ha demostrado que la activación de LXR $\alpha$  por el agonista sintético TO901317 induce una disminución en los niveles de ROS producidos en neutrófilos humanos (Alba y cols., 2012; Reyes-Quiroz y cols., 2014). También, según nuestros experimentos, la curcumina posee efectos antioxidantes y estos resultados coinciden con los observados por Barzegar y Moosavi-Movahedi sobre que la curcumina disminuye la producción de ROS en células de músculo esquelético de rata (mioblastos L-6) estimuladas con hidróperóxido (Barzegar y Moosavi-Movahedi, 2011). Además, se ha indicado que la curcumina puede actuar como antioxidante bifuncional debido a su capacidad de reaccionar directamente con las ROS

y de inducir una regulación de diversas proteínas citoprotectoras y antioxidantes (Dinkova-Kostova y Talalay, 2008).

La curcumina es también un potente inhibidor de enzimas encargadas de la generación de especies reactivas de oxígeno, tales como lipoxigenasa/ciclooxigenasa, xantina deshidrogenasa/oxidasa, la óxido nítrico sintasa inducible (Lin, 2004) y la NADPH oxidasa (Murakami, 2007). Por el contrario, también se han descrito estudios que demuestran que la curcumina induce estrés oxidativo en diversos tipos de células y tejidos tumorales. En línea celular HSG, procedente de carcinoma humano de glándula submandibular la curcumina aumentó la producción de ROS de forma significativa (Atsumi y cols., 2007). Otro ejemplo es que el estrés oxidativo inducido por la curcumina promueve la muerte de las células HUT-78, que son células T procedentes de linfoma cutáneo (Khan y cols., 2012).

La naringenina muestra también esta dualidad a la hora de establecer su posible función como agente anti-oxidante o pro-oxidante. En las células THP-1 diferenciadas con PMA y tratadas con 100  $\mu\text{M}$  de naringenina la producción de ROS medida mediante DCF es menor que en las células sin tratar (Figura 28). También al tratar las células con 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , la producción de ROS fue menor que la de las células sin tratar (Figura 29). Pero al estimular las células tratadas previamente con naringenina con 400  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  la producción de ROS aumentó significativamente (Figura 30). Existen varios ejemplos en los que la naringenina puede actuar como agente anti o pro-oxidante. La naringenina tuvo un efecto protector contra la nefrotoxicidad ocasionada por la gentamicina en ratas Sprague-Dawley. Las ratas tratadas sólo con naringenina o con gentamicina y naringenina presentaban niveles más bajos de creatinina sérica, malonaldehído en tejido de riñón, óxido nítrico, IL-8 y de actividad glutatión peroxidasa, todos indicadores de estrés oxidativo e inflamación. (Fouad y cols., 2014). Otras flavononas, como la hesperidina, también poseen propiedades antioxidantes en células de carcinoma sinovial SW982 (Choi y Lee, 2010). La naringenina, y la quercitina, son capaces de disminuir la producción de ROS en neutrófilos humanos estimulados con PMA (Nishimura y cols., 2013). También existen ejemplos en los que la naringenina provoca apoptosis en células THP-1 a través de aumento de la producción de ROS (Park y cols., 2008). En ocasiones la capacidad de inducir la producción de ROS puede ser beneficiosa. Existen otros ejemplos en los que la naringenina mejora la hiperlipidemia, aumentando la oxidación de ácidos grasos hepáticos e inhibiendo la lipogénesis

mediada por SREBP-1c tanto en hígado como en tejido muscular (Mulvihill y cols., 2009). En estudios *in vitro* con células de carcinoma hepidermoide humano (A431), la naringenina induce la muerte celular programa (apoptosis) al inducir la generación de ROS, activando así la vía de las caspasas (Ahamad y cols., 2014). En fragmentos de hígado aislado perfundido de rata, los efectos pro-oxidantes de la flavononas cítricas hesperetina, naringenina y, en menor medida, hesperidina predominaron sobre sus efectos antioxidantes (di Majo y cols., 2005).

## 8. Migración celular

Una característica de las células fagocíticas es su capacidad de migración en respuesta a agentes quimiotácticos. Hemos evaluado el efecto del TO901317, curcumina y naringenina sobre la migración celular ante estímulos quimiotácticos. Al incubar las THP-1 tratadas con TO901317, curcumina y naringenina durante 20 horas en una cámara de migración, frente a un estímulo quimiotáctico (fMLP), se observó que la migración de las células THP-1 disminuía en comparación con las células sin tratamiento (Figura 33). El agonista sintético de LXR $\alpha$  es capaz de inhibir la migración de las células THP-1 inducida por fMLP. Nuestro grupo ya describió la inhibición de la migración de neutrófilos humanos a través de membranas porosas ejercida por el TO901317 (Alba y cols., 2012, Reyes-Quiroz y cols., 2014). En linfocitos se ha encontrado que la estimulación de LXR $\alpha$  disminuye la migración mediada por quimioquinas CD4 positivas (Walcher y cols., 2010).

La curcumina también disminuyó la migración en las células THP-1 tratadas con PMA. Recientemente se ha descrito que la curcumina inhibe la migración en macrófagos, (Young y cols., 2014) y de fibrocitos circulantes (Fu 2014). También se ha demostrado que la curcumina puede inhibir la migración de células tumorales tales como células de hepatocarcinoma (Wang y cols., 2011), Kim 2013 células madre procedentes de cáncer de mama (MCF-7 y T47D) (Mukherjee y cols., 2014), células cancerígenas de pulmón (Chen 2013), o de tiroides (Tan 2014). La inhibición de la migración de células tumorales contribuye a la función antineoplásica atribuida a la curcumina.

La naringenina también es capaz de inhibir la migración de células de carcinoma humano de mama (MDA-MB-231) tratadas con el factor de crecimiento hepático (HGF, *Hepatocyte growth factor*) como quimioatrayente (Lee y cols., 2007). Inhibe igualmente la migración de células de dos tipos de carcinoma de páncreas humano (Aspc-1 y panc-1) inducidas por TGF $\beta$  como agente quimiotáctico (Lou y cols., 2012) y de células SCC-25 procedentes de carcinoma oral de células escamosas humanas (Maggioli y cols., 2014).

## 9. Salida de colesterol

Las proteínas ABCA1 median el transporte activo de colesterol desde el interior celular a las apoproteínas extracelulares y forman las partículas HDL. En último lugar analizamos la capacidad de la curcumina y la naringenina de inducir el transporte reverso de colesterol en las células THP-1 tratadas con PMA. Al someter a estas células a los tratamientos con TO901317, curcumina y naringenina durante 20 horas se observó cómo el transporte reverso de colesterol desde el interior celular al medio externo se vio incrementado en todos los casos (Figura 36). Se ha descrito que la expresión de ARNm de ABCA1 se induce en macrófagos en respuesta a la carga lipídica, y que la expresión y activación de LXR estimula la eliminación de colesterol mediada por ApoA1 (apolipoproteína A1) (Schwartz y cols., 2000). En monocitos de sangre periférica humana diferenciados a macrófagos, Ma y cols. (2014) describen un aumento del flujo de colesterol y aumento de la expresión de ABCA1 y G1 después del tratamiento con el agonista sintético de LXR $\alpha$  (TO901317).

La curcumina fue capaz de inhibir la captación de partículas LDL oxidadas mediada por SR-A e incrementar la salida de colesterol dependiente de ABCA1 en macrófagos J774.A1. Estos dos acontecimientos son cruciales para la supresión de la acumulación de colesterol por parte de los macrófagos, evitando así su transformación a células espumosas (Zhao y cols., 2013). También se ha demostrado en experimentos *in vivo* que en ratones ApoE<sup>-/-</sup> la curcumina aumenta de los niveles proteicos de ABCA1, ABCG1 y SR-BI y disminuye de la expresión de SR-A, atenuando la progresión de la aterosclerosis, reduciendo la inflamación sistémica, disminuyendo los niveles séricos de colesterol y triglicéridos, y aumento los de colesterol HDL (Zhao y cols., 2013). La curcumina aumenta la salida de colesterol a través de la supresión de la vía de JNK y

activando la vía SR-BI/LXR-ABCA1 en macrófagos de ratón RAW 264.7 y células THP-1, lo que revela un efecto de protección vascular relacionada con su una actividad anti-inflamatoria y anti-aterosclerótica (Liu y cols., 2014).

La naringenina aportada en la dieta a ratas experimentales tuvo efectos hipolipidémicos a través de la activación del factor de transcripción PPAR $\alpha$  y sus genes diana, disminuyendo los niveles de triglicéridos y colesterol en plasma y en hígado (Cho y cols., 2011). También mejora las alteraciones del metabolismo lipídico en ratones LDL<sup>-/-</sup> sometidos a dieta rica en grasas, disminuyendo la aterosclerosis y el riesgo de ésta asociada a la resistencia a insulina (Mulvihill y cols., 2011). Otras flavononas, como es la hesperitina, aumentan la actividad de LXR $\alpha$  y ABCA1, y además la expresión de ARNm del transportador en células THP-1, favoreciendo el transporte reverso del colesterol (Iio y cols., 2012).

## CONCLLUSIONES

---

- 1. Los niveles de ARNm de LXR $\alpha$  aumentan en las células THP-1 estimuladas por el TO901317, la curcumina y la naringenina. lo que se evidencia también con el aumento de la transcripción de sus genes diana ABCA1, G1 y SREBP1c. Se observa un aumento propocional en la expresión proteica de LXR $\alpha$ .**
- 2. La estimulación de LXR $\alpha$  por la curcumina y la naringenina aumenta el transporte reverso del colesterol desde el interior celular en células THP-1 a través del aumento de la transcripción de los ABCs.**
- 4. La estimulación de LXR $\alpha$  por estos compuestos aumenta la capacidad amortiguadora de las células THP-1 frente al estrés basal o el inducido por la acción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**
- 3. Se demuestra la existencia de una relación entre el receptor nuclear LXR $\alpha$  y enzimas con actividad quinasa.**
- 5. Los neutrófilos humanos son muy sensibles al AO a los que proporciona protección contra la activación de los mismos durante los procesos inflamatorios.**
- 6. El AO facilita la eliminación de colesterol de los tejidos a través del aumento de la transcripción de los ABCs y sin ejercer efectos lipogénicos.**

# **BIBLIOGRAFÍA**



## BIBLIOGRAFÍA

---

1. A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. (1999) *Cell*. 97: 161–163.
2. A-González, N., Castrillo, A. (2011) Liver X receptors as regulators of macrophage inflammatory and metabolic pathways. *Biochim. Biophys. Acta* 1812: 982–994.
3. Ahamad MS, Siddiqui S, Jafri A, Ahmad S, Afzal M, Arshad M. Induction of apoptosis and antiproliferative activity of naringenin in human epidermoid carcinoma cell through ROS generation and cell cycle arrest. *PLoS One*. 2014; 9(10):e110003.
4. Anand K., Sarkar A., Kumar A., Ambasta R.K., Kumar P. (2012) Combinatorial antitumor effect of naringenin and curcumin elicit angioinhibitory activities in vivo. *Nutr Cancer.*; 64(5):714-24.
5. Apfel, R., Benbrook, D., Lernhardt, E., Ortiz, M.A., Salbert, G., Pfahl, M. (1994) A novel orphan receptor specific for a subset of thyroid hormone-responsive elements and its interaction with the retinoid/thyroid hormone receptor subfamily. *Mol. Cell. Biol.* 14: 7025–7035.
6. Atsumi T, et al. Comparative cytotoxicity and ROS generation by curcumin and tetrahydrocurcumin following visible-light irradiation or treatment with horseradish peroxidase. *Anticancer Res.* 2007; 27:363–371.
7. Barzegar A, Moosavi-Movahedi AA (2011) Intracellular ROS protection efficiency and free radical-scavenging activity of curcumin. *PLoS ONE* 6(10):e26012.
8. Bateman, A. (1997).The structure of a domain common to archaebacteria and the homocystinuria disease protein. *Trends Biochem. Sci.*; 22:12–13.
9. Beg, Z. H., Allmann, D.W., Gibson, D. M. (1973) Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity with cAMP and with protein fractions of rat liver cytosol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 54: 1362-1369.
10. Bensinger, S.J., Tontonoz, P. (2008) Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. *Nature*. 454: 470–477.
11. Berridge M.J. *Cell Signalling Biology*. Portland Press Ltd; London, UK: 2012.

12. Bienert G. P., Schjoerring J. K., Jahn T. P. (2006). Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta* 1758, 994–1003.
13. Blumberg, B., Evans, R.M. (1998) Orphan nuclear receptors – new ligands and new possibilities. *Genes Dev.* 12: 3149–3155.
14. Borradaile NM, de Dreu LE, Huff MW (2003) Inhibition of net HepG2 cell apolipoprotein B secretion by the citrus flavonoid naringenin involves activation of phosphatidylinositol 3-kinase, independent of insulin receptor substrate-1 phosphorylation. *Diabetes* 52: 2554–2561.
15. Bors W, Heller W, Michel C, Saran M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.* 1990; 186:343–355.
16. Cadenas E. (1989). *Biochemistry of oxygen toxicity.* *Annu Rev Biochem.*; 58:79-110.
17. Calkin, A.C., Tontonoz, P. (2012) Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 13: 213–224.
18. Cao J, Han Z, Tian L, Chen K, Fan Y, Ye B, Wang C, Huang Z. Curcumin inhibits EMMPRIN and MMP-9 expression through AMPK-MAPK and PKC signaling in PMA induced macrophages. *J Transl Med.* (2014); 12(1):266.
19. Carballo M, Conde M, El Bekay R, Martín-Nieto J, Camacho MJ, Monteseirín J, et al. Oxidative stress triggers STAT3 tyrosine phosphorylation and nuclear translocation in human lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry.* 1999; 274: 17580.
20. Carling, D., Zammit, V.A., Hardie, D.G. (1987) A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS. Lett.* 223: 217-222.
21. Carlson, C.A., Kim, K.H. Beg (1973) Regulation of hepatic acetyl coenzyme A carboxylase by phosphorylation and dephosphorylation. *J. Biol. Chem.* 248: 378-380.
22. Castrillo A, Tontonoz P. Nuclear receptors in macrophage biology: at the crossroads of lipid metabolism and inflammation. *Annu Rev Cell Dev Biol* (2004) 20:455–80.
23. Castrillo, A., Tontonoz, P. (2004) Nuclear receptors in macrophage biology: at the crossroads of lipid metabolism and inflammation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20: 455–480.

24. Castrillo, A., Tontonoz, P. (2004) Nuclear Receptors in Macrophage Biology: At the Crossroads of Lipid Metabolism and Inflammation. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 20: 455–480.
25. Chambon, P. (2005) The nuclear receptor superfamily: a personal retrospect on the first two decades. *Mol. Endocrinol.* 19: 1418–1428.
26. Chan-Hui, P. Y. and Weaver, R. (1998). Human mitogen-activated protein kinase kinase mediates the stress-induced activation of mitogen-activated protein kinase cascades. *Biochem. J.* 336,599 -609.
27. Chávez-Santoscoy RA, Tovar AR, Serna-Saldivar SO, Torres N, Gutiérrez-Urbe JA. (2014) Conjugated and free sterols from black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed coats as cholesterol micelle disruptors and their effect on lipid metabolism and cholesterol transport in rat primary hepatocytes. *Genes Nutr.* 9(1):367.
28. Chen, J.D., Evans, R.M. (1995) A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377: 454–457.
29. Chen, Z.P., Mitchelhill, K.I., Michell, B.J., Stapleton, D., Rodriguez-Crespo, I., Witters, L.A., Power, D.A., Ortiz de Montellano, P.R., Kemp, B.E. (1999) AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS. Lett.* 443: 285-289.
30. Cho KW, Kim YO, Andrade JE, Burgess JR, Kim Y-C. Dietary naringenin increases hepatic peroxisome proliferators-activated receptor  $\alpha$  protein expression and decreases plasma triglyceride and adiposity in rats. *European Journal of Nutrition.* 2011; 50 (2):81–88.
31. Choi EM, Lee YS (2010) Effects of hesperetin on the production of inflammatory mediators in IL-1 $\beta$  treated human synovial cells. *Cell Immunol* 264:1–3.
32. Cobb, M. and Goldsmith, E. J. (1995). How MAP kinases are regulated. *J. Biol. Chem.* 270, 14843 -14846.
33. Constantin RP, do Nascimento GS, Constantin RP, Salgueiro CL, Bracht A, Ishii-Iwamoto EL, Yamamoto NS, Constantin J. Citrus flavanones affect hepatic fatty acid oxidation in rats by acting as prooxidant agents. *Biomed Res Int.* 2013; 2013:342973.
34. Corton JM, Gillespie JG & Hardie DG (1994). Role of the AMP-activated protein kinase in the cellular stress response. *Curr Biol* 4, 315–324.

35. Corton, J.M., Gillespie, J.G., Hawley, S.A., Hardie, D.G. (1995) 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur. J. Biochem.* 229: 558-565.
36. Cowan KJ, Storey KB. Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *J Exp Biol.* 2003; 206:1107–1115.
37. Crute, B. E., Seefeld, K., Gamble, J., Kemp, B. E. & Witters, L. A. (1998) Functional domains of the  $\alpha$ 1 catalytic subunit of the AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 273, 35347–35354.
38. D'Autréaux B, Toledano MB. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8:813–24.
39. Davies, S.P., Helps, N.R., Cohen, P.T., Hardie, D.G. (1995) 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C alpha and native bovine protein phosphatase-2AC. *FEBS. Lett.* 377: 421-425.
40. Denhardt, D. T. (1996). Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: the potential for multiplex signalling. *Biochem. J.* 318,729 -747.
41. di Majo D, Giammanco M, la Guardia M, Tripoli E, Giammanco S, Finotti E. Flavanones in Citrus fruit: structure-antioxidant activity relationships. *Food Research International.* 2005; 38(10):1161–1166.
42. Dong S.Z., Zhao S.P., Wu Z.H., Yang J., Xie X.Z., Yu B.L. Curcumin promotes cholesterol efflux from adipocytes related to PPARgamma-LXRalpha-ABCA1 passway. *Mol Cell Biochem.* 2011; 358: 281–285.
43. Dröge, W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82:47–95.
44. Dröse S, Brandt U. Mitochondrial oxidative phosphorylation. *Adv Exp Med Biol* 2012:145–69.
45. El Bekay R, Alvarez M, Monteseirin J, Alba G, Chacon P, Vega A, et al. Oxidative stress is a critical mediator of the angiotensin II signal in human neutrophils: Involvement of mitogen-activated protein kinase, calcineurin, and the transcription factor NF- $\kappa$ B. *Blood.* 2003; 102: 662.

46. Escriva, H., Langlois, M.C., Mendonça, R.L., Pierce, R., Laudet, V. (1998) Evolution and diversification of the nuclear receptor superfamily. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 839: 143–6.
47. Evans, R.M. (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science.* 240: 889–895.
48. F. Antunes, E. Cadenas, Estimations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gradients across biomembranes, *FEBS Lett.* 475 (2000) 121–126.
49. Fay J.R., Steele V, Crowell J.A. (2009) Energy homeostasis and cancer prevention: the AMP-activated protein kinase. *Cancer Prev. Res. (Phila)*; 13 (4):301–309.
50. Flora SJ. Role of free radicals and antioxidants in health and disease. *Cell Mol Biol (Noisy-le-Grand)* 2007; 53:1–2.
51. Fouad AA, Albuali WH, Zahran A, Gomaa W. (2014). Protective effect of naringenin against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Environ Toxicol Pharmacol.*; 38(2):420-9.
52. Frodin, M. and Gammeltoft, S. (1999). Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. *Mol. Cell Endocrinol.* 151, 65-77.
53. Fujii, N., Hayashi, T., Hirshman, M.F., Smith, J.T., Habinowski, S.A., Kaijser, L., Mu, J., Ljungqvist, O., Birnbaum, M.J., Witters, L.A., Thorell, A., Goodyear, L.J. (2000) Exercise induces isoform-specific increase in 5'AMP-activated protein kinase activity in human skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273: 1150-1155.
54. Gabaldón T. Peroxisome diversity and evolution. *Phil Trans R Soc B* 2010; 365:765–73.
55. Gao M, Liu D. Resveratrol suppresses T0901317-induced hepatic fat accumulation in mice. *AAPS J.* 2013; 15:744–752.
56. Germain, P., Altucci, L., Bourguet, W., Rochette-Egly, C., Gronemeyer, H. (2003) Nuclear receptor superfamily: Principles of signaling. *Pure Appl. Chem.* 75: 1619-1664.
57. Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M., Laudet, V. (2006) Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev.* 58: 685–704.
58. Giguere, V., Yang, N., Segui P., Evans, R.M. (1988) Identification of a new class of steroid hormone receptors. *Nature.* 331: 91–94.

59. Glass, C.K., Ogawa, S. (2006) Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 44–55.
60. Glass, C.K., Rosenfeld, M.G. (2000) The co-regulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev.* 14: 121–141.
61. Goel, A., Kunnumakkara, A.B., Aggarwal, B.B. (2008) Curcumin as “Curecumin”: from kitchen to clinic, *Biochem. Pharmacol.* 75: 787–809.
62. Goldwasser J, Cohen PY, Yang E, Balaguer P, Yarmush ML, Nahmias Y. Transcriptional regulation of human and rat hepatic lipid metabolism by the grapefruit flavonoid naringenin: role of PPARalpha, PPARgamma and LXRalpha. *PLoS One.* 2010; 5:e12399.
63. González-Granillo M, Steffensen KR, Granados KR, Torres N, Korach-André M, et al. Soy protein isoflavones differentially regulate liver X receptor isoforms to modulate lipid metabolism and cholesterol transport in the liver and intestine in mice. *Diabetologia.* 2012; 22:2469–2478.
64. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW (1994) Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circulation Research* 74(6):1141–1148.
65. Gronemeyer, H., Gustafsson, J.A., Laudet, V. (2004) Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 3: 950–964.
66. Gupta, S.C, Patchva, S, Koh, W, Aggarwal, B.B. (2012) Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 39 (3): 283–299.
67. Hardie D.G., Ross FA, Hawley S.A. (2012) AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 251–262.
68. Hawley, S.A., Boudeau, J., Reid, J.L., Mustard, K.J., Udd, L., Mäkelä, T.P., Alessi, D.R., Hardie, D.G. (2003) Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J. Biol.* 2: 28.
69. Hawley, S.A., Davison, M., Woods, A., Davies, S.P., Beri, R.K., Carling, D., Hardie, D.G. (1996) Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 271: 27879-27887.
70. Hawley, S.A., Pan, D.A., Mustard, K.J., Ross, L., Bain, J., Edelman, A.M., Frenguelli, B.G., Hardie, D.G. (2005) Calmodulin-dependent protein kinase

kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell. Metab.* 2: 9-19.

71. Hawley, S.A., Ross F.A., Chevtzoff C., Green K.A., Evans A., Fogarty S, Towler M.C., Brown L.J., Ogunbayo O.A., Evans A.M., Hardie DG. (2010) Use of cells expressing gamma subunit variants to Identify diverse mechanisms of AMPK activation. *Cell Metab* 11: 554–565.
72. Hawley, SA, Gadalla AE, Olsen GS, Hardie DG. (2002) The antidiabetic drug metformin activates the AMP-activated protein kinase cascade via an adenine nucleotide-independent mechanism. *Diabetes.* 51: 2420-2425.
73. Heery, D.M., Kalkhoven, E., Hoare, S., Parke,r M.G. (1997) A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387: 733–736.
74. Heery, D.M., Kalkhoven, E., Hoare, S., Parker, M.G. (1997) A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387: 733–736.
75. Henin N, Vincent MF, Gruber HE & Van den Berghe G (1995). Inhibition of fatty acid and cholesterol synthesis by stimulation of AMP-activated protein kinase. *FASEB J* 9, 541–546.
76. Hong I, Lee MH, Na TY, Zouboulis CC, Lee MO. LXRalpha enhances lipid synthesis in SZ95 sebocytes. *J Invest Dermatol.* 2008; 128(5):1266–1272.
77. Hörlein, A., Näär, A., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G. (1995) Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377: 397–404.
78. Hu, X., Li, S., Wu, J., Xia, C., Lala, D.S. (2003) Liver X receptors interact with corepressors to regulate gene expression. *Mol. Endocrinol.* 17: 1019–1026.
79. Hurley, R.L., Anderson, K.A., Franzone, J.M., Kemp, B.E., Means, A.R., Witters, L.A. (2005) The Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. *J. Biol. Chem.* 280: 29060-29066.
80. Huwait EA, Greenow KR, Singh NN, Ramji DP. A novel role for c-Jun N-terminal kinase and phosphoinositide 3-kinase in the liver X receptor-mediated induction of macrophage gene expression. *Cell Signal.* 2011; 23: 542–549.

81. Iio A, Ohguchi K, Iinuma M, Nozawa Y, Ito M. J. Hesperetin Upregulates ABCA1 Expression and Promotes Cholesterol Efflux from THP-1 Macrophages *Nat Prod.* 2012; 75:563–566.
82. Imamura, K., Ogura, T., Kishimoto, A., Kaminishi, M., Esumi, H. (2001) Cell cycle regulation via p53 phosphorylation by a 5'-AMP activated protein kinase activator, 5-aminoimidazole- 4-carboxamide- 1-beta-D-ribofuranoside, in a human hepatocellular carcinoma cell line. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 287: 562-567.
83. Imlay JA. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nat Rev Microbiol* 2013; 11:443–54.
84. Iseli TJ, Walter M, van Denderen BJ, Katsis F, Witters LA, Kemp BE, Michell BJ, Stapleton D. (2005) AMP-activated protein kinase beta subunit tethers alpha and gamma subunits via its C-terminal sequence (186 –270). *J Biol Chem* 280: 13395–13400.
85. Janowsky, B.A., Willy, P.J., Devi, T.R., Falck, J.R., Mangelsdorf, D.J. (1996) An oxysterol signaling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* 383: 728–731.
86. Ji C, Yang B, Yang YL, He SH, Miao DS, He L, Bi ZG. (2010) Exogenous cell-permeable C6 ceramide sensitizes multiple cancer cell lines to doxorubicin-induced apoptosis by promoting AMPK activation and mTORC1 inhibition. *Oncogene* 29, 6557–6568.
87. Jia Y, Hoang MH, Jun HJ, Lee JH, Lee SJ. Cyanidin, a natural flavonoid, is an agonistic ligand for liver X receptor alpha and beta and reduces cellular lipid accumulation in macrophages and hepatocytes. *Bioorg Med Chem Lett.* 2013; 23(14):4185–4190.
88. Jonsson, F.; Mancardi, D. A.; Albanesi, M.; Bruhns, P. (2013) Neutrophils in local and systemic antibody-dependent inflammatory and anaphylactic reactions *J. Leukoc. Biol.*, 94 (4): 643-656.
89. Kang, C., Kim, E. (2010) Synergistic effect of curcumin and insulin on muscle cell glucose metabolism. *Food. Chem. Toxicol.* 48: 2366–2373.
90. Khan MA, Gahlot S, Majumdar S. Oxidative stress induced by curcumin promotes the death of cutaneous T-cell lymphoma (HuT-78) by disrupting the function of several molecular targets. *Mol Cancer Ther.* 2012 (9):1873-83.

91. Kim EJ, Yoon YS, Hong S, et al. Retinoic acid receptor-related orphan receptor  $\alpha$ -induced activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase results in attenuation of hepatic steatosis. *Hepatology* 2012; 55:1379–1388.
92. Kim SH, Hur HJ, Yang HJ, Kim HJ, Kim MJ, Park JH, Sung MJ, Kim MS, Kwon DY, Hwang JT. Citrus junos Tanaka Peel Extract Exerts Antidiabetic Effects via AMPK and PPAR- $\gamma$  both In Vitro and In Vivo in Mice Fed a High-Fat Diet. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013; 2013:921012.
93. Kim T, Davis J, Zhang AJ, He X, Mathews ST. Curcumin activates AMPK and suppresses gluconeogenic gene expression in hepatoma cells. *BBRC.* 2009; 388: 377–382.
94. Kim, T., Davis, J., Zhang, A.J., He X., Mathews, S.T. (2009) Curcumin activates AMPK and suppresses gluconeogenic gene expression in hepatoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 388: 377–382.
95. Kliewer, S.A., Lehmann, J.M., and Willson, T.M. (1999) Orphan nuclear receptors: shifting endocrinology into reverse. *Science.* 284: 757–760.
96. Knoefler D, Leichert LI, Thamsen M, Cremers CM, Reichmann D, Gray MJ, et al. About the dangers, costs and benefits of living an aerobic lifestyle. *Biochem Soc Trans* 2014; 42:917–21.
97. Kudo, N., Barr, A.J., Barr, R.L., Desai, S., Lopaschuk, G.D. (1995) High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase. *J. Biol. Chem.* 270: 17513-17520.
98. Kurth-Kraczek, E.J., Hirshman, M.F., Goodyear, L.J., Winder, W.W. (1999) 5' AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle. *Diabetes.* 48: 1667-1671.
99. Laffitte, B.A., Joseph, S.B., Walczak, R., Pei, L., Wilpitz, D.C., Collins, J.L., Tontonoz, P. (2001) Autoregulation of the Human Liver X Receptor Alpha Promoter. *Mol. Cell. Biol.* 21: 7558–7568.
100. Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Microbiol* 2004; 4:181–9.
101. Laudet, V. (1997) Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J. Mol. Endocrinol.* 19: 207–226.

102. Laucinkiene, J., Rydén, M. (2012) Liver X receptors and fat cell metabolism. *Int. J. Obes.* 36:1494-502.
103. Lee S. L., Wang W. W., Fanburg B. L. Superoxide as an intermediate signal for serotonin-induced mitogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* (1998); 24:855–858.
104. Lee WJ, Chen WK, Wang CJ, Lin WL, Tseng TH. Apigenin inhibits HGF-promoted invasive growth and metastasis involving blocking PI3K/Akt pathway and beta 4 integrin function in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008; 226:178–91.
105. Lehmann, J.M., Lenhard, J.M., Oliver, B.B., Ringold, G.M., Kliewer, S.A. (1997) Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J. Biol. Chem.* 272: 3406–3410.
106. Levonen A.L. Antioxidant gene therapy for cardiovascular disease: current status and future perspectives. *Circulation.* 2008; 117(16):2142–2150.
107. Li D, Wang D, Wang Y, Ling W, Feng X, Xia M. Adenosine monophosphate-activated protein kinase induces cholesterol efflux from macrophage-derived foam cells and alleviates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Biol Chem.* 2010a; 285:33499–33509.
108. Li D, Zhang R, Zhu W, Xue Y, Zhang Y, Huang Q, Liu M, Liu Y (2013) S100A16 inhibits osteogenesis but stimulates adipogenesis. *Mol Biol Rep* 40:3465–3473.
109. Li X, Song Y, Han Y, Wang D, Zhu Y. (2012) Liver X receptor agonist alleviated high glucose-induced endothelial progenitor cell dysfunction via inhibition of reactive oxygen species and activation of AMP-activated protein kinase. *Microcirculation.* (6):547-53.
110. Li Y, Xu S, Mihaylova MM, Zheng B, Hou X, Jiang B, Park O, Luo Z, Lefai E, Shyy JY, et al. AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. *Cell Metab.* 2012; 13: 376–388.
111. Li, A.C., Glass, C.K. (2004) PPAR- and LXR-dependent pathways controlling lipid metabolism and the development of atherosclerosis. *J. Lipid. Res.* 45: 2161–2173.

112. Lin JK: Suppression of protein kinase C and nuclear oncogene expression as possible action mechanisms of cancer chemoprevention by Curcumin. *Arch Pharm Res* 27: 683-692, 2004.
113. Liu T, Li C, Sun H, Luo T, Tan Y, Tian D, Guo Z. Curcumin inhibits monocyte chemoattractant protein-1 expression and enhances cholesterol efflux by suppressing the c-Jun N-terminal kinase pathway in macrophage. *Inflamm Res*. 2014; 63(10):841-50.
114. Lou C, Zhang F, Yang M, Zhao J, Zeng W, et al.: Naringenin decreases invasiveness and metastasis by inhibiting TGF- $\beta$ -induced epithelial to mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. *PLoS One* 7(12), e50956, 2012.
115. Low, H, Hoang, A, Sviridov, D. Cholesterol efflux assay. *J Vis Exp*. 2012; (61): e3810.
116. Ma AZ, Song ZY, Zhang Q. (2014) Cholesterol efflux is LXR $\alpha$  isoform-dependent in human macrophages. *BMC Cardiovasc Disord.*; 14:80.
117. Maggioni D, Nicolini G, Rigolio R, Biffi L, Pignataro L, Gaini R, Garavello W. (2014) Myricetin and naringenin inhibit human squamous cell carcinoma proliferation and migration in vitro. *Nutr Cancer.*; 66(7):1257-67.
118. Malik, S., Roeder, R.G. (2005) Dynamic regulation of pol II transcription by the mammalian Mediator complex. *Trends Biochem. Sci.* 30: 256–263.
119. Marino PL. *Medicina crítica y terapia intensiva*. buenos aires: Editora médica panamericana. 1993: 430.
120. Marsin A.-S., Bertrand L., Rider M. H., Deprez J., Beauloye C., Vincent M. F., Van den Berghe G., Carling D., Hue L. Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Current Biology*. 2000; 10(20):1247–1255
121. Marsin, A.S., Bertrand, L., Rider, M.H., Deprez, J., Beauloye, C., Vincent, M.F., Van den Berghe, G., Carling, D., Hue, L. (2000) Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Current. Biol.* 10: 1247-1255.
122. Masip L, Veeravalli K, Georgiou G. The many faces of glutathione in bacteria. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8: 753–62.

123. Momcilovic, M., Hong, S.P., Carlson, M. (2006) Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase in vitro. *J. Biol. Chem.* 281: 25336-25343.
124. Moodie, S. A. and Wolfman, A. (1994). The 3Rs of life: Ras, Raf, and growth regulation. *Trends Genet.* 10, 44 -48.
125. Morrison D.K., Davis R.J. (2003) Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annual Review of Cell and Developmental Biology.* 19:91–118.
126. Morrow, V.A., Foufelle, F., Connell, J.M., Petrie, J.R., Gould, G.W., Salt, I.P. (2003) Direct activation of AMP-activated protein kinase stimulates nitric-oxide synthesis in human aortic endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 278: 31629-31639.
127. Motoshima H, Goldstein BJ, Igata M, Araki E. AMPK and cell proliferation-- AMPK as a therapeutic target for atherosclerosis and cancer. *J Physiol.* 2006; 574: 63–71.
128. Mottis, A., Mouchiroud, L., Auwerx, J. (2013) Emerging roles of the co-repressors NCoR1 and SMRT in homeostasis. *Genes Dev.* 27: 819-35.
129. Mukherjee S, Mazumdar M, Chakraborty S, Manna A, Saha S, Khan P, Bhattacharjee P, Guha D, Adhikary A, Mukherjee S, Das T. Curcumin inhibits breast cancer stem cell migration by amplifying the E-cadherin/beta-catenin negative feedback loop. *Stem Cell Res Ther.* 2014; 5 (5):116.
130. Nagy, Z.S., Czimmerer, Z., Nagy, L. (2012) Nuclear receptor mediated mechanisms of macrophage cholesterol metabolism. *Mol. Cell. Endocrinol.* 368: 85–98.
131. Nauseef WM. Biological roles for the NOX family NADPH oxidases. *J Biol Chem* 2008; 283:16961–5.
132. New, L. and Han, J. (1998). The p38 MAP kinase pathway and its biological function. *Trends Cardiovasc. Med.* 8,220 -229.
133. Nicholls P. The reaction between aminotriazole and catalase. *Biochemical Biophysical Acta.* 1962; 59: 414.
134. Nishimura Fde C, de Almeida AC, Ratti BA, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV, et al. (2013) Antioxidant effects of quercetin and naringenin are associated with impaired neutrophil microbicidal activity. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013: 795916.

135. Olefsky, J.M. (2001) Nuclear receptor minireview series. *J. Biol. Chem.* 276: 36863–36864.
136. Park JH, Jin CY, Lee BK, Kim GY, Choi YH, et al. (2008) Naringenin induces apoptosis through downregulation of Akt and caspase-3 activation in human leukemia THP-1 cells. *Food Chem Toxicol* 46: 3684–3690.
137. Pawlak, M., Lefebvre, P., Staels, B. (2012) General molecular biology and architecture of nuclear receptors. *Curr. Top Med. Chem.* 12: 486-504.
138. Perissi, V., Rosenfeld, M.G. (2005) Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 542–554.
139. Perissi, V., Staszewski, L.M., McInerney, E.M., Kurokawa, R., Krones, A., Rose, D.W., Lambert, M.H., Milburn, M.V., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G. (1999) Molecular determinants of nuclear receptor-co-repressor interaction. *Genes and Development.* 13: 3198–3208.
140. Pratt, W.B., Toft, D.O. (1997) Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr. Rev.* 18: 306–360.
141. Pu Y, Zhang H, Wang P, et al. Dietary curcumin ameliorates aging-related cerebrovascular dysfunction through the AMPK/uncoupling protein 2 pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry.* 2013; 32(5):1167–1177.
142. Ramirez-Tortosa MC, Mesa MD, Aguilera MC, Quiles JL. Oral administration of a turmeric inhibits LDL oxidation and has hypocholesterolemic effects in rabbits with experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 1999; 147(2):371-8.
143. Rattan, R., Giri, S., Singh, A.K., Singh, I. (2005) 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside inhibits cancer cell proliferation in vitro and in vivo via AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 280: 39582-39593.
144. Ray PD, Huang B-W, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal* 2012; 24:981–90.
145. Repa, J.J., Mangelsdorf, D.J. (2000) The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16: 459–481.
146. Reth M. (2002). Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. *Nat Immunol.*; 3(12):1129-34.
147. Roemer, S.C., Donham, D.C., Sherman, L., Pon, V.H., Edwards, D.P., Churchill, M.E. (2006) Structure of the progesterone receptor-deoxyribonucleic acid

- complex: novel interactions required for binding to half-site response elements. *Mol. Endocrinol.* 20: 3042–3052.
148. Rosenfeld, M.G., Lunyak, V.V., Glass, C.K. (2006) Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes Dev.* 20: 1405–1428.
  149. Ross SE, Erickson RL, Gerin I, DeRose PM, Bajnok L, Longo KA et al. Microarray analyses during adipogenesis: understanding the effects of Wnt signaling on adipogenesis and the roles of liver X receptor alpha in adipocyte metabolism. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 5989–5999.
  150. Santos AM, Lopes T, Oleastro M, Gato IV, Floch P, Benejat L, Chaves P, Pereira T, Seixas E, Machado J, Guerreiro AS. Curcumin inhibits gastric inflammation induced by helicobacter pylori infection in a mouse model. *Nutrients.* 2015; 7(1):306-20.
  151. Scott, J.W., Hawley, S.A., Green, K.A., Anis, M., Stewart, G., Scullion, G.A., Norman, D.G., Hardie, D.G. (2004) CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *J. Clin. Invest.* 113: 274-284.
  152. Scott, J.W., Norman, D.G., Hawley, S.A., Kontogiannis, L., Hardie, D.G. (2002) Protein kinase substrate recognition studied using the recombinant catalytic domain of AMP-activated protein kinase and a model substrate. *J. Mol. Biol.* 317: 309-323.
  153. Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 1995; 9:726–735.
  154. Seol, W., Choi, H.S., Moore, D.D. (1995) Isolation of proteins that interact specifically with the retinoid X receptor: two novel orphan receptors. *Mol. Endocrinol.* 9: 72–85.
  155. Shao W, Yu Z, Chiang Y, Yang Y, Chai T, Foltz W, Lu H, Fantus Ig, Jin T. Curcumin prevents high fat diet induced insulin resistance and obesity via attenuating lipogenesis in liver and inflammatory pathway in adipocytes. *PLoS One* 2012; 7: e28784.
  156. Shinar, D.M., Endo, N., Rutledge, S.J., Vogel, R., Rodan, G.A., Schmidt, A. (1994) NER, a new member of the gene family encoding the human steroid hormone nuclear receptor. *Gene.* 147: 273–276.
  157. Sim, A.T., Hardie, D.G. (1988) The low activity of acetyl-CoA carboxylase in basal and glucagonstimulated hepatocytes is due to phosphorylation by the AMP-

- activated protein kinase and not cyclic AMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett.* 233: 294-298.
158. Sladek, F.M. (2011) What are nuclear receptor ligands? *Mol. Cell. Endocrinol.* 334: 3–13.
159. Song, C., Kokontis, J.M., Hiipakka, R.A., Liao, S. (1994) Ubiquitous receptor: a receptor that modulates gene activation by retinoic acid and thyroid hormone receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 10809–10813.
160. Stahmann, N., Woods, A., Carling, D., Heller, R. (2006) Thrombin activates AMP-activated protein kinase in endothelial cells via a pathway involving Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase beta. *Mol. Cell. Biol.* 26: 5933-5945.
161. Steinberg, G.R., Kemp, B.E. (2009) AMPK in Health and Disease. *Physiol Rev* 89: 1025–1078.
162. Sugawara, T., Abe, S., Sakuragi, N., Fujimoto, Y., Nomura, E., Fujieda, K., Saito, M., Fujimoto, S. (2001) RIP 140 modulates transcription of the steroidogenic acute regulatory protein gene through interactions with both SF-1 and DAX-1. *Endocrinology* 142: 3570–3577.
163. Dinkova-Kostova T and P. Talalay, “Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins,” *Molecular Nutrition and Food Research*, vol. 52, no. 1, pp. S128–S138, 2008.
164. Henzler T., E. Steudle, Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in *Chara corallina*: model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> across water channels, *J. Exp. Bot.* 51 (2000) 2053–2066.
165. Talukdar S, Hillgartner FB (2006) The mechanism mediating the activation of acetyl- coenzyme A carboxylase-  $\alpha$  gene transcription by the liver X receptor agonist T0-901317. *J Lipid Res* 47: 2451–2461
166. Tamas, P., Hawley, S.A., Clarke, R.G., Mustard, K.J., Green, K., Hardie, D.G., Cantrell, D.A. (2006) Regulation of the energy sensor AMP-activated protein kinase by antigen receptor and Ca<sup>2+</sup> in T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 203: 1665-1670.

167. Teboul, M., Enmark, E., Li, Q., Wikstrom, A.C., Pelto-Huikko, M., Gustafsson, J.A. (1995) OR-1, a member of the nuclear receptor superfamily that interacts with the 9-cis-retinoic acid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 2096–2100.
168. Thannickal V.J., Fanburg B.L., Reactive oxygen species in cell signalling, *Am. J. Physiol.: Lung. Cell Mol. Physiol.* 279 (2000) 1005–1028.
169. Walcher D, Vasic D, Heinz P, Bach H, Durst R, Hausauer A, Hombach V, Marx N. LXR activation inhibits chemokine-induced CD4-positive lymphocyte migration. *Basic Res Cardiol.* 2010 105(4):487-94.
170. Wan X, Huo Y, Johns M, Piper E, Mason JC, Carling D, Haskard DO, Boyle JJ. 5'-AMP-activated protein kinase-activating transcription factor 1 cascade modulates human monocyte-derived macrophages to atheroprotective functions in response to heme or metformin. (2013) *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 33(11): 2470-80.
171. Wang S., Yu S., Shi W., Ge L., Yu X., Fan J., et al. . (2011). Curcumin inhibits the migration and invasion of mouse hepatoma Hca-F cells through down-regulating caveolin-1 expression and epidermal growth factor receptor signaling. *IUBMB Life* 63, 775–782.
172. Wang Z, Wilson W.A., Fujino M.A., Roach P.J. (2001). Antagonistic controls of autophagy and glycogen accumulation by Snf1p, the yeast homolog of AMP-activated protein kinase, and the cyclin-dependent kinase Pho85p. *Mol. Cell. Biol.* 21: 5742–5752.
173. Whitney, K.D., Watson, M.A., Goodwin, B., Galardi, C.M., Maglich, J.M., Wilson, J.G., Willson, T.M., Collins, J.L., Kliewer, S.A. (2001) Liver X Receptor (LXR) Regulation of the LXRalpha Gene in Human Macrophages. *J. Biol. Chem.* 276: 43509–43515.
174. Widegren, U., Wretman, C., Lionikas, A., Hedin, G. and Henriksson, J. (2000). Influence of exercise intensity on ERK/MAP kinase signalling in human skeletal muscle. *Pflugers Arch.* 441,317 -322.
175. Willy, P.J., Umesono, K., Ong, E.S., Evans, R.M., Heyman, R.A., Mangelsdorf, D.J. (1995) LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev.* 9: 1033–1045.
176. Winder, W.W., Hardie, D.G. (1996) Inactivation of acetyl-CoA carboxylase and activation of AMPactivated protein kinase in muscle during exercise. *Am. J. Physiol.* 270: E299-E304.

177. Winterbourn CC. Are free radicals involved in thiol-based redox signaling? *Free Radic Biol Med* 2015.
178. Winterbourn CC. The biological chemistry of hydrogen peroxide. *Methods Enzymol* 2013; 528:3–25.
179. Witters, L.A., Nordlund, A.C., Marshall, L. (1991) Regulation of intracellular acetyl-CoA carboxylase by ATP depletors mimics the action of the 5'-AMP-activated protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181: 1486-1492.
180. Wojtaszewski, J.F., Nielsen, P., Hansen, B.F., Richter, E.A., Kiens, B. (2000) Isoform-specific and exercise intensity-dependent activation of 5'-AMP-activated protein kinase in human skeletal muscle. *J. Physiol.* 528: 221-226.
181. Wong J., Quinn C.M., Gelissen I.C., Brown A.J. (2008) Endogenous 24(S), 25-epoxycholesterol fine-tunes acute control of cellular cholesterol homeostasis. *J. Biol. Chem.* 283: 700–707.
182. Woods A, Azzout-Marniche D, Foretz M, Stein SC, Lemarchand P, Ferre P, Foufelle F & Carling D (2000). Characterization of the role of AMP-activated protein kinase in the regulation of glucose-activated gene expression using constitutively active and dominant negative forms of the kinase. *Mol Cell Biol* 20, 6704–6711.
183. Woods, A., Dickerson, K., Heath, R., Hong, S.P., Momcilovic, M., Johnstone, S.R., Carlson, M., Carling, D. (2005) Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell. Metab.* 2: 21-33.
184. Xiao K, Jiang J, Guan C, Dong C, Wang G, Bai L, Sun J, Hu C, Bai C. Curcumin induces autophagy via activating the AMPK signaling pathway in lung adenocarcinoma cells. *J Pharmacol Sci.* 2013; 123:102–109.
185. Yang H, Zheng S, Qiu Y, Yang Y, Wang C, Yang P, Li Q, Lei B. Activation of liver X receptor alleviates ocular inflammation in experimental autoimmune uveitis. 2014. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*; 5(4):2795-804.
186. Yang J, Craddock L, Hong S, Liu ZM. AMP-activated protein kinase suppresses LXR-dependent sterol regulatory element-binding protein-1c transcription in rat hepatoma McA-RH7777 cells. *J Cell Biochem.* 2009; 106(3):414–426.

187. Zhao JF, Ching LC, Huang YC, Chen CY, Chiang AN (2012) Molecular mechanism of curcumin on the suppression of cholesterol accumulation in macrophage foam cells and atherosclerosis. *Mol Nutr Food Res* 56(5): 691-701.
188. Zheng F, Zhang S, Lu W, Wu F, Yin X, Yu D, Pan Q, Li H. Regulation of insulin resistance and adiponectin signaling in adipose tissue by liver X receptor activation highlights a cross-talk with PPAR $\gamma$ . *PLoS One*. 2014 Jun 27; 9(6):e101269.
189. Zheng, D., MacLean, P.S., Pohnert, S.C., Knight, J.B., Olson, A.L., Winder, W.W., Dohm, G.L. (2001) Regulation of muscle GLUT-4 transcription by AMP-activated protein kinase. *J. Appl. Physiol.* 91: 1073-1083.
190. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J et al.(2001). Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 108, 1167–1174.
191. Zygmunt K, Faubert B, MacNeil J, Tsiani E. Naringenin, a citrus flavonoid, increases muscle cell glucose uptake via AMPK. *Biochem Biophys Res Commun.*2010; 398:178–183.