



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

## TESIS

LA SIMVASTATINA COMO REGULADOR DEL ESTRÉS  
OXIDATIVO A NIVEL MITOCONDRIAL EN UNA LÍNEA DE  
CÉLULAS ENDOTELIALES DE AORTA DE CERDO

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

ANGEL FLORES ALANIS

DIRECTORA DE TESIS

Dra. en C.B. Emma Rodríguez Maldonado

ASESORA DE TESIS:

M. en B.R.A. María Judith Villavicencio Macías

MEXICO D.F 2016





Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

AMOR SCIENTIAE QVE INSEMIANT CORDI

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

CARRERA DE BIOLOGÍA

LA SIMVASTATINA COMO REGULADOR DEL ESTRÉS  
OXIDATIVO A NIVEL MITOCONDRIAL EN UNA LÍNEA DE  
CÉLULAS ENDOTELIALES DE AORTA DE CERDO

Tesis presentada por: Flores Alanis Angel

Directora de tesis: Dra. Emma Rodríguez Maldonado

Asesora de Tesis: M. en B.R.A. María Judith  
Villavicencio Macías

Realizada en el Laboratorio de Fisiología Celular del  
Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** M en C. Enrique Mendieta Márquez

**VOCAL:** Dra en C.B. Emma Rodríguez Maldonado

**SECRETARIO:** M. en B.R.A. María Judith Villavicencio Macías

**1er. SUPLENTE:** M. en C Marisela Valdés Ruiz

**2° SUPLENTE:** M. en C. Catalina Machuca Rodríguez

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA "IGNACIO CHÁVEZ"

**ASESOR DEL TEMA:**

Dra Emma Rodríguez Maldonado

**SUSTENTANTE:**

Flores Alanis Angel

**AÑO DE ELABORACIÓN DEL TRABAJO**

2016

## *Dedico este trabajo*

*A mi madre. Con gran admiración y Respeto.*

*Por otorgarme la oportunidad de ser alguien en la vida. Y mostrarme que grandes pueden ser los sueños y que como este, cumplido ahora, se hacen realidad. Gracias por seguir a mi lado y tu amor incondicional a pesar de mis errores. Gracias por seguir en mi vida.*

*Perla Gabriela Alanís Chávez*

*A mi ángel de la guarda. Sé que donde estés, estarás orgullosa de mí, porque así como te llevo en mi corazón, sé que tengo tus mejores deseos.*

*Constancia Chávez Velázquez*

*Con gran admiración*

*Dra. Emma Rodríguez Maldonado.*

*Por su tiempo, su atención, por sus consejos y su alegría; pero sobre todo por sus enseñanzas que me han permitido mejorar en mi profesión e iniciarme en la investigación. De todo corazón, muchas gracias.*

*Al Doctor Vicente Castrejón Téllez.*

*Por ser un ejemplo a seguir, por su motivación, por su dedicación y por creer en mí, además por impulsarme en este paso de mi carrera de manera incondicional, por formar parte de este logro. Muchas gracias Doc.*

## *Agradecimientos.*

*A la profesora Judith Villavicencio Macías*

*Por compartir su sabiduría y conocimientos en la formación de mi carrera Profesional, por el cariño y la confianza que me ha brindado las cuales me han acompañado hasta ese paso de mi vida y sobre todo por su presencia en esencia.*

*A mis hermanos Iván y Gabriel.*

*Por estar siempre para recibirme con los brazos abiertos, por su amor y apoyo incondicional, con quienes he compartido momentos muy felices e inolvidables. Gracias por compartir esta vida conmigo.*

*A mis amigas de la carrera Grecia Molina y Daniela Reyes.*

*Por ser como son, porque juntos hemos pasado los momentos más difíciles y siempre logramos estar para apoyarnos; gracias por todo amigas.*

*A tí Ale.*

*Porque tus pasos y los míos en todo este tiempo me han impulsado en alcanzar mis metas y como esta, tiene partes de ti. Gracias por caminar junto a mí en este sendero de la vida.*

*A mis Sínodales: Maestra Catalina Machuca, Maestra Marisela Valdés Ruiz, Maestro Enrique Mendieta Márquez.*

*Por ser partícipes de este paso tan grande en la culminación de mi carrera Profesional, por sus consejos y su apoyo inigualable. Muchas gracias.*

*A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO*

*Por haberme brindado un lugar en sus Facultades y salones, porque cada aprendizaje obtenido de ella me ha impulsado a mejorar mi persona y mi profesión, por dejar una huella en mi vida, por eso y por mucho más... gracias Universidad.*

*Y por último a mi admirable FES Zaragoza.*

*Por qué el haber recorrido cada una de sus instalaciones durante todo este tiempo me ha enseñado a valorar lo mejor de cada lugar, porque al final de tantos sentimientos, me permitió formarme y hacerme de una profesión tan bella como es la Biología.*





*He aquí mi secreto,  
que no puede ser más simple:  
Sólo con el corazón se puede ver bien,  
Lo esencial es invisible para los ojos.*

El Principito



## Índice.

---

<b>1. Resumen.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Abreviaturas.....</b>	<b>3</b>
<b>3. Introducción.....</b>	<b>5</b>
<b>3.1. Generalidades de las Estatinas.....</b>	<b>5</b>
<b>3.2. Historia y clasificación de las estatinas.....</b>	<b>6</b>
<b>3.3. Mecanismo de acción de las estatinas.....</b>	<b>9</b>
<b>3.4. Efectos pleiotropicos de las estatinas.....</b>	<b>10</b>
<b>3.5. Las Estatinas y la prenilación proteica.....</b>	<b>11</b>
<b>3.6. Las GTPasas pequeñas y los receptores activados         por proliferadores peroxisomales (PPARs).....</b>	<b>15</b>
<b>3.7. Las proteínas desacoplantes         mitocondriales(UCPs).....</b>	<b>18</b>
<b>3.8. Función de las UCP y su Relación con la Regulación         de los Niveles de Radicales Libres.....</b>	<b>20</b>
<b>4. Justificación.....</b>	<b>22</b>
<b>5. Hipótesis.....</b>	<b>24</b>
<b>6. Objetivo General.....</b>	<b>25</b>
<b>6.1. Objetivos Particulares</b>	
<b>7. Material y Método.....</b>	<b>26</b>
<b>7.1. Material Químico.....</b>	<b>26</b>
<b>7.2. Material Biológico.....</b>	<b>26</b>
<b>7.3. Tratamiento con Simvastatina.....</b>	<b>26</b>
<b>7.4. Extracción de Proteína.....</b>	<b>27</b>
<b>7.5. Cuantificación de Proteína.....</b>	<b>27</b>

7.6.	Separación de Proteínas por Electroforesis.....	28
7.7.	Transferencia de Proteínas.....	28
7.8.	Bloqueo de Membranas.....	29
7.9.	Incubación con anticuerpos, Western Blot.....	29
7.10.	Revelado de membranas, Inmunoquimioluminiscencia.....	30
7.11.	Cuantificación de Especies Reactivas de Oxígeno mediante Fluorescencia .....	30
7.12.	Determinación de las Especies Reactivas de Oxígeno mediante Citometría de Flujo.....	31
7.13.	Análisis Estadístico.....	31
<b>8.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>32</b>
8.1.	Determinación de Radicales Libres con DCF-DA.....	32
8.2.	Determinación de la expresión UCP-2.....	33
8.3.	Determinación de la Expresión de Rho.....	34
8.4.	Determinación de la expresión de PPAR $\gamma$ .....	35
8.5.	Efecto del ácido Oleico en la regulación de PPAR $\gamma$ y la Producción de Radicales Libres.....	36
	Efecto del Fenofibrato y el BADGE sobre la actividad de PPAR $\gamma$ y la Producción de Radicales Libres.....	37
8.6.	Determinación de Especies Reactivas de Oxígeno mediante Citometría de Flujo en diferentes concentraciones de Simvastatina.....	38
<b>9.</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>41</b>
<b>10.</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>47</b>
<b>11.</b>	<b>Perspectivas para futuros trabajos.....</b>	<b>48</b>
<b>12.</b>	<b>Bibliografía.....</b>	<b>49</b>

## 1. Resumen.

---

El colesterol es un metabolito importante en la célula, se utiliza en las membranas celulares o como precursor de hormonas esteroideas y ácidos biliares. Sin embargo, en cantidades excesivas de colesterol se convierte en un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Aunque el colesterol de la dieta puede contribuir en el cambio de los niveles de colesterol en suero, más de dos tercios del colesterol en el cuerpo son sintetizados en el hígado. La enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa) corresponde al principal sitio de regulación en toda la síntesis del colesterol. Las estatinas son fármacos que bloquean la actividad de esta enzima. En la práctica clínica, las estatinas se usan en la prevención de enfermedades cardíacas, sin embargo, sus beneficios van más allá del control de los niveles de colesterol. Hay reportes que involucran a las estatinas con la función endotelial, con la reducción de las placas ateroscleróticas, con el estrés oxidativo, con la inflamación, con el sistema inmune y con el sistema nervioso central. Estos efectos, llamados "pleiotrópicos", están relacionados con la inhibición de la síntesis de una serie de metabolitos intermediarios en el catabolismo del colesterol, los isoprenos farnesil pirofosfato y geranylgeranyl pirofosfato, los cuales pueden ser utilizados como moléculas de adhesión durante la modificación post-traducciona l de algunas proteínas. Tal como sucede con la familia de proteínas pequeñas unidas a GTP (GTPasas pequeñas), Rho, Ras y Rac, cuya adecuada localización y función en la membrana celular dependen de su prenilación. Esta regulación tiene consecuencias en la actividad de otras proteínas, como son los PPAR; los cuales se unen con el receptor PPAR  $\gamma$ -cis retinoico (RXR), a los elementos de respuesta a PPARs (PPREs) y finalmente con el ADN. De tal manera que la transcripción de varios genes puede ser regulada a través de este proceso de interacción. En este trabajo, proponemos la posible regulación de genes nucleares relacionados con proteínas mitocondriales, como son las proteínas desacoplantes mitocondriales (UCPs). Y proponemos que las estatinas regulan la cascada de señalización que involucra la activación de los PPARs y las UCPs, teniendo como consecuencia la regulación de los niveles de

radicales libres en la célula. Poco se sabe sobre el papel del desacoplamiento de la fosforilación oxidativa provocado por las UCPs, en tejidos que no son adiposo marrón y, ningún mecanismo ha sido propuesto que relacione a las estatinas con la actividad mitocondrial. Es por eso que buscamos demostrar que existe una relación entre las estatinas y la síntesis de las UCPs, teniendo como consecuencia la regulación de los niveles de radicales libres en la célula, principalmente porque a estas proteínas se les ha relacionado con la regulación de los radicales libres. Esta relación aún no ha sido reportada, lo cual implica un factor novedoso sobre la utilización de estos fármacos, durante el tratamiento de enfermedades relacionadas con defectos cardiacos, como son el síndrome metabólico, la diabetes y la hipertensión.

## 2. Abreviaturas.

---

ANOVA	Análisis de Varianza
ANT	Nucleótidos de Adenina
APS	Persulfato de Amonio
BADGE	Bisfenol a diglicir éter
CARE	Cholesterol and recurrent events
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DCF	7',2'-diclorofluoresceína
DCF-DA	7',2'-diacetato de diclorofluoresceína
DMSO	Dimetil sulfóxido
eNOS	Enzima de Óxido Nítrico Sintasa
EROs	Especies Reactivas de Oxígeno
FPP	Farnesil Pirofosfato
GAPs	Activadores de Proteínas GTPasas
GDI	Inhibidor disociativo de guanina
GDP	Guanosin difosfato
GEFs	Factor de cambio de nucleótidos de Guanina
GGPP	Geranilgeranil Pirofosfato
GTP	Guanosin Trifosfato
GTPasa	Guanosina Trifosfatasa
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HCl	Ácido Clorhídrico
HDL	Lipoproteínas de Alta Densidad
HMG-CoA	3-Hidroxil-3-Metil-Glutaril Coenzima A
HPS	Heart Protection Study
kDa	KiloDalton
K <sub>i</sub>	Constante de Inhibición
λ	Longitud de onda
LDL	Lipoproteínas de Baja Densidad
μM	Micromolar

MDOS	Superóxido dismutasa
NaCl	Cloruro de Sodio
nM	Nanomolar
Nm	Nanómetro
NEM	N-etil-maleimida
Células PAE	Células Endoteliales de Aorta Porcinas
PBS	Buffer Fosfato Salino
Pi	Fósforo Inorgánico
PMSF	Fenil-metano-sulfonil fluoruro
PVDF	Membrana de transferencia de Fluoruro de Polivinilideno
PPAR $\gamma$	Receptores activados por proliferadores peroxisómicos tipo gamma
PPRE	Elementos de Respuesta proliferación Peroxisomal
ROCK	Proteinasa asociada a Rho
RNAm	ácido ribonucleico mensajero
Rpm	Revoluciones por minuto
RXR	Receptor ácido 9-cis retinoico
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SFB	Suero Fetal Bovino
Simv	Simvastatina
SRB	Solución Reactivo de Bradford
TBS-T	Buffer Tampón Salino con Tween
UCPs	Proteínas Desacoplantes Mitocondriales



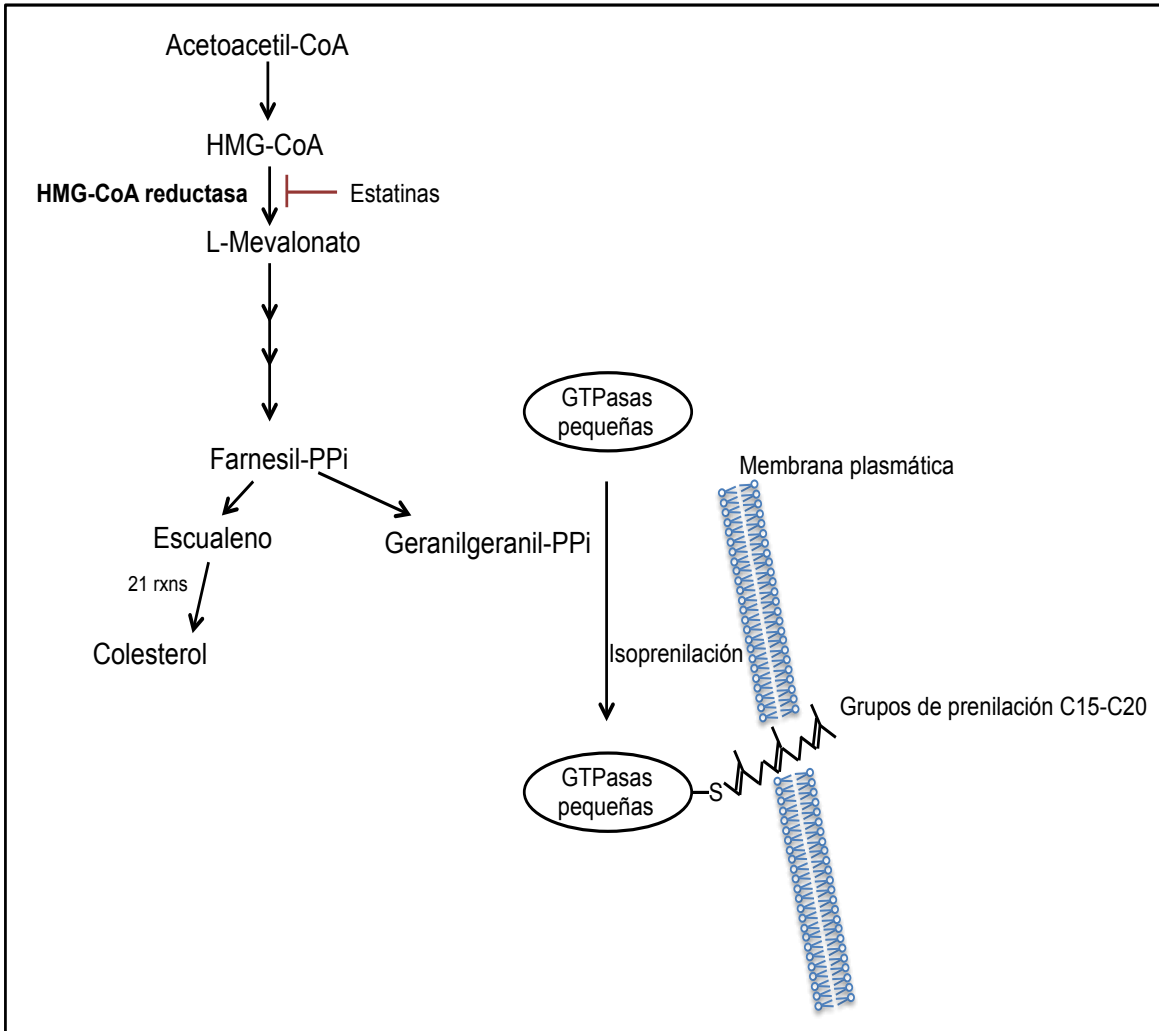
### 3. Introducción.

---

#### 3.1. Generalidades de las estatinas.

El colesterol es un componente vital de las membranas celulares y es el principal precursor de hormonas esteroideas y ácidos biliares<sup>1</sup>. Las estatinas son inhibidores de la síntesis de colesterol utilizada en las terapias que implican el tratamiento primario y secundario de la enfermedad arterial coronaria. El efecto de las estatinas ha sido extensamente explorado a través de diversos estudios clínicos, como el Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S)<sup>2</sup>, el Cholesterol and Recurrent Events (CARE)<sup>3</sup>, el West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS)<sup>4</sup>, o el Heart Protection Study (HPS)<sup>5</sup>, los cuales han demostrado los efectos benéficos de la estatinas en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares. Debido a que del 60 al 70% del colesterol total en el humano se sintetiza en el hígado, inhibir la producción del colesterol a nivel hepático es un proceso importante para la disminución de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) unidas a colesterol<sup>6</sup>.

Además de regular la síntesis del colesterol, se han observado otros efectos, conocidos como efectos pleiotropicos, que son independientes a la regulación de los niveles de colesterol pero que involucran a algunos de sus intermediarios. Al inhibir la conversión del 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) a ácido mevalónico, las estatinas inhiben la síntesis de isoprenos como el farnesil pirofosfato (FPP) y el geranilgeranil pirofosfato (GGPP), que a su vez son precursores de la síntesis de colesterol (Figura 1). Estos isoprenos son metabolitos importantes durante la modificación post-traducciona de proteínas. De hecho, esas proteínas isopreniladas constituyen aproximadamente el 2% del total de las proteínas celulares, y la isoprenilación promueve su apropiada localización celular y su transporte en sitios específicos dentro de la célula<sup>7</sup>.

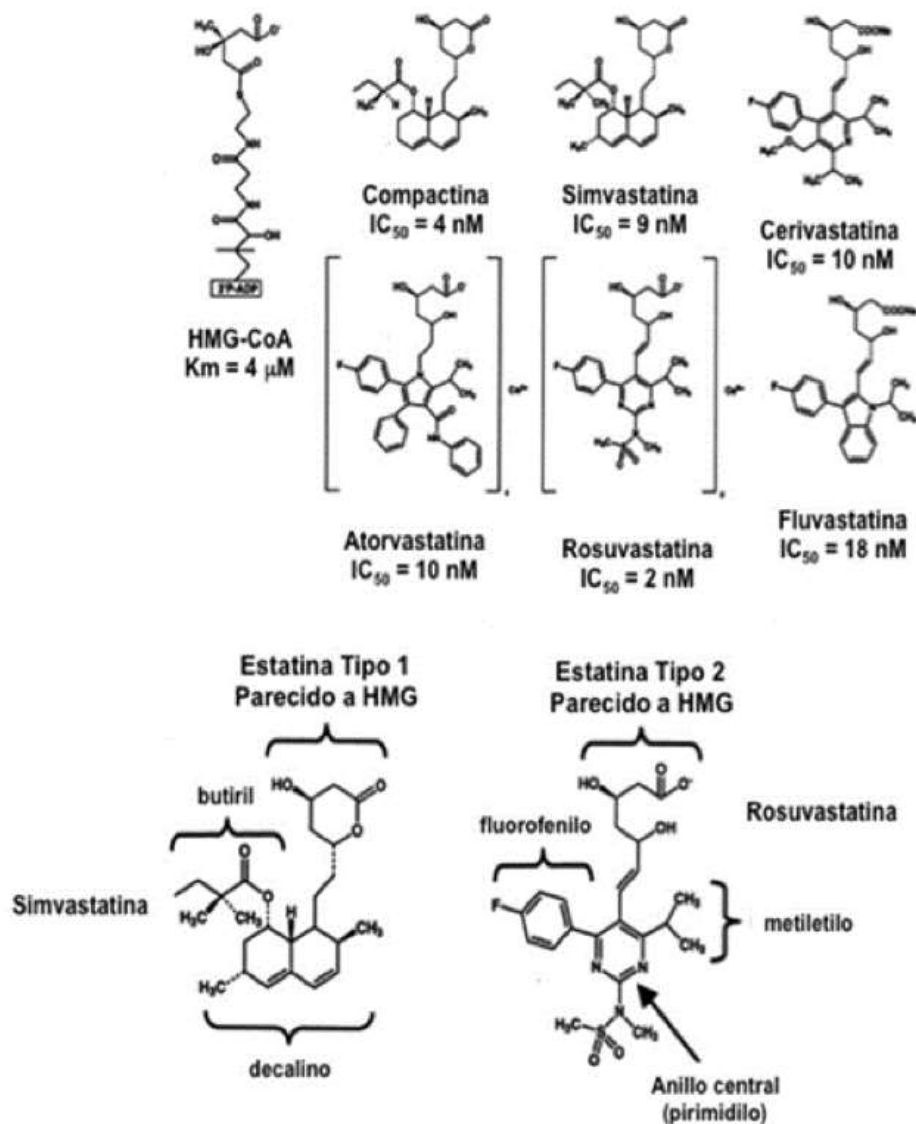


**Figura 1.** Biosíntesis del colesterol, sitio de unión de las estatinas y regulación sobre la isoprenilación de las GTPasas pequeñas lo cual modula diversas funciones celulares<sup>8</sup>

### 3.2. Historia y clasificación de las estatinas.

Los inhibidores de la enzima HMG-CoA reductasa o estatinas fueron aislados e identificados originalmente como derivados fúngicos secundarios. La primera estatina identificada fue la mevastatina o compactina, aislada de cultivos de *Penicillium citrinium*. En su forma activa, la mevastatina tiene una estructura muy similar al sustrato natural de la HMG-CoA reductasa<sup>8</sup>. Al ser administrada en ratas, la mevastatina fue capaz de inhibir la biosíntesis del colesterol con una constante de inhibición ( $K_i$ ) de 1.4nM. Sin embargo su administración mostró consecuencias secundarias afectando el hígado, por lo cual se descartó su uso en los estudios

clínicos<sup>9</sup>. Estudios posteriores a partir de cultivos de *Aspergillus terreus*, se purificó la meviolina o lovastatina, que resultó ser un inhibidor más estable, más potente y sin efectos adversos. Estructuralmente la lovastatina presenta de un grupo metilo no observado en la mevastatina. La lovastatina tiene una  $K_i$  de 0.6nM y no mostró ningún efecto tóxico, convirtiendo a la lovastatina en el primer fármaco utilizado en humanos para el tratamiento de la hipercolesterolemia<sup>10, 11</sup>.

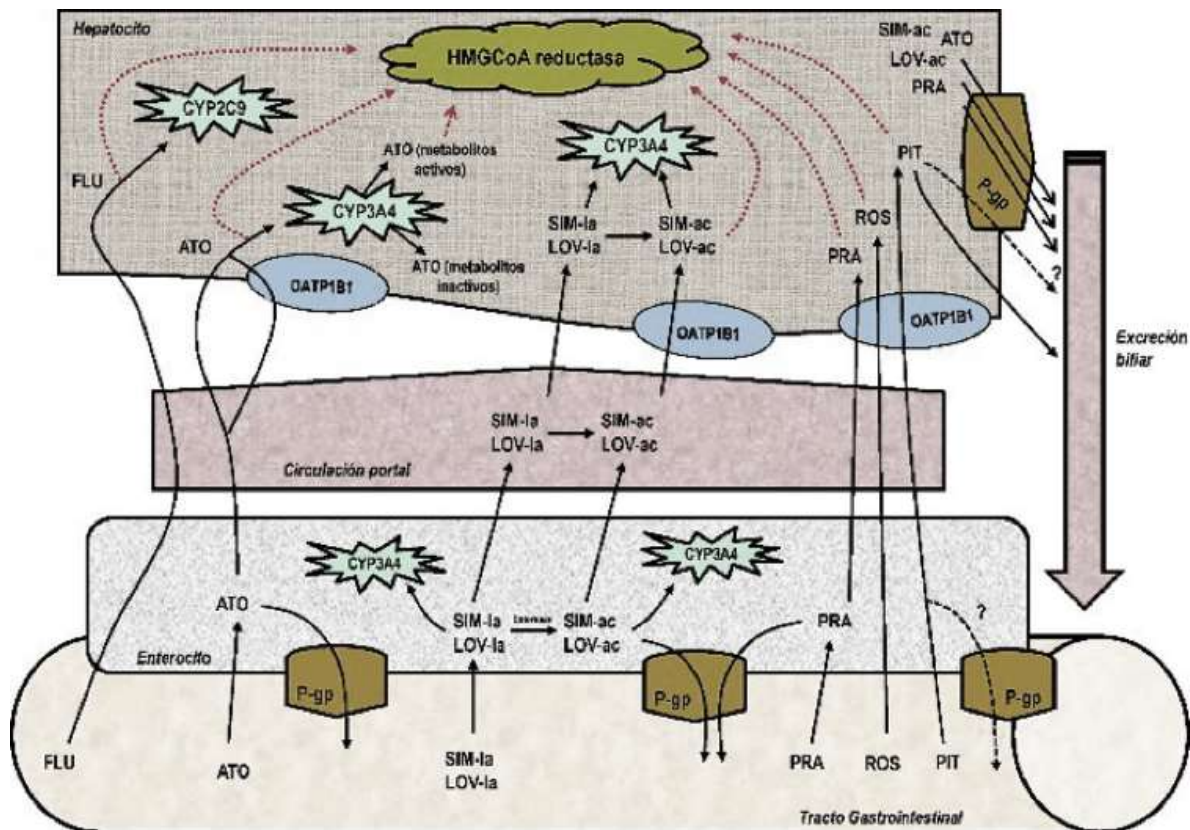


**Figura 2.** Estructura molecular de las estatinas, su relación con el HMG-CoA y su constante inhibición para la HMG-CoA reductasa<sup>15</sup>.

La extracción y la síntesis de nuevas estatinas continúan en desarrollo. Estructuralmente, las estatinas pueden clasificarse en dos tipos, el Tipo 1 que

incluye la lovastatina, Simvastatina y pravastatina, las cuales comparten la misma estructura con respecto al anillo de hidronaftaleno; y las estatinas de Tipo 2, como la fluvastatina, atorvastatina, cerivastatina y rosuvastatina, que son estatinas sintéticas que contienen grandes grupos unidos en su estructura que son similares al HMG-CoA. Con base a su naturaleza química, las estatinas son clasificadas en hidrofílicas, como la pravastatina, la fluvastatina o la rosuvastatina; en lipofílicas, como la lovastatina, la cerivastatina o la Simvastatina; o mixtas como la atorvastatina y la pitavastatina. La estructura molecular de estos fármacos les proporciona una permeabilidad diferente en el organismo lo cual puede tener como consecuencia efectos secundarios que repercuten en la eficiencia del fármaco dependiendo el individuo (Figura 2)<sup>12</sup>. También se puede clasificar a las estatinas de acuerdo a su origen, existen las estatinas naturales derivadas principalmente de hongos y las estatinas sintéticas elaboradas por la industria farmacéutica<sup>13, 14</sup>.

Las estatinas son fármacos que requieren entrar a la célula para llevar a cabo su efecto, a través de dos mecanismos principales el primero implica la interacción directamente con la membrana celular (estatinas lipofílicas) y el segundo requiere la actividad de proteínas acarreadoras (estatinas hidrofílicas). De 30% al 85% de estos fármacos son inicialmente absorbidos y metabolizados en el hígado, dejando en circulación sistémica del 5% al 30% de la concentración total administrada. Las estatinas son metabolizadas principalmente por el sistema P-450 (CYP). Las estatinas metabolizadas por el sistema CYP en la mayoría de los casos son los sustratos principales de la isoforma más activa del sistema, CYP3A4 (Figura 3)<sup>12, 16</sup>.



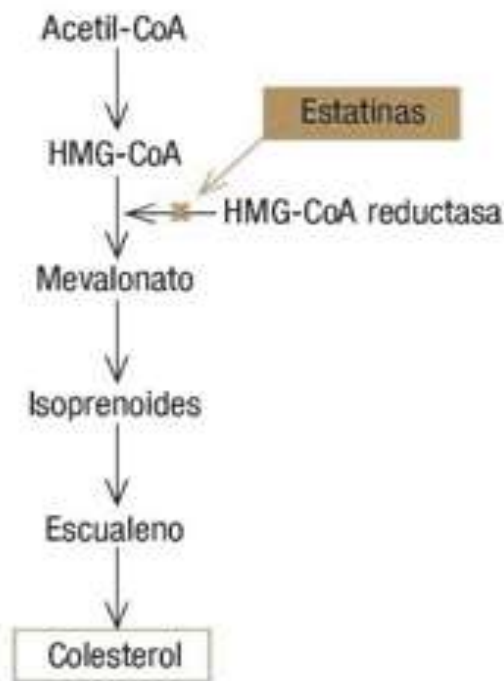
**Figura 3.** Distribución selectiva de las estatinas entre el hígado y el intestino. En hígado las estatinas son transportadas por transportadores selectivos que incluyen a los Polipéptidos Transportadores de Aniones Orgánicos (Oatps), se metabolizan principalmente por proteínas de la familia CYP y ejercen su efecto sobre la HMG CoA reductasa<sup>33</sup>.

### 3.3. Mecanismo de Acción de las Estatinas.

Las estatinas se encargan de inhibir reversiblemente a la enzima HMG-CoA reductasa, principalmente por la unión de sus cadenas laterales con el sitio activo de la enzima y bloqueando de esta manera el estado de transición entre el sustrato y el producto de la catálisis enzimática. En general, toda la familia de estatinas comparten la misma estructura de interacción con la enzima y por lo tanto inhiben a la enzima prácticamente por el mismo mecanismo (Figura 4)<sup>17,18</sup>. Técnicas como la cristalografía han hecho posible resolver la estructura de la porción catalítica de la HMG-CoA reductasa asociada a diferentes tipos de estatina, y lo que se ha observado es que la interacción entre ambas estructuras es principalmente de tipo hidrofóbico, es decir, se une el extremo hidrofóbico de las estatinas con el sitio

activo de la enzima y esa interacción involucra un gran número de enlaces de tipo de Van Der Waals, esto es a través de los anillos hidrofóbicos de las estatinas quienes están en un contacto muy estrecho con las hélices del dominio más grande de la HMG-CoA reductasa<sup>18,19,20</sup>.

Con respecto a la HMG-CoA reductasa en mamíferos, las estatinas se unen a la enzima en concentraciones que van en el rango nano molar (nM), lo cual implica un excelente mecanismo de competencia con su sustrato natural, que se encuentra en concentraciones micro molares ( $\mu\text{M}$ ), haciendo que la afinidad por el sitio catalítico de estos fármacos sea hasta 1000 veces mayor a la del sustrato natural y que la unión esta mediada por un gran número de enlaces de Van der Waals<sup>19, 21</sup>



**Figura 4.** Vía del metabolismo del mevalonato, que indica el lugar de acción de las estatinas y los productos finales de la reacción de HMG-CoA reductasa, incluyendo el colesterol y los isoprenos<sup>21</sup>.

### 3.4. Efectos pleiotropicos de las estatinas.

Además de la regulación sobre los niveles de colesterol por parte de las estatinas, estos fármacos tienen efectos adicionales llamados "pleiotropicos", que pueden ser causa de la interacción directa del fármaco sobre su efector o ser consecuencia de la inhibición de la síntesis y reducción del colesterol plasmático.

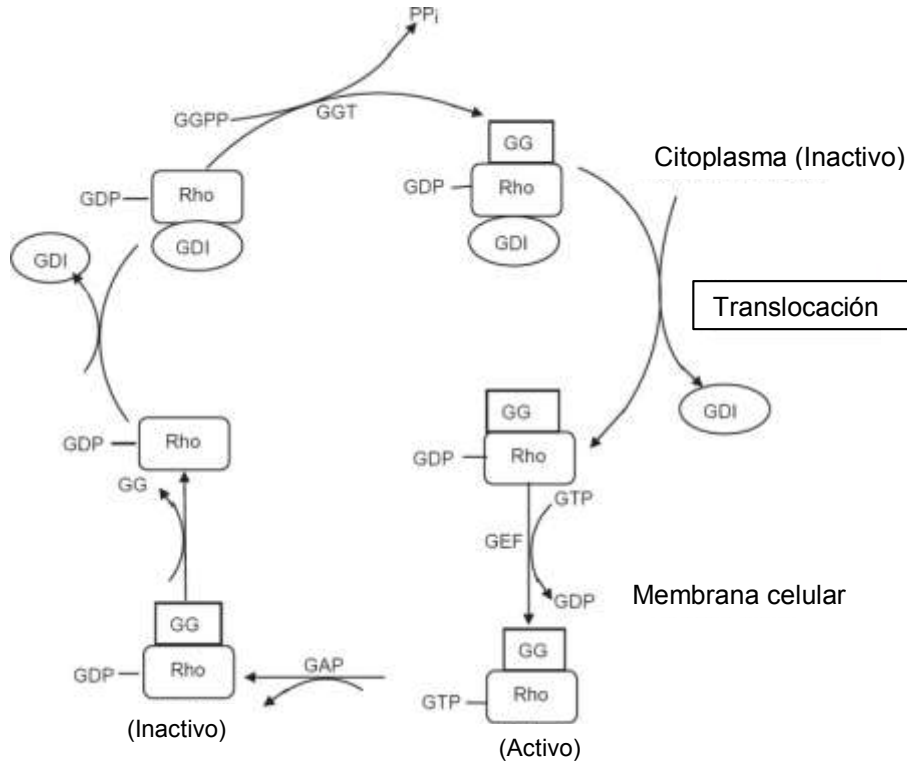
Estos efectos comprenden desde la mejora en la función endotelial mediante la regulación de la enzima de Óxido Nítrico Sintasa (eNOS) en las células endoteliales, hasta la influencia benéfica sobre las enfermedades arteriales<sup>22</sup>. Un ejemplo de los efectos que tienen las estatinas independientemente de su función como fármacos hipolipemiantes, está en relación con la formación de ateromas. La administración de las estatinas, puede promover una mejora en los resultados después de un evento cardiovascular en el paciente, lo cual puede ser consecuencia a la reducción de la vulnerabilidad de placa, probablemente, a partir de la inhibición de la infiltración de los miocitos a la pared arterial y a la reducción de la secreción de metaloproteinasas<sup>23</sup>.

### **3.5. Las estatinas y la prenilación proteica.**

Posiblemente el mecanismo más importante de los efectos pleiotropicos de las estatinas implica la inhibición de la síntesis del mevalonato impidiendo de esta manera la síntesis de las unidades isoprenoides, pirofosfato de farnesilo (FPP) y pirofosfato de geranyl-geranyl (GGPP). Los isoprenos son moléculas formadas por múltiples de cinco carbonos utilizadas durante la síntesis de moléculas más complejas como el colesterol, o son utilizadas en los procesos conocidos como prenilación proteica, que se lleva a cabo durante la modificación pos-traduccional de muchas proteínas que están relacionadas con la membrana celular. La interacción de estas proteínas con los isoprenos implica su correcta translocación desde el citosol hacia la membrana celular. De hecho, la correcta ubicación de estas proteínas en la membrana es un requisito indispensable para su función biológica<sup>24</sup>.

Los sitios de unión durante la prenilación proteica se localizan en aquellas proteínas que tienen la secuencia CaaX localizado principalmente en el carboxilo terminal, donde “C” corresponde a una cisteína, “a” son aminoácidos alifáticos y “X” puede ser cualquier aminoácido, en el genoma humano existen más de 100 proteínas conocidas o que pueden tener esta secuencia en su estructura<sup>25</sup>. La modificación por prenilación implica proteínas como las proteínas G heterotrimericas, el grupo Hemo-a, las láminas nucleares y las proteínas pequeñas de unión a la guanosin trifosfato (GTP) Ras y proteínas parecidas a Ras como son,

Rho, Rab, Rac, Ra1 y Rap. De tal manera que la prenilación es un proceso de interacción covalente capaz de promover la localización celular y el tránsito intracelular de proteínas asociadas a la membrana<sup>26</sup>.

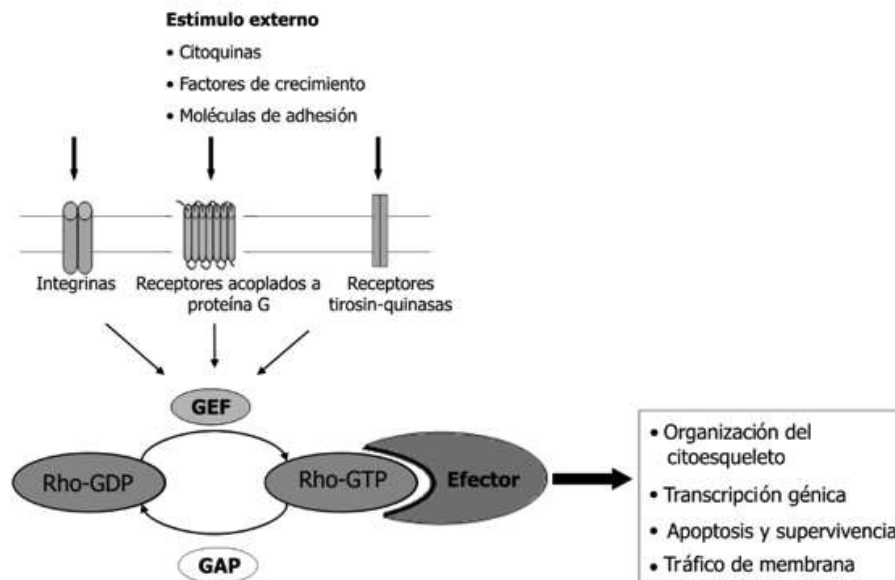


**Figura 5.** Vía del mevalonato de la biosíntesis de colesterol que muestra los efectos de la inhibición de la HMG CoA reductasa por las estatinas. Las estatinas disminuyen la isoprenilación de moléculas de señalización lo que conduce a la modulación (↑ [aumento] / ↓ [disminución]) de varias vías de señalización<sup>28</sup>.

Los miembros de la familia de proteínas pequeñas de unión a GTP, Ras y Rho, tienen un peso molecular entre 20 y 25 kiloDalton (kDa) y son de las principales proteínas reguladas pos-traduccionalmente por prenilación. Ras y Rho son proteínas que alternan entre el estado inactivo unidas al guanosin difosfato (GDP) y el estado activo unidas a GTP, además, ambas proteínas requieren estar interaccionando con la membrana celular para llevar a cabo su función y para que esto suceda deben ser preniladas. Por ejemplo, en las células endoteliales la translocación de Ras del citosol a la membrana es dependiente de farnesilación, mientras que, la translocación de Rho, es dependiente de su geranyl-geranilación. El efecto de las estatinas, al inhibir la síntesis de isoprenos, provoca que ambas proteínas, Ras y Rho, se acumulen en el citoplasma de forma inactiva (Figura 5)<sup>27</sup>.



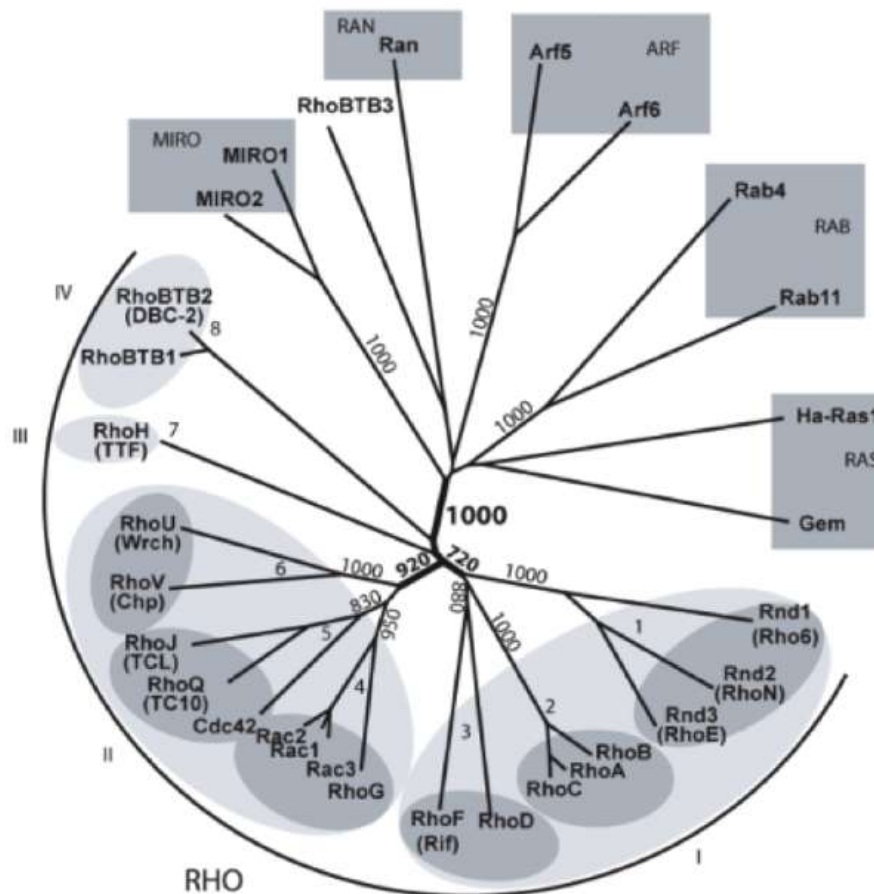
Cada miembro de la familia de las trifosfatasa de guanosina (GTPasas) pequeñas cumple funciones específicas en el organismo, como son la forma de la célula, la motilidad, la secreción, y la proliferación celular, de hecho, efectos sinérgicos de estas funciones se pueden observar en sistemas de sobreexpresión. Por ejemplo, la forma activa de Rho comprende funciones de señalización, secreción, movilidad celular y especialmente cuando las células se someten a la reorganización de la actina de su citoesqueleto en respuesta a señales extracelulares, como factores de crecimiento, el movimiento celular o la mitosis (Figura 6)<sup>29</sup>.



**Figura 6.** Modelo de regulación de Rho GTPasas. Las proteínas actúan como transductores de señales al ser activados por el factor intercambiador de nucleótido de guaninas (GEFs), que responden a una gran variedad de estímulos extracelulares a través de la activación de diferentes receptores de membrana. La conformación activa de Rho es capaz de unirse a diversos efectores celulares, regulando así variadas funciones celulares<sup>31</sup>.

Los efectos biológicos de Rho son mediados por una serie de efectores que involucran a las proteínas ROCK (proteínquinas asociada a Rho): ROCK1 y ROCK2. Estas enzimas, son serín/treonin cinasas que son el blanco principal de las GTPasas pequeñas RhoA, RhoB, and RhoC. Las cinasas ROCKs están involucradas en diversas actividades celulares como son la organización del citoesqueleto, la adhesión y motilidad celular, la proliferación y apoptosis, la

remodelación de la matriz extracelular y la contracción de las células de músculo liso<sup>30</sup>.



**Figura 7.** Delineación y estructura de la familia Rho en humanos se estructuró en 4 grupos y 8 subfamilias, esto se debe a que corresponden a los dominios de Rho y a los aminoácidos 5-173, Mientras que en los nodos se muestran a las demás proteínas que constituyen a la familia Ras

La superfamilia de las GTPasas está constituida por proteínas que son capaces de unir e hidrolizar el GTP. Este tipo de proteínas están presentes y conservadas tanto en procariontas como eucariotas y juegan un papel fundamental en una gran variedad de fenómenos biológicos. Los distintos miembros de la familia comparten entre un 30% y un 50% de identidad en la secuencia, y todos ellos poseen una secuencia consenso responsable de la unión e hidrólisis del GTP (Figura 7). Las mayores diferencias entre la estructura activa e inactiva se localizan en unas regiones denominadas switch I y switch II que involucran al fosfato  $\gamma$  del

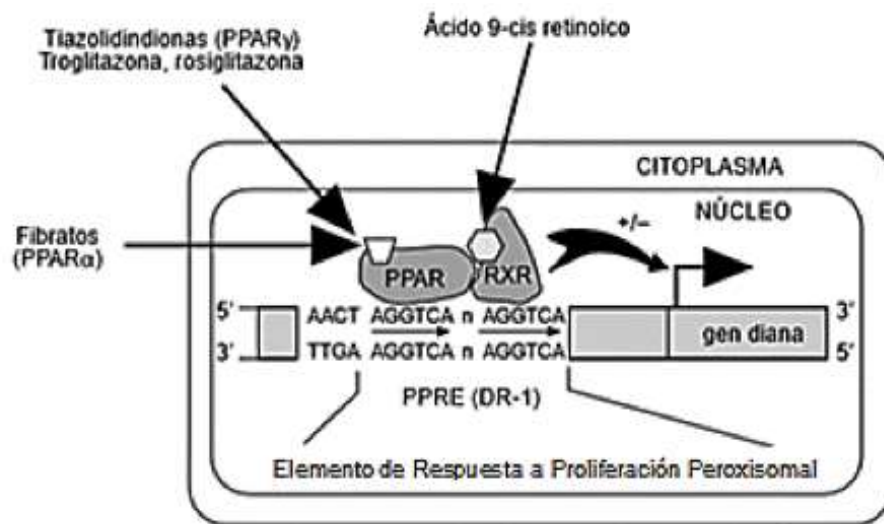
GTP. Los cambios conformacionales que ocurren en la región switch I son especialmente relevantes para la unión de los efectores, ya que provoca que la estructura activa tenga una afinidad alta por ellos. Una vez activadas, estas proteínas son capaces de regular múltiples cascadas de señalización. En humanos, esta superfamilia de proteínas Ras está compuesta aproximadamente por 150 miembros que tienen en común un dominio de unión a GTP<sup>31</sup>.

A estas GTPasas también se les denomina interruptores moleculares debido a que oscilan entre dos estados, activo e inactivo, en función de su unión a GTP o a GDP respectivamente). El paso de un estado a otro se produce de manera muy lenta, por lo que necesita ser catalizado por otras proteínas, las GEFs (factor intercambiador de nucleótido de guanina) que favorecen el intercambio de GDP por GTP, activando a la GTPasa, y las GAPs (Activadores de proteínas de las GTPasas) que estimulan su actividad de hidrolasa intrínseca, provocando su inactivación. Algunas GTPasas como Rho y Ras son reguladas adicionalmente por un tercer tipo de proteínas, los GDIs (inhibidores dissociativos de nucleótidos de guanina) que enmascaran los grupos isoprenilo y retienen a las proteínas inactivas en el citosol<sup>32</sup>.

Las señales surgidas a partir de distintas GTPasas pueden converger en los mismos efectores, como ocurre en el caso de la cascada de la ERK-MAP cinasa, que es activada tanto por Ras como por Rac, o divergen en una misma señal que puede dar lugar a la activación simultánea de varias GTPasas pertenecientes a distintas familias<sup>33</sup>. Las GTPasas también pueden activarse en serie, de manera que la acción de una de ellas puede desencadenar la acción de otra. Esta activación puede ocurrir dentro de la misma familia de GTPasas, como en el caso de Rho; Cdc42 es un potente activador de Rac, mientras que se ha descrito que Rac puede activar o inhibir a Rho dependiendo del contexto en el que ocurra<sup>34</sup>.

### 3.6. Las GTPasas pequeñas y los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPARs).

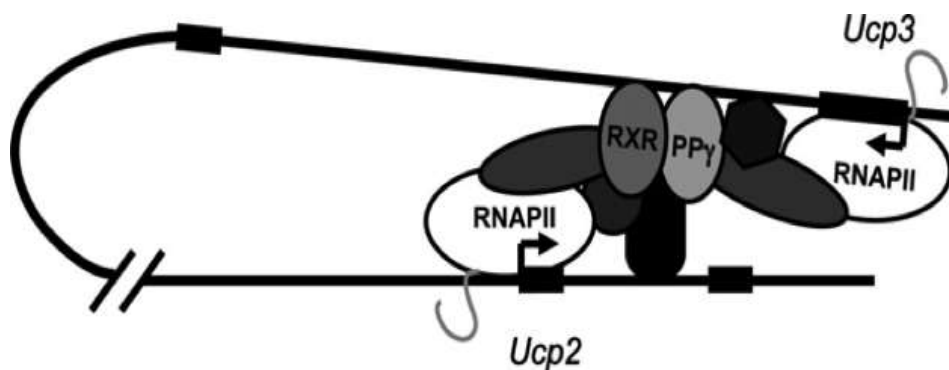
Las proteínas Rho están directamente relacionadas con las vías de regulación y liberación del colesterol que es uno de los procesos más importantes en la patogénesis y tratamiento de la aterosclerosis. Varios estudios han sugerido que la activación de la GTPasa pequeña Rho inhibe la actividad de los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPARs), relacionados con la liberación del colesterol <sup>35, 36</sup>.



**Figura 8.** Los receptores activados por proliferadores peroxisómicos (PPAR) actúan como factores de transcripción. Tras su activación por los ligandos, los PPAR heterodimerizan con el receptor del ácido 9-cis retinoico (RXR) y se unen a elementos de respuesta (PPRE) localizados en el promotor de genes diana, regulando así la transcripción de sus genes diana<sup>37</sup>.

Los PPARs pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares que son factores de transcripción activados por ligando y que regulan diversos aspectos como la reproducción, el desarrollo y la homeostasis. Derivados de los ácidos grasos y eicosanoides fueron identificados como ligandos naturales de los PPARs. Los PPARs se heterodimerizan con el receptor ácido 9-cis retinoico (RXR) e interaccionan específicamente con los elementos de respuesta a PPAR (PPREs) localizados en las regiones regulatorias de los genes que son activados con estos factores de transcripción (Figura 8)<sup>37</sup>.

Se han descrito tres tipos de PPARs los cuales son codificados por genes separados; PPAR $\alpha$  (NR1C1), PPAR $\beta$  (NR1C2) y PPAR $\gamma$  (NR1C3). Las tres isoformas proteicas tienen una estructura y características similares entre ellas, se han identificado cuatro dominios funcionales, llamados A/B, C, D y E/F (Figura 8)<sup>38</sup>. El amino terminal corresponde al dominio A/B es donde se encuentra el sitio que tiene una función de activación 1 independiente de ligando (AF-1) que corresponde al sitio donde se fosforilan los PPARs. El dominio C corresponde al dominio de unión al DNA y es el sitio donde se une a los PPRES localizados en la región promotora de los genes blanco<sup>39</sup>.



**Figura 9.** Modelo de la activación de genes de UCP-2 y UCP-3 por PPARs a través de un bucle intracromosómico. Los datos muestran que la región +1950 en el intrón llamada región PPRE de los genes de UCP3 es el principal sitio de unión para UCP3 y UCP2. Mostrando un modelo para la transactivación de ambos locus por la unión de PPARs/RXR a el sitio PPRE<sup>43</sup>.

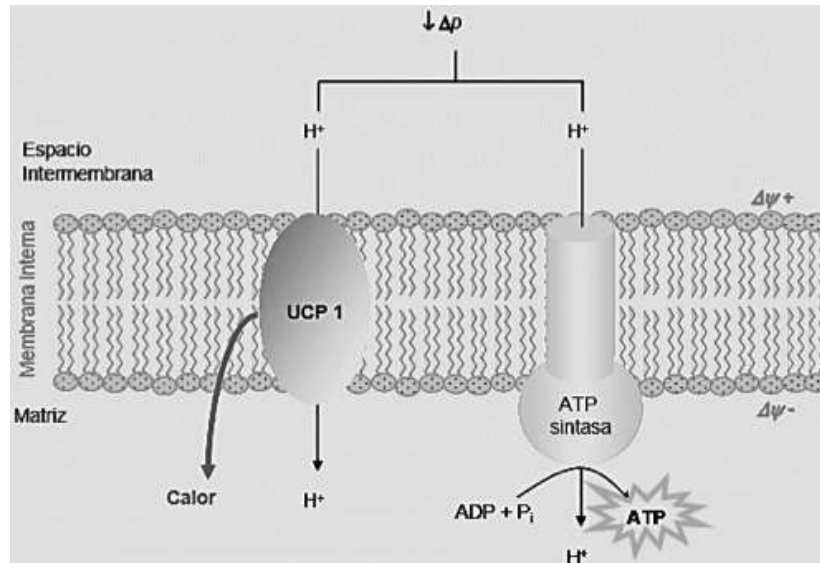
Los PPARs son activados por un gran número de compuestos que se clasifican en dos tipos: endógenos y sintéticos. Las moléculas endógenas más representativas son los ácidos grasos, los eicosanoides como el ácido 8-S-eicosatetraenoico, el leucotrieno B4 (LTB4), el ácido araquidónico (15-deoxi-12,14-prostaglandina J2, PGJ2), el ácido 9-hidroxiocetadecadienoico (9-HODE) y el 13-HODE16, los fosfolípidos de las LDL oxidadas (LDLox). Mientras que las moléculas exógenas más utilizados son los fibratos como el clofibrato, el fenofibrato, el bezafibrato y el gemfibrozilo; y las tiazolidindionas o glitazonas antidiabéticas, como troglitazona, la rosiglitazona y la pioglitazona <sup>39,40</sup>.

Diversos estudios han demostrado que los PPARs son una familia de factores de transcripción que regulan la expresión de una gran cantidad de proteínas de

diferente tipo y localización. Por ejemplo, durante el tratamiento con fármacos agonistas de PPARs, se observó el aumento en la expresión de las proteínas desacoplantes mitocondriales (UCPs), desencadenada por la unión de PPAR $\alpha$  y PPAR $\gamma$  a un sitio regulador de la síntesis de UCPs. También se han observado otro tipo de funciones de los PPARs, por ejemplo, PPAR $\gamma$  es un regulador de la adipogénesis y promueve el aumento de la masa adiposa y la respuesta sensible a la insulina en los animales obesos; PPAR $\beta$  juega un papel importante en el desarrollo y la fisiología de tejidos como el adiposo, la placenta, la piel, y el intestino delgado; diferentes estudios indican que PPAR $\beta$  tiene un papel importante en el catabolismo de los lípidos y ha sido descrito como un "sensor de la eliminación de grasa". La sobreexpresión de PPAR $\gamma$ , provoca el cambio en la composición muscular debido al aumento del estrés oxidativo, al aumento en la expresión de diferentes marcadores del metabolismo oxidativo, a la reducción de la adiposidad y a cambios en la expresión de UCP 2 y UCP-3 (Figura 9) <sup>41, 42</sup>. También se ha demostrado que la unión de los PPARs y el sitio de la unión RXR en el intrón 1 de UCP-3 permite una interacción específicamente con el promotor y la región 5 de UCP-2, lo que sugiere que PPAR logra activar UCP-2 y UCP-3 a través del mismo sitio de unión<sup>43</sup>.

### **3.7. Las proteínas desacoplantes mitocondriales (UCPs).**

Varios estudios han demostrado que UCP-2 y UCP-3 pueden funcionar como canales de protones. En ratones knockout la actividad de estas proteínas no está relacionada con la temperatura del cuerpo durante la exposición al frío, lo que significa que UCP-2 y UCP-3 no participan significativamente con la termogénesis inducida por el frío en este tipo de ratones, como sucede con la proteína UCP-1; de tal manera que se ha concluido que UCP-2 y UCP-3 tiene como función principal el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa. Con base a esta característica, diferentes autores han sugerido que la función primaria de UCP-2 y UCP-3 es limitar la producción de especies reactivas de Oxígeno (EROs) asociadas con la respiración mitocondrial (figura 10).

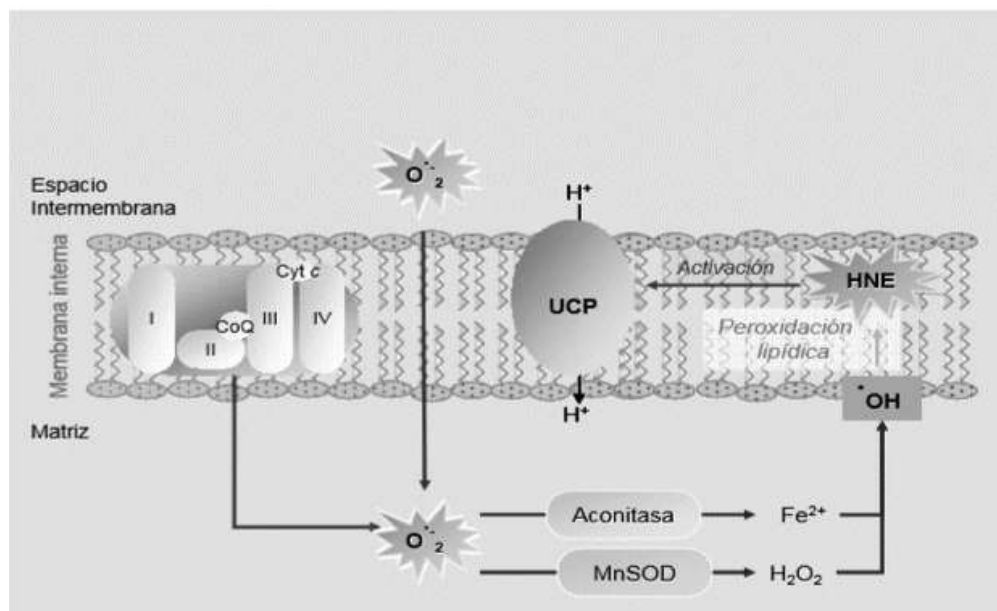


**Figura 10.** La energía contenida en el gradiente de protones ( $\Delta p$ ) es utilizada por la ATP Sintasa para la síntesis de ATP, pero el gradiente también es disipado por la UCP-1 en el tejido adiposo pardo, destinándose dicha energía a la generación de calor<sup>42</sup>.

Las proteínas desacoplantes (UCPs) tienen 4 canales iónicos integrales que residen en la membrana mitocondrial interna. El miembro fundador de la familia, la UCP-1, se expresa exclusivamente en el tejido adiposo marrón, donde tiene un papel vital para la termogénesis. UCP-1 desacopla la fosforilación oxidativa disminuyendo en un alto grado la generación de ATP, debido a la disipación del gradiente electroquímico de protones y de ese modo libera la energía en forma de calor. Otras proteínas homólogas a UCP-1 han sido descritas, incluyendo UCP-2 y UCP-3, que comparten 59% y el 57% de identidad con UCP1. Los genes que codifican estas dos isoformas UCPs se encuentran en el cromosoma 7 en ratones (cromosoma 11 en humanos). La UCP-2 se expresa en varios tejidos, incluyendo pulmón, riñón, páncreas, y el tejido adiposo blanco, mientras que UCP-3 se expresa principalmente en el músculo y en el tejido adiposo marrón blanco<sup>44</sup>.

### 3.8. Función de las UCP y su Relación con la Regulación de los Niveles de Radicales Libres.

Como ya se había mencionado, la función primaria de UCP2 y UCP3 es limitar la producción de especies reactivas de oxígeno asociados con la actividad respiratoria de la mitocondria, efecto que se ha observado en ratones que carecen de esta proteína, lo cual, se refleja en el aumento de la actividad microbicida de macrófagos aislados de estos animales<sup>7</sup>. Otras hipótesis ampliamente sostenidas consideran UCP3 puede funcionar para limitar la oxidación de piruvato o para ser un exportador de los aniones de ácidos grasos y peróxidos tóxicos que se acumulan en la mitocondria durante los períodos de  $\beta$ -oxidación elevada<sup>45</sup>.



**Figura 11.** Esquema del mecanismo de activación de las UCPs por parte del superóxido y el HNE. El superóxido ( $\cdot\text{O}_2$ ) generado en la cadena de transporte de electrones interacciona con la proteína aconitasa induciendo la liberación de  $\text{Fe}^{2+}$ . El radical superóxido también es transformado por la superóxido dismutasa (Mn-SOD) en  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Mediante la reacción de Fenton, el  $\text{Fe}^{2+}$  y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  dan lugar a radicales hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ). Estos radicales inician la peroxidación lipídica de los fosfolípidos de la membrana dando lugar al 4-Hidroxinonenal (HNE) quien activa a las UCPs<sup>46</sup>.

Los organismos poseen una variedad de mecanismos de protección fisiológica para contrarrestar el estrés oxidativo y restablecer el equilibrio redox. El daño oxidativo a las células que resulta de un desequilibrio de la producción durante la



degradación de las especies reactivas del oxígeno (EROs), como el anión superóxido en particular ( $^{\cdot}\text{O}_2$ ) y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), se asocia con una variedad de enfermedades cardiovasculares, incluyendo el fallo cardíaco, la aterosclerosis y la hipertensión.

Además de las enzimas de degradación de radicales libres, como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y los antioxidantes de bajo peso molecular, como el ácido ascórbico y el glutatión (Figura 11)<sup>46</sup>, las UCPs han surgido como importantes antioxidantes naturales para la regulación de los niveles de EROs. Estas proteínas pertenecen a una superfamilia de transportadores de aniones mitocondriales que desacoplan la fosforilación oxidativa, debido al transporte de protones que llevan a cabo a través de la membrana interna mitocondrial, lo cual conduce al aumento en la velocidad de flujo de electrones en la cadena respiratoria disminuyendo de esta manera el gradiente electroquímico de protones formado a través de la membrana interna mitocondrial. De los cinco miembros de UCPs descritos hasta ahora, se ha sugerido que la UCP2 tiene una mayor importancia en la fisiopatología cardiovascular asociada con el estrés oxidativo<sup>47</sup>.

#### 4. Justificación.

---

El colesterol es un componente esencial de las membranas celulares y ácidos biliares<sup>1</sup>. Parte de su síntesis se realiza directamente en el hígado llegando a ser más de las dos terceras partes en el organismo y tiene como papel el regular los niveles del colesterol sérico en nuestro sistema. Sin embargo, en proporciones excesivas, el colesterol se convierte en un importante factor de riesgo para el desarrollo de problemas cardiovasculares<sup>4</sup>.

El paso limitante en la síntesis del colesterol corresponde a la enzima HMG-CoA reductasa; las Estatinas son fármacos que interaccionan con esta enzima inhibiendo su actividad al interaccionar sus cadenas laterales con el sitio activo, bloqueando el estado de transición del sustrato/producto. En la práctica clínica, las estatinas son utilizadas en la prevención de enfermedades cardíacas, sin embargo, sus beneficios se han visto más allá del control del colesterol sérico. Ya que se han reportado efectos de las estatinas en la mejora endotelial<sup>7</sup>, en la disminución de las placas ateroscleróticas, el estrés oxidativo<sup>9</sup>, la inflamación<sup>11</sup>, el sistema inmune<sup>12</sup> y el sistema nervioso central<sup>13</sup>.

Estos efectos son llamados “pleiotropicos”, y en el caso de las estatinas, son regulados por la inhibición de la síntesis de isoprenos, que sirven como moléculas de adhesión durante la modificación post-traducciona como sucede con la familia de proteínas pequeñas unidas a GTP (GTPasas pequeñas) de las cuales se conocen Rho, Rac y Ras, cuya adecuada localización membranal y su función, dependen de su isoprenilación a la membrana. Esta regulación post-traducciona, en algunos reportes, se ha observado que trae consecuencias en la actividad de otras proteínas como son los PPARs, factores de transcripción inducibles por ligando como son los ácidos grasos y los eicosanoides, además de ser regulados negativamente por Rho.

Los PPARs se heterodimerizan con el receptor 9-cis retinoico (RXR), que a su vez, interaccionan con los elementos de respuesta (PPRE) en el DNA. De esta manera, es regulada genéticamente la transcripción de genes, como sucede con las proteínas desacoplantes mitocondriales (UCPs). Este proceso de expresión génica

proporciona un mecanismo de regulación en los niveles de estas proteínas, involucradas en la homeostasis energética mitocondrial.

El mecanismo de desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, efectuado por las UCPs, tiene varias funciones celulares, entre ellas la termogénesis producida por el tejido adiposo marrón o la reducción de la producción de especies reactivas de oxígeno (EROS). Las EROS son moléculas encargadas de regular varios procesos fisiológicos y patológicos a nivel celular. Aunque se conoce su participación en diferentes eventos aún no se ha descrito ningún mecanismo que explique por completo su regulación durante los procesos pleiotropicos de las estatinas en la mitocondria; lo que se puede asegurar es, que la disfunción mitocondrial aumenta la producción de radicales libres, importantes moduladores pro-inflamatorios, que promueven el desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

## 5. Hipótesis.

---

Si la Simvastatina disminuye la producción de los derivados isoprenoides utilizados durante la modificación post-traducciona l de las GTPasas pequeñas, que son las encargadas de regular la actividad de factores de transcripción como los PPARs, cuya función es regular la síntesis de otras proteínas; entonces, el aumento de la síntesis de macromoléculas como las proteínas desacoplantes mitocondriales, tendrá como consecuencia el incremento de la síntesis de la proteína desacoplante (UCP-2) y la disminución de los niveles de las Especies Reactivas de Oxígeno (EROs).

## **6. Objetivo General.**

---

---

- Determinar en efecto de la Simvastatina sobre la regulación del estrés oxidativo y la UCP-2 a nivel mitocondrial en una línea celular PAE.

### **6.1. Objetivos Particulares.**

---

---

- Cuantificar los niveles de UCP-2, PPAR $\gamma$  y Rho en presencia de diferentes concentraciones de Simvastatina por medio de Western Blot.
- Determinar la producción de EROS (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por fluorescencia y citometría de flujo a diferentes concentraciones de Simvastatina.

## **7. Materiales y Método.**

---

### **7.1. Material Químico.**

La Simvastatina (Simv), el dimetil sulfóxido (DMSO), el desoxicolato de sodio (DOC), el 2-mercaptoetanol, la 2'7' diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA), la N-etil-maleimida (NEM), el fenil-metano-sulfonil fluoruro (PMSF), la aprotinina, la leupeptina, el Tris, el TEMED y el NaCl, fueron de Sigma Aldrich (St. Louis MO). El reactivo de Bradford, el marcador de peso molecular, el persulfato de amonio (APS) y el dodecil sulfato de sodio (SDS) fueron de Bio-Rad (Com). La acrilamida y la bis-acrilamida fueron de IBI Scientific. La glicina fue de Baker. Metanol fue de Amresco. El Tween-20 fue de Meyer. La leche fue Svelty libre de grasa de Nestle Com. El Kit de quimioluminiscencia fue de Millipore (Temechula, CA). Los anticuerpos anti- $\alpha$ -actina, anti-Rho. Anti UCP2 y anti PPAR $\gamma$  fueron de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Los anticuerpos secundarios con HRP fueron de Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc. (West Grove, PA).

### **7.2. Material Biológico.**

Las células endoteliales de aorta de cerdo (PAE) fueron proporcionadas por el Dr. A. Sorkin (Universidad de Pittsburg), y se crecieron a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de humedad en un medio de Ham F-12 que contenía 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de penicilina/estreptomicina (Life Technologies, Grand Island, NY). El análisis de viabilidad celular se llevó a cabo utilizando Ioduro de Propidio (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).

### **7.3. Tratamiento con Simvastatina.**

Las células PAE se cultivaron y extendieron en cajas de cultivo T-25, en cajas Petri de 100 mm y/o en cajas de 6 pozos de 35mm de diámetro, dependiendo el experimento, se dejaron crecer de un 50% a 60% de confluencia para la realización de los tratamientos y hasta un 90% a 100% de confluencia en el desarrollo de los experimentos finales. Al 50% de crecimiento celular se administraron diferentes concentraciones de Simv, que van de 0.0 $\mu$ M, 0.1 $\mu$ M, 0.5 $\mu$ M, 1.0 $\mu$ M, 2.5 $\mu$ M, 5 $\mu$ M,

7.5 $\mu$ M y 10 $\mu$ M. Las soluciones stock fueron preparadas en DMSO, y diluidas en medio de cultivo hasta la concentración requerida para el experimento, de tal manera que la concentración de DMSO agregado a las células no excedía el 0.1%. Las dosis de Simv utilizadas en este estudio (0.1 $\mu$ M a 10 $\mu$ M) están muy relacionadas a los niveles sanguíneos de Simv que hay en los pacientes con dosis que van de 10mg a 80mg de fármaco. Suponiendo la absorción completa de la estatina, se estima que para las dosis de 10mg a 80mg consumidas por un paciente, los niveles sanguíneos finales son de aproximadamente 1.8 $\mu$ M - 18 $\mu$ M (en un hombre de 70kg con un volumen de sangre de 5L)<sup>48</sup>.

#### **7.4. Extracción de Proteína.**

Para la extracción de proteína total a partir de las células PAE, después de las incubaciones y/o tratamientos, a las células se colocaron durante 10 minutos en hielo. Posteriormente se les retiró el medio de cultivo, se lavaron tres veces buffer de PBS y se les agrego un buffer de lisis modificado de RIPA<sup>49</sup> constituido por 25mM HEPES, 100mM NaCl, 15mM Imidazol, 10% Glicerol, 1% Triton-X100, pH= 8.0; 2.5mM PMSF, 10ng aprotinina, 10ng leupeptina, 1.25mg/1ml N-etilmaleimida, 7mg/1ml desoxicolato de sodio. Utilizando un raspador (Scraper, CellTreat, Scientific Products), se levantan las células por raspado, todo el proceso se lleva a cabo a 4°C, posterior al raspado utilizando una jeringa de 1ml se hace pasar el lisado celular varias veces a través de una aguja de 8mm para incrementar la ruptura de los organelos y se colocan en un agitador orbital a 4°C durante 15 min. Posterior a la agitación el lisado celular se centrifugó a 14000rpm durante 10 min, recuperando el sobrenadante quien contiene la proteína total, se centrifugó nuevamente el sobrenadante para descartar cualquier residuo y se determinó la concentración de proteína.

#### **7.5. Cuantificación de Proteína.**

La cuantificación de proteína se realizó por el método de Bradford<sup>50</sup>. La cuantificación se llevó a cabo de acuerdo a lo que se observa en la Tabla 1. Donde, el tubo número 1 corresponde al blanco o control de calibración, los tubos del 2 al 5 corresponden a la curva patrón de la proteína albúmina, del tubo 6 en adelante

corresponden a las muestras problema. La determinación se llevó a cabo midiendo la absorbencia a una  $\lambda$  de 590nm en un espectrofotómetro (Eppendorf).

Tubo	Albúmina [1 mg/ml] ( $\mu$ L)	Muestra Problema ( $\mu$ L)	H <sub>2</sub> O ( $\mu$ L)	Reactivo Bradford ( $\mu$ L)	Buffer de Lisis ( $\mu$ L)
1	0.0	-----	800	200	2.0
2	2.5	-----	800	200	2.0
3	5.0	-----	800	200	2.0
4	7.5	-----	800	200	2.0
5	10	-----	800	200	2.0
6	-----	2.0	800	200	-----

**Tabla 1.** Método de cuantificación de Proteína total para cada muestra de acuerdo a su tratamiento. Todas las determinaciones se llevaron a cabo por duplicado y siempre se utilizó una alícuota de albúmina nueva.

## 7.6. Separación de Proteínas por Electroforesis.

Para la detección de las proteínas Rho, PPAR $\gamma$ , UCP2 y  $\alpha$ -Actina de los extractos purificados de las células PAE, se utilizaron 40 $\mu$ g de proteína total y se separaron por electroforesis desnaturizante de acuerdo al método de SDS-PAGE<sup>51</sup>. La proteína se incubó a 100°C en combinación con un buffer de carga 3x (0.125M Tris-HCl, 4% SDS, 20% v/v Glycerol, 0.2 M DTT, 0.02% Bromophenol Blue, pH=6.8) durante 5 minutos. Posteriormente se colocaron las muestras incluyendo los estándares de peso molecular (precision plus protein dual standards), en carriles diferentes, en un gel de electroforesis monodimensional, formado por un gel separador al 12% y un gel concentrador al 4%. Se le aplicó un voltaje de 35 Volts durante 15 minutos, para concentrar la muestra y después se aumentó el voltaje a 110 Volts durante 2.5 horas aproximadamente.

## 7.7. Transferencia de Proteínas.

Las proteínas separadas después de la electroforesis se transfirieron a una membrana de PVDF (Immuno-Blot PVDF de Bio-Rad), previamente activada con



Metanol al 100%, la cual se colocó sobre el gel de electroforesis siguiendo el método propuesto por Towbin<sup>52</sup>. La transferencia se llevó a cabo utilizando una cámara húmeda (Bio-Rad Laboratories, Inc.) con buffer de transferencia (25mM Trisma base, 195mM Glicina, 10% Metanol, pH 8.3 aprox.), durante 1 hora, 0.4 Å, a 4°C y con agitación constante.

### 7.8. Bloqueo de la Membrana.

Al finalizar la transferencia, se deja secar la membrana a temperatura ambiente, para una mayor adherencia de las proteínas a la membrana para, posteriormente, volver a humedecerla con Metanol al 100%. Las membranas se transfirieron a la solución de bloqueo, TBS-T (20mM Trisma base, 150mM NaCl, pH 7.5 más 0.1% Tween-20) más 5% de leche libre de grasa (Svelty) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente, para cubrir los espacios vacíos de proteína.

### 7.9. Incubación con Anticuerpos. Western Blot.

Anticuerpo	Isotipo	Tipo	Dilución	Marca
UCP2	Mouse IgG	Monoclonal	1:200	Santa Cruz Biotecnology
$\alpha$ -Actina	Mouse IgG	Monclonal	1:500	Santa Cruz Biotecnology
Rho	Rabbit IgG	Policlonal	1:1000	Santa Cruz Biotecnology
PPAR $\gamma$	Rabbit IgG	Policlonal	1:1000	Santa Cruz Biotecnology

**Tabla 2.** Relación de anticuerpos primarios y secundarios utilizados, así como su origen y marca. Los anticuerpos secundarios se utilizaron en una concentración 1:10000, diluidos en TBS-T y descartados al término de la incubación. Los anticuerpos primarios fueron reutilizados en un máximo de tres veces.

Posterior al bloqueo, la membrana se lavó tres veces con TBS-T por 10 minutos. Para llevar a cabo la detección de las proteínas mediante inmunodetección. Las membranas se incubaron con el anticuerpo primario diluido en la solución TBS-T toda la noche y a 4°C. Posterior a la incubación, se recuperó la solución con el anticuerpo primario y se lavaron las membranas tres veces durante 10 minutos con TBS-T. Las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario unido a peroxidasa diluido en TBS-T dependiente del origen del

anticuerpo primario durante toda la noche. En la Tabla 2 se muestran los diferentes anticuerpos primarios y secundarios utilizados, así como las concentraciones finales utilizadas.

#### **7.10. Revelado de Membranas. Inmunoquimioluminiscencia.**

Después de la incubación con el anticuerpo secundario, las membranas se lavaron tres veces con TBS-T y se procedió a la detección de las proteínas seleccionadas en el Western Blot por quimioluminiscencia. La detección se llevó a cabo utilizando el Kit de quimioluminiscencia Millipore ECL Reagent (Merck Millipore, CO), en una relación 1:1 y exponiendo durante 2 minutos la membrana con los sustratos quimioluminiscentes. La membrana se colocó en un plástico protector de hojas transparentes y se procedió a exponer films de rayos X azules (Phoenix Research Products). La membrana fue expuesta durante varios intervalos de tiempo (entre 30 segundos hasta 1 minuto) hasta asegurar una adecuada visualización de las bandas de la proteína en estudio. Después se introdujo en solución de Revelado (Kodak GBX, CAT 190 0984) durante 5 a 10 segundos, y finalmente, se detuvo la reacción con agua y se colocó directamente sobre reactivo fijador (Kodak GBX, CAT 190 2485).

#### **7.11. Cuantificación de Especies Reactivas de Oxígeno mediante Fluorescencia.**

Las células PAE previamente tratadas con las diferentes concentraciones de Simvastatina durante 24 horas a 37°C, se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCF-DA), el cual es un reactivo permeante fluorogénico que mide actividad de hidroxilo, peróxido y otros radicales libres dentro de la célula. Después de su difusión en la célula, el DCF-DA es deacetilado por esterasas celulares a un compuesto no fluorescente que después es oxidado por las EROs en 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), el cual es un compuesto altamente fluorescente, que puede ser detectado con un espectro de excitación de 495nm y de emisión de 529nm. Las células se incubaron con 10µM de DCF-DA disuelto en PBS durante 40 minutos a 37°C. Al término de la incubación las células se lavaron dos veces con PBS, se despegaron con 1.5ml de Tripsina y

se detuvo la reacción con 2ml de medio F12 + SFB, se recuperaron las células en un tubo Falcón de 15ml y se centrifugaron a 1500rpm durante 4 minutos, el botón celular se resuspendió en 1ml de PBS. Se cuantificó el número total de células con la cámara de Neubauer y se utilizó el volumen necesario de células para tener 100,000 células por mililitro, durante la determinación de la fluorescencia del DCF para cada tratamiento. Durante el proceso se utilizó un Espectroscopio FluoroMax Series (Horiba Scientific) a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de excitación de 475nm y una  $\lambda$  de emisión de 525nm.

### **7.12. Determinación de las Especies Reactivas de Oxígeno mediante Citometría de Flujo.**

La producción celular de radicales libres en los diferentes tratamientos con Simv también se llevó a cabo por Citometría de Flujo. Después de 24 horas de incubación con la estatina, las células se les llevaron a cabo el mismo tratamiento descrito en la detección fluorescencia. Posteriormente las células fueron incubadas con Tripsina para despegarlas de la caja de cultivo y la Tripsina se inactivo con medio de cultivo más SFB, homogenado celular se centrifugó 1400rpm durante 4 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió con 1ml de PBS. Utilizando un Citómetro de Flujo FACScan (Becton Dickinson Co. California USA), a las células de los diferentes tratamientos se les hizo pasar por el detector laser del equipo en una relación de 3,000 células por tratamiento y la señal fue registrada utilizando el programa de captura Modift (Becton Dickinson Facscalibur). Posterior a la detección inicial de radicales libres a las células se les agregó el agente oxidante  $H_2O_2$ , y se volvieron a hacer pasar por el láser detector del citómetro.

### **7.13 Análisis Estadístico.**

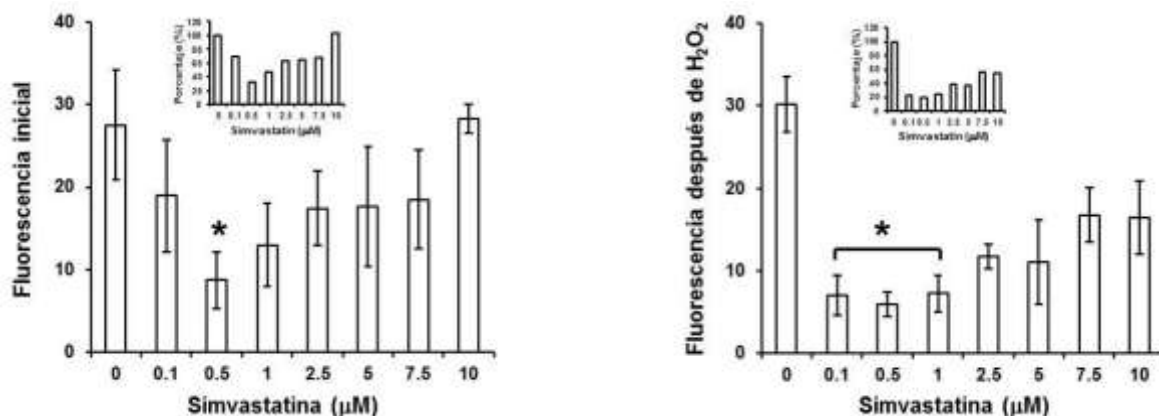
El análisis estadístico para las diferentes condiciones experimentales se calculó mediante la prueba de ANOVA, considerando significativos los valores de  $p < 0.05$ . Utilizando el programa estadístico de Sigma Plot 11.

## 8. Resultados.

### 8.1. Determinación de Radicales Libres con DCF-DA.

En la Figura 12 se observa la producción de EROs en los diferentes grupos tratados con Simvastatina. La fluorescencia basal del DCF unido a radicales libres en los diferentes tratamientos con Simvastatina se muestra en la figura 12A. Con respecto al grupo control en 0.5 $\mu$ M de estatina se observó aumento con una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ); en los demás tratamientos también se observó disminución de la fluorescencia, aunque no se encontró significancia, excepto en 10 $\mu$ M de estatina donde no hubo cambio con respecto al control.

La Figura 12B muestra los cambios de fluorescencia observados después de agregar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a las células PAE. Como se ve en la figura, en el grupo control con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumentó su fluorescencia con respecto al control en ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Para el caso de las células tratadas con estatinas, se observó un decremento en la fluorescencia en todos los tratamientos, siendo más significativos en las concentraciones de 0.1 $\mu$ M, 0.5 $\mu$ M y 1.0 $\mu$ M de Simvastatina ( $p < 0.05$ ).



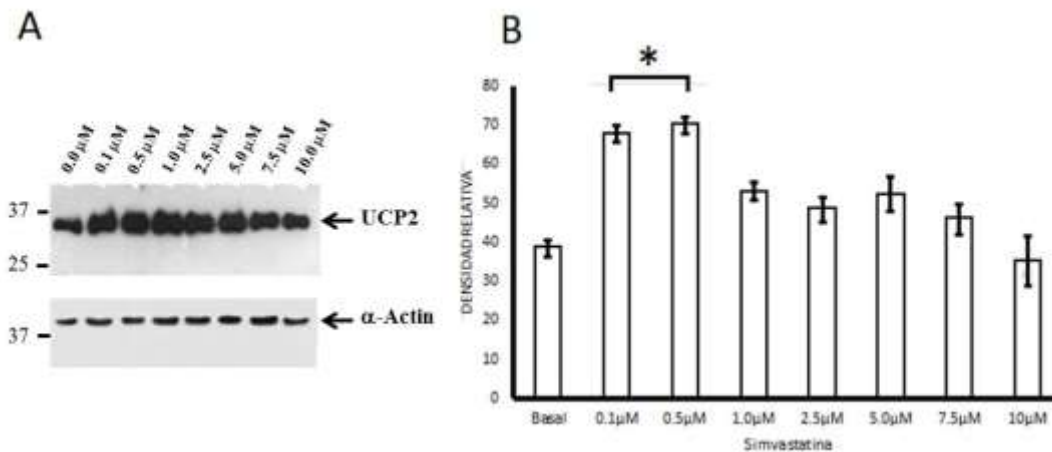
**Figura 12** Presencia de EROs sobre células PAE con diferentes grupos de Simvastatina. Se cuantificaron 100,000 células por cada evento, se permitió la permeabilidad de las células con PBS y 10 $\mu$ M de DF-DA en cada grupo y se observaron a una longitud de onda de excitación de 475nm y una longitud de emisión de 525nm. (n=3  $p \leq 0.05$ ).

## 8.2. Determinación de la Expresión UCP2.

Después de observar el efecto de la Simvastatina sobre la producción de radicales libres, se midieron los niveles de proteína desacoplante mitocondrial Tipo 2 (UCP2), la cual está relacionada con la regulación de la producción de radicales libres mitocondriales y celulares (Figura 13).

En la Figura 13A se muestra un blot representativo de la detección por Western Blot de UCP-2. En la imagen se observa el aumento de la expresión de UCP-2 en todos los tratamientos con Simvastatina comparados con la proteína proveniente de células controles, es decir, en ausencia de Simvastatina. Se observó menor expresión a 10 $\mu$ M de estatina.

La figura 13B representa la densidad relativa de cada banda obtenida en un densitómetro marca BioRad (n=3). En la gráfica se observa que en las concentraciones de 0.1 $\mu$ M y 0.5 $\mu$ M de Simvastatina la expresión de UCP-2 fue muy significativa con respecto al control ( $p < 0.05$ ). En las demás concentraciones de estatina también se observó aumento de la proteína pero no fue significativo.



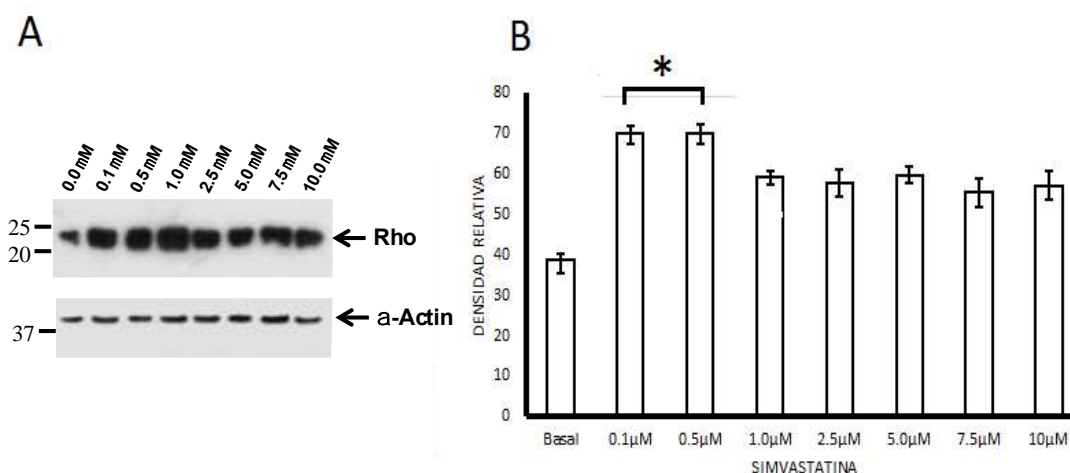
**Figura 13.** Efecto de la Simvastatina sobre la expresión de UCP-2. Células PAE tratadas durante 24 horas con diferentes grupos de Simvastatina (0 $\mu$ M, 0.1 $\mu$ M, 0.5 $\mu$ M, 1 $\mu$ M, 2.5 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 7.5 $\mu$ M y 10 $\mu$ M) e incubadas con anticuerpo primario anti-UCP2 1:200 y un anticuerpo secundario HRP-anti-mouse 1:500. Se detectaron en un peso de 33 kDa. La gráfica corresponde a una n=3 con una significancia de  $p \leq 0.05$ .

### 8.3. Determinación de la Expresión de Rho.

Dado que uno de los papeles importantes de las estatinas es inhibir la producción de isoprenos como el geranylgeranyl pirofosfato y el farnesil pirofosfato, que son utilizados durante la modificación post-traduccional de proteínas como las GTPasas pequeñas de la familia, Rho y Ras, las cuales son reguladores positivos y/o negativos en la célula para diversos procesos, como por ejemplo, la regulación de proteínas una familia de proteínas relacionada con la regulación de expresión de UCP-2. Decidimos determinar los niveles de la GTPasa pequeña Rho con las diferentes concentraciones de Simvastatina (Figura 14).

En la Figura 14A se muestra un blot representativo de la detección por Western Blot de Rho inactivo. En la imagen se observa el aumento de la expresión de Rho en todos los tratamientos con Simvastatina al compararlos con la proteína proveniente de células controles, es decir, en ausencia de Simvastatina.

La figura 14B representa la densidad relativa de cada banda obtenida en un densitómetro marca BioRad (n=3). En la gráfica se observa que a concentraciones de 0.1  $\mu$ M y 0.5  $\mu$ M de Simvastatina la expresión de Rho inactivo fue significativa con respecto al control ( $p < 0.05$ ). En las demás concentraciones de estatina también se observó aumento de la proteína pero el aumento no fue significativo.



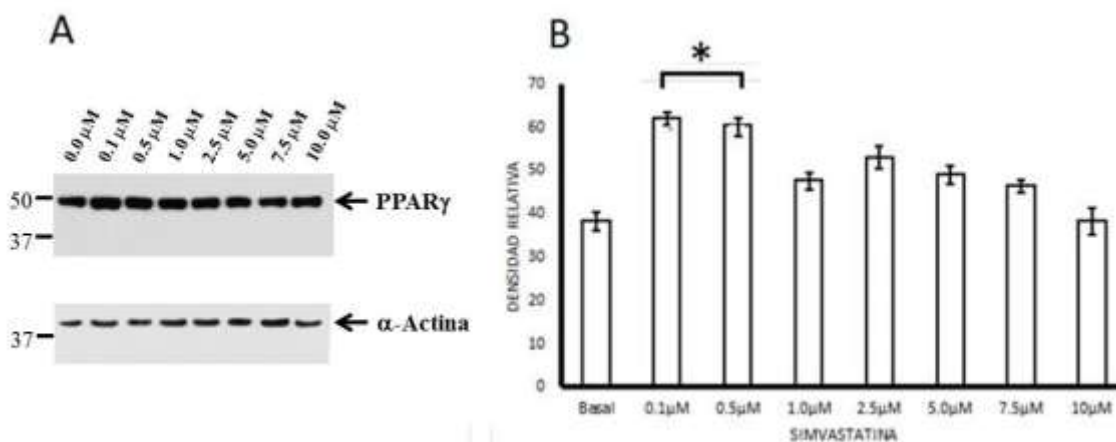
**Figura 14.** Determinación de Rho no prenilado por medio de Western Blot. Las células PAE se incubaron con diferentes concentraciones de Simvastatina, los cuales fueron incubadas con un anticuerpo primario anti-Rho en una concentración 1:1000 durante 24 horas y un anticuerpo secundario HRP anti-rabbit en una concentración 1:10,000 durante 5 horas. La gráfica corresponde a una n=3 y una significancia de  $p \leq 0.05$ .

#### 8.4. Determinación de la Expresión de PPAR $\gamma$ .

Después de medir los niveles de GTPasa pequeña Rho y observar que los niveles de la forma inactiva de enzima aumentan, se decidió medir los niveles de PPAR $\gamma$ , debido a que esta proteína tiene un papel importante en la regulación de la expresión de las proteínas desacoplantes. De hecho PPAR $\gamma$  es regulada negativamente cuando la GTPasa pequeña Rho está en su forma activa. La Figura 15 muestra la expresión de PPAR $\gamma$  a diferentes concentraciones de Simvastatina.

La Figura 15A muestra un blot representativo de la detección por Western Blot de PPAR $\gamma$ . En la imagen se observa el aumento de la expresión de PPAR $\gamma$  en todos los tratamientos con Simvastatina comparado con la proteína control en ausencia de Simvastatina.

La figura 15B representa la densidad relativa de cada banda obtenida en un densitómetro marca BioRad (n=3). En la gráfica se observa que a concentraciones de 0.1 y 0.5 $\mu$ M de Simvastatina la expresión de PPAR $\gamma$  fue significativa con respecto al control (p<0.05). En las demás concentraciones de estatina también se observó aumento de la proteína pero el aumento no fue significativo. A 10 $\mu$ M de Simvastatina no se observó cambio en los niveles de PPAR $\gamma$ .



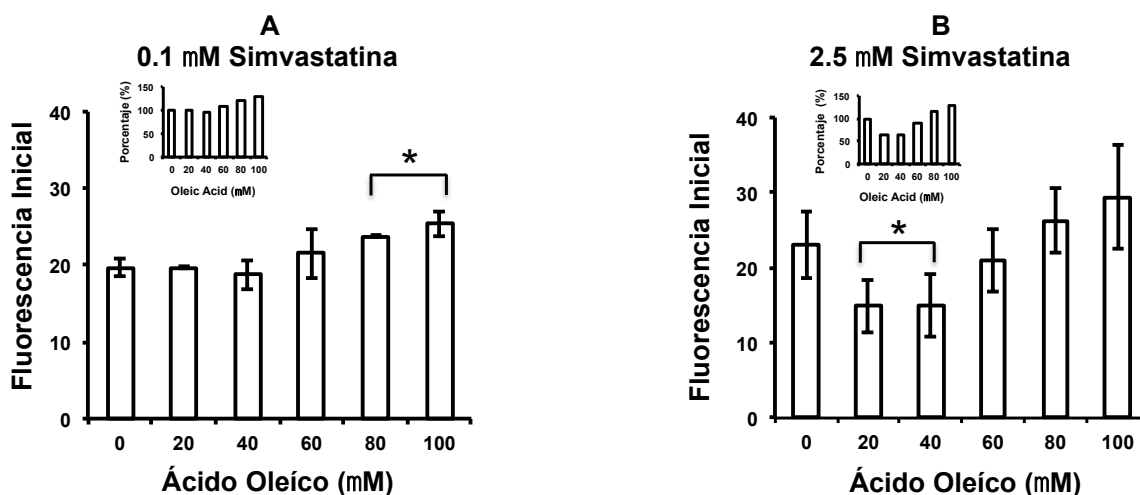
**Figura 15.** Determinación de PPAR $\gamma$  por Western Blot. La proteína PPAR $\gamma$  se identificó por su peso molecular de 50kDa. La membrana fue incubada con un anticuerpo primario anti-PPAR $\gamma$  en una concentración 1:1000 durante 24 horas y un anticuerpo secundario HRP anti-goat en una concentración 1:10,000 durante 5 horas. La gráfica corresponde a una n=5 y a una significancia de  $p \leq 0.05$ .

## 8.5. Efecto del Ácido Oleico en la Regulación de PPAR $\gamma$ y la Producción de Radicales Libres.

Para demostrar la participación que tiene PPAR $\gamma$  sobre la expresión y por lo tanto en la actividad de la UCP-2, se realizaron tratamientos en presencia de diferentes concentraciones ácido oleico. El Ácido Oleico es un regulador natural positivo de la actividad de PPAR $\gamma$ . Se seleccionaron dos condiciones en presencia de Simvastatina, 0.1 $\mu$ M y 2.5 $\mu$ M, y se incubaron en presencia de diferentes concentraciones de Ácido Oleico (Figura 16).

En la Figura 16A no se observó cambio en la fluorescencia al incubar las células con diferentes concentraciones de ácido graso, manteniéndose el efecto protector de la Simvastatina cuando la concentración es de 0.1 $\mu$ M donde la expresión de UCP-2 es alta (Figura 13).

En la figura 16B se observa la disminución de la fluorescencia en las concentraciones de 20 $\mu$ M y 40 $\mu$ M de Ácido Oleico cuando la concentración de Simvastatina es de 2.5mM. En estas condiciones la proteína UCP-2 aunque esta aumentada ese incremento no es significativo con respecto al control (Figura 13), por lo tanto, el ácido graso estaría actuando como un activados de la actividad o de la síntesis de la UCP-2 cuando está presente a esta concentración de estatina.

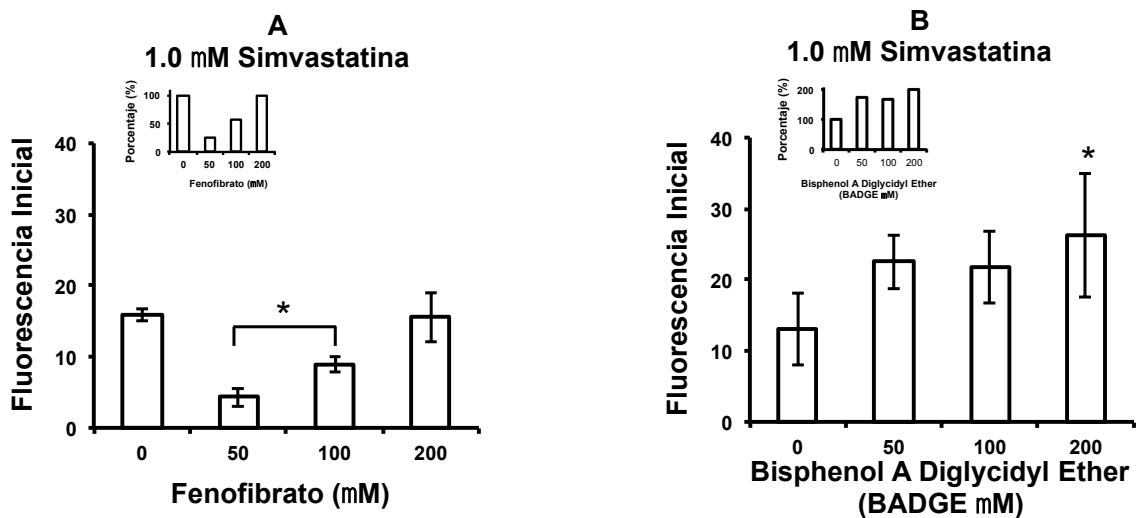


**Figura 16.** Efecto del ácido Oleico sobre la Producción de EROs. (a) Células PAE con 100 000 células por evento y con 2.5 $\mu$ M de Simvastatina y se les adicionaron diferentes concentraciones de Ácido Oleico 20 $\mu$ M, 40 $\mu$ M, 60 $\mu$ M 80 $\mu$ M y 100 $\mu$ M). (b) células PAE con 0.1 $\mu$ M de Simvastatina y las mismas concentraciones de ácido Oleico. Se observaron a una longitud de onda de excitación de 475nm y una longitud de emisión de 525nm. Las gráficas corresponden a una n=3 y una significancia de p $\leq$ 0.05.



## 8.6. Efecto del Fenofibrato y el BADGE sobre la actividad de PPAR $\gamma$ y la Producción de Radicales Libres.

Los factores de transcripción PPAR $\gamma$ , además de tener reguladores naturales como los ácidos grasos, tienen también reguladores sintéticos que pueden funcionar como agonistas o como antagonistas. Con el objetivo de corroborar el efecto observado después del tratamiento con el ácido oleico, se decidió utilizar Fenofibrato como antagonista de la actividad de PPAR $\gamma$  y al BADGE como antagonista de PPAR $\gamma$ . La Figura 17 muestra el efecto de estos compuestos en células tratadas con 0.1mM de Simvastatina, se seleccionó esta concentración de estatina porque fue donde se observó mayor efecto protector de la estatina en la producción de radicales libres y mayor expresión de la proteína UCP-2 (Figuras 12 y 13).



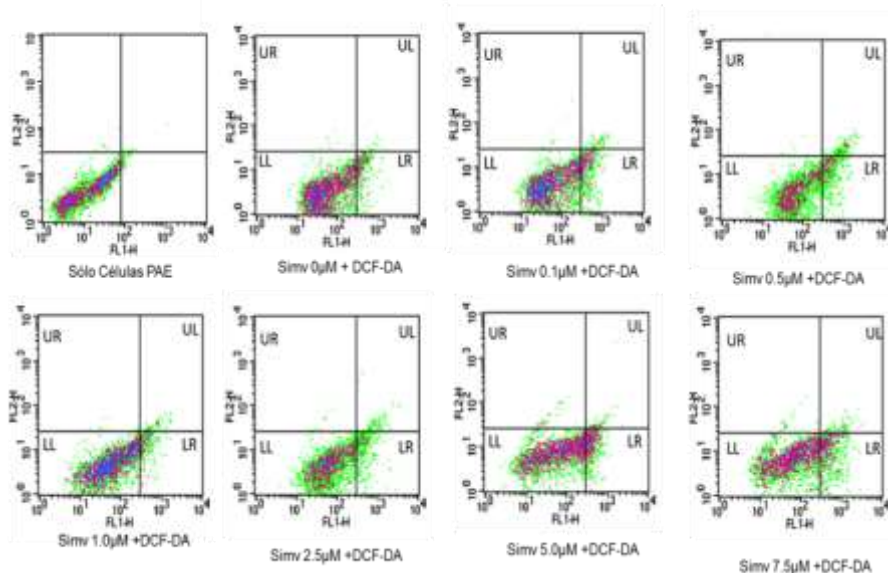
**Figura 17.** Producción de EROs a diferentes concentraciones de un Agonista y un Antagonista de PPARs sobre la Simvastatina. (a) Células PAE con 100 000 células por evento y con 1 $\mu$ M de Simvastatina y se le adiciono diferentes concentraciones de Fenofibrato 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M y 200 $\mu$ M). (B) células PAE con 1 $\mu$ M de Simvastatina y concentraciones de BADGE de 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M y 200 $\mu$ M. Se observaron a una longitud de onda de excitación de 475nm y una longitud de emisión de 525nm. La gráfica corresponde a una n=3 y con una significancia de  $p \leq 0.05$

La Figura 17A muestra el efecto del Fenofibrato en presencia de 0.1 mM de Simvastatina, observándose que con las concentraciones de 50 $\mu$ M y 100 $\mu$ M de Fenofibrato disminuyó aún más la fluorescencia emitida en ausencia del agonista y con la estatina, de manera significativa ( $p < 0.05$ ). Lo cual quiere decir que el

Fenofibrato está promoviendo la disminución de los niveles de radicales libres, probablemente por un aumento en la actividad de las proteínas encargadas de regular la síntesis de estos compuestos, como la UCP-2, o, por el aumento en la actividad de las enzimas encargadas de eliminar radicales libres, como la catalasa y la superóxido dismutasa.

La figura 17B muestra el aumento en la fluorescencia relativa cuando se adicionó el antagonista BADGE mostrando la relación tienen con PPAR $\gamma$  en la regulación de la proteína UCP-2 y su papel con la disminución de los radicales libres.

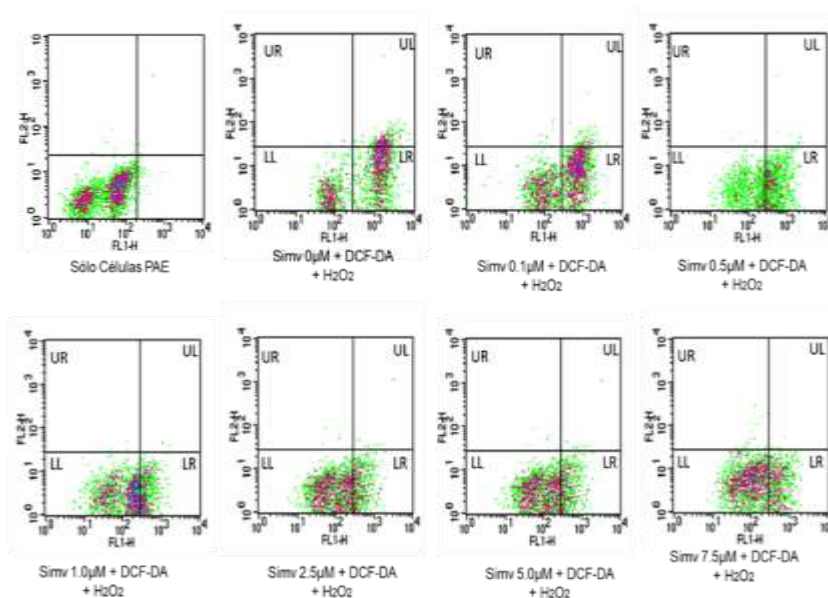
### 8.7. Determinación de Especies Reactivas de Oxígeno mediante Citometría de Flujo en diferentes concentraciones de Simvastatina.



**Figura 18.** Adquisición de cada concentración de Simv (0 $\mu$ M, 0.1 $\mu$ M, 0.5 $\mu$ M, 1.0 $\mu$ M, 2.5 $\mu$ M, 5.0 $\mu$ M, 7.5  $\mu$ M) a los cuales se les administró DCF-DA, el DCF-DA puede ser detectado con un espectro de excitación y emisión máxima de 495nm y 529nm respectivamente, se consideraron los desplazamientos en las grafica hacia FL1-H, tomando como referencia el cuadrante LL (abajo izquierda. Traducido del inglés *low left*) como el grupo control. Se leyeron a 3000 eventos cada uno en un citómetro de flujo.

Para corroborar el efecto de la Simvastatina sobre la producción de radicales libres en la célula, observado por fluorescencia en la Figura 12. Se llevaron a cabo

experimentos de citometría de flujo en las mismas condiciones, las células se cargaron con DCF-DA, se incubaron con diferentes concentraciones de Simvastatina y se utilizaron para medir la fluorescencia en el Citómetro de Flujo FACScan, 3000 eventos fueron medidos por cada experimento, las Figuras 18, 19 y 20, muestran los resultados obtenidos al considerar los datos obtenidos de los cuadrantes FL1-H y FL2-H, así como, el desplazamiento de la fluorescencia, y se calculó el porcentaje de eventos adquiridos para cada ensayo.

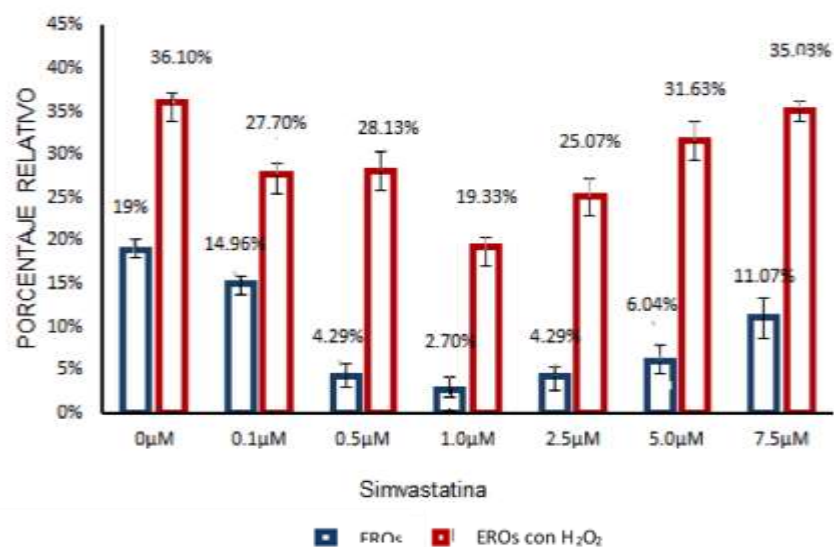


**Figura 19.** Adquisición de cada concentración de Simv ( $0\mu\text{M}$ ,  $0.1\mu\text{M}$ ,  $0.5\mu\text{M}$ ,  $1.0\mu\text{M}$ ,  $2.5\mu\text{M}$ ,  $5.0\mu\text{M}$ ,  $7.5\mu\text{M}$ ) a los cuales se les administró DCF-DA y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , el DCF-DA puede ser detectado con un espectro de excitación y emisión máxima de  $495\text{nm}$  y  $529\text{nm}$  respectivamente, se consideraron los desplazamientos en las graficas hacia FL1-H, tomando como referencia el cuadrante LL (abajo izquierda). *Traducido del inglés low left*) como el grupo control. Se leyeron a 3000 PAE eventos cada uno en un citómetro de flujo.

En la Figura 18, se observa cambio de la fluorescencia emitida por las células en los diferentes tratamientos con estatinas, con el aumento de la concentración de Simvastatina se observó una disminución de la fluorescencia, de rojo a verde en la imagen, indicando una menor cantidad de radicales libres, estos resultados concuerdan con lo obtenido en la Figura 12.

En la Figura 19, se observó el efecto de la adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a las células con y sin tratamiento, y lo que se nota es la aparición de dos grupos celulares, un grupo que no fue muy sensible al estrés oxidativo provocado por la adición del  $\text{H}_2\text{O}_2$  y un

grupo que, además de ser más sensible al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se desplazó en los cuadrantes mostrando la alta sensibilidad al estrés por parte de las células cuando no hay Simvastatina presente. Pero cuando se midió el efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las células tratadas con Simvastatina, hubo una mayor protección al estrés provocado por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> observándose el desplazamiento y recuperación de las células cuando la Simvastatina está presente.



**Figura20.** Para los datos se resolvió sumando el porcentaje de los cuadrantes UL, UR y LR los cuales representaron la presencia de especies reactivas de oxígeno sobre las células y para el grupo control se realizó sumando el cuadrante de LL, consiguiente a eso se calculó el promedio de estos dos datos y se representaron sobre la gráfica los porcentajes relativos de las células con radicales libres. La tabla corresponde a una n=3 y una significancia de p≥ 0.05.

La Figura 20, muestra el cambio de fluorescencia expresado en porcentaje relativo de desplazamiento en las células tratadas con diferentes concentraciones de Simvastatina, los datos fueron obtenidos a partir de las imágenes mostradas en las Figuras 19 y 20. Se observa claramente la disminución de radicales libres generados por la célula en presencia de Simvastatina, con mayor significancia en la concentración de 0.5 mM de estatina, tanto en ausencia como en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

## 9. Discusión.

---

Las estatinas son fármacos que inhiben la actividad de la enzima HMG-CoA reductasa, principal regulador de la síntesis del colesterol; además de esta función, otros efectos han sido descritos en su utilización, llamados pleiotropicos. Algunos de estos efectos implican la mejora de la función endotelial<sup>53</sup>, la estabilidad de las placas ateroscleróticas<sup>21</sup> disminuyendo el estrés oxidativo<sup>54</sup>, la inflamación<sup>26</sup>, y la inhibición de la respuesta trombogénica<sup>28</sup>. Se han propuesto dos mecanismos con respecto a la participación de las estatinas en regulación de dichas funciones, uno de ellos implica la interacción directa del fármaco y el segundo es a través del bloqueo de la síntesis de los intermediarios metabólicos como el Farnesil Pirofosfato (FPP) y geranilgeranil pirofosfato (GGPP), que tienen una función importante durante la activación pos-traducciona de proteínas. Entre las principales proteínas reguladas por este mecanismo están las GTPasas pequeñas, que se encargan de regular el metabolismo celular a través de reacciones de fosforilación, uno de esos efectos de regulación, que es muy importante para el desarrollo de este trabajo, es la regulación que tiene la GTPasa pequeña Rho sobre función de los PPARs, que actúan como factores de transcripción post-traducciona que permiten, a su vez, la regulación de la síntesis de proteínas como las encargadas de desacoplar la fosforilación oxidativa (UCPs), cuya actividad desacoplante en la membrana interna mitocondrial implica la aceleración de la cadena respiratoria mitocondrial lo que provocan una disminución en la liberación de radicales libres.

Mediante espectroscopia, observamos que la producción de radicales libres sobre las diferentes concentraciones de Simvastatina coincide con lo reportado anteriormente, ya que se observa una disminución de las especies reactivas de oxígeno de manera significativa en concentraciones bajas como son 0.1 $\mu$ M, 0.5 $\mu$ M y 1 $\mu$ M, como se puede observar en la Figura 12, estas concentraciones no solo producen menor cantidad de especies reactivas, sino también, demuestran tener un efecto en presencia de un medio oxidante. Así mismo, realizamos un segundo ensayo mediante citometría de flujo, donde se confirmó que en concentraciones menores efectivamente disminuyen los niveles de radicales libres (Figura 18, 19 y

20). En esos mismos resultados se observó que a altas concentraciones de Simvastatina no se producen cambios significativos sobre la inhibición de radicales libres.

Uno de los efectos importantes de las estatinas a nivel celular es la disminución del estrés oxidativo<sup>56</sup>, debido principalmente a la inhibición de enzimas como la NADPH oxidasa, que se encarga de producir radicales libres<sup>57</sup> y generar estrés oxidativo, o la activación de enzimas como el óxido nítrico sintasa<sup>58</sup>. Poco o nada se sabe sobre la participación de la mitocondria sobre la regulación de los radicales libres en presencia de estatinas. Lo que nosotros observamos fue un aumento en la expresión de una proteína importante en la generación de radicales a nivel de la cadena respiratoria, que es uno de los principales sitios de generación de radicales libres en la célula. Como se ve en la Figura 13, los niveles de la proteína UCP-2 aumentan en presencia de Simvastatina principalmente cuando la concentración de la estatina está entre 0.1  $\mu$ M y 1  $\mu$ M, aunque a concentraciones mayores aún siguen observándose niveles altos de esta proteína, aunque los valores no son significativos.

Este resultado nos muestra que posiblemente la regulación de la Simvastatina sobre los niveles de radicales libres en la célula implica a la mitocondria como uno de los principales sitios de regulación en la producción de estos metabolitos dañinos para la célula y que esta regulación es resultado de la participación de la proteína desacoplante mitocondrial UCP-2.

Lo que tratamos de hacer en el proyecto fue encontrar el mecanismo a través de la cual las estatinas estimulan la síntesis de UCP-2, lo que nos hizo pensar que el fármaco estaba relacionado con la regulación de un factor de transcripción importante en el aumento de la síntesis de la UCP-2, esta proteína corresponde a PPAR $\gamma$ <sup>59</sup>. PPAR $\gamma$  es un factor de transcripción interacciona, en asociación con otras proteínas, a un sitio regulador de la transcripción de UCP-2 estimulando su síntesis. Como se observa en la Figura 15 los niveles de PPAR $\gamma$  aumentan en presencia de Simvastatina, en mayor proporción cuando los niveles del fármaco están entre 0.1  $\mu$ M

y 1 $\mu$ M, lo cual coincide con lo observado al medir los niveles de UCP-2 (Figura 14) y la disminución de los niveles de radicales libres (Figura 12, 18, 19 y 20). Estos datos nos indican que muy posiblemente, existe una relación entre, los niveles de PPAR $\gamma$  y la síntesis de UCP2 que esté relacionada con la disminución de los radicales libres determinados al determinarse el DCF por fluorescencia y por citometría de flujo.

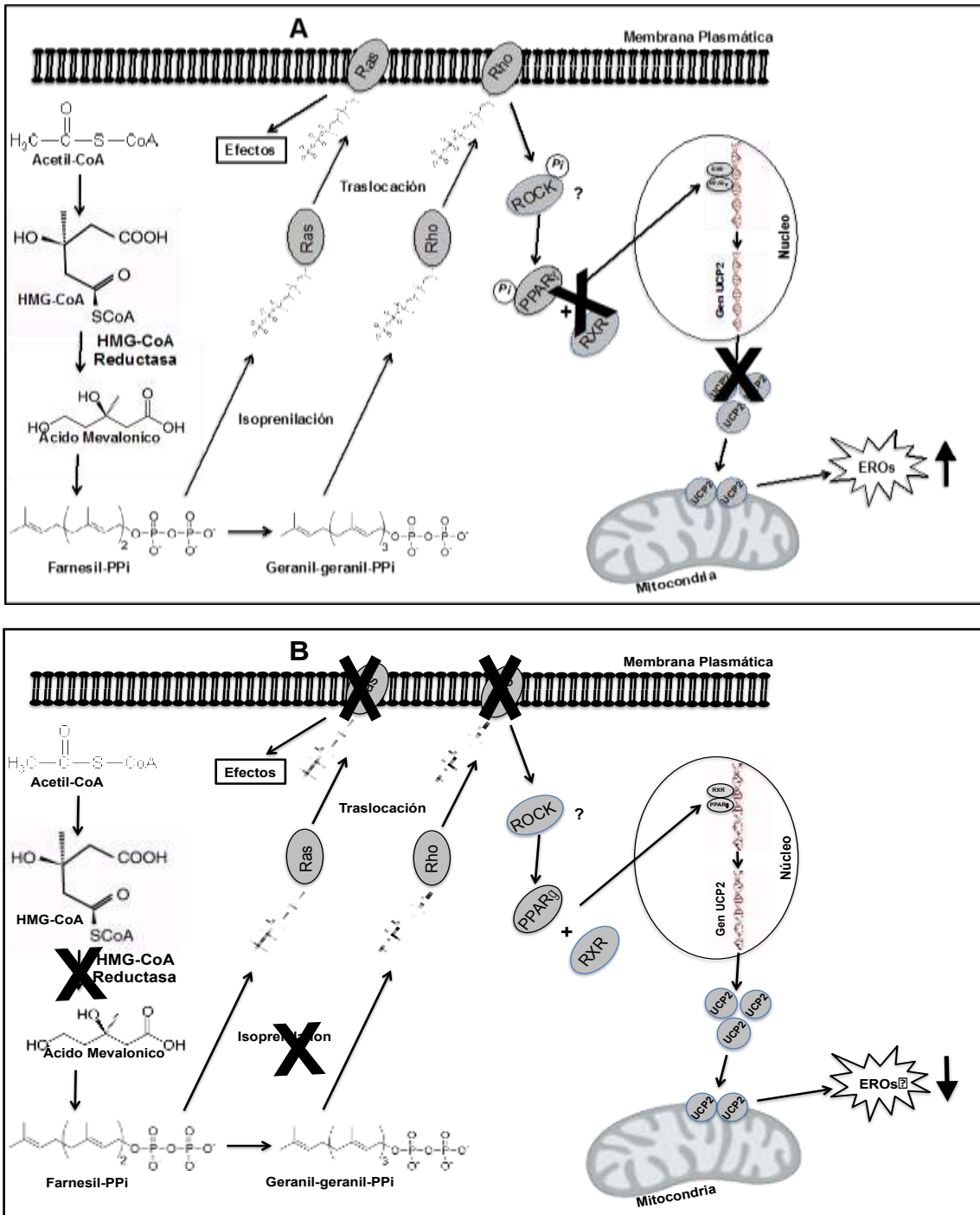
Como ya se sabe, las estatinas regulan la producción de los isoprenos, farnesil pirofosfato y geranylgeranyl pirofosfato<sup>60</sup>, que son utilizado como moléculas de unión durante la modificación post-traducciona de algunas proteínas, dentro de las cuales se entra las GTPasas pequeñas, una familia de enzimas encargada de regular la función celular por fosforilación a través de sus efectores principales, las Rho Cinasas (ROCK)<sup>61</sup>. Uno de los sitios de fosforilación de las GTPasas pequeñas a través de sus efectores corresponde a los PPARs<sup>62</sup>. Y como se observa en la Figura 14, cuando determinamos los niveles de la GTPasa pequeña Rho utilizando un anticuerpo que interacciona con la enzima en su forma inactiva, los resultados muestran un aumento significativo de la enzima en presencia de Simvastatina, coincidiendo en significancia cuando las concentraciones de estatina van de 0.1 $\mu$ M a 1 $\mu$ M (Figura 14). Como ya se sabe<sup>63</sup> la función de las GTPasas pequeñas es regulada por procesos de isoprenilación, es decir, por la modificación covalente que sufren al interactuar con ellas los isoprenos formados durante la síntesis del colesterol<sup>64</sup>. Lo que observamos aquí es que la Simvastatina está eliminando la presencia de estos metabolitos provocando la inactivación de Rho, teniendo como consecuencia la regulación positiva de PPAR $\gamma$  (Figura 15).

Tratando de corroborar que PPAR $\alpha$  está siendo responsable del aumento de UCP-2 y por lo tanto, de la disminución de radicales libres, utilizamos un mecanismo indirecto para corroborar el papel de UCP-2 con los radicales empleando moléculas que regulan la actividad de PPAR $\gamma$ ; metabolitos sintéticos como el fenofibrato, el BADGE y metabolitos naturales como los ácidos grasos insaturados (ácido oleico). Considerando que el rango de mayor protección de la

Simvastatina se localiza en las concentraciones que van de 0.1 $\mu$ M a 1 $\mu$ M, decidimos utilizar ambos extremos de concentración para determinar el efecto de los reguladores naturales (ácido oleico) de PPAR $\gamma$  con respecto a la síntesis de radicales libres. En la Figura 16A y Figura 16B observamos que en presencia del ácido oleico se mantiene la actividad de PPAR $\gamma$  con respecto al control en todas las concentraciones de ácido graso utilizadas. La expresión de PPAR $\gamma$  es importante ya que se ve relacionada en la regulación específica del gen de UCP2. En la Figura 15 las concentraciones de Simvastatina como 0.1 $\mu$ M, 0.5 $\mu$ M y 1 $\mu$ M la expresión de sus bandas de PPAR $\gamma$  aumenta de manera significativa en comparación al grupo control, lo que concuerda con lo observado en las Figura 13 de UCP2 y las mismas concentraciones de esta estatina. Este experimento nos indica que probablemente es posible regular la expresión de UCP-2 mediante la vía de regulación de PPAR $\gamma$ .

La regulación de PPAR $\gamma$  y su posible papel en la regulación de la síntesis de UCP-2, se analizó en presencia de moléculas que regulan la actividad de los PPARs, como el fenofibrato, el BADGE y los ácidos grasos de cadena larga, para demostrar el papel de esta vía de síntesis con la regulación de los niveles de radicales libres sintetizados en las células. Cuando se utilizó al ácido oleico como agonista natural de PPAR $\gamma$  en presencia de Simvastatina, como se observa en la Figura 16, observamos que en presencia del ácido oleico disminuye la fluorescencia emitida por la presencia de radicales libres, principalmente en las concentraciones del ácido oleico de 20 $\mu$ M y 40 $\mu$ M, en presencia de 2,5 $\mu$ M de Simvastatina, pero no a 0.1 $\mu$ M donde se mantuvo la fluorescencia. Lo interesante de este experimento es que en 2.5 $\mu$ M de Simvastatina, donde el efecto protector de la estatina *per se* es menor de acuerdo a lo observado en la Figura 12, la presencia del ácido graso disminuye los niveles de radicales libres detectados con el DCF, indicando que sí existe una relación positiva de la actividad de los PPARs con respecto a la disminución de los radicales, nosotros creemos que debido a la presencia de la proteína desacoplante UCP-2.





**Figura 21.** Representación esquemática sobre el posible mecanismo de regulación de la síntesis de UCP2 por parte de la Simvastatina. Esquema **A**, en ausencia de Simvastatina se generan isoprenos los cuales se utilizan en la prenilación de las GTPasas pequeñas que a su vez se activan y regulan la actividad de PPAR $\gamma$  y de esta manera la síntesis de UCP2 disminuye al no haber suficiente factor de transcripción, lo cual permite el aumento de los niveles de radicales libres. Esquema **B**, la presencia de Simvastatina bloquea la síntesis de isoprenos y de esta manera no se activan por prenilación las GTPasas pequeñas, activándose PPAR $\gamma$  quien interacciona con su sitio de reconocimiento en el promotor del gen que codifica a UCP2, esto promueve su síntesis, lo cual tiene como resultado final la disminución de los niveles de radicales libres.

Tratando de confirmar esta aseveración empleamos un agonista (Fenofibrato) y un antagonista (BADGE) de PPAR $\gamma$ , utilizando la concentración de Simvastatina donde el efecto de la estatina comenzaba a disminuir un poco sobre la inhibición de los niveles de radicales, 1 $\mu$ M de Simvastatina (Figura 17A y Figura 17B). Como se observó en la Figura 17A, cuando la presencia del fenofibrato disminuyó los niveles de radicales libres detectados con el DCF, lo cual coincide con lo observado con el ácido oleico (Figura 16B) al comportarse ambas moléculas como agonistas, por otro lado, al adicionar BADGE, un antagonista) los niveles de radicales libres aumentaron Figura 17B, indicando que efectivamente PPAR $\gamma$  está relacionado con la regulación de los niveles de radicales libres y dado que, esta proteína actúa como un factor de transcripción importante en la síntesis de proteínas como UCP-2, creemos que la UCP-2 está directamente relacionada con la regulación de la síntesis de radicales libres, Figura 20A y Figura 20B.

En las Figuras 21A y 21B, tratamos de explicar el mecanismo a través del cual la Simvastatina regula la síntesis de UCP-2 y por lo tanto los niveles de radicales libres celulares, aunque aún faltan muchos experimentos por realizar que continúen corroboren el modelo. La Figura 21A, nos muestra lo que posiblemente está sucediendo cuando no hay Simvastatina, se sintetiza los isoprenos que son utilizados para prenilar a la GTPasa pequeña Rho activándola y de esta manera fosforilar a su efector ROCK y que aún no hemos determinado su participación, esta fosfatasa fosforila a proteínas como PPARs regulándola negativamente, disminuyendo la síntesis de UCP-2, lo cual repercute en un aumento de los niveles de radicales libres. Por otro lado, cuando se adiciona Simvastatina, se inhibe la prenilación de Rho al no haber síntesis de isoprenos, lo que inhibe su actividad y permite que los PPARs se activen e interaccionen con su sitios de unión en el DNA, aumentando la síntesis de UCP-2 y de esta manera participar en la disminución y regulación de los niveles de radicales libres.

## 10. Conclusiones.

---

- La Simvastatina en concentraciones de 0.1 $\mu$ M, 0.5 $\mu$ M y 1.0 $\mu$ M actúan como inhibidores en la síntesis de especies reactivas de oxígeno.
- La Simvastatina actúa bloquea la síntesis de isoprenos y permite la inactivación de Rho, aumentando la forma inactiva en el citosol.
- La inactivación de Rho, permite la activación y síntesis de los factores de transcripción PPAR $\gamma$ .
- El aumento de PPAR $\gamma$  permite una mayor activación de la síntesis de UCP2.
- El aumento en la proteína desacoplante UCP-2 disminuye los niveles de radicales libres en la célula.

## 11. Perspectivas para Trabajos Futuros.

---

- Determinación de la expresión de proteínas en células mitocondriales en un modelo in vivo.
- Determinación de la expresión de PPAR $\alpha$  en células mitocondriales.
- Determinación de la expresión de UCP-2 por medio de PCR-RT
- Cuantificación del potencial membranal en células mitocondriales a partir de la sobreexpresión de UCP-2
- Efectos de ácido Oleico y ácido palmítico sobre diferentes concentraciones de Simvastatina y la regulación de PPAR $\gamma$

## 12. Bibliografía.

---

1. Nelson DL, Cox MM. Lehninger Principios de Bioquímica. 4<sup>a</sup>. Edición. Editorial Omega; 2005, p. 816-829. Campbell MK, Farrel SO. Bioquímica. 4<sup>a</sup>. Edición. Editorial Thomson; 2004, p. 601-613.
2. Elizondo A, Araya J, Rodrigo R et al. Effects of weight loss on liver and erythrocyte polyunsaturated fatty acid pattern and oxidative stress status in obese patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Biol Res* 2014; 41: 59-68.
3. Lancet. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). 1994; 344:1383–1389.
4. Sacks FM, et al. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. *N. Engl. J. Med* 1996; 335:1001–1009.
5. Shepherd J, et al. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. *N. Engl. J. Med* 1995; 333:1301–1307.
6. Lancet. Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20.536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. 2002; 360:7–22.
7. Liao JK, Lauf U. Pleiotropic effects of statins. *Annu. Rev Pharmacol Toxicol* 2005; 45:89–118.
8. Maurer-Stroh S, Koranda M, Benetka W, Schneider G, Sirota FL, Eisenhaber F. Towards complete sets of farnesylated and geranyl-geranylated proteins. *PLoS Comput Biol.* 2007; 3:66.
9. (Chao-Yung Wang, Ping-Yen Liu, and James K. Liao. Pleiotropic effects of statin therapy: molecular mechanisms and clinical results. *Trends Mol Med.* 2008; 14:37-44.

10. Endo A, Kuroda M, Tsujita Y. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*. *J Antibiot* (Tokyo). 2006. 12:1346-1348.
11. (Alberts AW. Lovastatin and simvastatin--inhibitors of HMG CoA reductase and cholesterol biosynthesis. *Cardiology*. 1990; 4:14-21
12. L. Aguirre, E. Hijona, M.T. Macarulla, A. Gracia, I. Larrechi, L. Bujanda, L. Hijona, M.P. Portillo. Several statins increase body and liver fat accumulation in a model of metabolic síndrome. *Journal of physiology and pharmacology*. 2013; 64: 281-288.
13. Sirtori CR. The pharmacology of statins. *Pharmacol Res*. 2014; 88:3-11.
14. Shitara Y, Sugiyama Y. Pharmacokinetics and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: Drug-drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions. *Pharmacology and Therapeutics*. 2006; 112: 71-115
15. Makuc D, Fabris J, Plavec J. Conformational analysis of geometric isomers of pitavastatin together with their lactonized analogues. *Molecules*. 2013; 18: 13283-13296.
16. Tiwari V, Khokhar M. Mechanism of action of anti-hypercholesterolemia drugs and their resistance. *Eur J Pharmacol*. 2014; 741:156-70.
17. Neve EP, Artursson P, Ingelman-Sundberg M, Karlgren M. An integrated in vitro model for simultaneous assessment of drug uptake, metabolism, and efflux. *Mol Pharm*. 2013; 10:3152-3163.
18. Eva S. Istvan, Johann Deisenhofer. The structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase. Review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2000; 1529, 1-3: 9-18
19. Istvan ES. Structural mechanism for statin inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Am Heart Journal*. 2002; 6:27-32.

20. Istvan ES and Deisenhofer J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science*. 2001; 292:1160-4.
21. Istvan E. Statin inhibition of HMG-CoA reductase: a 3-dimensional view. *Atherosclerosis*. 2003; 4: 3-8.
22. Fong CW. Statins in therapy: Understanding their hydrophilicity, lipophilicity, binding to 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, ability to cross the blood brain barrier and metabolic stability based on electrostatic molecular orbital studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2014; 85: 661- 674.
23. Forstermann U, Li H. Therapeutic effect of enhancing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and preventing enos uncoupling. *Br Journal Pharmacol*. 2011; 164:213-23.
24. Komukai K, Kubo T, Kitabata H, Matsuo Y, Ozaki Y, Takarada S, Okumoto Y, Shiono Y, Orii M, Shimamura K, Ueno S, Yamano T, Tanimoto T, Ino Y, Yamaguchi T, Kumiko H, Tanaka A, Imanishi T, Akagi H, Akasaka T. Effect of atorvastatin therapy on fibrous cap thickness in coronary atherosclerotic plaque as assessed by optical coherence tomography: the EASY-FIT study. *J Am Coll Cardiol*. 2014; 640: 2207 - 2217.
25. Kavalipati N, Shah J, Ramakrishan A, Vasnawala H. Pleiotropic effects of statins. *Indian J Endocrinol Metab*. 2015; 19:554-62.
26. Chao-Yung W, Ping-Yen L, Liao JK. Pleiotropic effects of statin therapy: molecular mechanisms and clinical results. *Trends Mol Med*. 2008; 14: 37-44.
27. Tanaka S, Fukumoto Y, Nochioka K, Minami T, Kudo S, Shiba N, Takai Y, Williams CL, Liao JK, Shimokawa H. Statins exert the pleiotropic effects through small GTP-binding protein dissociation stimulator upregulation with a resultant Rac1 degradation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013; 33:1591-1600.
28. Takemoto M, Liao JK. Pleiotropic Effects of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; 21:1712-1719.

29. Narasaraju Kavalipati, Jay Shah, Ananthraman Ramakrishnan, and Hardik Vasawala. Pleiotropic effects of statins. *Indian J Endocrinol Metab.* 2015; 195: 554-562.
30. Cromm PM, Spiegel J, Grossmann TN, Waldmann H. Direct Modulation of Small GTPase Activity and Function. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2015; 54: 516-537.
31. Hartmann S, Ridley AJ, Lutz S. The Function of Rho-Associated Kinases ROCK1 and ROCK2 in the Pathogenesis of Cardiovascular Disease. *Front Pharmacol.* 2015; 6: 276.
32. Riching KM, Keely PJ. Rho family GTPases: making it to the third dimension. *Int J Biochem Cell Biol.* 2015; 59:111 - 115.
33. Tetlow AL, Tamanoi F. The Ras superfamily G-proteins. *Enzymes.* 2013; 33, Pt A: 1 - 14.).
34. Palazhy S, Kamath P, Vasudevan DM. Elevated oxidative stress among coronary artery disease patients on statin therapy: A cross sectional study *Indian Heart J.* 2015; 67:227-32.
35. Omar M. Khan, PhD; Murali K. Akula, MS; Kristina Sk. Ien, PhD; Christin Karlsson, PhD; Marcus Ståhlman, PhD; Stephen G. Young, MD; Jan Borén, MD, PhD; Martin O. Bergo, PhD. Targeting GGTase-I Activates RHOA, Increases Macrophage Reverse Cholesterol Transport, and Reduces Atherosclerosis in Mice. *Circulation.* 2013; 127:782-790.
36. Geneviève Martin, Hélène Duez, Christophe Blanquart, Vincent Berezowski, Philippe Poulain, Jean-Charles Fruchart, Jamila Najib-Fruchart, Corine Glineur, and Bart Staels. Statin-induced inhibition of the Rho-signaling pathway activates PPAR $\alpha$  and induces HDL apoA-I. *J. Clin. Invest.* 2001; 107:1423–1432.
37. Kota BP, Huang TH, Roufogalis BD. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol Res.* 2005; 51:85-94.
38. Tumova J, Malisova L, Andel M1, Trnka J. Protective Effect of Unsaturated Fatty Acids on Palmitic Acid-Induced Toxicity in Skeletal Muscle Cells is not Mediated by PPAR $\delta$  Activation. *Lipids.* 2015; 50:955-64.



39. Kratky, J. G. Strauss, and R. Zechner, Tissue-specific activity of lipoprotein lipase in skeletal muscle regulates the expression of uncoupling protein 3 in transgenic mouse models, *Biochemical Journal*, 2001; 647–652.
40. Villarroya, F., Iglesias, R., Giralt, M. PPARs in the Control of Uncoupling Proteins Gene Expression. *PPAR Res*, 2007; 74:364.
41. Klingenberg, M., Winkler, E., and Echtay, K. Uncoupling protein, H<sup>+</sup> transport and regulation. *Biochem Soc Trans*, 2001; 806-811
42. Nicholls, D. G., Rial, E. . A history of the first uncoupling protein, UCP1. *J Bioenerg Biomembr*. 1999; 399-406.
43. Astroch, M., Wuertz, S., Kloas, W., and Klingenspor, M. Uncoupling protein 1 in fish uncovers an ancient evolutionary history of mammalian nonshivering thermogenesis. *Physiol Genomics*. 2005; 22, 150-156.
44. Anne Bugge, Majken Siersbæk ‡ 1, María S. Madsen , Anita Irndo, Carole Rougier, Susanne Mandrup 3. *la revista de. biológica química* vol. 285, no.23, 2010; 17310-17317.
45. Jarmuszkiewicz, W., Sluse-Goffart, C. M., Hryniewiecka, L., Sluse, F. E. Identification and characterization of a protozoan uncoupling protein in *Acanthamoeba castellanii*. *J Biol Chem*, 2000; 23198-23202.
46. Samuel HH Chan, Chiung-Ai Wu, Kay LH Wu, Ying-Hao Ho , Alice YW Chang, Julie YH Chan *Circulation Research*. 2009; 105: 886-896)
47. Echtay, K. S., Brand, M. D. 4-hydroxy-2-nonenal and uncoupling proteins: an approach for regulation of mitochondrial ROS production. *Redox Rep*, 2007; 12: 26-29.
48. Victoria Bonn, Raphael C. Cheung, Biao Chen, Changiz Taghibiglou, Stephen C. Van Iderstine, Khosrow Adeli. Simvastatin, and HMG-CoA reductase inhibitor, induces the synthesis and secretion of apolipoprotein AI in HepG2 cells and primary hamster hepatocytes. *Atherosclerosis*. 2002; 163: 59–68.
49. Ballard KD,, Mazur SM, Taylor BA2,, Thompson PD Short-term cessation of statin therapy does not alter aerobic exercise performance in physically active middle-aged adults. *Phys Sportsmed*. 2016; 7:1-5

50. Sefton BM. Labeling cultured cells with <sup>32</sup>Pi and preparing cell lysates for immunoprecipitation. 2005; 18-
51. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-254.
52. Laemmli UK. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature.* 1970; 680–685.
53. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology.* 1979); 24:145-9. 1979.
54. Jin Bo Su. Vascular endothelial dysfunction and pharmacological treatment. *World J Cardiol.* 2015; 26:719-41.
55. Jaime González, Nicolás Valls, Roberto Brito, Ramón Rodrigo. Essential hypertension and oxidative stress: New insights. *World J Cardiol* 2014; 6: 353-366.
56. Palazhy S1, Kamath P2, Vasudevan DM3. Elevated oxidative stress among coronary artery disease patients on statin therapy: A cross sectional study *Indian Heart J.* 2015; 227-32.
57. Liu H, Liu HY, Jiang YN, Li N Protective effect of thymoquinone improves cardiovascular function, and attenuates oxidative stress, inflammation and apoptosis by mediating the PI3K/Akt pathway in diabetic rats. *Mol Med Rep.* 2016; 103:139.
58. Wang M, Collins MJ, Foster TR, Bai H, Hashimoto T, Santana JM, Shu C, Dardik A. Eph-B4 mediates vein graft adaptation by regulation of endothelial nitric oxide synthase. *J Vasc Surg.* 2016; S0741-5214.
59. Silva JC, César FA, de Oliveira EM, Turato WM, Tripodi GL, Castilho G, Machado-Lima A, de Las Heras B, Boscá L, Rabello MM, Hernandez MZ, Pitta MG, Pitta IR, Passarelli M, Rudnicki M, Abdalla DS New PPAR $\gamma$  partial agonist improves obesity-induced metabolic alterations and atherosclerosis in LDLr<sup>-/-</sup> mice. *Pharmacol Res.* 2015; 104:49-60.

60. Jennings BC, Danowitz AM, Wang YC, Gibbs RA, Distefano MD, Fierke CA. Analogs of farnesyl diphosphate alter CaaX substrate specificity and reactions rates of protein farnesyltransferase. *Bioorg Med Chem Lett.* 2015; 960-994.
61. Liu J, Gao HY, Wang XF The role of the Rho/ROCK signaling pathway in inhibiting axonal regeneration in the central nervous system. *Neural Regen Res.* 2015;10:18.
62. Just WW, Peränen J. Small GTPases in peroxisome dynamics. *Biochim Biophys Acta.* 2016: 167-248.
  
63. Hashemi M, Hoshyar R, Ande SR, Chen QM, Solomon C, Zuse A, Naderi M. Mevalonate cascade and its regulation in cholesterol metabolism in different tissue in health and disease. *Curr Mol Pharmacol.* 2016, 12-18.