



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**Regulación de los Niveles de Radicales Libres a
Nivel Celular y Mitocondrial. Papel de la
simvastatina**

T E S I S

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGICO**

PRESENTA

VALERIA CRUZ PÉREZ

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Vicente Castrejón Téllez

ASESOR DE TESIS

Dra. Juana Rosado Pérez



CIUDAD DE MÉXICO, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: M. en C. Claudia Fabiola Martínez Rodríguez

VOCAL: Dr. Vicente Castrejón Téllez

SECRETARIO: Dra. Juana Rosado Pérez

1er. SUPLENTE: M. en C. Taide Laurita Arista Ugalde

2° SUPLENTE: Q.F.B Adriana Hernández Reyes

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA “IGNACIO CHÁVEZ”

DIRECTOR DEL TEMA

DR. VICENTE CASTREJÓN TÉLLEZ

ASESOR DEL TEMA:

DRA. JUANA ROSADO PÉREZ

SUSTENTANTE:

VALERIA CRUZ PÉREZ

Agradecimientos

A gradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por ser parte de esta gran institución.

A gradezco al Dr. Vicente Castrejón Téllez por su dedicación, comprensión, paciencia, enseñanzas y su asesoría para que se pudiera llevar a cabo este proyecto de investigación.

A gradezco a mis sinodales por la asesoría y correcciones que aportaron en mi proyecto de tesis.

A gradezco al laboratorio de fisiología por brindarme la oportunidad de realizar mi proyecto de tesis.

A gradezco a la Dra. Emma por sus consejos a lo largo de esta etapa.

Dedicatorias

A mis padres.

Por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, además por haber creído en mí, por sus consejos, su amor y su apoyo constante en toda mi educación.

A mis hermanos.

Por ser parte de mi vida en especial a Veronica y Marco Antonio por estar siempre conmigo en los momentos más difíciles y brindarme su cariño. Los quiero mucho a todos.

A Osvaldo

Gracias por ser parte en el logro de mis metas profesionales, por la motivación y apoyo que siempre me has dado en cada momento. Eres una persona muy especial.

A mi amiga Aida

Gracias por brindarme tu ayuda y compartir momentos agradables, además recuerda que eres muy importante para mí.

A Leonardito

Quien ha sido y es una motivación y felicidad en la familia

A todas las personas que me han acompañado en las diferentes etapas de mi vida.

Índice

1	RESUMEN	8
2	ABREVIATURAS	9
3	INTRODUCCIÓN	11
4	MARCO TEÓRICO	12
4.1	Generalidades de las estatinas	12
4.2	Estructura de las estatinas	13
4.3	Farmacocinética de las estatinas	14
4.4	Funciones de las Estatinas	15
4.5	Pleiotropicidad de las estatinas	16
4.6	Participación de los PPARs en la transcripción génica	17
4.7	La mitocondria y su función	19
4.8	Fosforilación oxidativa	19
4.9	El desacoplamiento mitocondrial	22
4.10	Distribución de las proteínas desacoplantes (UCPs)	22
4.11	Las especies reactivas de oxígeno	23
4.12	Producción de EROs en el complejo I	24
4.13	Producción de EROs en el complejo III	25
5	PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA	26
6	HIPÓTESIS	27
7	OBJETIVOS	28
7.1	Objetivo general	28
7.2	Objetivos particulares	28
8	MATERIALES Y MÉTODOS	30

8.1	Material Químico.	30
8.2	Cultivo celular	30
8.3	Tratamiento con simvastatina	30
8.4	Extracción de proteína total de los cultivos	31
8.5	Determinación de proteína	32
8.6	Separación de proteínas por SDS- PAGE	32
8.7	Transferencia y bloqueo de membranas	33
8.8	Incubación con anticuerpos	34
8.9	Revelado de las membranas	34
8.10	Ensayo de la actividad de catalasa	34
8.11	Producción de EROs por fluorescencia	35
8.12	Detección de especies reactivas de oxígeno por citometría de flujo	37
8.13	Análisis Estadístico	39
9	RESULTADOS	40
9.1	Efecto de la simvastatina sobre la expresión de la proteína UCP2	40
9.2	Oxidación del DCF en presencia de peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones de simvastatina	41
9.3	Efecto de los agonistas y antagonistas de PPARs en los niveles de radicales libres a diferentes concentraciones de simvastatina	41
9.4	Efecto de la simvastatina sobre los niveles de expresión de SOD	45
9.5	Efecto de la simvastatina sobre la expresión y actividad de la Catalasa	46
9.6	Determinación de radicales libres con el fluorocromo CellRox Green a diferentes concentraciones de simvastatina	46
9.7	Determinación de especies reactivas a oxígeno en la mitocondria con el fluorocromo MitoSox Red a diferentes concentraciones de simvastatina	47
10	DISCUSIÓN	50
11	CONCLUSIONES	54

12	PERSPECTIVAS	55
----	--------------	----

13	REFERENCIAS	56
----	-------------	----

Índice de figuras

Figura 1. Esquema representativo de la vía de síntesis de colesterol	12
Figura 2. Estructura del HMG-CoA, las estatinas y una comparación entre los dos tipos de estatinas	13
Figura 3. Distribución selectiva de estatinas en hígado por transportadores hepáticos y del intestino	15
Figura 4. Estructura de los dominios de los receptores nucleares	17
Figura 5. Estructura y función de la mitocondria	20
Figura 6. Fosforilación oxidativa	21
Figura 7. Producción de especies reactivas de oxígeno	24
Figura 8 Estructura molecular del DCFH-DA y su mecanismo de oxidación	36
Figura 9. Esquema detección por citometría de flujo	38
Figura 10. Estructuras moleculares de MitoSox Red y CellRox Green en su forma reducida y oxidada	39
Figura 11. Expresión de la proteína UCP2 en la línea celular PAE en a diferentes concentraciones de simvastatina	40
Figura 12. Efecto de la simvastatina sobre la velocidad de oxidación del DCF	41
Figura 13. Efecto del ácido oleico sobre la velocidad de oxidación del DCF a dos concentraciones diferentes de simvastatina	43
Figura 14. Efecto del fenofibrato y el BADGE sobre la velocidad de oxidación del DCF a 1 μ M de simvastatina	44
Figura 15. Expresión de Mn-SOD mitocondrial y la Cu/Zn-SOD citosólica a diferentes concentraciones de simvastatina	45
Figura 16. Expresión y actividad de la catalasa a diferentes concentraciones de simvastatina	46
Figura 17. Determinación de radicales libres con el fluoróforo Cell Rox Green a diferentes concentraciones de Simvastatina	48

Índice de cuadros

Cuadro 1. Propiedades farmacocinéticas de las estatinas	14
Cuadro 2. Método de cuantificación de proteína	32
Cuadro 3. Composición del gel separador y concentrador	33
Cuadro 4. Anticuerpos primarios	34
Cuadro 5 Condiciones de cultivo	37

1 Resumen

Antecedentes. Recientemente se ha demostrado que el beneficio de las estatinas va más allá del control de los niveles de colesterol, ya que presentan otros efectos independientes al metabolismo del colesterol, conocidos como pleiotrópicos. Entre estos se encuentra la regulación postraduccional de algunas proteínas, conocido como prenilación proteica, proceso a través del cual se regulan proteínas como las GTPasas pequeñas, las cuales están implicadas en la regulación de factores de transcripción como los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPARs), que a su vez se encargan de regular la expresión de variadas moléculas, incluyendo proteínas mitocondriales como las proteínas desacoplantes mitocondriales (UCPs), vinculadas con la expresión de enzimas antioxidantes. En nuestro grupo de trabajo proponemos que las estatinas pueden disminuir los niveles de EROs a nivel mitocondrial así como aumentar enzimas que regulan la homeostasis redox como son catalasa, SOD₁ y SOD₂ a través de la activación de UCP₂ por la activación de PPAR.

Objetivo: Determinar el efecto de la simvastatina sobre los niveles de EROs a nivel mitocondrial en la línea celular PAE.

Método. Se realizó un estudio experimental en la línea celular PAE, la línea fue cultivada a diferentes concentraciones de simvastatina por 24 horas. Posteriormente, se determinaron los niveles de expresión de las proteínas UCP₂, catalasa y SOD mediante la técnica de western blot. También se midió de forma cualitativa la producción de EROs por citometría de flujo, utilizando dos colorantes fluorogénicos MitoSoxRed y CellRox Green. Además se midió la actividad de catalasa por geles de poliacrilamida en condiciones nativas (BN-PAGE).

Resultados: Se observó una disminución en la producción de EROs mitocondrial en la concentración de 0.5µM de simvastatina además se encontró que la expresión de UCP₂ aumentó con una diferencia significativa ($p < 0.05$) en las concentraciones desde 0.5 hasta 2.5 µM de simvastatina utilizadas. En la expresión de SOD₂ mitocondrial hubo un aumento en las concentraciones de 0.1, 0.5 y 2.5µM de simvastatina con una diferencia significativa ($p < 0.05$), mientras que en la expresión de SOD₁ citosólica, hubo una tendencia de aumento en todas las concentraciones. En la expresión de catalasa se observó una tendencia de aumento en las concentraciones de 0.1, 0.5, 1.0 y 2.5 µM de simvastatina pero no fue significativa.

Conclusiones: Los resultados del estudio apoyan nuestra hipótesis, respecto a que la simvastatina disminuye la producción de EROs mediante la regulación positiva de proteínas mitocondriales como son la UCP₂, SOD₂ y catalasa

2 Abreviaturas

• ADN	Ácido desoxirribonucleico
• APS	Persulfato de amonio
• ATP	Adenosín trifosfato
• BADGE	Bis-fenol A diglicil éter
• BN-PAGE	Blue Native- Polyacrylamide Gel Electrophoresis
• CAT	Catalasa
• CO ₂	Dióxido de carbono
• DCF	Diclorofluoresceína
• DCF-DA	Diacetato de diclorofluoresceína
• DMSO	Dimetilsulfóxido
• DOC	Desoxicolato de sodio
• EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
• EGTA	Ácido Etilen glicol tetraacetico
• EROS	Especies Reactivas de oxígeno
• FADH ₂	Flavín adenín dinucleótido reducido
• FMN	Flavín mononucleótido
• FMNH ₂	Flavín mononucleótido reducido
• FPP	Farnesil pirofosfato
• GDP	Guanidin difosfato
• GGPP	Geranilgeranil pirofosfato
• GTP	Guanidin trifosfato
• GTPasa	Guanosina trifosfatasa
• GPX	Glutation peroxidasa
• HEPES	Ácido 4-(2-hydroxietil)-1-piperazinoetanosulfonico
• HMG-CoA	3-hidroxi-3-metil-glutaril-Coenzima A
• HRP	Peroxidasa de Rábano
• Km	Constante de afinidad
• LDL	Lipoproteína de baja densidad
• mtDNA	ADN mitocondrial

• NAD ⁺	Adenin Nicotinamida dinucleótido oxidado
• NADH	Adenin Nicotinamida dinucleótido reducido
• NEM	N-etil-maleimida
• NO	Óxido nítrico
• OATP	Transportador de polipéptidos aniónicos
• PAE	Células endoteliales de aorta de cerdo
• PBS	Buffer de Fosfatos
• PMSF	Fluoruro de Fenil-metano-sulfonilo
• PPARs	Receptor activado por proliferadores peroxisomales
• PPRE	Elemento de respuesta a PPARs
• QH ₂	Quinona
• ROCK	Cinasa asociada a Rho
• RXR	Receptor X retinoide
• SDS	Dodecil sulfato de sodio
• SFB	Suero Fetal Bovino
• SOD	Superóxido dismutasa
• TAC	Tejido adiposo café
• TBS-T	Buffer de Tris-sodio más Tween-20
• TEMED	Tetramethylethylenediamine
• UCPs	Proteínas desacoplantes
• VDAC	Canal aniónico dependiente del voltaje

3 Introducción

Las estatinas son fármacos utilizados para inhibir a la HMG-CoA reductasa, esta enzima participa en el paso limitante en la síntesis del colesterol y, se ha convertido en el blanco terapéutico para el tratamiento de problemas cardiovasculares. El colesterol es componente de las membranas celulares, precursor de hormonas esteroideas y ácidos biliares; sin embargo, el aumento de su concentración lo convierte en un factor de riesgo en el desarrollo de enfermedades cardíacas. El beneficio de las estatinas va más allá del control de los niveles de colesterol, presenta otros efectos independientes al metabolismo del colesterol, conocidos como pleiotrópicos. De los más importantes se encuentra la regulación postraduccional de algunas proteínas, conocido como prenilación proteica. A través de este proceso proteínas como las GTPasas pequeñas, son reguladas durante el desarrollo de su función en la célula. Funciones como, la regulación de factores de transcripción encargados de reconocer secuencias específicas en el genoma regulando de esta manera la expresión proteica. Como sucede con los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPARs), que se encargan de regular la expresión de diversas proteínas, incluyendo proteínas mitocondriales como las proteínas desacoplantes mitocondriales (UCPs). En el laboratorio se ha observado que la simvastatina es capaz de regular la expresión de las UCPs, quienes están relacionadas con la homeostasis energética y oxidativa celular. Las UCPs se encargan de disipar el gradiente electroquímico de protones, formado por la actividad de la cadena respiratoria a través de la membrana internamitocondrial, básicamente cuando el gradiente electroquímico o la concentración de ATP están elevados. Una de las funciones de las UCPs, está relacionada con la regulación de los niveles de especies reactivas de oxígeno. Las especies reactivas a oxígeno (EROs) son moléculas encargadas de regular un gran número de procesos fisiológicos y patológicos, y la mitocondria es una de las principales fuentes de producción de estas moléculas. En este trabajo, se quiere demostrar que la simvastatina, a través de las proteínas desacoplantes, regula los niveles de EROs a nivel mitocondrial; efecto que aún no ha sido estudiado.

4 Marco teórico

4.1 Generalidades de las estatinas

Las estatinas son un grupo de fármacos administrados para el control terapéutico de las dislipidemias y las enfermedades cardiovasculares¹. Una de las funciones más importantes de las estatinas es disminuir los niveles de LDL, debido a que son inhibidores competitivos reversibles del 8-hidroximetilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa, que cataliza el paso limitante de la síntesis del colesterol (Figura 1)². Además del efecto en los niveles de colesterol, a las estatinas se les atribuye otras acciones biológicas como por ejemplo, tienen efecto antiinflamatorio e inmunomodulador³, tener actividad antioxidante⁴, participan en la disminución de la incidencia de algunos tipos de cáncer⁵ y mostrar efectos benéficos en el metabolismo óseo⁶.

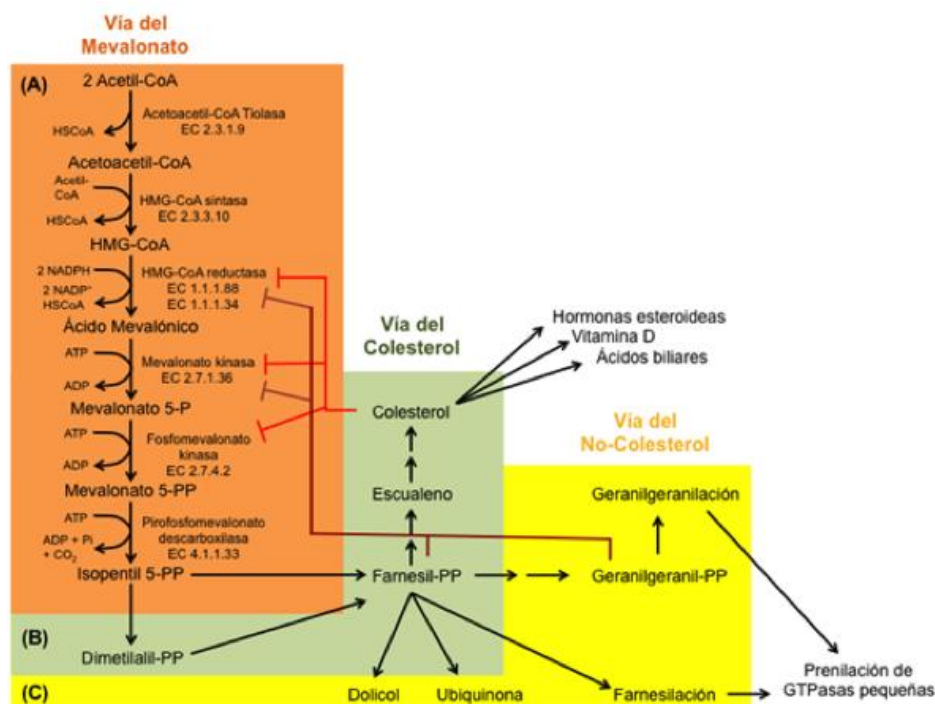


Figura 1. Esquema representativo de la vía de síntesis de colesterol. Dividido en tres secciones: (A) La ruta del Mevalonato, donde se forma mevalonato 5-PP y termina en isopentil 5-PP; (B) La ruta del Colesterol que finaliza con la síntesis de colesterol a partir del cual se forman las hormonas esteroideas, la vitamina D y los ácidos biliares; y (C) la ruta del No-Colesterol importante para la formación de Farnesil-PP y Geranilgeranil-PP que se utilizan en la Farnesilación y Geranilgeranilación de las GTPasas pequeñas. Modificado de Tricarico P, et al.2015².

La mevastatina fue una de las primeras estatinas, se extrajo del hongo *Penicillium citrinum*, pero su eficacia para inhibir la HMG-CoA reductasa era limitada debido a su toxicidad y fue retirada del mercado⁷. Posteriormente, se purificó la lovastatina a partir de *Aspergillus terreus*, que resultó ser más eficiente que su antecesor y menos tóxica⁸. A partir de este descubrimiento fueron purificadas y sintetizadas una gran cantidad de nuevos inhibidores de la HMG-CoA reductasa, como la pravastatina, simvastatina, fluvastatina, atorvastatina, cerivastatina, pitavastatina y rosuvastatina⁹.

4.2 Estructura de las estatinas

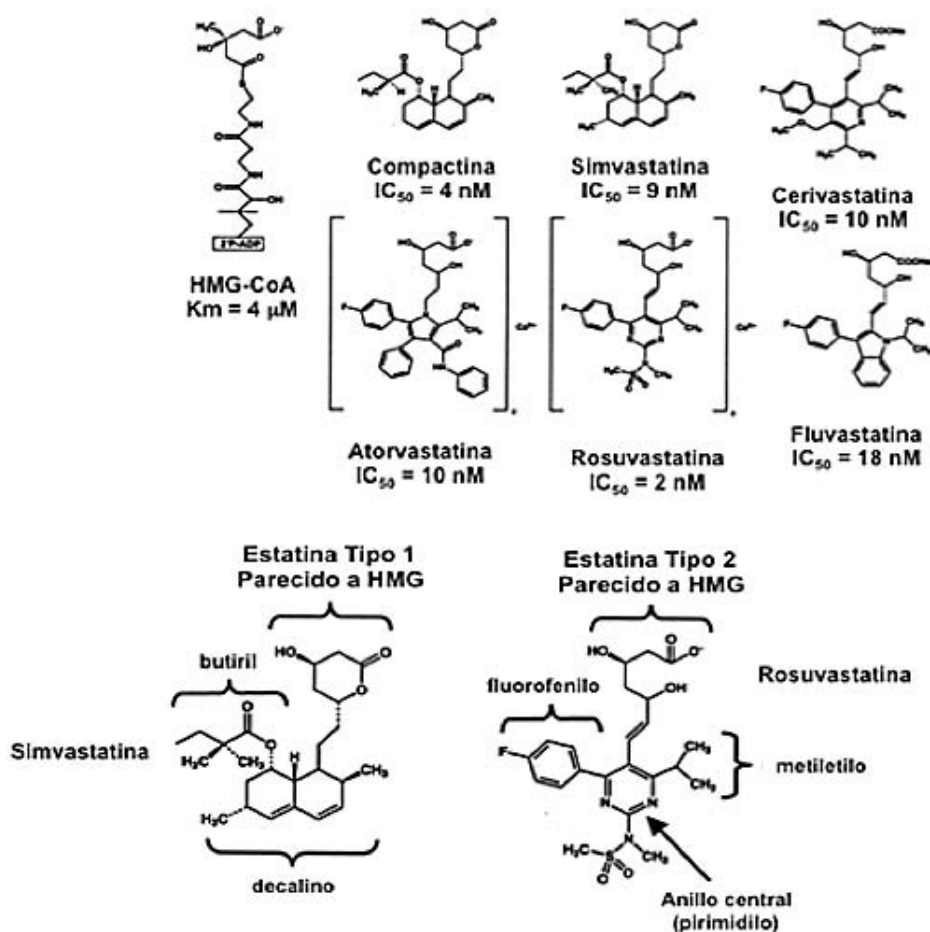


Figura 2. Estructura del HMG-CoA, las estatinas y una comparación entre los dos tipos de estatinas. Arriba a la izquierda, el HMG-CoA unido a la enzima; arriba a la derecha la estructura de las estatinas de Tipo 1 y Tipo 2, se observa también la constante de afinidad (Km) del HMG-CoA y las constantes de inhibición (IC₅₀) de las diferentes estatinas. En la parte de abajo, se comparan las estructuras de los dos tipos de estatinas. Modificado de Istvan E. 2003¹¹.

Las estatinas comparten un componente estructural similar a la porción hidroximetilglutaril (HMG) de la molécula hidroximetilglutaril-CoA (HMG-CoA). La porción parecida a HMG está unida covalentemente a un grupo hidrofóbico rígido el cual va de altamente hidrofóbico a parcialmente hidrofóbico. Todas las estatinas son inhibidores competitivos de la enzima HMG-CoA reductasa con respecto a la unión del HMG-CoA, variando en su tamaño e hidrofobicidad, características que le proporcionan a cada estatina una capacidad de interacción diferente con la enzima¹⁰.

Estructuralmente las estatinas pueden dividirse en dos tipos: Tipo 1, como la: compactina, pravastatina y simvastatina, quienes tienen un anillo de tipo decalino, y las Tipo 2, como la: rosuvastatina, atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, que tienen un grupo fluorofenilo y un grupo metiletilo no observado en los inhibidores de Tipo 1 (Figura 2)¹¹.

4.3 Farmacocinética de las estatinas

Cuadro 1. Propiedades farmacocinéticas de las estatinas

Estatinas	Simvastatina	Lovastatina	Fluvastatina	Pravastatina
Dosis(mg)	10	20	40	40
Administradas como pro- drogas	Si	Si	No	No
Solubilidad	Lipofílica	Lipofílica	Lipofílica	Hidrofílica
Absorción (%)	60-85	30	98	35
Biodisponibilidad (%)	≤ 5	5	30	18
Tiempo de vida media de eliminación (h)	2-5	2-5	1-3	1-3
Metabolismo de CYP450 isoenzima	3A, 2C8	3A, 2C8	2C9	3A

Se muestran las dosis expresadas en (mg) de cada estatina que comúnmente se administran en pacientes con un peso de 70Kg. Tabla modificada de Neuvonen P, et al. 2008¹²

Las estatinas son fármacos anfipáticos, por su capacidad de pasar a través de la membrana plasmática, en el caso de los agentes lipofílicos (como la simvastatina, fluvastatina o atorvastatina) el transporte es pasivo, interaccionando directamente con la membrana mientras que en el caso de los agentes hidrofílicos como la pravastatina el transporte es por medio de proteínas transportadoras (Cuadro 1)¹².

El hígado es el órgano principal en la eliminación de fármacos en el organismo debido a que posee mecanismos de inactivación constituidos por rutas metabólicas y sistemas de transportadores específicos para fármacos ¹³. Se ha demostrado que los transportadores hepáticos, como el transportador de polipéptidos aniónicos orgánicos OATP1B1 y el OATP1B3, también transportan fármacos aniónicos como las estatinas cuyo principal mecanismo de eliminación es a través de la vía del citocromo P450 y del UDP-glucuronosil transferasa en el hígado (Figura 3)¹⁴.

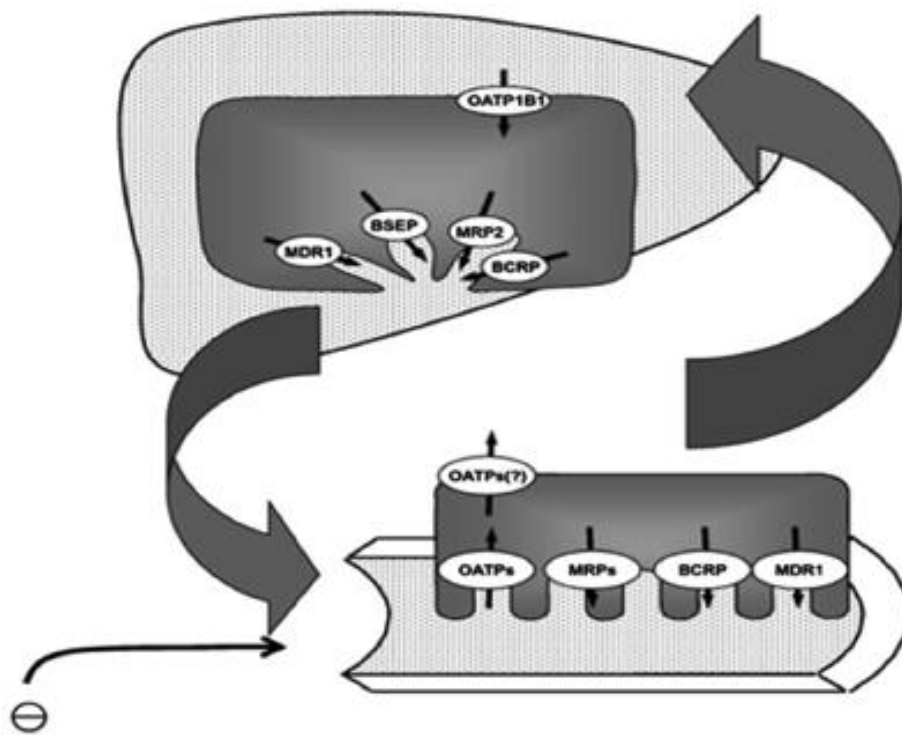


Figura 3. Distribución selectiva de estatinas en hígado por transportadores hepáticos y del intestino. El esquema muestra el mecanismo de distribución de la pravastatina, aunque esos transportadores están también involucrados en el transporte de otras estatinas hacia el hígado. Esquema modificado de Shitara y Sugiyama, 2006.¹⁴

4.4 Funciones de las estatinas

En la clínica las estatinas son fármacos importantes para el control de los niveles de colesterol sin embargo, los beneficios van más allá de este control, muchos estudios han revelado que las estatinas participan en el mejoramiento de la función endotelial¹⁵, en la disminución de la formación placas ateroscleróticas¹⁶, la

disminución del estrés oxidativo e inflamación, así como, se ha observado que tiene efectos en el sistema inmune¹⁷, el sistema nervioso central¹⁸ y en el hueso.¹⁹

Estos efectos son llamados “pleiotrópicos” y, son regulados en su mayoría, por la inhibición de la síntesis de isoprenos, metabolitos que sirven como moléculas de adhesión durante la señalización intracelular. Por ejemplo, las proteínas pequeñas unidas a GTP o GTP asas pequeñas, como sucede con: Rho, Ras y Rac, cuya adecuada localización y función en la membrana plasmática dependen de un proceso de señalización conocido como prenilación proteica²⁰. La prenilación proteica se ve afectada al inhibir la síntesis del mevalonato por la presencia de las estatinas, las cuales inhiben la síntesis de intermediarios isoprenoides, como el farnesil-pirofosfato (FPP) y el geranilgeranil pirofosfato (GGPP) que funcionan como moléculas de unión durante la modificación post-traducciona l de varias proteínas, incluyendo la subunidad γ de las proteínas G heterotriméricas, el grupo hemo-a y las proteínas pequeñas de unión a GTP²¹.

Las GTPasas pequeñas, tales como Rho, pueden regular varios aspectos de la función celular, principalmente a través de sus proteínas blanco, las Rho cinasas (ROCKs), que son parte de la familia de proteínas serín/treonin cinasas, las cuales tienen dos isoformas ROCK β (ROCKII) y ROCK α (ROCKI)²². Existe evidencia donde se ha demostrado la participación de esas dos proteínas en la patogénesis de problemas cardiovasculares²³. Otro miembro de la familia de proteínas Rho, la GTPasa Rac tiene como principales mecanismos de señalización, la regulación de la polimerización de la actina en el citoesqueleto y la regulación de la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) al igual que Rho²⁴.

4.5 Pleiotropicidad de las estatinas

Como ya se describió anteriormente los efectos pleiotrópicos son efectos diferentes al uso primario de las estatinas. Se ha reportado que el tratamiento con estatinas, previene el aumento de la presión inducida por hipertrofia a través de la inhibición de la actividad de la NADPH oxidasa regulada por Rac1 en el músculo liso vascular y en el corazón de modelos de ratón²⁵. Estos resultados fueron corroborados al analizar muestras de corazón, donde el aumento de los niveles de

EROS está asociado con el aumento en la actividad de Rac1, efectos que fueron atenuados por el tratamiento con estatinas²⁶. Por otro lado se demostró que en los macrófagos las estatinas activan PPAR γ y PPAR α , por un mecanismo de señalización dependiente de RhoA previniendo la hipertrofia cardíaca²⁷.

4.6 Participación de los PPARs en la transcripción génica

Los PPARs (Receptores activados por proliferadores peroxisomales) son proteínas que forman parte de una superfamilia de factores de transcripción inducibles por ligando²⁸, cuyo ligando natural son los ácidos grasos insaturados y los eicosanoides. Tras su heterodimerización con el receptor 9-cis ácido retinoico (RXR), los PPARs se unen a los llamados elementos de respuesta a PPARs (PPREs) en el DNA, que corresponden a secuencias génicas regulatorias que pueden estar localizadas, ya sea dentro de la secuencia promotora de un gen o en una secuencia localizada en un sitio diferente y distante al gen que regulan²⁹. En los mamíferos existen tres tipos de PPARs: PPAR α (NR1C1), PPAR β/δ (NR1C2) y PPAR γ (NR1C3); que tienen como función principal la regulación de la expresión de genes involucrados en la adipogénesis, el metabolismo de lípidos, la inflamación y el mantenimiento de la homeostasis metabólica;³⁰ al igual que los receptores nucleares típicos (Figura 4), los PPARs están formados de distintos dominios funcionales, que incluyen el dominio de transactivación en el amino terminal (AF1), el dominio de unión a DNA altamente conservado (DBD) y el dominio de unión a ligando en el carboxilo terminal (LBD) que contiene una función de transactivación dependiente de ligando (AF2), todos esos dominios son sitios potenciales de regulación de su actividad³¹.



Figura 4. Estructura de los dominios de los receptores nucleares. En el esquema se representan los dominios funcionales denominados con letras: El dominio N-terminal (NTD, A/B) contiene la función de activación independiente de ligando (AF1). El dominio de unión al ligando ((LBD, E), contiene la función de activación dependiente del ligando (AF-2), La región D conecta al DBD con la región E y además contiene la secuencia de localización nuclear. Esquema modificado de Poulsen L, 2012³¹.

Aunque comparten muchas similitudes, cada PPAR tiene funciones únicas in vivo, probablemente debido a su distribución en los diferentes tejidos, su respuesta a distintos ligandos y a sus propiedades bioquímicas. Por ejemplo, PPAR α se expresa básicamente en hígado, corazón y tejido adiposo café (TAC), y su función principal consiste en ser el mayor activador de la ruta encargada de oxidar a los ácidos grasos y es el blanco principal de los fibratos, un fármaco hipolipidémico³². El PPAR δ/β , se expresa prácticamente en todos los tejidos y su función principal es participar en la oxidación de los ácidos grasos en tejidos como el músculo esquelético, el corazón y el hígado³³. PPAR γ se expresa principalmente en tejido adiposo, donde es el regulador principal de la adipogénesis y de la sensibilidad a insulina³⁴.

El control de la transcripción génica determina los niveles y función correspondientes de las proteínas en los organelos, las células, los tejidos y, por lo tanto, en la homeostasis del organismo. Se ha demostrado que los PPARs son el principal sistema de control de la transcripción de los genes involucrados en la síntesis de las proteínas, como desacoplantes mitocondriales (UCPs)³⁵. El control de la expresión de estos genes a través de los PPARs, proporciona un mecanismo de regulación de los niveles de proteínas mitocondriales involucradas en la homeostasis energética y oxidativa mitocondrial³⁶.

Las proteínas desacoplantes (UCPs), son transportadores de protones localizados en la membrana interna mitocondrial; con una masa molecular alrededor de 32 kDa, en su estructura posee seis hélices que atraviesan la membrana interna mitocondrial con los extremos carboxilo y amino terminal del lado citosólico. Las tres secuencias, tienen 100 aminoácidos que se repiten tres veces a su vez, contiene dos regiones hidrofóbicas transmembranales unidas por una región hidrofílica. La unidad funcional de las UCPs es un homodímero, y se ha observado que tienen un comportamiento dual, es decir, se pueden comportar como acarreador o como canal. La función biológica de las UCPs consiste en disipar el gradiente electroquímico de protones formado por la actividad de la cadena respiratoria³⁷.

4.7 La mitocondria y su función

La mitocondria es un organelo celular localizado en el citoplasma de las células eucariotas, que participa en procesos celulares importantes como la apoptosis³⁸, la homeostasis de las células madre pluripotentes³⁹, la homeostasis del calcio⁴⁰ y el ciclo de Krebs⁴¹. Sin embargo, la función principal de la mitocondria es la producción de energía celular en forma de ATP. La mitocondria está formada por una membrana interna y una membrana externa, que forman dos compartimentos, el espacio intermembranal y la matriz mitocondrial. La membrana externa es altamente permeable, debido a la presencia del canal selectivo de aniones dependiente de voltaje (VDAC), una proteína involucrada en el transporte de metabolitos como el ADP y ATP entre la mitocondria y el citosol⁴², la membrana interna mitocondrial, posee numerosas invaginaciones o crestas, donde se localizan los complejos de la cadena de transporte de electrones y se lleva a cabo la fosforilación oxidativa. Por otra parte, en la matriz mitocondrial se lleva a cabo la mayor parte de las reacciones, el ciclo de Krebs, la oxidación de los ácidos grasos, y además contiene el material genético mitocondrial (mtDNA)⁴³ (Figura 5)

4.8 Fosforilación oxidativa

La fosforilación oxidativa, es el proceso en el cual se produce ATP como resultado de la transferencia de electrones desde NADH o FADH₂ hasta el O₂. Este proceso se lleva a cabo en la membrana interna de la mitocondria y es la principal fuente de energía en organismos aerobios⁴⁵.

La fosforilación oxidativa se basa en la teoría quimiosmótica propuesta en el año 1966 por Peter Mitchell⁴⁶, para explicar el acoplamiento entre la oxidación de los sustratos y la producción de ATP. En esta teoría se postuló que la cadena transportadora de electrones mitocondrial está acoplada a la síntesis de ATP mediante un gradiente electroquímico de protones ($\Delta\mu\text{H}^+$) que se genera a través de la membrana interna mitocondrial⁴⁷.

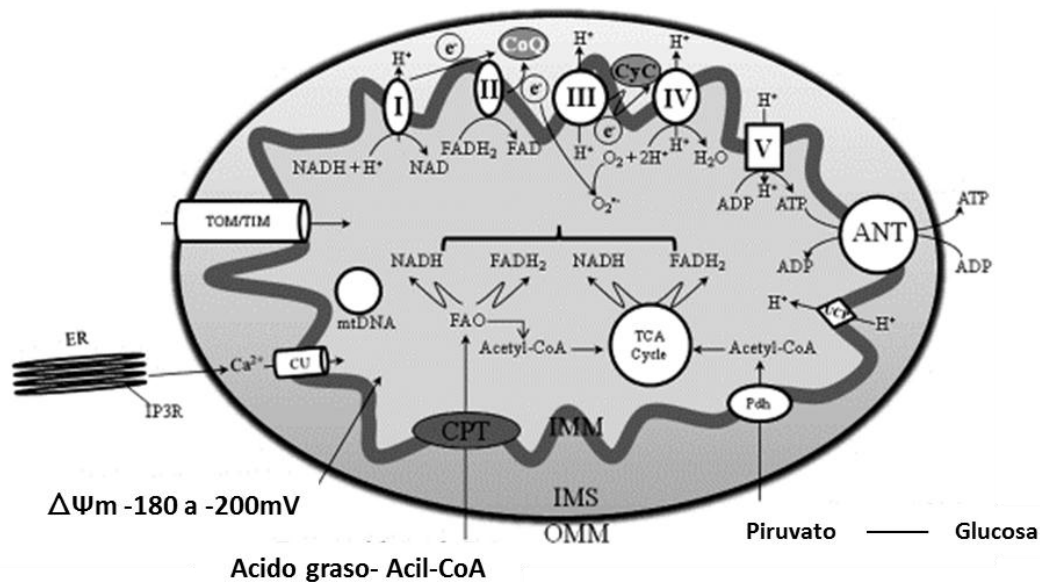


Figura 5. Estructura y función de la mitocondria. El esquema muestra los complejos (I, II, III, IV y V) de la cadena de transporte de electrones (CTE) además, del citocromo c (Cyc), el flujo de electrones a través de los complejos y la generación de ATP. La oxidación de los ácidos grasos (FAO) y el ciclo de Krebs generan los cofactores NADH y FADH₂ necesarios para la producción de energía en la mitocondria y estabilizar el potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$ -180 a -200mV). $\Delta\Psi_m$ es también modulado por las proteínas desacoplantes (UCPs). Los acarreadores de fosfatos, incluye a la adenina nucleótido translocasa (ANT) que regula los niveles de fosfato. La captación de sustratos esta mediada por proteínas que se localizan en la membrana interna mitocondrial (IMM). Por ejemplo, la carnitina palmitoil transferasa (CPT) y piruvato deshidrogenasa (PDH). El ADN mitocondrial (mtDNA) codifica proteínas mitocondriales específicas y proteínas citosólicas producidos por el ADN nuclear (n) son trasladadas a la mitocondria a través del translocador de la membrana externa (TOM) y la membrana mitocondrial interna (IMM). Esquema modificado de Camara A, et al. 2010.⁴⁴

La fuente directa de energía para la síntesis de ATP es el gradiente electroquímico de protones ($\Delta\mu$) generado por la transferencia de electrones que se lleva a cabo a través de los complejos de la cadena respiratoria en la mitocondria. La cadena de transporte de electrones es una estructura multi-proteica que consta de 5 complejos transportadores de electrones, el complejo I (NADH-CoQ oxidoreductasa), complejo II (Succinato-CoQ oxidoreductasa), complejo III (complejo *bc1*; ubiquinol: citocromo c oxidoreductasa), complejo IV (citocromo c oxidasa) y por último el complejo V (ATP sintasa)⁴⁸.

La energía de este gradiente se utilizará para producir ATP en la ATPasa o F₁F₀-ATPasa mitocondrial o para el transporte de iones y metabolitos a través de la membrana interna mitocondrial. En estado estacionario el bombeo de protones tiene que estar compensado con la reentrada de estos en la matriz. Como la

principal vía de reentrada de los protones es la ATPasa, se puede decir que el flujo de protones se encuentra acoplado a la síntesis de ATP, y por tanto, la velocidad de respiración depende fundamentalmente de la demanda de ATP en la célula.

La F_1F_0 -ATPasa está formada por 2 dominios: un dominio hidrosoluble F_1 , formado por 5 subunidades (α 3, β 3, γ , δ y ϵ), las subunidades α y β contienen los sitios de fijación de los nucleótidos de adenina, además posee tres sitios catalíticos ubicados en las 3 subunidades ($\beta\beta$) con una subunidad adyacente en donde ocurre la síntesis de ATP y la reacción de hidrólisis. El dominio membranoso F_0 (ab_2c_{10-14}) es un oligómero de subunidades c que giran cuando se produce el paso de protones del espacio intermembranal hacia la matriz (Figura 6)^{49,50}.

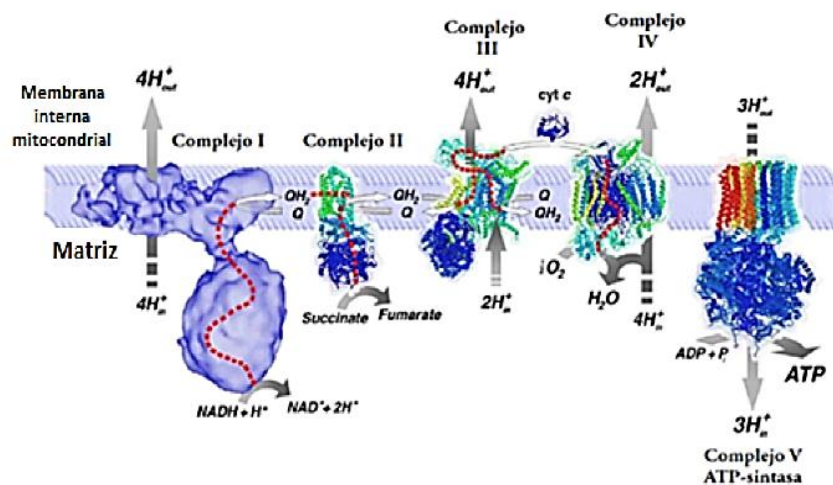


Figura 6. Fosforilación oxidativa. Los acarreadores de electrones están organizados en 4 complejos en la membrana interna mitocondrial. En el complejo 1, cataliza la entrada de electrones desde el NADH; el complejo II, transfiere los electrones a la coenzima Q reduciendo al ubiquinol; en el complejo III se cataliza la transferencia de electrones del ubiquinol al citocromo C; el complejo IV recibe los electrones procedentes del citocromo y los transfiere al O_2 convirtiéndolo en H_2O . La transferencia de electrones en el complejo I, III y IV, están asociados con una disminución de energía libre, que es usada para bombear protones desde la matriz hacia el espacio intermembranal. El gradiente electroquímico es aprovechado por el complejo V, ATP sintasa que sintetiza ATP a partir de ADP.⁴⁹

4.9 El desacoplamiento mitocondrial

El desacoplamiento mitocondrial es consecuencia de la actividad de una proteína de la membrana interna, perteneciente a la superfamilia de acarreadores mitocondriales, la proteína desacoplante mitocondrial⁵¹. Estas proteínas han sido descritas como una familia de cinco miembros en los mamíferos con un peso molecular que oscila entre 31 - 34 KDa⁵². Su función radica en regular el potencial transmembranal ($\Delta\Psi$), creado por la translocación de protones durante la actividad de la cadena respiratoria, esto se logra desacoplando la conexión entre la cadena de transporte de electrones y la síntesis de ATP, lo que disminuye la eficiencia de la síntesis de ATP⁵³.

Los genes que codifican a las UCPs están ampliamente distribuidos, no solo en mamíferos, sino también en plantas y protozoarios⁵⁴, esta amplia distribución sugiere que el proceso de desacoplamiento pudiera ser parte de una estrategia para mantener la homeostasis energética y oxidativa celular. El mecanismo de desacoplamiento regulado por las UCPs puede tener varias funciones biológicas, dentro de las cuales encontramos la termogénesis, la regulación de energía excedente, el mantenimiento del equilibrio redox cuando hay exceso de NADPH, o la reducción en la producción de especies reactivas de oxígeno generadas por la mitocondria⁵⁵.

4.10 Distribución de las proteínas desacoplantes (UCPs)

En el humano se encuentran cinco isoformas de UCP que están distribuidas en diferentes tejidos: la UCP₁ se expresa tanto en adipocitos blancos, caracterizados por tener una sola vesícula de grasa que ocupa casi todo el volumen celular, y los adipocitos marrones que se diferencian de los adipocitos blancos en poseer una menor cantidad de grasa presentando un mayor número de vesículas y además un gran número de mitocondrias, ambos se encuentran en el tejido adiposo marrón (TAB) que tiene como principal función generar calor mediante un proceso llamado termogénesis.⁴⁰ La segunda proteína descrita fue UCP₂, esta se distribuye en varios tejidos, que incluyen el bazo, los riñones, el sistema inmunológico, páncreas, y el sistema nervioso central, la UCP₃ está

principalmente en el músculo esquelético y por último la UCP₄ y UCP₅ (BCP1) se expresan exclusivamente en el cerebro⁴¹

4.11 Las especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) son moléculas importantes encargadas de regular un gran número de procesos fisiológicos y patológicos en la célula. Sin embargo, existe mucha evidencia acerca de la sobreproducción de EROs en la célula, está involucrada con el desarrollo de varias enfermedades como el Parkinson⁵⁶, el Alzheimer⁵⁷, desórdenes bipolares⁵⁸ y la mayoría de las enfermedades cardiovasculares⁵⁹. Muchos estudios en modelos experimentales y reportes clínicos muestran una relación entre la sobreproducción de EROs en la pared vascular y el desarrollo de aterosclerosis y daño cardíaco⁶⁰.

Las especies reactivas de oxígeno son moléculas pequeñas derivadas de oxígeno, que incluye radicales libres por ejemplo el radical hidroxilo (OH[•]), anión superóxido (O₂⁻), peroxilo (RO₂[•]) y alcoxilo (RO[•]) y algunos compuestos que no son radicales libres como ozono (O₃), ion hipoclorito (OCl⁻), y peróxido de hidrógeno (H₂O₂). En general existen dos caminos para la eliminación de radicales libres, el primero, involucra la administración de antioxidantes, y el segundo, involucra la regulación mediada por enzimas como superoxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPX) y catalasa.

SOD es un homodímero que cataliza la dismutación de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno. Existen tres tipos de isoformas de SOD en eucariontes, la Mn-SOD que se encuentra en el espacio intermembranal de la mitocondria. La Cu/Zn- SOD que es una proteína citosólica y la Fe-SOD que es una proteína extracelular.⁶¹

Las principales fuentes de producción de EROs en la célula incluyen enzimas redox como la NADPH oxidasa, la xantina oxidasa, la lipooxigenasa y las ciclooxigenasas, es importante notar que estas enzimas están en constante interacción unas con otras (Figura 7). La mitocondria es una de las fuentes importantes de la producción de EROs, como resultado del subproducto del metabolismo aerobio, por lo que altos niveles provoca estrés celular esto

contribuye a una serie de condiciones patológicas por ejemplo daño por isquemia/reperfusión, enfermedades neurodegenerativas, aterosclerosis, entre otras⁶².

Los principales sitios de producción del radical superóxido en la cadena de transporte de electrones son el complejo I (sitios IQ y IF) y complejo III (sitio IIIQo), varios estudios previos han reportado que la mayor producción de superóxido es predominante en el extremo de la matriz mitocondrial para el complejo I, mientras que en el complejo III la producción se da tanto en la matriz y en el espacio intermembranal⁶³.

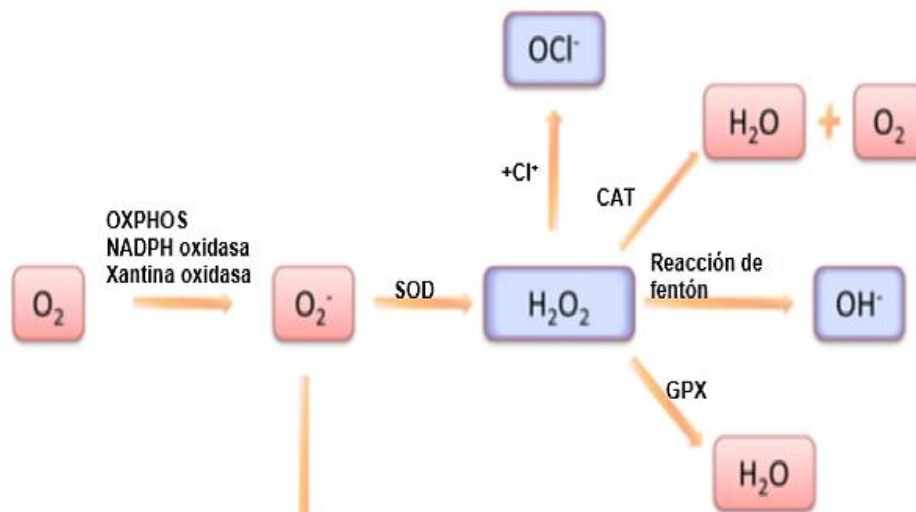


Figura 7. Producción de especies reactivas de oxígeno. La formación del radical superóxido ocurre, cuando el oxígeno acepta un electrón, reacción que se lleva a cabo en los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones y por las enzimas NADPH oxidasa y xantina oxidasa (XO). El peróxido de hidrógeno es formado por la enzima superóxido dismutasa (SOD); y es neutralizado por la enzima catalasa (CAT) que lo transforma en una molécula de agua y una molécula de oxígeno. La formación del radical hidroxilo se lleva a cabo por la reacción de Haber-Weiss entre el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno catalizada por un metal de transición. Esquema modificado de Shaerzadeh, et al. 2011⁶⁴.

4.12 Producción de EROs en el complejo I

El complejo I posee centros redox, flavin mononucleótido (FMN), que contienen la actividad catalítica de NADH deshidrogenasa; coenzima Q y ocho centros Fe-S

(N1a, N1b, N2, N3, N4, N5, N6a y N6b). La transferencia de electrones intermolecular a través de los centros redox del complejo I sigue una secuencia inicial desde NADH hasta el aceptor final la coenzima Q ⁶⁵.

En el Complejo I el superóxido es formado por dos sitios, el centro IF y centro IQ. En el centro IF se forma el superóxido por la transferencia de un electrón desde el FMNH₂ al oxígeno (O₂), el segundo mecanismo ocurre en el dominio de unión a la ubiquinona, cuando se realiza transporte inverso de electrones desde QH₂ a NAD⁺ ⁶⁶.

4.13 Producción de EROs en el complejo III

La generación de superóxido en el complejo III se lleva a cabo a través del ciclo Q, el cual acopla la transferencia de electrones de la ubiquinona al citocromo *c* con la translocación de protones para la síntesis de ATP. El ciclo inicia cuando los electrones transportados por el complejo I o II son cedidos a la ubiquinona (Q), reduciéndose a ubiquinol (QH₂), el cual interacciona con el centro Q_o del Complejo III, próximo al espacio intermembranal, el ubiquinol cede un electrón a la Ferro-Sulfo Proteína de Rieske, transformándose en semiquinona inestable (Q_o^{·-}). Ese electrón pasa a un citocromo *c*₁, y al citocromo *c*, para transportarse finalmente al complejo IV. El electrón de la semiquinona unida al sitio Q_o es cedido al citocromo *b* en donde pasa por dos grupos hemo *b*_L y *b*_H y de ahí al sitio Q_i próximo a la matriz mitocondrial, donde se encuentra una quinona, quien recibe el electrón formán una semiquinona estable (Q_i^{·-}) ⁶⁷.

Se han sugerido 2 sitios en los cuales se puede generar el superóxido dentro del mecanismo del ciclo Q, en los cuales se encuentran electrones desapareados y oxígeno. Uno de ellos es cuando la ubiquinona (Q_i) recibe el electrón del citocromo *b*_H y forma la semiquinona, un estado intermedio antes de formar el ubiquinol. En el otro sitio el ubiquinol (Q_o) pierde los protones y cede los electrones al citocromo *b*_L, en este punto se vuelve a formar una semiquinona que puede llevar un electrón desapareado y, en contacto con el oxígeno, se forma un radical superóxido ⁶⁸.

5 Planteamiento de problema

Las estatinas como inhibidores de la HMG-CoA reductasa forman parte de los tratamientos utilizados comúnmente en la clínica para un gran número de pacientes, con el objetivo de controlar los niveles altos de colesterol en el cuerpo y disminuir los problemas generados por esta condición en el organismo. Además de su función primaria, el efecto de las estatinas se extiende más allá de la regulación lipídica, presentan efectos secundarios benignos denominados pleiotrópicos, incluyen la mejora en la función endotelial, el aumento en la disponibilidad del óxido nítrico; tienen función antioxidante y antiinflamatoria; participan en la inmuno regulación; en la estabilización de placas ateroscleróticas, y su participación en la inhibición de la hipertrofia cardíaca.

Aunque ningún mecanismo explica por completo las múltiples ventajas ejercidas por las estatinas, la evidencia emergente sugiere en algunos modelos degenerativos cerebrales y en lesiones, que el deterioro mitocondrial puede estar desempeñando un papel importante en el desarrollo de estos problemas. Sin embargo, una evidencia que apoye la influencia de las estatinas sobre las proteínas mitocondriales aún no se tiene de manera clara. La disfunción mitocondrial puede aumentar la producción de radicales libres de oxígeno, que a su vez deja las células sensibles por la falta de la energía, desencadenando problemas tan graves como la apoptosis que podría resultar fatal para la célula.

Por tal motivo se plantea la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál será el efecto de la simvastatina sobre la proteína desacoplante tipo dos y su regulación en la formación de especies reactivas de oxígeno a nivel mitocondrial?

6 Hipótesis

Dadas las evidencias científicas que demuestran que la simvastatina inhibe la actividad de la HMG-CoA reductasa induciendo la disminución de los derivados isoprenoides utilizados en la modificación postraducciona proteica, lo cual desencadena una cascada de señalización dependiente de la inhibición de las GTPasas pequeñas, suponemos que la administración de simvastatina tendrá como consecuencia la regulación positiva de proteínas mitocondriales implicadas en la regulación de los niveles de radicales libres en la célula como son la UCP₂, SOD₂ y catalasa.

7 Objetivos

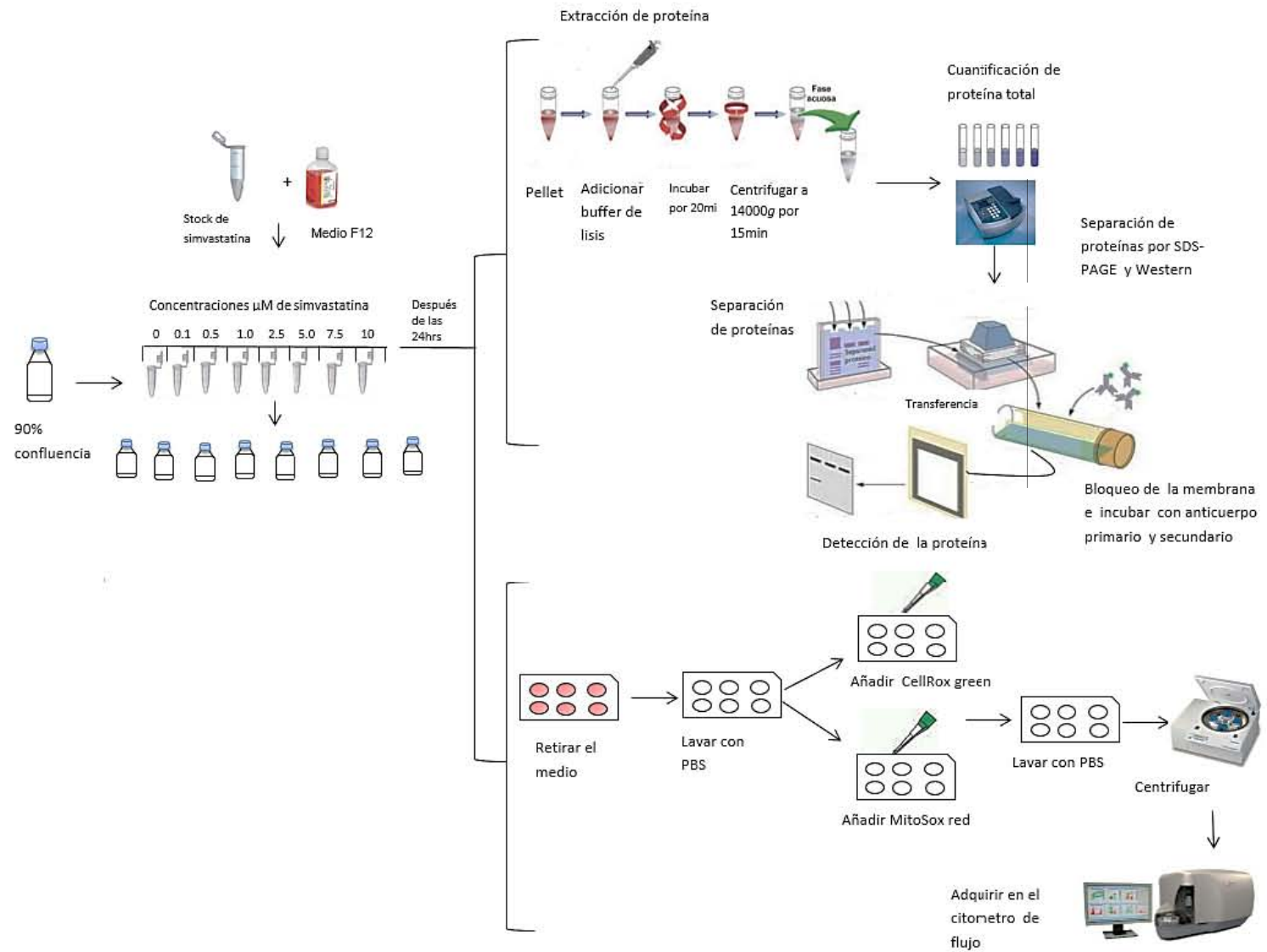
7.1 Objetivo general

- Evaluar el efecto de la simvastatina sobre la formación de especies reactivas a oxígeno a nivel mitocondrial en las células endoteliales de aorta de cerdo (PAE).

7.2 Objetivos particulares

- Analizar el efecto de diferentes concentraciones de simvastatina sobre la proteína desacoplante mitocondrial (UCP₂) además del efecto en las proteínas superóxido dismutasa (SOD₂) y catalasa mitocondrial, por western blot.
- Determinar la producción a nivel celular y mitocondrial de especies reactivas por citometría de flujo, usando el colorante fluorogénico MitoSox Red, cuando se somete a las células a diferentes concentraciones de simvastatina.
- Determinar qué efecto tiene la simvastatina a diferentes concentraciones, sobre la actividad de la enzima catalasa.
- Determinar el efecto de la simvastatina en la producción de radicales libres, en células sometidas a estrés oxidativo con H₂O₂, utilizando el colorante 2,7 diclorofluoresceína-diacetato (DCFH-DA), mediante la técnica de fluorescencia.

Esquema general de trabajo



8 Materiales y Métodos

8.1 Material Químico.

Se utilizó el medio Hams F12 (Biowest, Texas, USA), suplementado con una solución de antibióticos estreptomicina/penicilina al 1%, (Life Technologies, Grand Island, NY) y suero fetal bovino al 10% (SFB) (Thermo scientific, Logan, Utah, USA.). Se utilizó una solución de tripsina-EDTA (0.25%), rojo de feno (Gibco, USA).

La simvastatina, el dimetil sulfóxido (DMSO), el desoxicolato de sodio (DOC), el 2-mercaptoetanol, la 2'7'diclorofluoresceína diacetato (DCFDA), la N-etil-maleimida (NEM), el fenil-metano-sulfonil fluoruro (PMSF), la aprotinina, la leupeptina, el Tris, el TEMED, el stock de catalasa de hígado de bovino(2,000-5,000 unidades/mg proteína), FeCl₃, K₄Fe(CN)₆ 3H₂O 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 (California USA). La acrilamida y bis-acrilamida fueron de IBI Scientific. La leche fue Svelty libre de grasa de Nestle (Vevey Suiza). El Kit de quimioluminiscencia fue de Millipore (Temecula, CA). Los anticuerpos anti-VDAC, Anti-UCP2, Anti-SOD y anti-Catalasa fueron de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Los anticuerpos secundarios con HRP fueron de Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc. (West Grove, PA). Los colorantes fluorogénicos MitoSox™ Red y CellRox Green fueron de Life Technologies (Grand Island, NY).

8.2 Cultivo celular

Se utilizó la línea celular de aorta de cerdo (PAE). Proporcionada por el Dr. A. Sorkin (Universidad de Pittsburg). Se incubó la línea celular en condiciones de 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad en medio de cultivo Ham F-12 suplementado con suero fetal bovino y antibióticos. Las células fueron cultivadas en diferentes cajas de cultivo T25 y cajas Petri de 150 mm hasta llegar al 90% de confluencia.

8.3 Tratamiento con simvastatina

Cuando las células PAE alcanzaron un 50% de confluencia, se les administraron diferentes concentraciones de simvastatina, 0.0 µM, 0.1 µM, 0.5 µM, 1.0 µM, 2.5 µM, 5 µM, 7.5 µM y 10 µM y se dejaron incubar con este fármaco durante 24

horas hasta alcanzar un 90 a 100% de confluencia. Las dosis de simvastatina (0.1–10 μ M) utilizadas en este estudio están relacionadas con los niveles sanguíneos de simvastatina existentes en aquellos pacientes (peso de 70 kg y con un volumen de sangre de 5L) que ingieren dosis que van de 10 a 80 mg del fármaco⁶⁹.

8.4 Extracción de proteína total de los cultivos

Después de 24 horas de tratamiento con la estatina, se retiró el medio F12 a las células, se lavaron dos veces con buffer de fosfatos pH 7.4. A partir de aquí todo el proceso se llevó a cabo a 4°C. Se les agregó un buffer de lisis modificado de RIPA⁷⁰ constituido por 25 mM HEPES, 10 mM EGTA, 100 mM NaCl, 15 mM Imidazol, 10% Glicerol, 1% Triton-X100, pH=8.0; 2.5 mM PMSF, 10 ng aprotinina, 10 ng leupeptina, 1.25 mg/1 ml N-etilmaleimida, 7 mg/1 ml desoxicolato de sodio; y se dejó incubando durante 10 min en hielo. Se levantaron las células por raspado. Posterior al raspado, el lisado celular se colectó en un tubo eppendorf previamente marcado y frío. Se utilizó una jeringa de 1 ml para hacer pasar el lisado celular varias veces a través de una aguja para asegurar la ruptura celular total y se colocaron los tubos en un agitador orbital a 4°C durante 20 min. Posterior a la agitación, se centrifugó a 14000 rpm durante 10 min. a 4°C, se recuperó el sobrenadante que contenía la proteína total y se determinó la concentración de proteína por el método de Bradford.

Después de incubar las células durante 24 horas en las condiciones arriba mencionadas, se retiró el medio de cultivo de cada caja y se lavaron dos veces con buffer de fosfatos pH 7.4, posteriormente se despegaron las células de la caja con tripsina -EDTA (0.25%), a 37°C por 3 min, después se inactivó la tripsina con medio F12. El siguiente paso fue centrifugar la suspensión celular a 1200 rpm por 3 minutos, pasado el tiempo de centrifugación se retiró el sobrenadante y se suspendió el paquete con PBS IX para quitar el medio completamente, después se centrifugó a 900 rpm por 5 min. A partir de aquí todo el proceso se llevó a cabo a 4°C. Se adiciono 100 μ L del buffer de lisis modificado de RIPA constituido por 25 mM HEPES, 10 mM EGTA, 100 mM NaCl, 15 mM Imidazol, 10% Glicerol, , pH=8.0; 2.5 mM PMSF, 10 ng aprotinina, 10 ng leupeptina, 1.25 mg/1 ml N-

etilmaleimida; Se utilizó una jeringa de 1ml para hacer pasar el lisado celular varias veces a través de una aguja para asegurar la ruptura celular total y se colocaron los tubos en un agitador orbital a 4°C durante 20 min. Posterior a la agitación, se centrifugó a 14000 rpm durante 10 min a 4°C

8.5 Determinación de proteína

La cuantificación de proteína se llevó a cabo por el método de Bradford (Bradford MM.1976). Este método se lleva a cabo midiendo la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro (Eppendorf). En el cuadro se muestra el mecanismo de determinación.

Cuadro 2. Método de cuantificación de proteína

Tubo	Albúmina [1 mg/mL] (mL)	Muestras (mL)	H ₂ O (mL)	Reactivo Bradford (mL)	Buffer de Lisis (mL)
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	-----

El tubo 1 es el blanco, los tubos 2 a 5 corresponden a la curva patrón de albúmina y del tubo 6 en adelante se agregaron los lisados celulares. Siempre se utilizó una alícuota de albúmina nueva

8.6 Separación de proteínas por SDS- PAGE

Para la determinación de las proteínas catalasa, SOD₁, SOD₂ y α-actina, se utilizaron 50 µg de proteína total, separada mediante electroforesis, de acuerdo al método de Laemmli⁷¹, se adiciono buffer de carga (4% SDS, 0.125 M Tris-HC (pH 6.8), glicerol 20% v/v, 0.02 g azul de bromofenol y 0.2% 2- mercaptoetanol) a las muestras a una concentración final de 1X, con respecto al volumen de muestra, previamente calculado por espectrofotometría. Posteriormente se mezclaron las muestras contenidas en tubos eppendor de 0.5 ml y se incubaron a 100°C por 5 minutos. Las proteínas desnaturalizadas incluyendo los estándares de peso molecular se cargaron en un gel de electroforesis en diferentes carriles. El

gel de electroforesis está formado por un gel separador a una concentración del 12% o al 15% dependiendo del tamaño de la proteína a detectar, y un gel concentrador al 4% (Cuadro 3). Finalmente se hizo pasar un voltaje de 40 Volts durante 15 min, para concentrar la muestra y después se aumentó el voltaje a 100 Volts durante 2.5 horas aproximadamente.

Cuadro 3. Composición del gel separador y concentrador

Reactivos	Gel separador		Reactivos	Gel Concentrador 40%
	12%	15%		
Reactivos	12%	15%		
Acrilamida / Bis-acrilamida (40%)	3.0 mL	3.75 mL	Bis/Acrilamida 40%	400 µL
Tris 1.5M, (pH=8.8)	2.5 mL	2.5 mL	Tris 1.5M, (pH=6.8)	300 µL
H ₂ O milli Q	4.35 mL	3.6 mL	H ₂ O milli Q	2.4mL
SDS 10%	100 µL	100 µL	SDS 10%	50 µL
Persulfato de amonio(APS) 10%	50 µL	50 µL	Persulfato de amonio(APS) 10%	21µL
TEMED 100%	6 µL	6 µL	TEMED 100%	5 µL

Se realizaron cálculos para un volumen de 10 mL del gel separador y para un volumen de 4 mL del gel concentrador, los vidrios con espaciador de 1.5 mm de espesor

8.7 Transferencia y bloqueo de membranas

Posterior a la electroforesis, las proteínas separadas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa utilizando el método descrito por Towbin⁷². La transferencia se llevó a cabo utilizando una cámara húmeda (Bio-Rad Laboratories, Inc.) con buffer de transferencia (25 mM Trisma base, 195 mM Glicina, 10% Metanol, pH 8.3), las condiciones de transferencia cambiaron de acuerdo al tamaño de la proteína a detectar, y se realizó con agitación constante y a 4 °C.

Después de la transferencia, las membranas fueron bloqueadas con una solución de TBS-Tween (20 mM Trisma base, 150 mM NaCl, pH 7.5, 0.1% Tween-20) más 5% de leche libre de grasa (Svelty) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente.

8.8 Incubación con anticuerpos

Después del bloqueo, las membranas se lavaron tres veces con TBS-Tween por 5 min, la identificación de las proteínas se llevó a cabo incubando con anticuerpos primarios específicos a cada membrana por 24 horas a 4°C. Posterior a la incubación, se lavaron las membranas 3 veces durante 10 minutos con TBS-Tween y se incubaron con el anticuerpo secundario, dilución 1:10000, unido a peroxidasa diluido en TBS-Tween (Cuadro 4).

Cuadro 4. Anticuerpos primarios

Anticuerpo	Isótipo	Tipo	Dilución
Ac- α -actina	Mouse IgG	Monoclonal	1:1000
Ac-SOD 1	Goat IgG	Policlonal	1:1000
Ac-SOD 2	Goat IgG	Policlonal	1:1000
Ac-Catalasa	Rabbit IgG	Policlonal	1:1000

Se muestra los anticuerpos (Ac) primarios utilizados, así como su dilución 1:1000 en TBS-T, además la forma en que se obtuvieron los Ac (policlonal y monoclonal).

8.9 Revelado de las membranas

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 min 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) con la membrana en un cuarto oscuro a diferentes tiempos hasta obtener la mejor imagen, después de revelar, lavar y fijar el film.

8.10 Ensayo de la actividad de catalasa

La detección la actividad de la catalasa se llevó a cabo siguiendo la reducción del peróxido de hidrogeno. En este ensayo se utilizaron 50 μ g de proteína total, separadas por tamaño y carga mediante electroforesis nativa. Primero se adiciono buffer de carga 1X (0.125 M Tris-HC (pH 6.8), glicerol 20% v/v, 0.02 azul de bromo-fenol) a las proteínas. Se cargaron las proteínas en un gel de electroforesis nativo al 10 %, incluyendo un control positivo de enzima catalasa (1ng/ μ L). Se le

aplicó un voltaje de 80 Volts durante 1 hora, para concentrar la muestra y después se aumentó el voltaje a 140 Volts durante dos horas y media aproximadamente para separar las proteínas. Al finalizar la electroforesis el gel se colocó en un recipiente y se realizaron tres lavados con agua destilada por 5 min. Para el revelado el gel se incubó previamente con una solución de peróxido de hidrogeno (0.015%) a temperatura ambiente y con agitación, inmediatamente después se utilizó una solución de revelado (ferrocianuro de potasio y cloruro férrico al 1%) hasta que se observaron las bandas en el gel, por último se inactivo esta reacción utilizando agua, el gel obtenido se analizó por densitometría usando el Software Image J (NIH).

8.11 Producción de EROs por fluorescencia

Con el fin de detectar la producción de EROs de la línea celular PAE se utilizó el colorante diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA), debido a su capacidad de difundir libremente a través de la membrana plasmática, el DCF-DA es desesterificado en el citosol por esterasas inespecíficas, generando un compuesto DCFH que puede ser oxidado por los radicales libres⁷³. El colorante se detecta por fluorescencia a través de fuentes de excitación y filtros específicos (Figura 8).

Primero, se prepararon 900µL de DCFH-DA (10µM) con DMSO. Posteriormente, se retiró el sobrenadante del cultivo, se lavaron las células con 500µL de PBS y se agregó 1µL/ pozo de DCFH-DA, se incubó a 37°C por 40 minutos. Después, nuevamente se lavaron dos veces las células con 500µL de PBS y se agregaron 500µL de tripsina (1X), que se incubó durante 3 minutos a 37°C, se neutralizó la reacción con medio F12. Por último las células se centrifugaron a 1200rpm durante 3 minutos. Posteriormente, el botón celular se resuspendió en 1mL de PBS de cada muestra.

Se cuantificó el número total de células con la cámara de Neubauer. El conteo de las células se llevó a cabo en los cuatro cuadrantes para leucocitos. 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. Después de

determinar la fluorescencia inicial en cada tratamiento se adicionaron 82 mM de peróxido de hidrógeno, y se determinó el cambio de la velocidad de oxidación del DCF para cada tratamiento. Durante el proceso se utilizó un fluorómetro FluoroMax Series (Horiba Scientific) a una longitud de onda (λ) de excitación de 475 nm y una λ de emisión de 525 nm.

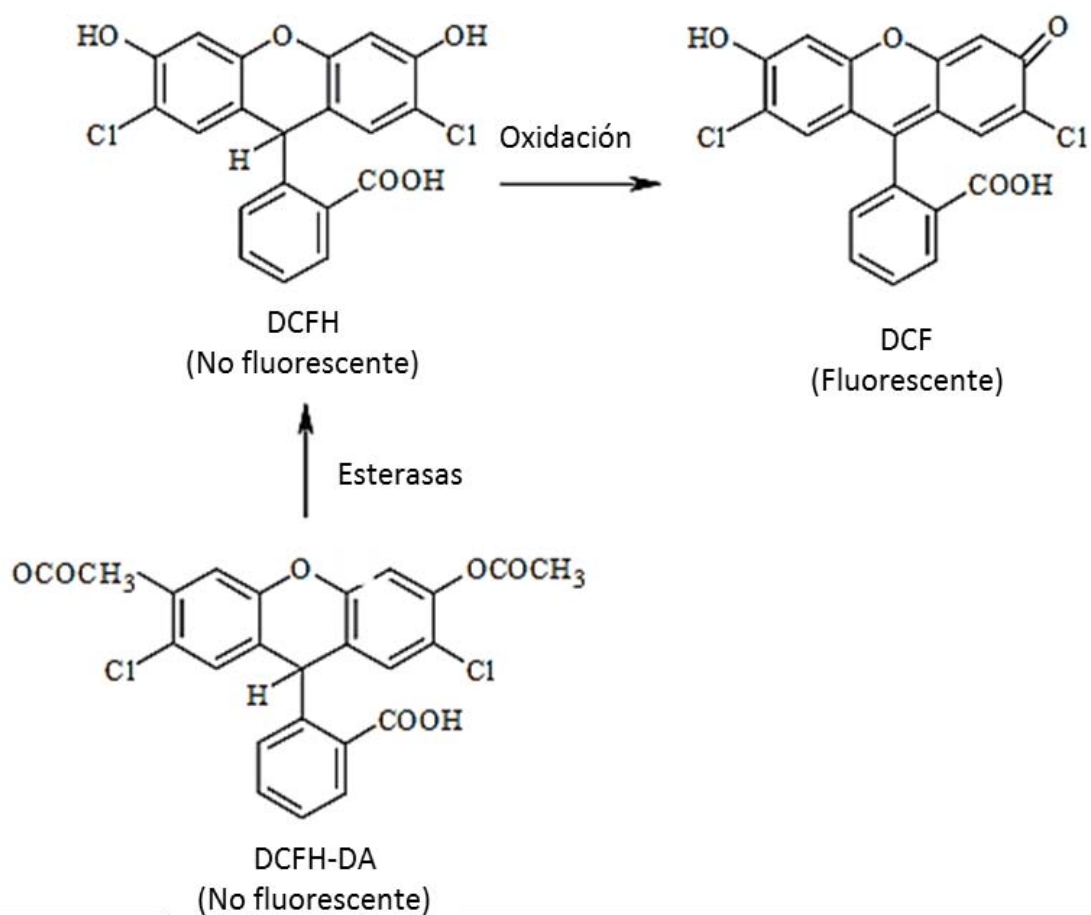


Figura 8 Estructura molecular del DCFH-DA y su mecanismo de oxidación. En la figura se muestra la estructura del compuesto diacetato de 2,7-dichlorodihydrofluoresceína diacetato (DCFH-DA). Tras la disociación de los grupos de acetato del DCFH-DA se transforma en el compuesto 2,7-dichlorodihydrofluoresceína (DCFH), y posterior a su oxidación se convierte en una molécula altamente fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF).⁷⁴

Para determinar el efecto de los agonistas (ácido oleico y fenofibrato) y el antagonista (BADGE) de PPARs sobre los niveles de radicales libres, la línea celular PAE se cultivó en 4 condiciones que se muestra en el cuadro 5, durante 24 horas, pasado este tiempo se despegaron de las placas de 6 pozos de la siguiente manera. Primero se retiró el medio de cultivo de cada pozo, después; se adiciono 500µL de PBS para retirar el exceso de medio F12, posteriormente se añadieron 500 µL de tripsina 1X a las células y se incubaron durante 3 min a 37°C. Pasado este tiempo se inactivó la tripsina con 500 µL de medio F12 suplementado con suero fetal bovino y antibióticos. La suspensión celular obtenida se centrifugó a 900rpm por 5 minutos. Por último las células provenientes de cada una de las 4 condiciones se determinaron la velocidad de oxidación del colorante DCFH-DA por la técnica de fluorescencia, descrito anteriormente.

Cuadro 5 Condiciones de cultivo

Condición	Concentración final
Simvastatina	0.1, 2.5, 1.0µM
Ácido oleico	20,40,60,80,100µM
Fenofibrato	50,100, 200 µM
BADGE	50,100,200 µM

Para determinar el efecto del ácido oleico, se seleccionaron dos concentraciones de simvastatina 0.1 y 2.5µM. De la misma forma para determinar el efecto del Fenofibrato y BADGE, se incubaron las células con 1µM de simvastatina.

8.12 Detección de especies reactivas de oxígeno por citometría de flujo

La técnica de citometría de flujo es un método de medición de la dispersión de la luz y la fluorescencia que poseen las células o partículas suspendidas en líquido conforme se las hace pasar a través de una fuente de luz, permitiendo medir múltiples parámetros celulares como, el tamaño, forma, complejidad y cualquier componente celular o función que pueda ser marcada con un fluorocromo (Figura 9)⁷⁵

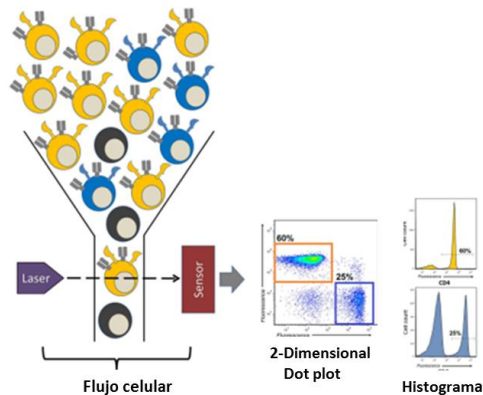


Figura 9. Esquema detección por citometría de flujo. En el momento de realizar las mediciones en el citómetro de flujo, las células en suspensión pasan en forma lineal, frente a un láser mediante un flujo continuo, cada célula, a la vez dispersa la luz, emite fluorescencia como consecuencia de la excitación del láser. Posteriormente el sistema electrónico se encarga de la cuantificación de los destellos de fluorescencia y de la luz dispersada y bajo el control del ordenador se encarga de amplificar la señal permitiendo almacenar los datos. Los datos generados se pueden representar en forma de histograma o en gráficos de puntos (Dot plot). Esquema modificado de Verschoor C, 2015.⁷⁵

Para la determinación de EROs por citometria de flujo se utilizaron dos colorantes fluorescentes MitoSox Red⁷⁶ y CellRox Green⁷⁷ (Life Technologies Grand Island, NY). Ambos indicadores son agentes que tienen la capacidad de difundir a través de la célula que en presencia de radicales libres se oxidan y emiten una fuerte señal fluorogénica. El colorante Mito Sox Red es un fluoroforo que se acumula específicamente en la mitocondria por lo tanto cualquier cambio en la señal emitida por esta molécula, es directamente relacionada con la actividad mitocondrial en relación a la producción de anión superóxido (Figura 10).

Primero se prepararon 900µL de MitoSox Red (5µM) y CellRox Green (5µM) respectivamente. Posteriormente se retiró el sobrenadante de los cultivos, se lavaron las células con 500µL de PBS y se agregó 1µL /pozo de MitoSox Red para detectar el superóxido, se incubó a 37°C durante 10 minutos. Con respecto al colorante CellRox Green para la detección de peróxido de hidrógeno, se incubó a 37°C durante 40 minutos. Después, nuevamente se lavaron las células con 500µL de PBS para retirar el exceso de los colorantes. Posteriormente las células fueron incubadas a 37°C por 3 minutos con tripsina (1X) para despegarlas de la caja de cultivo y la tripsina se inactivó con medio F12, la suspensión celular se centrifugó a 900 rpm durante 5 minutos. Se desechó el sobrenadante y se realizó un lavado

con 1 mL de PBS al botón celular, después se centrifugó a 900 rpm por 5 minutos, terminado el tiempo de centrifugación se decantó el sobrenadante y se resuspendió en 500 μ L en tubos para citometría de flujo previamente etiquetados y envueltos en papel aluminio. Finalmente las muestras se adquirieron en el Citómetro de Flujo FACScan (Becton Dickinson Co. California USA), 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 Modifit (Becton Dickinson Facscalibur).

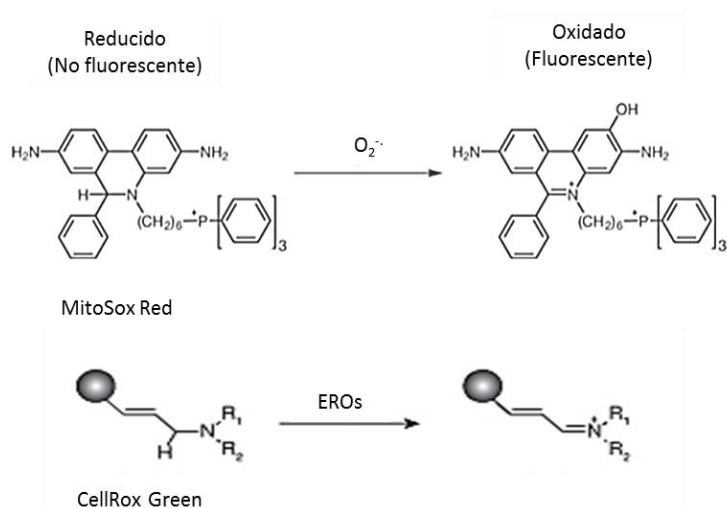


Figura 10 . Estructuras moleculares de MitoSox Red y CellRox Green en su forma reducida y oxidada.

8.13 Análisis Estadístico

El análisis estadístico para las diferentes condiciones experimentales se calculó mediante la prueba de ANOVA para grupos paramétricos. Se utilizó el programa Sigma Plot 11.0, Jandel Corporation, para el análisis estadístico. Los resultados numéricos representan la media \pm Error Estándar. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

9 Resultados

9.1 Efecto de la simvastatina sobre la expresión de la proteína UCP2

En resultados obtenidos en el laboratorio se había demostrado que la simvastatina posiblemente tiene un efecto sobre la expresión de las proteínas desacoplantes. Debido a esto, se determinaron los niveles de expresión de UCP2 en la línea celular PAE en diferentes concentraciones de simvastatina. En la Figura 11 se observa una imagen representativa de Western Blot donde se muestra que al utilizar 0.1, 0.5, 1.0 y 2.5 μM de simvastatina hay un aumento en la expresión de UCP2. El análisis densitométrico corrobora lo observado en la imagen, y demuestra que el aumento es significativo, con $p < 0.05$ en las concentraciones 0.5, 1.0 y 2.5 μM de simvastatina, observándose un pico máximo de expresión a 0.5 μM .

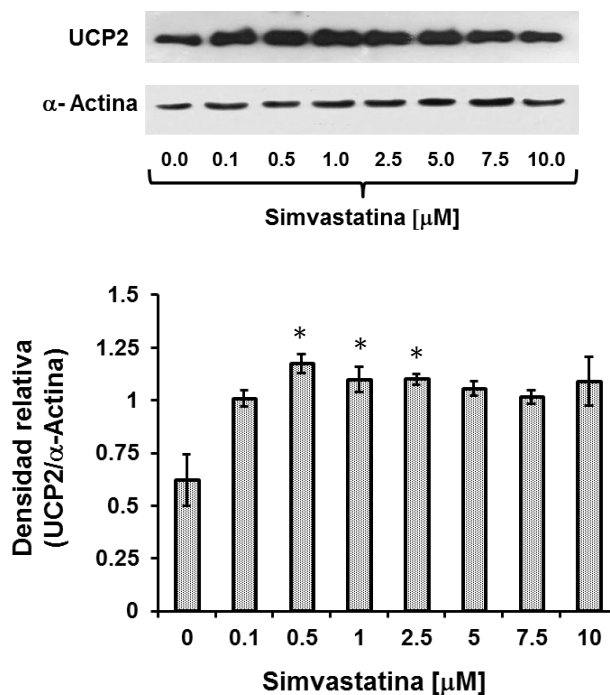


Figura 11. Expresión de la proteína UCP2 en la línea celular PAE en a diferentes concentraciones de simvastatina. En la figura se muestra la imagen de un Wester Blot, donde se observa la expresión de la proteína UCP2 después de incubar con el anticuerpo monoclonal anti-UCP2, dilución 1:1000; el gráfico muestra el efecto final del tratamiento expresado en unidades de densidad relativa y comparado con la proteína α -actina utilizada como control de carga. La densidad relativa se obtuvo utilizando programa Image J (NIH). En cada columna se muestra la Media \pm ES. *, ANOVA, $p < 0.05$, $n = 3$, comparados con las células tratadas con DMSO, 0.0 μM simvastatina.

9.2 Oxidación del DCF en presencia de peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones de simvastatina

Para establecer el efecto protector de la simvastatina en contra del estrés oxidativo, posiblemente ligado a la activación de UCP₂. Se determinó la velocidad de oxidación del DCF en las diferentes concentraciones de simvastatina (Figura 12). Se observó que tras agregar peróxido de hidrógeno, la velocidad de oxidación del DCF disminuyó de manera significativa ($p < 0.05$), en las concentraciones 0.5 y 1.0 μM de simvastatina. Lo cual coincide con el aumento observado sobre la expresión de UCP2 (Figura 11).

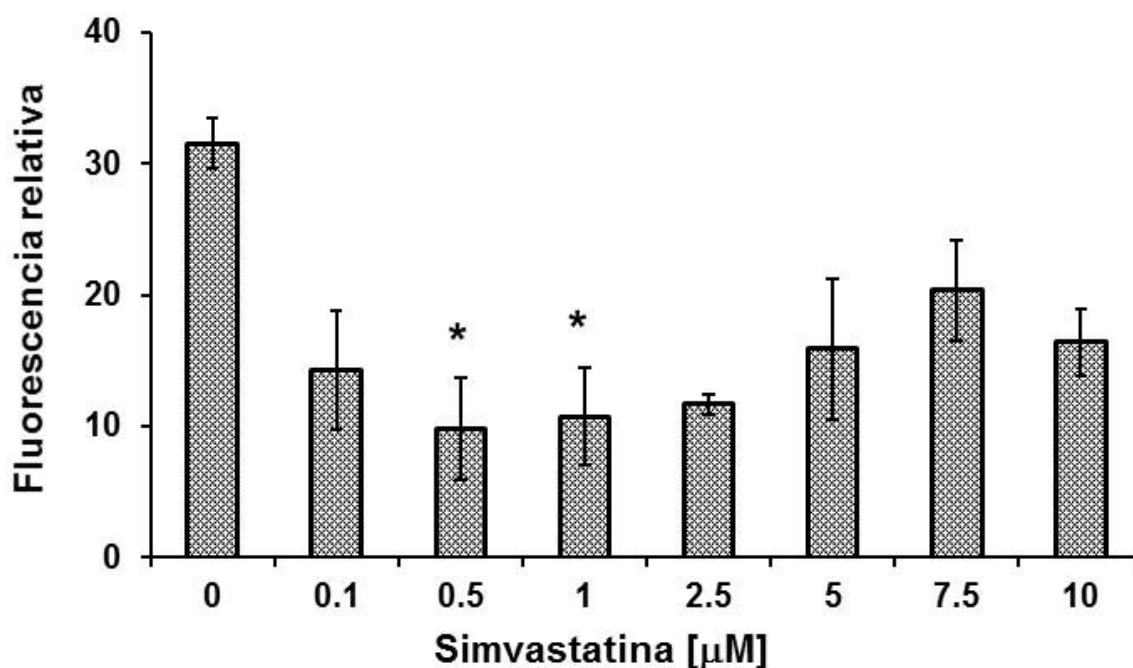


Figura 12. Efecto de la simvastatina sobre la velocidad de oxidación del DCF. Se determinó la velocidad de oxidación del DCF después de agregar 82 mM de H₂O₂ por fluorescencia, en cada experimento se utilizaron 100,000 células que se leyeron a 475 nm de excitación y 525 nm de emisión. En el gráfico se muestra los datos expresados como la Media \pm ES; n = 3, *, $p < 0.05$, ANOVA, comparado con el experimento control.

9.3 Efecto de los agonistas y antagonistas de PPARs en los niveles de radicales libres a diferentes concentraciones de simvastatina

Uno de los mecanismos de regulación de la expresión de la proteína desacoplante UCP₂ es a través de los factores de transcripción conocidos como PPARs. Los PPARs son regulados por agonistas naturales y artificiales, como son los ácidos grasos poliinsaturados y los fibratos. De tal manera, que una forma indirecta de

determinar si la proteína UCP₂ pudiera estar participando en la regulación de los niveles de radicales libres en presencia de simvastatina es utilizando agonistas o antagonistas de PPARs.

Para tal efecto, se utilizó en un primer experimento, al ácido oleico como agonista natural, en dos concentraciones de simvastatina, 0.1 μM (Figura 13a), donde el efecto sobre la disminución de la producción de radicales libres era muy marcada, y 2.5 μM de simvastatina (Figura 13b), donde el efecto sobre la síntesis de radicales libres va disminuyendo; y determinamos la velocidad de oxidación del DCF después de someter a estrés oxidativo (H₂O₂) las células.

En la Figura 13a, a 0.1μM de simvastatina se observó que la velocidad de oxidación del DCF se mantiene prácticamente estable sin importar la concentración de ácido oleico utilizada. Mientras que cuando la concentración de simvastatina de 2.5 μM, el aumento de la concentración de ácido oleico (100μM) provocó un aumento significativo ($p < 0.5$) en la velocidad de oxidación del DCF.

Por otra parte se observa que al utilizar 2.5μM de simvastatina el ácido oleico también tiene un efecto citotóxico en la célula a altas concentraciones (Figura 13b), efecto que no se observa al emplear 0.1 μM de simvastatina (Figura 13a).

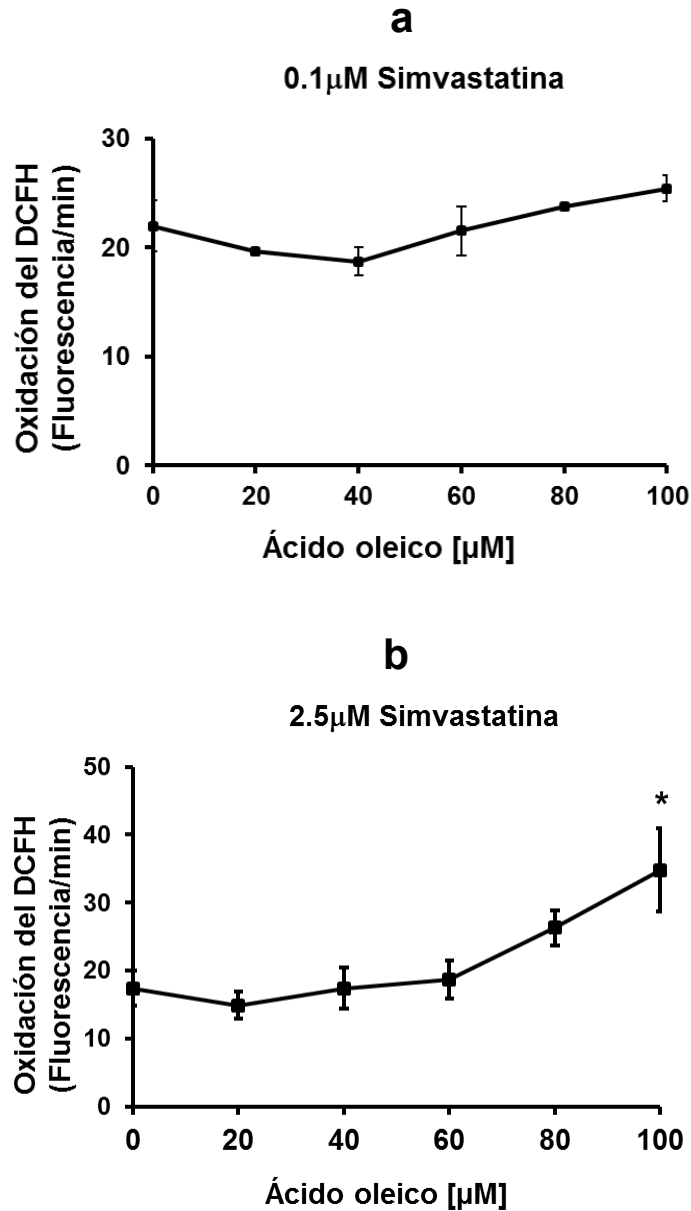


Figura 13. Efecto del ácido oleico sobre la velocidad de oxidación del DCF a dos concentraciones diferentes de simvastatina. Determinación de la velocidad de oxidación del DCF a diferentes concentraciones de ácido oleico después de agregar 82 mM de H_2O_2 . Se utilizaron 100,000 células por experimento, se leyeron a las longitudes de onda de excitación 475 nm y emisión 525 nm. a, células incubadas con 0.1 μ M de simvastatina; b, células incubadas con 2.5 μ M de simvastatina. En el grafico se muestra los datos expresados como la Media \pm ES; n = 3, *, $p < 0.05$, ANOVA, comparado con el experimento control.

Del mismo modo, se utilizó el agonista fenofibrato en la determinación de la velocidad de oxidación del DCF, utilizando una concentración de 1 μ M de simvastatina. En este experimento se observó que la simvastatina protege a las células de los radicales libres (Figura 14). Además, se observó que no existe

ningún cambio en la velocidad de oxidación del DCF en cualquier concentración de fenofibrato utilizada después de someter a las células a estrés oxidativo por la adición de H₂O₂ (Figura 14 a).

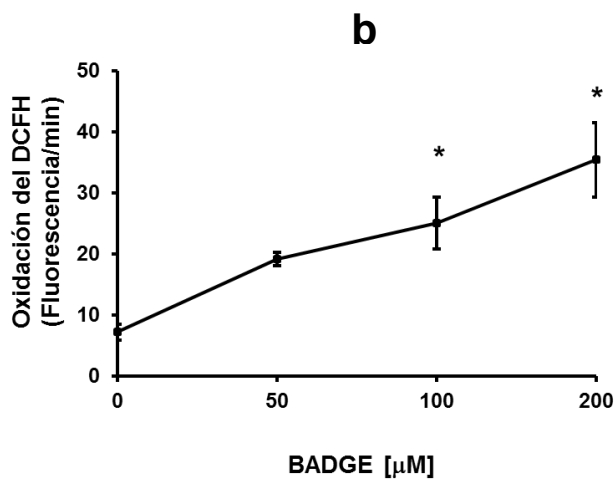
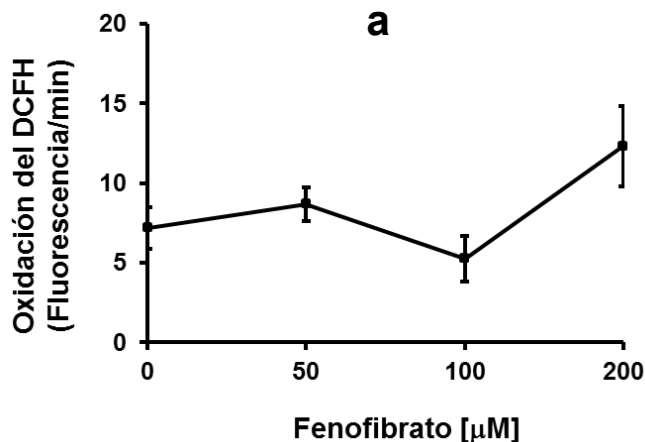


Figura 14. Efecto del fenofibrato y el BADGE sobre la velocidad de oxidación del DCF a 1 μM de simvastatina. a, velocidad de oxidación del DCF a diferentes concentraciones de Fenofibrato, después de agregar 82 mM de H₂O₂. b, velocidad de oxidación del DCF a diferentes concentraciones de BADGE, después de agregar 82 mM de H₂O₂. Se utilizaron 100,000 células por experimento, se leyeron a las longitudes de onda de excitación 475 nm y emisión 525 nm. En el gráfico se muestra los datos expresados como la Media \pm ES; n = 3, *, p < 0.05, ANOVA, comparado con el experimento control.

Tras analizar el efecto de los agonistas de PPARs, (ácido oleico y el fenofibrato) se analizó el efecto del antagonista BADGE (Bisphenol A diglycidyl ether), utilizando la misma concentración de simvastatina del análisis de fenofibrato (Figura 14b). Observando que en las concentraciones 100 y 200 μM de BADGE se

estimuló la oxidación del DCF de manera significativa ($p < 0.05$), con un aumento en la producción de radicales libres.

9.4 Efecto de la simvastatina sobre los niveles de expresión de SOD

Después de observar el efecto de la simvastatina sobre los niveles de radicales libres y de hacer notar la importancia de la proteína desacoplante mitocondrial UCP₂ en esta regulación. Se determinó el efecto de la simvastatina sobre la superóxido dismutasa (Mn-SOD mitocondrial y la Cu/Zn-SOD citosólica).

Se observó una tendencia de aumento en los niveles de expresión de la proteína Cu/Zn-SOD citosólica (SOD₁) al utilizar simvastatina en concentraciones 0.1, 0.5 y 2.5 μM con respecto al control (Figura 15 a). Además se observó un aumento significativo ($p < 0.05$) en los niveles de expresión de la enzima Mn-SOD mitocondrial (SOD₂), en las concentraciones 0.1, 0.5, 2.5 μM con respecto a su control (Figura 15b).

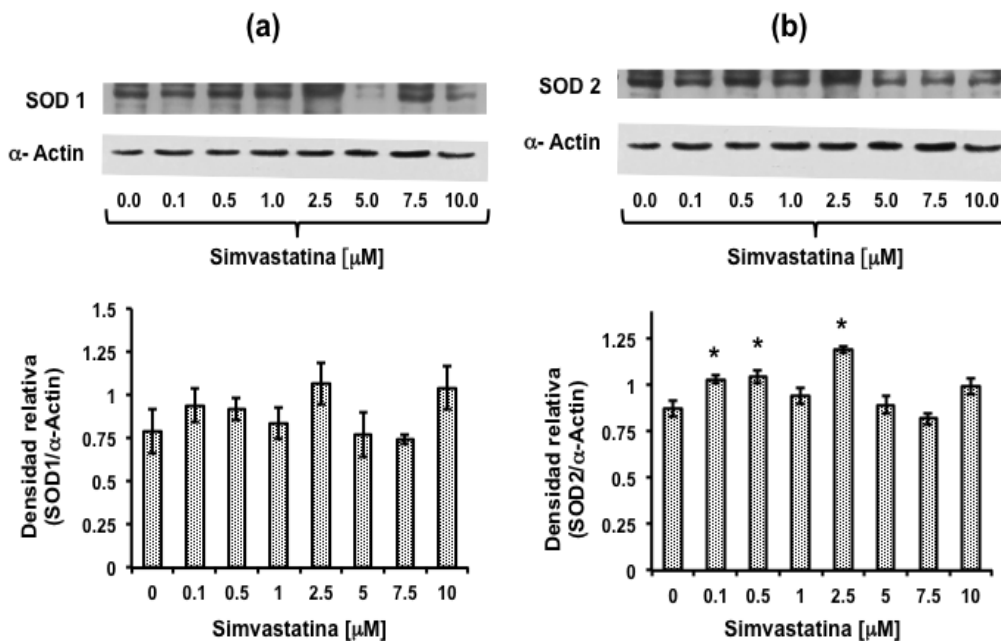


Figura 15. Expresión de Mn-SOD mitocondrial y la Cu/Zn-SOD citosólica a diferentes concentraciones de simvastatina. En la Figura 12a, se muestra la expresión de la proteína Cu/Zn-SOD citosólica y la Figura 12b, muestra la expresión de SOD mitocondrial. El gráfico muestra el efecto final del tratamiento expresado en unidades de densidad relativa y comparada con la proteína α -actina utilizada como control de carga. La densidad relativa se obtuvo utilizando programa Image J (NIH). En cada columna se muestra la Media \pm ES. *, ANOVA, $p < 0.05$, $n = 3$, comparados con las células tratadas con DMSO, 0.0 μM simvastatina.

9.5 Efecto de la simvastatina sobre la expresión y actividad de la Catalasa

Se observó un aumento en la expresión de la enzima (no significativo) bajo las diferentes concentraciones de simvastatina excepto en la concentración 7.5 μM (Figura 16 a). Por otra parte, cuando se midió la actividad de la enzima en un gel nativo, se observó un aumento significativo ($p < 0.05$) en la actividad de la enzima, cuando la concentración de simvastatina fue de 0.5 μM (Figura 16b).

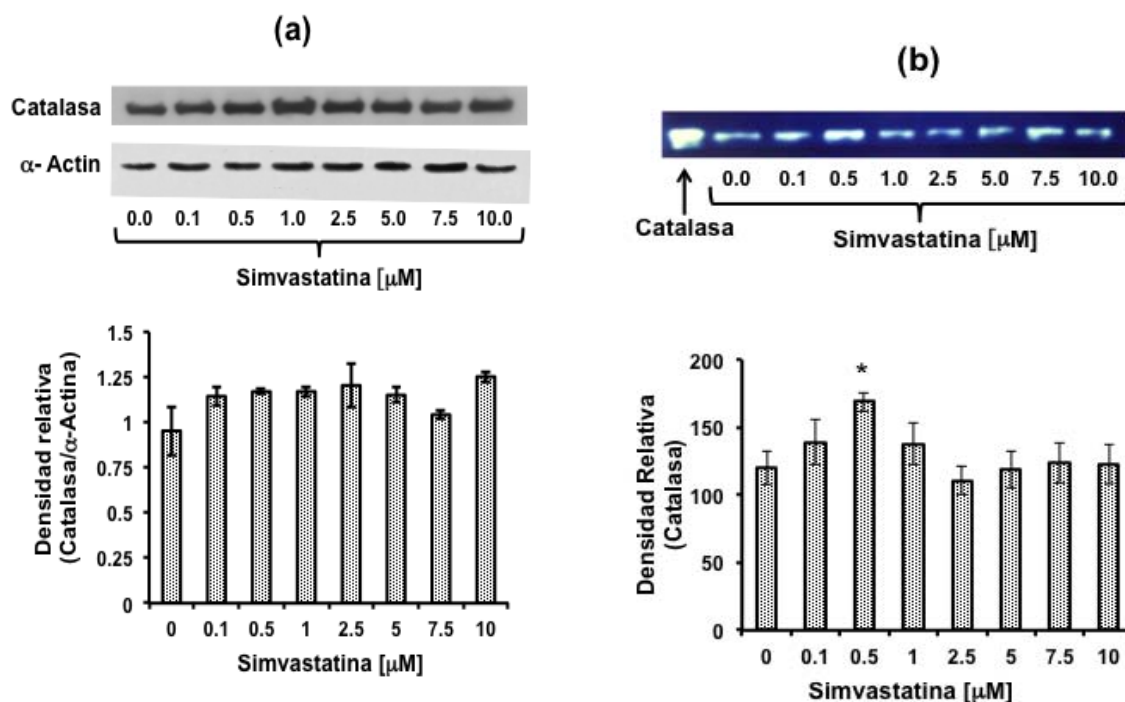


Figura 16. Expresión y actividad de la catalasa a diferentes concentraciones de simvastatina. En la figura 13a, se muestra la expresión de la proteína catalasa después de incubar con el anticuerpo policlonal anti-catalasa, dilución 1:1000; y la Figura 13b, se observa la actividad de la catalasa obtenida en un gel nativo al 10 %, revelada por la reducción del peróxido de hidrógeno. Los gráficos en cada imagen muestran el efecto final del tratamiento expresado en unidades de densidad relativa. La densidad relativa se obtuvo utilizando programa Image J (NIH). En cada columna se muestra la Media \pm ES. *, ANOVA, $p < 0.05$, $n = 3$, comparados con las células tratadas con DMSO, 0.0 μM simvastatina.

9.6 Determinación de radicales libres con el fluorocromo CellRox Green a diferentes concentraciones de simvastatina

Para corroborar el efecto observado con el DCF sobre la disminución de los niveles de radicales libres, así como, la disminución de la oxidación del DCF en la línea celular PAE, se midieron los radicales libres con el indicador fluorescente CellRox Green, que al igual que el DCF es sensible a radicales libres e ingresa

libremente al citosol de las células por sus características fisicoquímicas de hidrofobicidad.

Durante la citometría de flujo, se observó claramente la diferencia por desplazamiento en la fluorescencia, entre las células que no fueron incubadas con indicador y las células control incubadas con CellRox Green (Figura 17a y 17b). Sin embargo, lo más importante es que al igual que con el DCF con CellRox Green también se observa una disminución en los niveles de radicales libres presentes en la célula, efecto que se nota por el desplazamiento hacia la izquierda que tienen las células tratadas con simvastatina (Figuras 17 c – i).

9.7 Determinación de especies reactivas a oxígeno en la mitocondria con el fluorocromo MitoSox Red a diferentes concentraciones de simvastatina

Por último se analizó si la disminución de los radicales libres causada por la simvastatina podría suceder a nivel mitocondrial utilizando la oxidación del colorante MitoSox Red (Figura 18). Observando una diferencia por desplazamiento de la fluorescencia hacia la derecha, entre las células no incubadas con indicador y las células control incubadas con MitoSox (Figura 18a y 18b).

Lo cual indica una disminución en los niveles de anión superóxido liberado por la mitocondria, Figuras 15 c – i. Estos resultados corroboran la participación de la mitocondria con la regulación de los niveles de radicales libres en la célula en presencia de simvastatina.

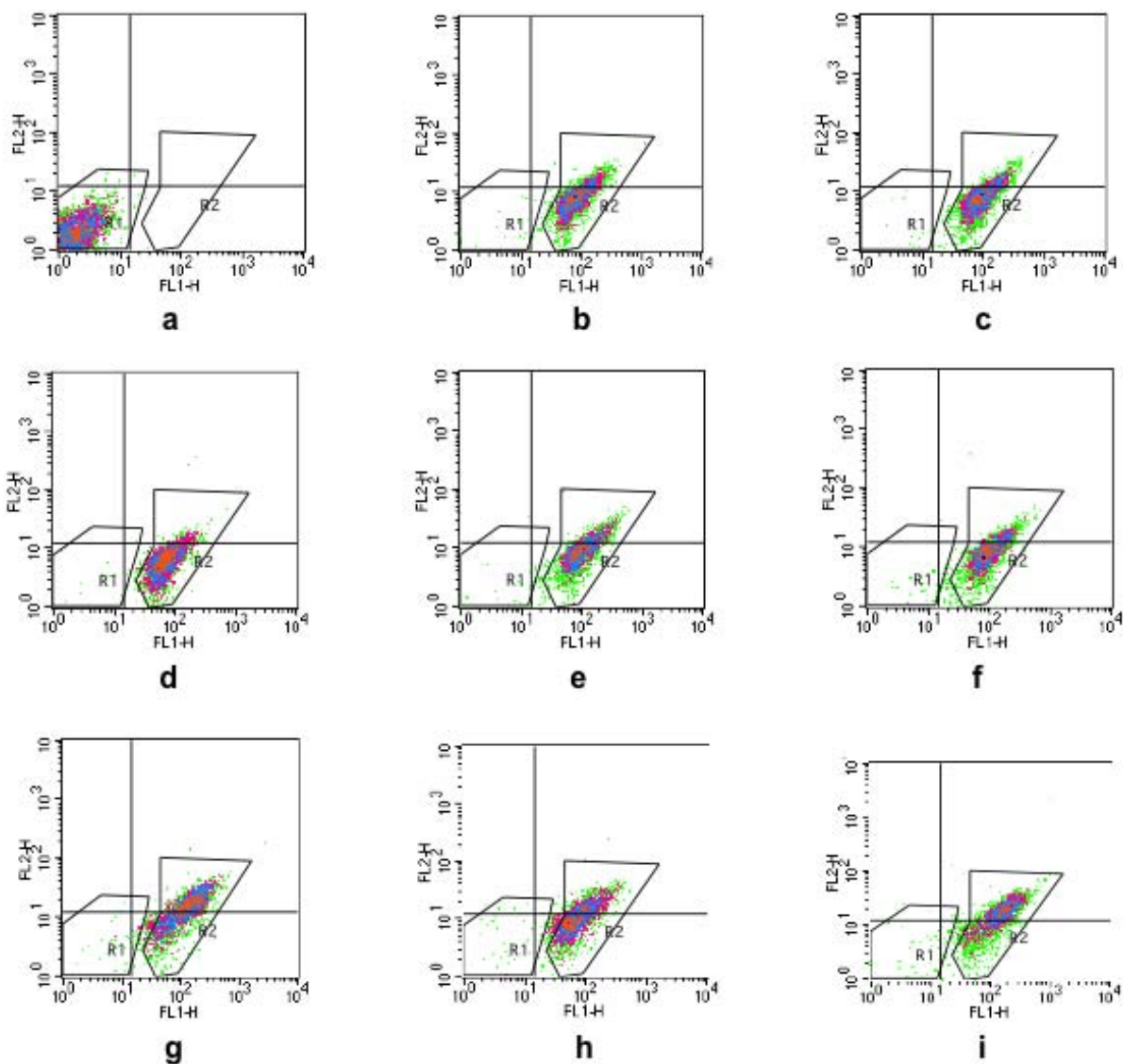


Figura 17. Determinación de radicales libres con el fluoróforo Cell Rox Green a diferentes concentraciones de Simvastatina. Se determinó la producción de radicales libres por citometría de flujo. El análisis se realizó por regiones (R1 y R2) en los diagramas FL1/FL2 de un experimento representativo de la producción de EROs, donde: a, solo células, b, 0 μM simvastatina + CellRox, de c - i, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10 μM simvastatina, + CellRox. Se adquirieron 3000 eventos y se leyeron a las longitudes de onda de excitación (485nm) y emisión (520nm).

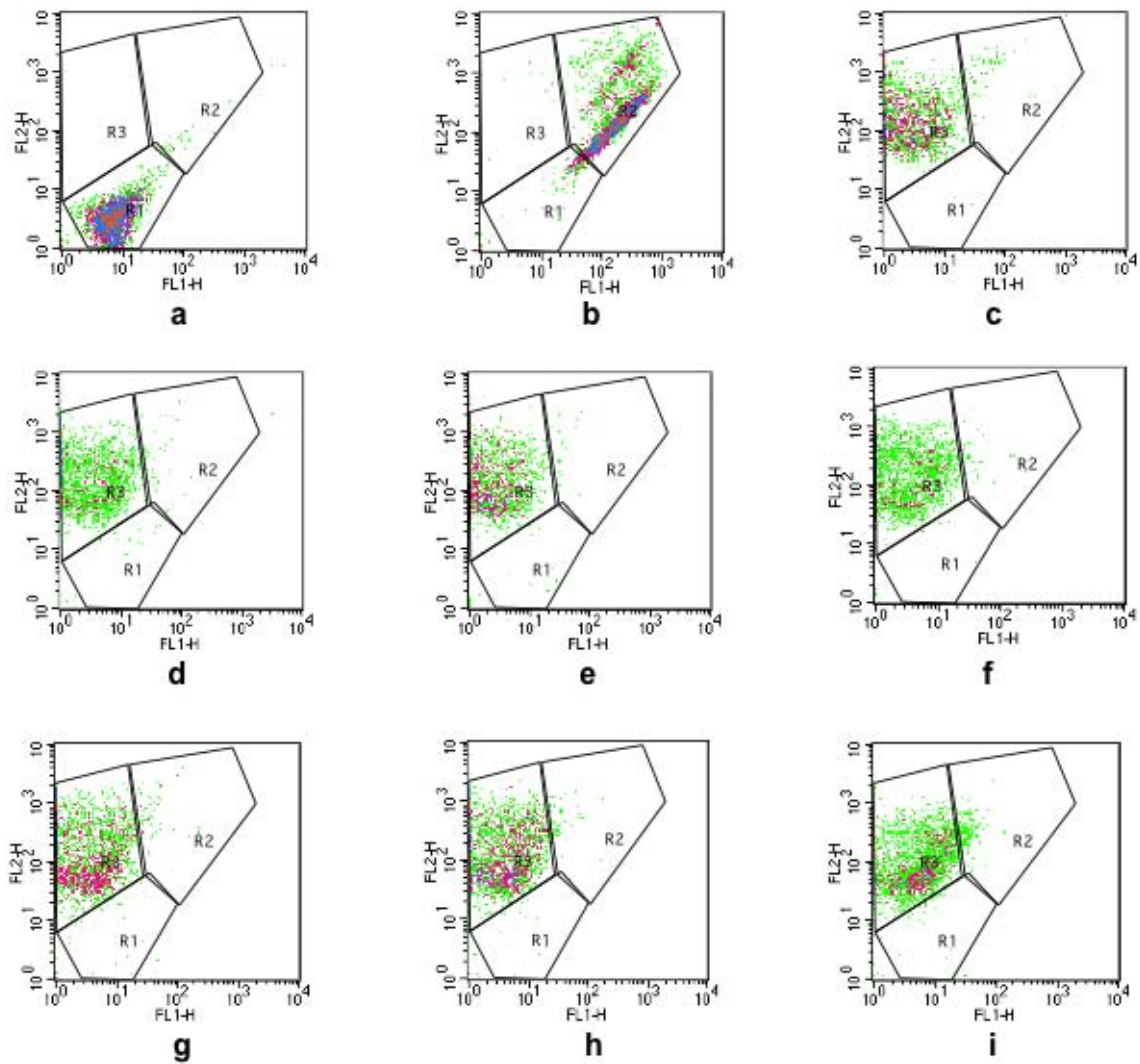


Figura 18 . Determinación de especies reactivas a oxígeno mitocondriales con el fluoróforo MitoSox red a diferentes concentraciones de simvastatina. Se determinó la producción de superóxido por citometría de flujo. El análisis se realizó por regiones (R1, R2 y R3) en los diagramas FL1/FL2 de un experimento representativo, donde: a, solo células, b, 0 μ M simvastatina + MitoSox, de c - i, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10 μ M simvastatina, + MitoSox.Red. Se adquirieron 3000 eventos y se leyeron a las longitudes de onda de excitación (543nm) y emisión (580nm).

10 Discusión

El primer objetivo abordado en este trabajo ha consistido en el estudio del papel de la simvastatina sobre la regulación de la proteína desacoplante mitocondrial UCP₂ en las células endoteliales. Previamente en el laboratorio de Cardiología se trató de encontrar la vía encargada de regular la síntesis de la proteína UCP₂ en las mismas condiciones antes mencionadas en este trabajo, y se observó que la GTPasa pequeña Rho está involucrada en la regulación de la síntesis de UCP₂ a través de la regulación de los factores de transcripción PPAR γ . Estos resultados coinciden con los obtenidos por Miyuki y cols. Al utilizar simvastatina para activar a PPAR gamma mediante, la supresión de la vía de mevalonato en la línea celular RAW264.7.⁷⁹ Estos hallazgos sugieren que PPAR γ está siendo regulado probablemente por una cascada de señalización que involucra a la GTPasas pequeña Rho la cual, a su vez, se regulan por procesos de isoprenilación.

Posteriormente, se evaluó la posible relación entre la simvastatina y la regulación del estrés oxidativo a nivel mitocondrial en la línea celular PAE, por un mecanismo de regulación de UCP₂. Los resultados muestran que en presencia de concentraciones bajas de simvastatina se induce un aumento significativo de los niveles de expresión de la proteína desacoplante (UCP₂). En este sentido Koziel y cols. observaron un incremento en la actividad de UCP₂ en células de cordón umbilical (EA.hy926) después de incubarlas con altas concentraciones de glucosa (25Mm)⁸⁰. Aunado a lo anterior, nuestros resultados indican que la proteína desacoplante puede actuar como un sensor capaz de disminuir la producción de EROs mitocondrial en respuesta a concentraciones bajas de simvastatina.

Por otra parte, Pienaar y cols. han identificado por medio de espectroscopía de masas la expresión de 24 proteínas mitocondriales totales y las diferentes isoformas de las proteínas UCP en neuronas tratadas con simvastatina. Además, identificaron que difieren significativamente ($p < 0.05$) en abundancia relativa como resultado del tratamiento con simvastatina. La mayoría de estas proteínas forman parte de la cadena de transporte de electrones.⁸¹

Para corroborar la participación de PPAR γ en la expresión de la proteína desacoplante y su función en la disminución de radicales libres, se llevaron a cabo

experimentos en presencia de los agonistas de PPAR ácido oleico (agonista natural), y fenofibrato (agonista sintético) así como con el antagonista sintético BADGE. Los resultados obtenidos después del tratamiento con simvastatina a una concentración de $0.1\mu\text{M}$, muestran que al utilizar el ácido oleico, no se observó ningún cambio en la velocidad de oxidación del DCF, lo mismo sucedió con fenofibrato.

Por el contrario al utilizar el antagonista BADGE con $0.1\mu\text{M}$ de simvastatina (efecto protector disminuido) se observó un aumento en la producción de radicales libres. Lo que podría indicar que efectivamente la proteína PPAR γ , está regulando la expresión de UCP $_2$ a través de la cascada de señalización propuesta por nuestro equipo de trabajo esto podría por lo tanto regular la síntesis y liberación de radicales libres.

Los intensos esfuerzos de investigación en las últimas décadas han demostrado que PPAR es uno de los principales controladores de la expresión de los genes que codifican para las proteínas desacoplantes mitocondriales. Zhou y cols. observaron que la activación de PPAR γ puede disminuir el estrés oxidativo en las células vasculares del músculo liso (VSMCs) por aumento de la expresión de UCP $_2$.⁸²

Al incubar las células con el indicador fluorescente CellRox Green se observó una disminución de los radicales libres en presencia de simvastatina; Este hallazgo coincide con reportes en los que se han encontrado que la simvastatina disminuye el estrés oxidativo a través de la disminución de la actividad de NADPH oxidasa en células endoteliales de cordón umbilical^{83,84}. Con respecto al papel de la simvastatina en la regulación de los radicales libres generados en la mitocondria, aún no existen reportes sobre si tiene alguna importancia en la formación de radicales libres.

Por otra parte, cuando se incubaron las células endoteliales con las diferentes concentraciones de simvastatina y con el indicador fluorescente MitoSox Red, observamos que estas células son capaces de disminuir la producción del radical superóxido. Esto sugiere que la simvastatina si tiene un efecto sobre la actividad

mitocondrial, muy probablemente ligado a la actividad de la UCP₂, de tal manera que promueve el aumento en la actividad de esta proteína provocando que los niveles de radicales libres disminuyan en la mitocondria y por ende en la célula completa.

Un mecanismo importante que también se analizó fue la actividad de algunas proteínas encargadas de regular los niveles de radicales libres, o proteínas antioxidantes, como la superóxido dismutasa citosólica, la superóxido dismutasa mitocondrial y la catalasa⁸⁵. Observando que después de incubar con simvastatina las células endoteliales, la proteína superóxido dismutasa mitocondrial, se encuentra significativamente más expresada que su contraparte citosólica. Esto concuerda con el aumento en la actividad de la enzima superóxido dismutasa observado en células tumorales de cáncer pulmonar (A-549) después de incubarlas durante 48hrs. con una concentración de 50µM simvastatina⁸⁶. Por su parte cuando se determinaron los niveles de expresión de catalasa, se observó una tendencia de aumento sin alcanzar una diferencia significativa. Aunque al medir la actividad de esta misma enzima, se observó un aumento significativo al utilizar una concentración de 0.5 µM de simvastatina. Aunado a esto, el aumento de la actividad de la enzima catalasa en la línea celular HeLa mediante los factores de transcripción PPARs descubierto por Yakunin y cols⁸⁷. Podría significar que existe un mecanismo de regulación de la actividad de catalasa y superóxido dismutasa a través, de los factores de transcripción PPARs.

Por otro lado, hay otra enzima encargada de descomponer el peróxido de hidrógeno, la glutatión peroxidasa (GPx), esta se encuentra principalmente en la mitocondria en las células de los mamíferos y se ha descrito que es más eficiente que la catalasa bajo varias condiciones fisiológicas por lo que sería necesario determinar la actividad de esta enzima.

Poco se sabe del efecto que tienen fármacos como las estatinas sobre el papel que tienen en la función mitocondrial, nuestro trabajo está contribuyendo a dilucidar su importancia. De hecho, no existe en la literatura una relación entre la regulación de los radicales libres, la mitocondria y el uso de simvastatina. Este

sería uno de los primeros reportes donde mostramos la posible relación entre los tres. Aunque aún faltan más experimentos por realizar para ligar adecuadamente esta relación, consideramos que nuestros datos están contribuyendo en la importancia de los efectos pleiotrópicos que tienen las estatinas al ser administradas a pacientes que requieran regular sus niveles de colesterol.

11 Conclusiones

- Dado que se observó un mayor aumento en los niveles de expresión de la proteína UCP₂, en respuesta al tratamiento con simvastatina, a partir de las concentraciones de 0.5, 1.0 y 2.5 μ M, podemos concluir que la simvastatina regular a la proteína UCP₂
- Dado que se observó una disminución de la oxidación de DCF mayor en concentraciones de 0.1 a 2.5 μ M, podemos concluir que la simvastatina tiene un papel importante en regular la síntesis de radicales libres principalmente a nivel mitocondrial.
- Dado que se observó un aumento en los niveles de expresión de la enzima superóxido dismutasa dos y el aumento en la actividad de catalasa, podemos concluir, la participación de la simvastatina en la regulación de los radicales libres.
- Dado que se observó una disminución en la fluorescencia del colorante MitoSox Red, podemos concluir que la simvastatina disminuye la producción del radical superoxido a nivel mitocondrial.

12 Perspectivas

- Determinar los niveles de expresión de UCP₂ cuando se incubaba la célula en presencia de los agonistas y antagonistas de PPAR.
- Corroborar en la vía de señalización involucrada en el aumento de UCP₂, el papel de las proteínas ROCK1 y ROCK2, que son efectores directos de la GTPasa pequeña Rho.
- Aislar mitocondrias para determinar, respiración mitocondrial, síntesis de ATP y potencial transmembranal, en células tratadas con simvastatina.
- En ese sentido, estandarizar el uso del MitoTracker para determinar y cuantificar potencial transmembranal en mitocondrias de células intactas.
- Medir los niveles de expresión de la UCP2 a diferentes concentraciones de simvastatina utilizando RT-PCR.
- Determinar la actividad de las enzimas antioxidantes SOD1 y SOD2, para compararlos con su expresión.
- Determinar la actividad y expresión de otras enzimas antioxidantes, como la glutatión peroxidasa.

13 Referencias

1. Akhmedov A, Rybin V, Marín-García J, et al. Mitochondrial oxidative metabolism and uncoupling proteins in the failing heart. *Heart Fail Rev.* 2015 :227-49.
2. Tricarico P, Crovella S, Celsi F. Mevalonate Pathway Blockade, Mitochondrial Dysfunction and Autophagy: A Possible Link. *IJMS.* 2015; 16(7):16067-16084
3. Antonopoulos AS, Margaritis M, Lee R, et al. Statins as anti-inflammatory agents in atherogenesis: molecular mechanisms and lessons from the recent clinical trials, *Curr Pharm Des.* 2012; 18(11):1519-30.
4. Bouitbir J, Charles A, Echaniz-Laguna A, Kindo M, Daussin F, Auwerx J et al. Opposite effects of statins on mitochondria of cardiac and skeletal muscles: a 'mitohormesis' mechanism involving reactive oxygen species and PGC-1. *Eur Heart J.* 2011;33(11):1397-1407.
5. Yeganeh B, Wiechec E, Ande S, Sharma P, Moghadam A, Post M et al. Targeting the mevalonate cascade as a new therapeutic approach in heart disease, cancer and pulmonary disease. *Pharmacol Ther.* 2014; 143(1):87-110.
6. Pauly S, Back D, Kaeppler K, Haas N, Schmidmaier G, Wildemann B. Influence of Statins locally applied from orthopedic implants on osseous integration. *BMC Musculoskeletal Disord.* 2012; 13(1).
7. Endo A, Kuroda M, Tsujita y. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*. *J Antibiot.* 1976; 29(12):1346-1348.
8. Alberts A, Chen J, Kuron G, Hunt V, Huff J, Hoffman C et al. Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. . *Proc Natl Acad Sci.* 1980; 77(7):3957-3961.
9. Janicko M, Drazilova S, Pella D, Fedacko J, Jarcuska P. Pleiotropic effects of statins in the diseases of the liver. *World J Gastroenterol.* 2016; 22(27):6201.

-
-
10. Sahebkar A, Giua R, Pedone C. Impact of Statin Therapy on Plasma Leptin Concentrations: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Placebo-Controlled Trials. *Br J Clin Pharmacol*. 2016.
 11. Istvan E. Statin inhibition of HMG-CoA reductase: a 3-dimensional view. *Atheroscler Suppl*. 2003; 4(1):3-8.
 12. Neuvonen P, Backman J, Niemi M. Pharmacokinetic Comparison of the Potential Over-the-Counter Statins Simvastatin, Lovastatin, Fluvastatin and Pravastatin. *Clin Pharmacokinet*. 2008; 47(7):463-474.
 13. Kilford P, Stringer R, Sohal B, Houston J, Galetin A. Prediction of Drug Clearance by Glucuronidation from in Vitro Data: Use of Combined Cytochrome P450 and UDP-Glucuronosyltransferase Cofactors in Alamethicin-Activated Human Liver Microsomes. *Drug Metab Dispos*. 2009; 37(1):82-89.
 14. Shitara Y, Sugiyama Y. Pharmacokinetic 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. *Pharmacol Ther*. 2006; 112(1):71-105.
 15. Margaritis M, Channon K, Antoniades C. Statins as Regulators of Redox State in the Vascular Endothelium: Beyond Lipid Lowering. *Antioxid Redox Signal*. 2014; 20(8):1198-1215
 16. Owens C. Statins and other agents for vascular inflammation. *J Vasc Surg*. 2012; 56(6):1799-1806.
 17. Shen G. Mitochondrial Dysfunction, Oxidative Stress and Diabetic Cardiovascular Disorders. *CHDDT*. 2012; 12(2):106-112.
 18. Bu D, Griffin G, Lichtman A. Mechanisms for the anti-inflammatory effects of statins. *Curr Opin Lipidol*. 2011; 22(3):165-170.
 19. Issa J, Ingraci de Lucia C, dos Santos Kotake B, Gonçalves Gonzaga M, Tocchini de Figueiredo F, Mizusaki Iyomasa D et al. The effect of simvastatin treatment on bone repair of femoral fracture in animal model. *Growth Factors*. 2015; 33(2):139-148.
 20. Zhou Q, Liao J. Pleiotropic Effects of Statins. *Circ J*. 2010; 74(5):818-826.

-
-
21. Cromm P, Spiegel J, Grossmann T, Waldmann H. Direct Modulation of Small GTPase Activity and Function. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2015; 54(46):13516-13537.
 22. Liu J, Gao H, Wang X. The role of the Rho/ROCK signaling pathway in inhibiting axonal regeneration in the central nervous system. *Neural Regen Res.* 2015; 10(11):1892.
 23. Li Q, Xu Y, Li X, Guo Y, Liu G. Inhibition of Rho-kinase ameliorates myocardial remodeling and fibrosis in pressure overload and myocardial infarction: Role of TGF- β 1-TAK1. *Toxicol Lett.* 2012; 211(2):91-97.
 24. Zhao W, Jamshidiha M, Lanyon-Hogg T, Direct Targeting of the Ras GTPase Superfamily through Structure-Based Design, *Curr Top Med Chem.* 2016
 25. Takemoto M, Node K, Nakagami H, Liao Y, Grimm M, Takemoto Y et al. Statins as antioxidant therapy for preventing cardiac myocyte hypertrophy. *J Clin Invest.* 2001; 108(10):1429-1437
 26. Maack C. Oxygen Free Radical Release in Human Failing Myocardium Is Associated With Increased Activity of Rac1-GTPase and Represents a Target for Statin Treatment. *Circulation.* 2003; 108(13):1567-1574.
 27. Zou C, Qi H, Liu ZH, Han L, Zhao C, Yang X. Simvastatin activates the PPAR γ -dependent pathway to prevent left ventricular hypertrophy associated with inhibition of RhoA signaling
 28. Gupta M, Mahajan V, Mehta K, Chauhan P, Rawat R. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and PPAR agonists: the 'future' in dermatology therapeutics?. *Arch Dermatol Res.* 2015; 307(9):767-780.
 29. Marion-Letellier R, Savoye G, Ghosh S. Fatty acids, eicosanoids and PPAR gamma. *Eur J Pharmacol.* 2015; 785:44-49.
 30. Filip-Ciubotaru F, Manciu C, Grigore C, Foia L. PPARs: physiological functions and pharmacological roles of agonists in human diseases. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi.* 2012; 116(1):240-7.
 31. Poulsen L, Siersbæk M, Mandrup S. PPARs: Fatty acid sensors controlling metabolism. *Semin Cell Dev Biol.* 2012; 23(6):631-639.

-
-
32. Koufany M, Jouzeau JY, Moulin D. Fenofibrate vs pioglitazone: Comparative study of the anti-arthritic potencies of PPAR-alpha and PPAR-gamma agonists in rat adjuvant-induced arthritis. *Biomed Mater Eng.* 2014; 24:81-8.
 33. Barish G, Narkar V, Evans R. PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2006; 116(3):590-7.
 34. Christodoulides C, Vidal-Puig A. PPARs and adipocyte function. *Mol Cell Endocrinol.* 2010; 318(1-2):61-68.
 35. Villarroya F, Iglesias R, Giralt M. PPARs in the Control of Uncoupling Proteins Gene Expression. *PPAR Research.* 2007; 2007:1-12.
 36. Bouillaud F, Alves-Guerra M, Ricquier D. UCPs, at the interface between bioenergetics and metabolism. *Biochim Biophys Acta - Molecular Cell Research.* 2016; 1863(10):2443-2456.
 37. Sluse F, Jarmuszkiewicz W, Navet R, Douette P, Mathy G, Sluse-Goffart C. Mitochondrial UCPs: New insights into regulation and impact. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1757(5-6):480-485.
 38. Redza-Dutordoir M, Averill-Bates D. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta. - Molecular Cell Research.* 2016.
 39. Diebold L, Chandel N. HSC Fate Is Tethered to Mitochondria. *Cell Stem Cell.* 2016; 18(3):303-304.
 40. Baltrusch S. Mitochondrial network regulation and its potential interference with inflammatory signals in pancreatic beta cells. *Diabetologia.* 2016; 59(4):683-687.
 41. Patterson J, Cousteils K, Lou J, Manning Fox J, MacDonald P, Joseph J. Mitochondrial Metabolism of Pyruvate Is Essential for Regulating Glucose-stimulated Insulin Secretion. *J Biol Chem.* 2014; 289(19):13335-13346.
 42. Yang Y, Karakhanova S, Hartwig W, D'Haese J, Philippov P, Werner J et al. Mitochondria and Mitochondrial ROS in Cancer: Novel Targets for Anticancer Therapy. *J Cell Physiol.* 2016; 231(12):2570-2581.

-
-
43. Kasiviswanathan R, Collins T, Copeland W. The interface of transcription and DNA replication in the mitochondria. *Biochim Biophys Acta - Gene Regulatory Mechanisms*. 2012; 1819(9-10):970-978.
 44. Camara A, Lesnefsky E, Stowe D. Potential Therapeutic Benefits of Strategies Directed to Mitochondria. *Antioxid Redox Signal*. 2010; 13(3):279-347.
 45. Lee H, Kim S, Lee J, Yang Y, Nam J, Kim B et al. Mitochondrial oxidative phosphorylation complexes exist in the sarcolemma of skeletal muscle *BMB Reports*. 2016; 49(2):116-121.
 46. Mitchell P. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biochim Biophys Acta- Bioenergetics*. 2011; 1807(12):1507-1538.
 47. Nicholls DFerguson S. *Bioenergetics 3*. Boston: Academic Press; 2002.
 48. Jana H, Zdeněk, Control mechanisms in mitochondrial oxidative phosphorylation. *Neural Regen Res*. 2013; 8(4): 363–375.
 49. Buchanan swalker J. Large-scale chromatographic purification of F₁F₀-ATPase and complex I from bovine heart mitochondria. *Biochem J*. 1996; 318(1):343-349.
 50. Rühle T, Leister D. Assembly of F₁F₀-ATP synthases, *Biochim Biophys Acta*:1847 (2015) 849–860
 51. Ricquier D, Bouillaud F. Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance. *J Physiol*. 2000; 529(1):3-10.
 52. Ledesma A, García M, Rial E. The mitochondrial uncoupling proteins. *Genome Biol*. 2002; 3(12).
 53. Ježek P, Jabůrek M, Garlid K. Channel character of uncoupling protein-mediated transport. *FEBS Letters*. 2010; 584(10):2135-2141.
 54. Sweetlove L, Lytovchenko A, Morgan M, Nunes-Nesi A, Taylor N, Baxter C et al. Mitochondrial uncoupling protein is required for efficient photosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(51):19587-19592.

-
-
55. Nadeene Parker, Paul G. Crichton, Uncoupling protein-1 (UCP1) contributes to the basal proton conductance of brown adipose tissue mitochondria, *J Bioenerg Biomembr* (2009) 41:335–342.
 56. Yan M, Wang X, Zhu X. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. *Free Radic Biol Med*. 2013; 62:90-101.
 57. Swomley A, Förster S, Keeney J, Triplett J, Zhang Z, Sultana R et al. Abeta, oxidative stress in Alzheimer disease: Evidence based on proteomics studies. *Biochim Biophys Acta. - Molecular Basis of Disease*. 2014; 1842(8):1248-1257.
 58. Steckert A, Valvassori S, Moretti M, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Role of oxidative stress in the pathophysiology of bipolar disorder. *Neurochem Res*. 2010; 35:1295–1301.
 59. Akhmedov A, Rybin V, Marín-García J, et al. Mitochondrial oxidative metabolism and uncoupling proteins in the failing heart. *Heart Fail Rev*. 2015 :227-49.
 60. Drummond G, Selemidis S, Griendling K, Sobey G. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2011; 10:453–471.
 61. Di Meo S, Reed T, Venditti P, Victor V. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 2016:1-44.
 62. Mythri R, Venkateshappa C, Harish G, et al. Evaluation of markers of oxidative stress, antioxidant function and astrocytic proliferation in the striatum and frontal cortex of Parkinson's disease brains. *Neurochem Res*. 2011; 36:1452–1463.
 63. Selivanov V, Votyakova T, Pivtoraiko V, Zeak J, Sukhomlin T, Trucco M et al. Reactive Oxygen Species Production by Forward and Reverse Electron Fluxes in the Mitochondrial Respiratory Chain. *PLoS Comput Biol*. 2011; 7(3):e1001115.

-
-
64. Shaerzadeh F, Ahmadiani A, Esmaili MA, et al. Antioxidant and antiglycating activities of *Salvia sahendica* and its protective effect against oxidative stress in neuron-like PC12. *Cells. J Nat Med.* 2011; 65:455–465.
65. Kussmaul L, Hirst J. The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(20):7607-12.
66. Martin D. Brand, The sites and topology of mitochondrial superoxide production, *Exp Gerontol*;45 (2010) 466–472
67. Lanciano P, Khalfaoui-Hassani B, Selamoglu N, Ghelli A, Rugolo M, Daldal F. Molecular mechanisms of superoxide production by complex III: A bacterial versus human mitochondrial comparative case study. *Biochim Biophys Acta. - Bioenergetics.* 2013; 1827(11-12):1332-1339.
68. Ying Wang and Siegfried Hekimi, Understanding Ubiquinone, *Trends Cell Biol.* 2016.
69. Dale KM, White CM, Henyan NN, et al. Impact of statin dosing intensity on transaminase and creatine kinase. *Am J Med.* 2007; 120(8):706-12.
70. Peach M, Marsh N, Miskiewicz E, MacPhee D. Solubilization of proteins: the importance of lysis buffer choice. *Methods Mol Biol.* 2015; 1312:49-60.
71. Laemmli UK. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature.* 1970; 680–685.
72. 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.
73. H2DCFDA (H2-DCF, DCF) - Thermo Fisher Scientific [Internet]. Thermofisher.com. 2016 [cited 20 October 2016]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/D399>.
74. Gomes A, Fernandes E, Lima J. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Biochem Biophys Methods.* 2005; 65(2-3):45-80.
75. Verschoor C, Lelic A, Bramson J, Bowdish D. An Introduction to Automated Flow Cytometry Gating Tools and Their Implementation. *Front Immunol.* 2015; 6.

-
-
76. MitoSOX Red Mitochondrial Superoxide Indicator, for live-cell imaging - Thermo Fisher Scientific [Internet]. Thermofisher.com. 2016 [cited 20 October 2016]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/M36008>.
77. CellROX Green Reagent, for oxidative stress detection - Thermo Fisher Scientific [Internet]. Thermofisher.com. 2016 [cited 20 October 2016]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C10444>.
78. Yano M, Matsumura T, Senokuchi T, Ishii N, Murata Y, Taketa K et al. Statins Activate Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Through Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent Cyclooxygenase-2 Expression in Macrophages. *Circulation Research*. 2007; 100(10):1442-1451.
79. Yano M, Matsumura T, Senokuchi T, Ishii N, Murata Y, Taketa K et al. Statins Activate Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Through Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent Cyclooxygenase-2 Expression in Macrophages. *Circ Res* 2007; 100(10):1442-1451.
80. Koziel A, Sobieraj I, Jarmuszkiewicz W. Increased activity of mitochondrial uncoupling protein 2 improves stress resistance in cultured endothelial cells exposed in vitro to high glucose levels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015; 309(1):H147-H156.
81. Pienaar I, Schallert T, Hattingh S, Daniels W. Behavioral and quantitative mitochondrial proteome analyses of the effects of simvastatin: implications for models of neural degeneration. *J Neural Transm*. 2009; 116(10):1349-1349.
82. Zhou Y, Zhang M, Li B, Chen L, Pi Y, Yin Y et al. PPAR γ Inhibits VSMC Proliferation and Migration via Attenuating Oxidative Stress through Upregulating UCP2. *PLOS ONE*. 2016; 11(5):e0154720.

-
-
83. Zhang G, Li M, Xu Y, Peng L, Yang C, Zhou Y et al. Antioxidation Effect of Simvastatin in Aorta and Hippocampus: A Rabbit Model Fed High-Cholesterol Diet. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 2016:1-8.
 84. Lin C, Huang P, Lai C, Chen J, Lin S, Chen J. Simvastatin Attenuates Oxidative Stress, NF- κ B Activation, and Artery Calcification in LDLR^{-/-} Mice Fed with High Fat Diet via Down-regulation of Tumor Necrosis Factor- α and TNF Receptor 1. *PLOS ONE*. 2015; 10(12):e0143686.
 85. Noctor G, Foyer C. Intracellular redox compartmentation and ROS-related communication in regulation and signaling. *Plant Physiology*. 2016:pp.00346.2016.
 86. Koziel A, Sobieraj I, Jarmuszkiewicz W. Simvastatin inhibits the proliferation of A549 lung cancer cells through oxidative stress and up-regulation of SOD2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015; 309(1):H147-56.
 87. Yakunin E, Kisos H, Kulik W, Grigoletto J, Wanders R, Sharon R. The regulation of catalase activity by PPAR γ is affected by α -synuclein. *Ann Clin Transl Neurol*. 2014; 1(3):145-159.