



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

Evaluación del nivel de expresión del RNA mensajero de factores angiogénicos en tejido adiposo visceral de conejos Nueva Zelanda tratados con atorvastatina y fenofibrato.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:

MONDRAGÓN GARCÍA ANDREA

ASESOR: Dr. Óscar A. Pérez Méndez.

COASESOR: QFB. Alejandro Gutiérrez García.

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2017.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVIZOR DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Evaluación del nivel de expresión del RNA mensajero de factores angiogénicos en tejido adiposo visceral de conejos Nueva Zelanda tratados con atorvastatina y fenofibrato.

Que presenta la pasante Andrea Mondragón García
Con número de cuenta: 310287144 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 22 de Junio de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Ma. Esther Revuelta Miranda	
VOCAL	Dra. Jazmín Flores Monroy	
SECRETARIO	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	
1er. SUPLENTE	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
2do. SUPLENTE	L.B.D Larisa Andrea González Salcedo	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cpa*

El presente trabajo se realizó en el Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” en el departamento de Biología Molecular, laboratorio de metabolismo de lípidos durante el periodo Julio 2016 – Julio-2017.

AGRADECIMIENTOS

A:

Mi papá por el esfuerzo que has hecho para darme lo mejor, por tu apoyo en todas mis decisiones, por escucharme cuando lo necesito y por los consejos que me das. ¡Te quiero Pa!

Mi mamá por la educación que me diste, los valores que fundaste en mí, los regañones, las felicitaciones, el apoyo y sobre todo, por nunca dudar de mi capacidad. ¡Te quiero ma!

Mi hermana por soportar mis peores momentos, porque me apoyas e impulsas a salir adelante. ¡A ti también te quiero!

Dios por permitirme estar aquí, finalizando este proyecto y por poner en mi camino a personas extraordinarias como mi familia y mis amigos.

Yoya que aunque no estés aquí, sé que estarías orgullosa de mí y compartirías esta alegría.

Mis tíos Valdo y Lupe por estar al pendiente de mi vida tanto profesional como personal, los quiero.

Mary Luna, gracias por ayudarme a que esto saliera a flote y por la gran amiga que has sido y sé que seguirás siendo, gracias por escucharme, por tus consejos, por todas las enseñanzas y buenos recuerdos que me llevo, ¡te quiero!

La banda del laboratorio, Belén, Eli, Cris (Jr), Vaquero y Sr. Juan, por todos los buenos momentos que pasamos juntos, el apoyo que siempre me dieron y por el conocimiento que compartieron.

Dr. Óscar Pérez por darme la oportunidad de desarrollar esta tesis en su laboratorio y por compartirme un poquito de su conocimiento.

Las Andy's (Moon, Kay y Bañitos) gracias por el apoyo en la formación profesional, por los momentos llenos de alegría que pasamos en clase y fuera de ellas, simplemente por hacer de la universidad una de las mejores etapas. Las quiero a las tres!!

Jonh y Greg, a ustedes también gracias por los momentos divertidos que pasamos, el apoyo y sobre todo la amistad que me ofrecen.

Mis amigas de prepa (Alexa, Silvia y Marte) que no desistieron de su amistad aunque el tiempo no era mucho para vernos.

Los demás amigos de la universidad que de cierta forma colaboraron en mi formación académica.

“La mayoría de la gente dice que es el intelecto lo que hace a un gran científico.

Están equivocados: es su carácter”

Albert Einstein.

ÍNDICE

Resumen	1
1. Marco teórico	
1.1 Tejido adiposo	2
1.2 Resistencia a la insulina	3
1.3 Enfermedad aterosclerosa coronaria	5
1.4 Fibratos	7
1.5 Estatinas	9
1.6 Angiogénesis	13
1.7 Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular	14
1.8 Factor de Crecimiento Transformante Beta	15
1.9 Factor de Crecimiento de Fibroblastos	17
1.10 Factor de Necrosis Tumoral Alfa	18
1.11 Efecto de los factores de crecimiento sobre el tejido adiposo	19
1.12 Efecto de las estatinas y fibratos en el tejido adiposo.	22
2. Justificación	24
3. Hipótesis	25
4. Objetivo	26
5. Metodología	27
6. Resultados	32

7. Discusión	37
8. Conclusiones	41
9. Perspectivas	42
10. Apéndices	
10.1 Apéndice A	43
10.2 Apéndice B	45
10.3 Apéndice C	46
11. Referencias	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Desarrollo del proceso aterosclerótico.	7
Figura 2	Mecanismo de acción de PPAR.	8
Figura 3	Ruta del Mevalonato en células animales.	10
Figura 4	Estatinas, Señalización Akt y angiogénesis.	12
Figura 5	Pasos de la angiogénesis.	14
Figura 6	Vía de señalización TGF- β 1/Smad3.	17
Figura 7	Biología de TNF- α transmembranal y TNF- α soluble.	19
Figura 8	Tinción Hematoxilina y Eosina de tejido adiposo visceral.	33
Figura 9	Nivel de expresión del RNAm de los genes estudiados en tejido adiposo visceral.	34
Figura 10	Alineamiento del gen VEGFA con el elemento de respuesta a PPAR α .	35
Figura 11	Inmunohistoquímica de la proteína CD31 en tejido adiposo visceral.	36

ABREVIATURAS

Apo B	Apolipoproteína B
Apo C	Apolipoproteína C
C/EBP	Proteína de unión a los potenciadores CCAAT
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EAC	Enfermedad aterosclerosa coronaria
EGF	Factor de crecimiento del endotelio
eNOS	Sintetasa de óxido nítrico endotelial
EPC	Célula endotelial progenitora
FATP	Proteína transportadora de ácidos grasos
FFA	Ácidos grasos libres
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FPP	Farnesilpirofosfato
GGPP	Geranil-geranilpirofosfato
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HIF α	Factor inducible de hipoxia alfa
HMG-CoA	Hidroximetilglutaril coenzima A
HRE	Elemento de respuesta a hipoxia
HSL	Lipasa sensible a Hormona.
HSP	Proteína de choque térmico
HSPG	Proteoglicanos sulfato de heparan
IDL	Lipoproteína de densidad intermedia
IL-10	Interleucina 10
Il-6	Interleucina 6
KGF-1	Factor de crecimiento de keratinocitos 1
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LPL	Lipasa lipoprotéica

MCP-1	Proteína quimiotrayente de monocitos 1
mTNF	Factor de necrosis tumoral transmembranal
NEFA	Ácidos grasos no esterificados
NF- κ β	Factor nuclear kappa beta
NLS	Señal de localización nuclear
NO	Óxido nítrico
PIP ₂	Fosfatidilinositolbiposfato
PIP ₃	Fosfatidilinositoltrifosfato
PKA	Proteína cinasa A
PPAR	Receptor activado por proliferador de peroxisomas
PPRE	Elementos de respuesta a PPAR
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RXR	Receptor de ácido retinoico.
SREBP	Proteína de unión a elementos regulatorios de esterol
sTNF	Factor de necrosis tumoral soluble
TACE	Enzima convertidora de TNF- α
TAG	Triacilgliceroles
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
T β R	Receptor del factor de crecimiento transformante beta
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VEGFR	Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad

RESUMEN

El efecto que ejerce la atorvastatina y el fenofibrato sobre el tejido adiposo visceral puede asociarse con el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 que presentan los pacientes tratados con atorvastatina y la disminución del riesgo cardiovascular que presentan pacientes con resistencia a la insulina después de la administración con fibratos. El tejido adiposo es el contribuyente principal para el desarrollo de resistencia a la insulina y enfermedad aterosclerosa coronaria. Su principal función es el almacenamiento de triacilgliceroles. En pacientes con obesidad ocurre la desregulación del tejido adiposo aumentando la hipoxia; los adipocitos se vuelven hipertróficos e hiperplásicos. Como consecuencia, secretan citocinas pro-inflamatorias que incrementan el riesgo del desarrollo de resistencia a la insulina. También se liberan ácidos grasos de los adipocitos aumentando los niveles de IDL y LDL, siendo mayor la probabilidad del desarrollo de aterosclerosis.

En este estudio se plantea la idea de que el tratamiento con atorvastatina y fenofibrato tiene un efecto sobre el desarrollo y vascularización del tejido adiposo visceral. Se cuantificó la expresión del RNA mensajero de factores angiogénicos como VEGFA, TGF- β , FGF2 y TNF- α , además de la cuantificación de PECAM-1 en tejido adiposo visceral de conejos sanos administrados con atorvastatina y fenofibrato y se midió el tamaño de los adipocitos en cada grupo.

La administración con fenofibrato mostró un incremento en la angiogénesis del tejido adiposo visceral ayudando a mantener un estado anti-inflamatorio y reduciendo la probabilidad de desarrollar las enfermedades antes mencionadas. Por el contrario, la administración con atorvastatina no mostró aumento en angiogénesis pero sí en el tamaño de los adipocitos, aumentando la hipoxia y la secreción de factores pro-inflamatorios que conlleven al desarrollo de resistencia a la insulina. Con estos resultados se sugiere que la hipertrofia de los adipocitos causada por la administración de atorvastatina puede ser el mecanismo por el cual las estatinas inducen la precipitación de diabetes mellitus tipo 2 en pacientes con riesgo.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 TEJIDO ADIPOSO

El tejido adiposo es un órgano metabólicamente activo, es importante en la secreción de factores que regulan numerosos procesos fisiológicos y patológicos como la sensibilidad a la insulina, equilibrio energético, la respuesta inmunológica e inflamatoria y angiogénesis (Lefterova y Lazar, 2009; Ali, Hochfeld, Myburgh y Pepper 2013).

El tejido adiposo se divide en tejido adiposo blanco y marrón; la principal función del tejido adiposo marrón es la producción de calor. Los adipocitos de este tejido se caracterizan por la gran cantidad de mitocondrias y gotas lipídicas que presentan en su interior. Por el contrario, la principal función del tejido adiposo blanco es el almacenamiento de lípidos en los adipocitos, estos últimos son caracterizados por contener una o dos mitocondrias en su interior y una gota lipídica que desplaza al núcleo hacia la membrana celular (Sarjeant y Stephens, 2012). Además de los adipocitos, el tejido adiposo blanco está constituido por células del estroma vascular como macrófagos y neutrófilos, asimismo se encuentran pre-adipocitos, células madre y células endoteliales (Ràfols, 2012; Iacobellis Corradi y Sharma, 2005; Rosen y Spiegelman, 2014).

El tejido adiposo secreta sustancias de naturaleza proteínica denominadas adipocinas, entre ellas se incluye el factor de necrosis tumoral alfa, (TNF- α) interleucinas, la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1), proteínas que intervienen en la angiogénesis, como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) (Ràfols, 2014). La adipogénesis es el proceso de diferenciación de fibroblastos a adipocitos, la adipogénesis se divide en dos etapas principalmente, la primera es la diferenciación de fibroblastos a pre-adipocito, mientras que la segunda es la etapa de maduración del adipocito donde adquiere las características mencionadas para el almacenamiento de

triacilgliceroles (TAG) y la respuesta a la insulina. La adipogénesis se resume en una red de regulación génica donde participa el receptor nuclear PPAR γ (receptor activado por proliferador de peroxisomas) y la familia de receptores de transcripción C/EBPs (Proteína de unión a los potenciadores CCAAT) para la transcripción de genes de diferenciación adipocítica (Rosen y Spiegelman, 2000; Ali et al, 2013).

1.2 RESISTENCIA A LA INSULINA

Cuando los factores genéticos y ambientales (sobrealimentación y sedentarismo) confluyen en el individuo, los adipocitos del tejido adiposo visceral aumentan de tamaño, alterando su patrón secretor. Por el aumento de volumen, el tejido adiposo comienza a sufrir hipoxia en ciertas zonas, produciendo necrosis, que a su vez induce la infiltración de monocitos que se transforman en macrófagos. Se ha observado que los pacientes sanos presentan un 10% de macrófagos infiltrados en tejido adiposo en comparación con el 50 % que presentan pacientes con obesidad (Guilherme, Virbasius, Puri y Czech, 2008). Estas células inflamatorias liberan TNF- α , entre otras moléculas, que actúa como factor de crecimiento para los adipocitos, exacerbando el aumento del volumen del tejido adiposo como se detalla más adelante.

Mayor volumen de tejido adiposo da lugar a la inflamación generada por la hipoxia, liberando mayor cantidad de TNF- α , lo que genera un ciclo de crecimiento el tejido adiposo. Cuando el adipocito crece, aumenta la producción de leptina, molécula que induce saciedad a nivel del hipotálamo. Sin embargo, la hiperleptinemia que se asocia a la hipertrofia del tejido adiposo, induce la sub-expresión de receptores de leptina hipotalámicos (resistencia a la leptina). Como consecuencia, el paciente no siente saciedad, consume más alimento y con ello, exagera la hipertrofia del tejido adiposo, incrementado la hiperleptinemia y agravando la resistencia a la leptina. Asimismo, el adipocito hipertrófico produce menor cantidad de adiponectina, adipocina que favorece la acción de la insulina en el músculo. La hipoadiponectinemia se manifiesta con una menor expresión de GLUT-4 en el músculo estriado en respuesta a la insulina que es liberada por el

páncreas cuando aumenta la glucosa en sangre durante el estado postprandial. En consecuencia, la tasa de transporte de glucosa al músculo disminuye, manteniendo así concentraciones de glucosa plasmática relativamente elevadas durante un periodo prolongado. A este estado alterado del metabolismo se le denomina resistencia a la insulina, el cual está evidentemente caracterizado por un hiperinsulinemia postprandial prolongada.

El tejido adiposo es uno de los principales órganos blancos de la insulina. La insulina induce la piruvato cinasa en el adipocito, enzima clave para la glicerolneogénesis. Al sintetizar mayor cantidad de glicerol, el adipocito es capaz de almacenar más ácidos grasos en forma TAG (Triacilgliceroles). Asimismo, la insulina inhibe la activación de la lipasa sensible a hormona en el adipocito y por lo tanto hay una menor degradación de TAG en el mismo. Además, la insulina favorece la expresión y actividad de la lipasa lipoproteica vascular, que cataliza la hidrólisis de TAG contenidos en las VLDL, (Lipoproteínas de muy baja densidad) favoreciendo la entrada de FFA (ácidos grasos libres) al adipocito y en consecuencia aumenta el almacén de TAG intracelulares. Durante la resistencia a la insulina, este proceso está exacerbado por efecto de la hiperinsulinemia (Semenkovich, 2006; Lopes, Correa, Consolim y Egan, 2016).

La resistencia a la insulina desencadena varios efectos en los principales órganos blanco: un incremento en la gluconeogénesis, lo que contribuye a la hiperglicemia. Por otra parte, en músculo, aumenta el almacenamiento de ácidos grasos libres y triacilgliceroles, manteniendo la hiperlipidemia e inflamación. Ambos influyen en la hiperplasia de las células- β pancreáticas lo que provoca una mayor secreción de insulina favoreciendo la hiperinsulinemia que a su vez, será equilibrada por una hiperglucagonemia aumentando la producción hepática de glucosa. (Lopes et al, 2016).

En pacientes con obesidad, la habilidad de los adipocitos para realizar su función es desregulada, lo que causa la hipertrofia de los mismos, caracterizada por un aumento en su tamaño y en la carga de lípidos que contienen. Los cambios morfológicos que sufre el adipocito durante la obesidad, producen una alteración

en la secreción de mediadores pro-inflamatorios, que conlleva a un aumento de la secreción de MCP-1, IL-6 y TNF- α y una disminución en factores anti-inflamatorios como adiponectina e IL-10 (Blüher, 2016). Con el incremento de la secreción de la proteína MCP-1 se origina una migración de monocitos hacia el tejido adiposo, donde se diferencian en macrófagos tipo 1 que secretan altas cantidades de TNF- α e IL-1 β . Además, en obesidad ocurre lipólisis, liberando ácidos grasos que desencadenan la resistencia a la insulina (Lopes et al, 2016). Se ha observado que los pacientes sanos, presentan un 10% de macrófagos infiltrados en tejido adiposo en comparación con el 50 % que presentan pacientes con obesidad (Guilherme et al, 2008).

La falta de la correcta señalización de insulina, especialmente en el tejido adiposo, causa un metabolismo anormal de lípidos, que conlleva a un fenotipo pro-aterogénico (Semenkovich, 2006). Además, la resistencia a la insulina induce la síntesis hepática de FFA, dando lugar al incremento de la síntesis y la secreción de triacilglicérols (TAG) en forma de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (Raghavan, 2012). A su vez la lipasa lipoprotéica hidroliza los TAG presentes en las VLDL obteniendo una IDL (Lipoproteína de densidad intermedia) la cual, también será degradada para crear una lipoproteína de baja densidad (LDL); ambas partículas (IDL y LDL) atraviesan al espacio subendotelial para formar el ateroma (Razani, Chakravarthy y Semenkovich, 2008).

1.3 ENFERMEDAD ATEROSCLEROSA CORONARIA (EAC)

Se sabe que las enfermedades cardiovasculares son la causa más común de morbilidad y mortalidad en los países desarrollados desde inicios del siglo XX (Ayaser, Basat, Arslan y Sayan, 2016). La aterosclerosis es la forma más común de enfermedad cardiovascular, cuyas manifestaciones clínicas más serias son el infarto agudo al miocardio, angina de pecho y la muerte súbita con la cual se encuentra relacionada hasta en un 75 % (Bourlon y López, 2010). La aterosclerosis abarca diversos aspectos pro-inflamatorios y pro-trombóticos que afectan directamente el endotelio vascular. En el desarrollo de la aterosclerosis se ven involucrados diversos factores de riesgo como dislipidemia, hipertensión,

diabetes, obesidad, tabaquismo y sedentarismo. La patogenia de la aterosclerosis ocurre principalmente en las arterias coronarias; comienza con la acumulación de LDL en la íntima vascular. Al atravesar al espacio subendotelial las LDL son sujetas a la oxidación por especies reactivas de oxígeno (ROS), estas LDL oxidadas dirigen la activación de las células endoteliales, las cuales expresarán moléculas de adhesión, ICAM-1 y VCAM-1 (Bobryshev, 2006), causando la atracción de monocitos circulantes al sitio de la lesión en donde se diferencian a macrófagos tipo I (Hopkins, 2013) capaces de fagocitar a las LDL previamente oxidadas. Ya que los macrófagos no cuentan con un mecanismo de regulación necesario para la degradación de colesterol, éste se acumula en el citoplasma del macrófago en forma de gota, dando lugar a la célula espumosa (Fig. 2) (Luna, 2015). La acumulación de células espumosas en el espacio subendotelial da lugar a la estría grasa, primera fase macroscópicamente reconocible en el desarrollo de la lesión aterosclerótica. La consecutiva infiltración de LDL oxidadas así como macrófagos exacerbaban la respuesta inmune del organismo y aumentan el tamaño del ateroma. Mediante la expresión de diversas citocinas y factores de crecimiento que son secretados por los macrófagos, se induce la migración y proliferación de células de músculo liso provenientes de la íntima media para formar la capa fibrosa (Lusis, 2000). La placa además de reducir el lumen del vaso sanguíneo, puede presentar una rotura causando un coágulo sanguíneo que ocluye la circulación y provocar un episodio vascular isquémico agudo, es decir, infarto o evento vascular cerebral.

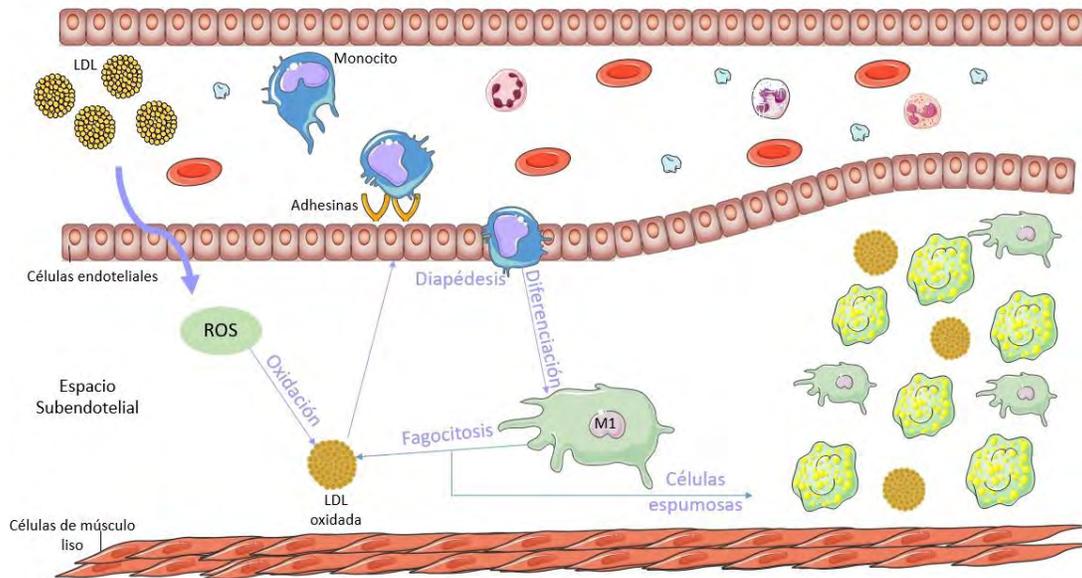


Figura 1. Desarrollo del proceso aterosclerótico. Las partículas LDL circulantes atraviesan al espacio subendotelial donde son oxidadas. El endotelio vascular es activado y expresa moléculas de adhesión que permiten la adhesión y rodamiento de los monocitos que se diferencian a macrófagos y fagocitan a las LDL oxidadas dando lugar a la formación de las células espumosas. Figura de elaboración propia.

En la actualidad, hay elementos suficientes para identificar a los pacientes con riesgo de desarrollar EAC, para ello se emplea la prevención secundaria que va dirigida al uso de tratamientos farmacológicos con la finalidad de controlar la dislipidemia característica de estos sujetos y por tanto, reducir el riesgo de desarrollar EAC. Entre los fármacos con mayor prescripción médica se encuentran las estatinas y los fibratos, el mecanismo de acción que ambos ejercen para disminuir el riesgo de eventos cardiovasculares es la reducción de colesterol y triacilglicéridos, respectivamente.

1.4 FIBRATOS

Los fibratos son una clase de compuestos hipolipidémicos que reducen los niveles de triacilglicéridos y colesterol en plasma. Estos efectos se atribuyen a dos procesos diferentes que son, un aumento en el catabolismo de las partículas ricas en triacilglicéridos y la inhibición de la secreción de las mismas partículas del hígado (Catapano, 1992). Los fibratos inducen la activación de los PPAR α ; éstos

pertencen a la familia de receptores nucleares, son factores de transcripción dependientes de ligando. Los PPAR regulan la expresión de genes específicos mediante su unión a elementos de respuesta a PPARs (PPREs) en los sitios potenciadores de dichos genes (Berger y Moller, 2002). Al interactuar con el ligando, en este caso fenofibrato, ocurre un cambio conformacional en PPAR- α , que lo lleva a formar un heterodímero con el receptor de ácido retinoico (RXR). El heterodímero se trasloca al núcleo y regula la transcripción de genes con PPREs (Friedmann et al, 2005).

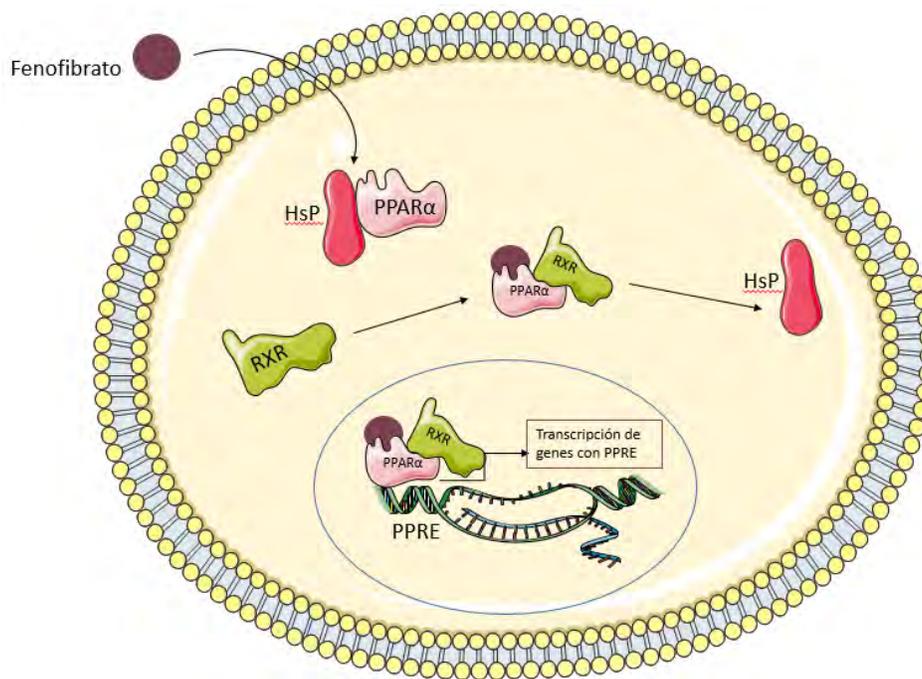


Figura 2. Mecanismo de acción de PPAR. En estado inactivo PPAR se encuentra unido a las proteínas de choque térmico (HSP), cuando el ligando se une a PPAR genera un cambio conformacional que libera a HSP y se une con RXR, el dímero formado se trasloca al núcleo en donde interactúa con los PPREs de diversos genes para regular su transcripción. (Friedmann et al, 2005).

Diversos estudios han demostrado que en el hígado, la β -oxidación de los ácidos grasos está regulada por PPAR- α ya que varios genes involucrados en esta vía tienen un PPRE en la región del promotor (Chinetti, Fruchat y Staels, 2000), como es el caso de la enzima acil CoA sintasa. Igualmente inducen la expresión de la lipasa lipoproteica (LPL), dicha enzima es la encargada de la hidrólisis de los TAG

contenidos en los quilomicrones y las VLDL. Esta reacción tiene como producto los ácidos grasos no esterificados (NEFA) para su utilización en diversos tejidos (Mead, Irvine y Rmji, 2002; Schoonjans, Staels y Aureux 1996). Al contrario de la acción que ejercen los fibratos sobre la LPL, la transcripción del gen de la apoC-III, proteína presente en las partículas VLDL, resulta inhibida por los PPAR- α en el hígado, exacerbando el catabolismo de las VLDL mediado por LPL. Asimismo, los fibratos incrementan la captación de ácidos grasos libres por la proteína transportadora de ácidos libres (FATP), con ello disminuye la síntesis de triacilgliceroles (Staels et al, 1998). Por otra parte, se ha observado que los activadores de PPAR- α inducen la sobre expresión de VEGF en células tumorales de vejiga y en células epiteliales de la córnea y de la retina (Fauconnet, 2002; Zhong y Ward, 2010).

En la pared vascular, la activación de los PPAR- α reduce la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1 y mediante la modulación de NF- κ B regulan la expresión de genes relacionados a la inflamación como proteína C reactiva, IL-6, MCP-1 y TNF- α . Los PPAR- α al contrario de las estatinas, disminuyen las concentraciones de fibrinógeno circulantes reduciendo la posibilidad de formar el fibroateroma (Staels, Maes y Zambon, 2008).

1.5 ESTATINAS

La biosíntesis del colesterol ocurre en el citoplasma y la membrana del retículo endoplásmático de casi todas las células, en este proceso se ve implicada la vía del mevalonato, un precursor del colesterol (Stancu y Sima, 2001). Las estatinas son un grupo de fármacos inhibidores de la enzima que cataliza la conversión de hidroximetilglutaril coenzima A (HMG-CoA) a mevalonato, etapa limitante en la biosíntesis del colesterol (Fig 4). Estos fármacos tienen como principal órgano blanco el hígado, donde compiten con el sustrato natural HMG-CoA para unirse a la enzima HMG-CoA reductasa; cuando se unen al sitio activo generan un cambio conformacional que origina una estructura no funcional, lo que hace a estos fármacos específicos (Emmanuel y Hasfa, 2016).

Las estatinas se introdujeron a la práctica médica como fármacos para disminuir el colesterol; sin embargo, conforme se han estudiado se les han atribuido múltiples actividades ateroprotectoras definidas a continuación.

Una vez que la biosíntesis del colesterol disminuye, se induce la activación de una proteasa que escinde a la proteína de unión a elementos regulatorios de esterol (SREBPs) del retículo endoplasmático, los SREBPs son translocados al núcleo e incrementan la expresión de receptores de LDL en el hepatocito. De esta manera, son captadas las LDL circulantes así como sus precursores (IDL y VLDL), con ello disminuye la susceptibilidad de las LDL a sufrir oxidación y desarrollar el ateroma (Emmanuel y Hasfa, 2016).

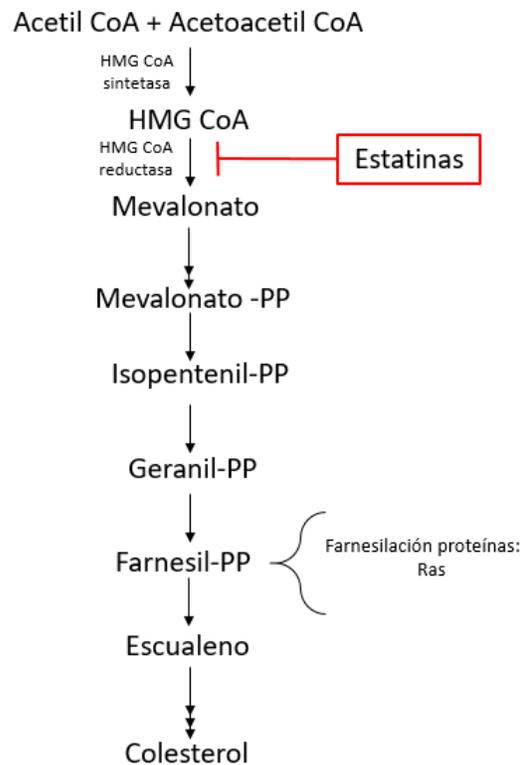


Figura 3. Ruta del mevalonato en células animales. La biosíntesis del colesterol comienza con la condensación de acetil-CoA con acetoacetyl-CoA para formar HMG-CoA en una reacción catalizada por HMG-CoA sintasa, posteriormente, la enzima HMG-CoA reductasa convierte HMG-CoA a mevalonato. Una serie de reacciones son llevadas a cabo y finalizan en la biosíntesis del colesterol. Las estatinas actúan inhibiendo la actividad de la HMG-CoA reductasa y por ende, la formación de intermediarios metabólicos. (Modificado de Goldstein y Brown, 1990).

Las estatinas tienen efectos pleiotrópicos. En este sentido, son capaces de inducir la activación del gen eNOS en el endotelio vascular y así dirigir la producción de óxido nítrico (NO), un potente vasodilatador, de esta forma, regulan la función endotelial. Además reducen los niveles de metaloproteasas que degradan la capa fibrosa del ateroma y aumentan la producción de colágeno, estabilizando el ateroma (Libby y Aikawa, 2003). Asimismo, se ha observado que en ratones tratados con estatinas, existe una disminución en la adherencia y rodamiento leucocitario por una menor expresión de moléculas de adhesión (VCAM-1 y P-selectina). La acción farmacológica de las estatinas también se ve implicada en la disminución de la expresión de citocinas proinflamatorias mediante la reducción de la actividad de NF- κ B en células inflamatorias y vasculares (McFarlane, Muniyappa y Sowers, 2002). El efecto se encuentra mediado por la inhibición de la fosforilación de I- κ B lo que resulta en la inactivación de NF- κ B.

Varios de los efectos de las estatinas son mediados por la inhibición de isoprenoides que se originan a partir del mevalonato y que son compuestos intermediarios en la síntesis endógena del colesterol, como el farnesilpírofosfato (FPP) y geranyl-geranylpirofosfato (GGPP) los cuales son lípidos requeridos para eventos postraduccionales de proteínas implicadas en diversas vías de señalización entre las que se encuentran los miembros de la familia Ras (Rho y Rac) resultando en la inhibición de la señalización. La isoprenilación de estas proteínas es fundamental para la activación y el transporte intracelular que actúan controlando vías de señalización y funciones celulares como apoptosis, diferenciación celular, migración, contracción y regulación de la transcripción de algunos genes (Emmanuel y Hasfa, 2016; Khaidakov, Wang, Khan, Kang, Hermonat y Metha, 2009).

Recientemente se ha demostrado que las estatinas promueven la angiogénesis en animales normocolesterolémicos mediante la estimulación de la vía de señalización intracelular de la proteína cinasa Akt/PKB en células endoteliales y células endoteliales progenitoras (EPC) procedentes de la médula ósea

(Llevandot y Asahara, 2002), dando como resultado la producción de NO; sin embargo, esta estimulación es dependiente de la dosis administrada, ya que se ha reportado que a altas dosis se inhibe dicho efecto, mientras que a bajas dosis promueve la angiogénesis (Weis et al. 2002). A su vez, Akt/PKB actúa en la vía intracelular estimulada por VEGF, el cual promueve la supervivencia celular y el desarrollo vascular. Akt funciona como un activador de la producción de NO por el endotelio en respuesta a VEGF a través de la fosforilación de la óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS), el NO es capaz de promover la angiogénesis mediante el aumento en la proliferación de células endoteliales y su migración (Weis, heeschen, Glassford y Cooke, 2002; Llevandot y Asahara, 2002; Hazem, Remessy, Paganingal y Fagan, 2010; Cooke, 2003).

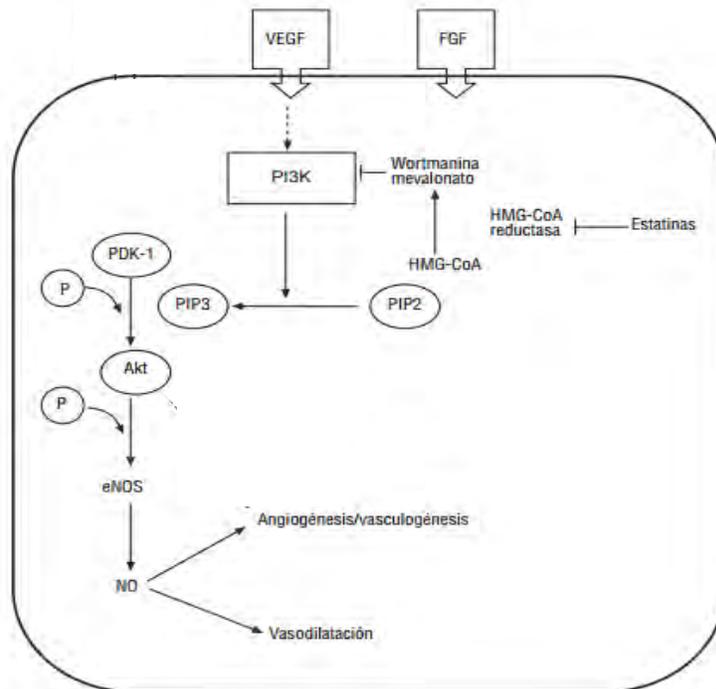


Figura 4. Estatinas, Señalización Akt y angiogénesis. En células endoteliales, el VEGF y FGF se unen con sus receptores, induciendo PI3K encargada de la conversión de PIP₂ a PIP₃, este último es necesario para la fosforilación de Akt, desencadenando la producción de óxido nítrico, promotor de la angiogénesis (Llevandot y Asahara, 2002).

1.6 ANGIOGÉNESIS

La expansión de un tejido es precedida por el desarrollo de nuevos capilares que permitan el intercambio de nutrientes a las células. La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. El proceso de angiogénesis se divide en dos etapas que son activación y resolución. La fase de activación ocurre cuando se produce un estímulo pro-angiogénico, como la secreción de factores de crecimiento (VEGF y FGF).

Después del estímulo las células son activadas y comienzan a perder el contacto célula-célula, así mismo, los pericitos del exterior del vaso y la degradación enzimática de la membrana, proveen una ruta para el desarrollo del vaso sanguíneo brotante. El crecimiento del vaso sanguíneo es dirigido por una célula endotelial denominada tip; la célula tip es sensible al gradiente de mediadores pro-angiogénicos que son secretados por los tejidos angiogénicos. Las células endoteliales adyacentes denominadas células stalk adquieren un fenotipo NOTCH+ que permite la migración de las células en la dirección de la célula tip (Fig 6). En la fase de resolución, los vasos sanguíneos brotantes se fusionan con los vasos vecinos para estabilizar el flujo sanguíneo, además de restablecer la membrana basal, el fenotipo phalanx de las células endoteliales y los pericitos cubrirán el vaso sanguíneo para darle estabilidad (Karamysheva, 2007; Jonhson y Wilgus, 2014).

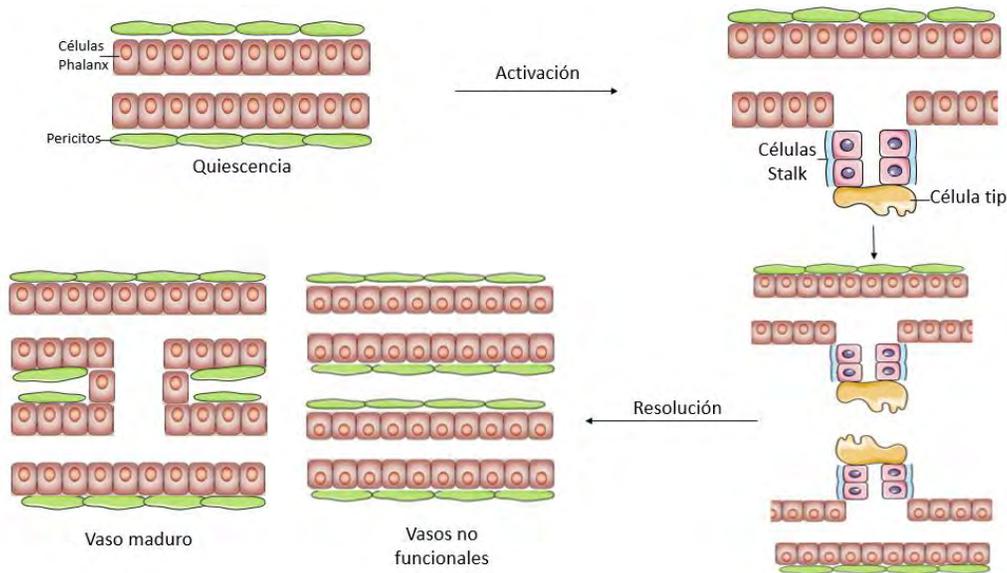


Figura 5. Pasos de la angiogénesis. Los vasos quiescentes están cubiertos por células phalanx, una membrana basal y se encuentran rodeados por pericitos. La activación dirige al cambio de fenotipo de las células phalanx que dirigen el vaso sanguíneo naciente, en la fase de resolución, los vasos nacientes se fusionan y restablecen el flujo sanguíneo, mientras que los vasos no funcionales regresan sin formar el nuevo vaso creciente. (Johnson y Wilgus, 2014).

1.7 FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR (VEGF)

El gen *VEGF* en humano se encuentra en el cromosoma 6 región p21.1 y está conformado por 640 pb, contiene 8 exones separados por 7 intrones (Ferrara et al, 2003). La familia VEGF se compone de seis miembros que son VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, PlGF, todos ellos tienen un dominio homólogo (Hoeben et al, 2004) y estimulan la proliferación y migración de las células endoteliales *in vitro* (Morfoisse et al, 2015). El VEGF-A a su vez se divide en 4 subtipos producto de *splicing* alternativo, VEGF₁₄₈, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆, (Shibuya, 2011) siendo VEGF₁₆₅ la isoforma más abundante, y la responsable de las propiedades nativas del VEGF (Ferrara, 1999).

La señalización de VEGF se lleva a cabo mediante el receptor VEGFR cuya familia contiene 3 miembros, VEGFA desencadena una cascada de señalización de angiogénesis interaccionando con el receptor VEGFR-1 y VEGFR-2. Dichos receptores pertenecen a la familia de tirosina cinasa. A pesar de que esta familia

activa la señalización Ras o la vía PI3K, se ha observado que la vía PLC γ -PKC-MAPK es activada en la interacción con VEGFR-2 y esto produce la proliferación celular (Shibuya, 2011).

La expresión génica de VEGF se encuentra regulada por una amplia variedad de estímulos como hipoxia, factores de crecimiento, transformaciones, mutaciones en p53, presencia de óxido nítrico y aumento o disminución de ciertas hormonas. Uno de los estímulos con mayor relevancia es la hipoxia, esta se ha estudiado debido a la particularidad presentada en su regulación transcripcional. En estados de hipoxia, una señal de localización nuclear (NLS) trasloca los factores inducibles de hipoxia (HIF1 α y HIF2 α) y activar el gen VEGF mediante la región promotora denominada elemento de respuesta a hipoxia (HRE) (Shibuya, 2011). Se sabe que una variedad de hormonas y factores de crecimiento inducen la sobre expresión del mRNA de VEGF, tales como EGF, TGF- β y el factor de crecimiento de keratinocitos 1 (KGF1). Por otra parte algunas citocinas como TNF- α , también inducen la expresión de VEGF, debido a que el TNF- α promueve la aparición de células endoteliales y el crecimiento de ellas, además de la liberación de moléculas angiogénicas (Hoeben et al, 2004).

1.8 FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA (TGF- β)

El gen que codifica para la proteína TGF- β se encuentra en el cromosoma 19q13.1, con una longitud de 1,448 pb. El precursor de esta proteína contiene 391 aminoácidos, llevándose a cabo una escisión proteolítica en el carbono terminal 112, que da lugar a la proteína formada por 2 cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro. Éste es un péptido multifuncional que regula procesos de proliferación, diferenciación y otras funciones en muchos tipos celulares. El TGF- β es una familia de alrededor de 35 miembros, las diferentes proteínas que la comprenden están relacionadas estructuralmente. A pesar de la gran cantidad de proteínas que presenta dicha familia, existen tres isoformas que han sido ampliamente estudiadas por las funciones biológicas que desarrollan, las cuales son TGF- β 1, TGF- β 2 Y TGF- β 3. De acuerdo a diversos estudios realizados, se encontró que tienen entre un 70- 80 % de homología en la secuencia que los

codifica. Además de tener propiedades similares, las diferentes isoformas son reconocidas por los mismos receptores y en algunos casos ejercen funciones similares por lo que se les han asignado el término genérico TGF- β (Mallat y Tedgui, 2002; Grainger, 2007).

TGF- β ejerce su actividad con la unión a receptores serina/treonina cinasa tipo I y II (T β RI y T β RII). En células endoteliales ha sido reportada la actividad de ALK5, un complejo heterodimérico formado por ambos receptores. El receptor tipo I es fosforilado por el tipo II, como consecuencia ocurre un cambio conformacional y la activación del T β RI que es capaz de propagar la señalización hacia el interior de la célula (fig.6). Se sabe que la angiogénesis se divide en dos etapas que son la fase de activación y la fase de resolución, en ambas TGF- β tiene un efecto en la transcripción de genes pro-angiogénicos que se encuentra mediado por las proteínas de la familia Smad. Dichas proteínas actúan en dos vías de señalización: en la primera, el complejo ALK5 es activado por TGF- β , ALK5 fosforila a Smad 2 y Smad 3, una vez fosforilados, éstos se unen a Smad 4, lo que provoca su traslocación al núcleo donde se une al DNA con la finalidad de regular la expresión de diversos genes que codifican para proteínas necesarias en la fase de resolución de la angiogénesis (PAI-I). TGF- β 1 está implicado también en la expresión de PPAR γ 2, por lo tanto, tiene un papel en la metabolización de lípidos y glucosa. En la segunda vía, la señalización de TGF- β mediada por Smad 1/5 se asocia con la expresión de genes relacionados a la fase de activación de la angiogénesis (*conexina 37*, *Big-H3* y *PAI-I*) (Bertolino et al, 2005; Tan y Chong, 2012).

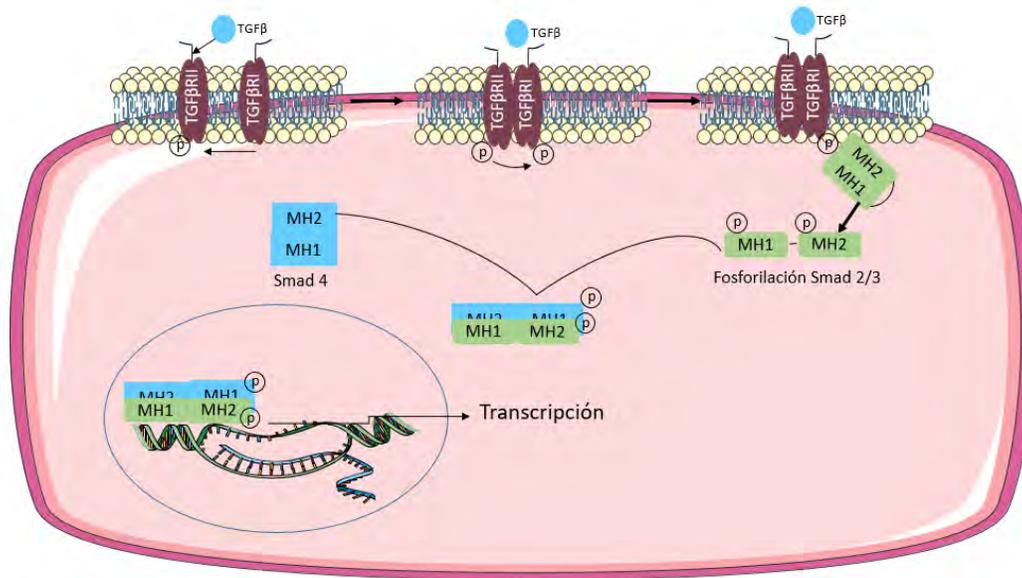


Figura 6. Vía de señalización de TGF-β1/Smad3. La señalización de TGF-β mediante los complejos de receptores TGFβRI y TGFβRII, recluta y activa a los mediadores intracelulares Smad 2 y 3 para ser translocados al núcleo y activar la transcripción de genes blanco (Tan et al, 2012).

1.9 FACTOR DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS

El gen que codifica para la proteína FGF consta de 638 pb. Su localización citogenética es 4q28.1. La familia de FGF consiste en 18 miembros que interfieren en una variedad de procesos mediante la inducción de la señalización intracelular vía FGFR. Estos receptores son de 4 tipos (FGFR1-4), tienen un dominio tirosina cinasa, relacionados estructuralmente, mediante los cuales el FGF ejerce sus efectos biológicos. Cuando el FGFR es activado, dirige la dimerización del receptor, mediante la acción cooperativa de los proteoglicanos sulfato de heparán (HSPGs). A su vez, la activación de los receptores FGFR inducen la vía de señalización MAPK, mediante esta vía ocurre la fosforilación de ERK1/2 lo que resulta en la regulación de la expresión de diversos genes, entre ellos PPARγ y C/EBPα (Neubauer et al, 2004; Presta et al, 2005; Javerzar, Auguste y Bikfalvi, 2002). Además de esta vía, FGF puede activar la vía de señalización PI3K/Akt, dicha vía finaliza en la producción de óxido nítrico que estimula la proliferación y

migración de las células endoteliales necesaria para la angiogénesis; además esta vía activa factores antiapoptóticos como BCL-2 (Murakami y Simons, 2008).

El FGF es un factor pleiotrópico que actúa en diferentes tipos celulares incluyendo las células endoteliales, en éstas, interactúa con el receptor FGFR1. FGF actúa en diversos procesos celulares como la estimulación de la proliferación, migración y diferenciación de células vasculares, por dichos procesos pertenece al grupo de factores angiogénicos junto con VEGF. En condiciones de hipoxia, aumenta HIF α , que activa transcripcionalmente las enzimas responsables de la activación de HIF α . A su vez, este evento aumenta la cantidad de HSPGs en la membrana celular permitiendo una mayor interacción entre FGF y FGFR (Javerzar et al, 2002).

1.10 FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA

Esta proteína se encuentra codificada por el gen *TNF* con una localización citogenética en 6p21.3 y una longitud de 2770 pb que conforman 233 aminoácidos. El TNF es sintetizado como una proteína transmembranal (mTNF) que se dispone en homotrímeros estables, a partir de esta proteína es constituida la citocina homotrimérica soluble (sTNF) que es liberada al citoplasma mediante una escisión proteolítica por la enzima convertidora de TNF- α (TACE) (Wajant, 2003). La sTNF resultante media las actividades biológicas con ayuda de los receptores TNF-R1 y TNF-R2. Una vez que se une el ligando a su receptor, ocurre la activación del factor nuclear kappa beta (NF- κ β) mediante la interacción de proteínas I- κ β con dímeros de TNF-R1, este proceso dirige a la traslocación de NF- κ β hacia el núcleo donde actúa como factor de transcripción de genes relacionados con la inflamación (Hoiruchi, Mitoma, Harashima, Tsukamoto y Shimoda, 2010).

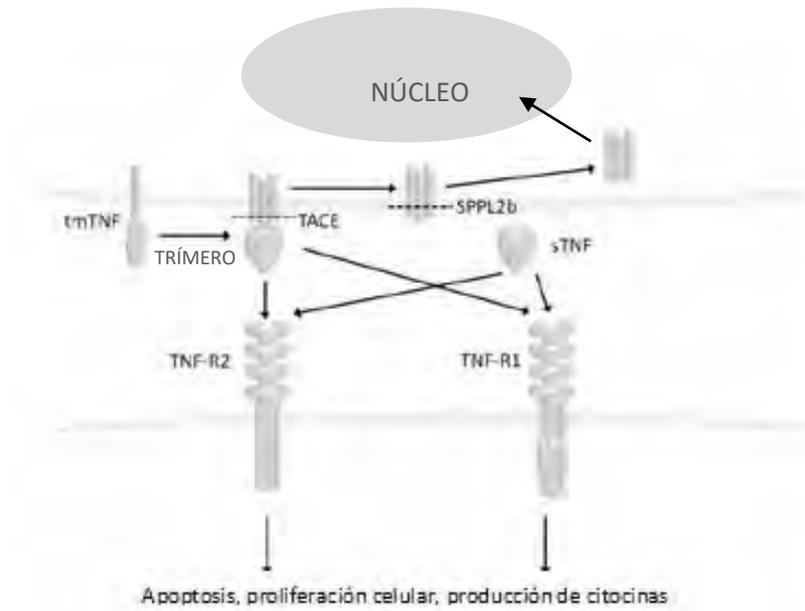


Figura 7. Biología del TNF- α transmembranal y TNF- α soluble. El TNF- α transmembranal, un homotrímero, es escindido por TACE y genera la forma soluble de TNF- α que es capaz de unirse a los receptores TNF-R1 y R2. Tras la escisión con TACE, la TNF- α transmembranal remanente es procesada por SPPL2b y el dominio intracelular es traslocado al núcleo para regular la producción de citocinas por medio de NF- κ B (Horiuchi et al, 2010).

Esta citocina se encuentra implicada en un amplio espectro de procesos biológicos entre los que se pueden destacar la proliferación celular, metabolismo de lípidos, además de ser una potente citocina pro-inflamatoria que ejerce efectos pleiotrópicos en diferentes tipos celulares (Horiuchi et al,2010).

1.11 EFECTO DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO SOBRE EL TEJIDO ADIPOSO

En los últimos años el tejido adiposo ha sido ampliamente estudiado debido a la asociación que tiene con el desarrollo de patologías como la resistencia a la insulina y enfermedades cardiovasculares. Los estudios se han enfocado en la desregulación del metabolismo, sin embargo, el estudio de algunos factores de crecimiento ha sugerido que éstos están relacionados con la disminución de dichas enfermedades.

Uno de los principales factores que se ha estudiado es el VEGF, no sólo por la relación que tiene con el proceso de angiogénesis, sino con el proceso de inflamación. Éste ha sido nombrado como protector de las enfermedades relacionadas a la obesidad ya que se ha observado que se encuentra implicado en la transformación de pre-adipocitos 3T3 a adipocitos maduros (Ferrara, 1999). Por otra parte, la hipoxia en el tejido adiposo es capaz de generar un ambiente inflamatorio que dirige a la desregulación en la secreción de adipocinas proinflamatorias como IL-6 y TNF- α . Un aumento en la secreción de estas citocinas se encuentra asociado con resistencia a la insulina. En este sentido, la sobre expresión de VEGFA en el tejido adiposo disminuye el riesgo de hipoxia y el aumento de la secreción de citocinas proinflamatorias que desencadenan resistencia a la insulina. Además, se ha observado que ratones transgénicos con una sobre expresión de VEGFA inducen la diferenciación de adipocitos beige en el tejido adiposo blanco, proceso conocido como *browning*, con ello, aumenta la termogénesis y disminuyen los niveles de TAG almacenados en los adipocitos. Por otro lado, se ha observado que, sujetos con obesidad mórbida y un nivel bajo de resistencia a la insulina, presentan niveles más altos de VEGFA en el tejido adiposo, por el contrario, pacientes con un alto nivel de resistencia a la insulina presentaron bajos niveles de VEGFA. Igualmente el VEGF es un factor quimioatrayente de macrófagos M2 en el tejido adiposo, con lo cual contribuye al mantenimiento del ambiente antiinflamatorio en el tejido adiposo (Elías, Franckhauser y Bosch, 2012).

Debido al efecto que tiene la hipoxia en el desarrollo de enfermedades metabólicas y sabiendo que FGF es un factor pro-angiogénico, ha sido estudiado el papel que desempeña FGF en el tejido adiposo y se ha encontrado que la única fuente de FGF en este tejido son los adipocitos (Kim, Ahn, Bong, Choe y lee, 2015). Además el FGF es capaz de inhibir así como estimular la adipogénesis dependiendo de la dosis y las condiciones del medio. En células madre de médula ósea tratadas con FGF a una dosis de 25ng/mL se reportó una disminución de la expresión de marcadores adipogénicos (PPAR γ 2) (Le Blanc, Simman, Jakob, Schutze, Shilling, 2015), mientras que a bajas dosis estimula la adipogénesis con

un aumento en la expresión del RNA mensajero de PPAR γ 2. Se sabe que FGF dirige a la activación de la vía de señalización MAPK, esta vía fosforila ERK1/2 lo que resulta en una expresión de PPAR γ y C/EBP α aumentada dirigiendo a la activación de la adipogénesis, (Neubauer et al, 2004) igualmente se ha observado que pacientes obesos, expresan menores niveles de FGF-2 en tejido adiposo visceral que sujetos delgados (Kim et al, 2015).

Dado que el TGF- β es otro factor angiogénico, se ha estudiado el efecto que ejerce en el tejido adiposo; se ha observado que inhibe adipogénesis mediante las proteínas Smad, a pesar de que las proteínas Smad 6 y 7 desempeñan un papel inhibitorio, se cree que la inhibición de la adipogénesis se lleva a cabo por un mecanismo dependiente de Smad 3. Estudios indican que en la inhibición de la adipogénesis por TGF- β , los niveles del RNA mensajero de PPAR γ y C/EBP α disminuyen, por lo que el blanco de TGF- β resulta ser río arriba de la cascada de transcripción de PPAR γ y C/EBP α (Choy y Derynck, 2003; Wang M et al, 2012). Además, se ha observado que en ratones obesos, los niveles de TGF- β 1 se elevan, mientras que en humanos ha sido correlacionado positivamente con el incremento en el tejido adiposo y se relaciona con la disminución en el perfil metabólico del mismo (Tan, Chong, Tan y Tan, 2012).

El TNF- α es una de las adipocinas más estudiadas por el efecto que ejerce en el desarrollo de enfermedades metabólicas; en pacientes con obesidad, el tejido adiposo se caracteriza por la inflamación y aumento de la secreción de TNF- α e IL-6 debido a la mayor infiltración de macrófagos, lo que altera la función del tejido adiposo. En pacientes con diabetes mellitus tipo 2 los niveles de mTNF- α y sTNF- α en tejido adiposo también se encuentran elevados (Cawthorn y Sethi, 2015). Igualmente el TNF- α es capaz de modular la expresión de genes como los transportadores de ácidos grasos (FATP y FAT) dirigiendo a una menor captación de FFA en el tejido adiposo e inhibe la acción de la LPL, disminuyendo el almacenamiento de FFA en los adipocitos y aumentando la presencia de FFA en circulación. Aunado a ello, el TNF- α es capaz de disminuir la expresión de enzimas clave de la lipogénesis como acetil-CoA carboxilasa y ácido graso

sintetasa (Sheti y Hotamisligil, 1999). Por otro lado el TNF- α estimula la lipólisis, ya que disminuye los niveles de expresión de perilipina A, proteína presente en las gotas lipídicas de los adipocitos que regula la acción de la lipasa sensible a hormona. Por último el TNF- α impide la señalización del receptor de insulina dirigiendo al desarrollo de resistencia a la insulina. La señalización de la cascada de insulina está regulada negativamente por fosfatasa incluyendo serina y tirosina fosfatasa. TNF- α induce la fosforilación de residuo ser307 del IRS-1 mediante la vía de señalización ERK (Nieto et al, 2008).

1.12 EFECTO DE LAS ESTATINAS Y FIBRATOS EN EL TEJIDO ADIPOSO.

Las investigaciones no han aportado datos suficientes sobre el efecto que ambos fármacos ejercen sobre el tejido adiposo, sin embargo, se ha observado que la monoterapia con fenofibrato, reduce los eventos cardiovasculares en pacientes que cursan con resistencia a la insulina o DM2 (diabetes mellitus tipo 2) (Halcox, 2014; Tenenbaum, y Fisman E, 2012). Este hallazgo sugiere que los fibratos involucran un mecanismo de acción diferente a la disminución de los TAG plasmáticos. En este sentido, se ha estudiado el efecto que ejerce el fenofibrato sobre el tejido adiposo, encontrando que pueden reducir el tamaño del tejido adiposo en modelos de diabetes, obesidad, resistencia a la insulina, en animales con una dieta alta en grasas y en ratas sanas. Este efecto ha sido atribuido al incremento en la expresión de enzimas involucradas en el catabolismo de ácidos grasos en el hígado, por tanto, la disminución de triacilgliceroles en circulación. Una vez que los ácidos grasos del hígado han sufrido catabolismo y la β -oxidación por acción de los PPAR- α prosigue, es necesario movilizar los ácidos grasos de tejidos periféricos, principalmente del tejido adiposo visceral (González et al, 2009). Igualmente, los fibratos disminuyen el tamaño del adipocito y causa un aumento en los adipocitos pequeños en ratones con una dieta alta en grasas. Por otra parte, el fenofibrato, en tejido adiposo, aumenta los niveles de expresión del RNAm de PEPCCK, enzima clave de la gliceroneogénesis, al contrario de Leptina y TNF- α cuyos niveles de expresión del RNAm disminuyen (Jeong y Yoon, 2009).

Por otro lado, múltiples ensayos clínicos han demostrado los efectos benéficos que las estatinas tienen en la disminución de los niveles de C-LDL y en la prevención del riesgo cardiovascular. Sin embargo, estudios sugieren que las estatinas pueden inducir el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 en sujetos a riesgo que presenten la dislipidemia aterogénica, caracterizada por un aumento en el C-LDL, niveles elevados de TAG en plasma y niveles bajos de C-HDL (colesterol de lipoproteínas de alta densidad). La administración de estatinas, dirige al aumento de la glucosa plasmática y de los niveles de hemoglobina glicosilada (HbA1c). El mecanismo por el cual ocurre dicho efecto aún no se encuentra dilucidado; sin embargo, diversas hipótesis sugieren que la disminución en la síntesis de isoprenoides (GGPP y FPP) produce una menor expresión del transportador de glucosa GLUT-4 en adipocitos, además, la sobreproducción de NO inducida por citocinas puede causar apoptosis en las células β pancreáticas. Por otro lado, cuando la glucosa entra a las células B pancreáticas por acción de GLUT-2, ocurre la fosforilación de la enzima glucocinasa, esta cascada metabólica finaliza en un influjo de calcio dependiente de ATP que a su vez dirige la secreción de insulina, las estatinas inhiben la ubiquinona (CoQ10) factor esencial en la cadena transportadora de electrones, resultando en la inhibición de la secreción de insulina debido a la reducción en la producción de ATP (Sattar y Taskinen, 2012). Además, se ha observado que la administración de estatinas en ratones con dieta alta en grasas, causa una reducción del 75 % en la expresión del receptor de insulina en tejido adiposo.

2. JUSTIFICACIÓN

Los niveles plasmáticos elevados de colesterol y triacilgliceroles son factores de riesgo de desarrollar enfermedad aterosclerosa coronaria. Por lo tanto, una de las estrategias para tratar a los pacientes con EAC es el consumo de fármacos antidislipidémicos como las estatinas y los fibratos. A pesar de controlar la dislipidemia, sigue existiendo una alta incidencia de eventos cardiovasculares en estos pacientes. Además, las estatinas se asocian con la aparición acelerada de diabetes mellitus tipo 2 en sujetos a riesgo de la enfermedad. En contraste, los fibratos aportan un beneficio en cuanto al riesgo de desarrollar enfermedad coronaria sólo en pacientes con resistencia a la insulina o DM2. Sin embargo, los mecanismos tanto del incremento del riesgo de desarrollo de DM2 por estatinas como el beneficio cardiovascular sólo en los pacientes con resistencia a la insulina son desconocidos.

Nuestra propuesta es que ambos fármacos ejercen efectos opuestos en el tejido adiposo visceral. La funcionalidad del tejido adiposo depende de una adecuada vascularización que permita el intercambio de nutrientes y oxígeno, de lo contrario cambia el patrón secretor promoviendo un ambiente pro-inflamatorio contribuyendo de esta manera con el desarrollo y progresión de la resistencia a la insulina y DM2. En este sentido, a pesar de que existe controversia al respecto, las estatinas son capaces de inhibir la angiogénesis. En contraste, los fibratos aumentan la expresión del RNAm de *VEGF*, en células de la córnea, retina y de vejiga. Con base en estos hallazgos, postulamos que las estatinas inhiben la angiogénesis del tejido adiposo y esta es, al menos en parte, la razón del incremento del riesgo de desarrollar DM2. En el mismo orden de ideas, los fibratos favorecerían la angiogénesis del tejido, aportando un beneficio clínico al paciente con resistencia a la insulina.

3. HIPÓTESIS

Si la administración de atorvastatina y fenofibrato tiene un efecto sobre la vascularización del tejido adiposo visceral, entonces el nivel de expresión de los genes angiogénicos será mayor.

4. OBJETIVO

Determinar el efecto de la atorvastatina y del fenofibrato sobre la angiogénesis del tejido adiposo visceral de conejo, por medio de la cuantificación de la proteína PECAM-1 y la expresión del RNA mensajero de los genes *TNF- α* , *TGF- β* , *FGF2* y *VEGFA* en biopsias de tejido.

5. METODOLOGÍA

5.1 Animales

Se utilizaron conejos Nueva Zelanda macho de 3-3.5 Kg sometidos a tratamiento durante ocho semanas y divididos en tres grupos de estudio. El primer grupo (n=6) recibió diariamente vía oral una dosis ponderal de 0.33 mg por kg de peso de atorvastatina y el segundo grupo (n=6) recibió por la misma vía de administración 2.6 mg por kg de peso de fenofibrato, ambas dosis equivalen en masa a 20/160mg de atorvastatina/fenofibrato en el humano. Finalmente, el grupo control (n=6) fue administrado con el vehículo diariamente. Todos los grupos fueron alimentados con alimento estándar y agua *ad libitum*.

5.2 Obtención de muestras sanguíneas

Las muestras sanguíneas utilizadas para los parámetros bioquímicos se obtuvieron antes y después del tratamiento por punción arterial de las orejas con heparina como anticoagulante y fueron centrifugadas a 4500 rpm durante 10 min a 4°C. El plasma obtenido se almacenó a -20°C hasta el momento de su uso.

5.3 Parámetros bioquímicos

Las concentraciones plasmáticas (Colesterol total, triacilgliceroles y glucosa) se determinaron mediante métodos colorimétricos siguiendo las instrucciones del fabricante (Randox UK) (Apéndice A).

5.4 Obtención de tejido adiposo

Una vez concluido el tratamiento, se sacrificó a los conejos mediante dislocación cervical y se extrajo el tejido adiposo visceral, el cual se pesó y guardó una biopsia del mismo en *RNA later* a -70°C hasta el momento de la extracción de RNA total y en formol al 10% para su fijación.

5.5 Extracción de RNA total.

El RNA total se extrajo con Ribozol™ Plus RNA Purification Kit (Amresco, OH, USA). Brevemente, el tejido adiposo visceral se homogenizó en Trizol (por cada 500 mg de tejido se adicionaron 3.5 mL de Trizol) con ayuda de un polytron. Las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 minutos a 4°C, se eliminó la capa de lípidos formada en la superficie del tubo y se transfirió 1 mL a un nuevo tubo.

Posteriormente, se adicionaron 400 µL de cloroformo por cada mL de homogeneizado transferido, se mezcló en vórtex durante 20 segundos y se incubó 3 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron centrifugadas a 15,000 rpm durante 30 minutos a 4°C, al finalizar se obtuvieron tres fases, (acuosa, interfase y orgánica) se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo. Se adicionó 1 mL de etanol al 70 %, se mezcló en vórtex durante 10 segundos y la mezcla se transfirió (600 µL) a una columna de sílice, la cual fue centrifugada a 14,000 rpm durante 1 minuto a 4°C. Se desechó el eluido, se adicionaron 400 µl de solución de lavado y se centrifugó a 14,000 rpm durante 1 minuto a 4°C, este paso se repitió dos veces más. Para eliminar la mayor cantidad posible de solución de lavado sobrante en la columna se centrifugó a 14,000 rpm durante 1 minuto a 4°C. Se ensambló la columna a un tubo nuevo y se agregaron 50 µl de buffer de elución incubando durante 3 minutos a temperatura ambiente. Para finalizar, se centrifugó a 2,000 rpm por 2 minutos a 4°C y a 14,000 rpm durante 1 minuto a 4°C. El RNA contenido en el eluido se cuantificó espectrofotométricamente a 260 nm. La calidad del RNA fue evaluado mediante geles de agarosa al 1 %.

5.6 Eliminación del DNA genómico contaminante

El RNA total obtenido se trató con DNAsa I libre de RNAsas (*Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*). Se utilizó el eluido obtenido durante la extracción de RNA total, donde, por cada 50 µL se agregaron 5 µL de buffer de DNAsa 10x y 1 µL de DNAsa I. Las muestras fueron incubadas durante 1 hora a 37°C con agitación cada 15 minutos. Una vez terminado el periodo de incubación

se agregó EDTA a una concentración final de 2.5 mM y se incubó a 75°C durante 10 minutos para la inactivación de la DNAsa I.

5.7 Retrotranscripción

La retrotranscripción se realizó mediante el uso del kit *Superscript® VILO™ cDNA Synthesis* (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) siguiendo las especificaciones del fabricante (Apéndice B)

5.8 Ensayo de expresión

5.8.1 PCR tiempo real

La cuantificación se llevó a cabo mediante PCR tiempo real utilizando Taqman® Gene Expression Assay y el ABI 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Se utilizó el método de cuantificación relativa por curva estándar (diluciones seriadas 1:5) con un pool de cDNA de tejido adiposo de conejo. Las sondas utilizadas fueron GAPDH (Oc03823402) como gen endógeno y TGF-β (Oc04176122), VEGFA (Oc03395999) FGF2 (Oc03396227) TNF-α (Oc03397716) (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) como genes blanco.

Se realizaron diluciones de las muestras para cada uno de los genes y la reacción de PCR tiempo real se llevó a cabo simplex con TaqMan® Universal PCR Master Mix (Apéndice C). Las condiciones de amplificación fueron 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C y 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y un minuto a 60°C.

5.9 Ensayos histológicos

5.9.1 Bloques de parafina

Las muestras de tejido adiposo visceral fueron fijadas en formol al 10% durante 24 horas. Se incluyeron en bloques de parafina, brevemente, las muestras se montaron en un molde de parafina y fueron incubadas en xilol, xilol-alcohol y soluciones crecientes de concentración de alcohol absoluto (80 %, 96 %, 100 %) para deshidratarlas, finalmente fueron embebidas en parafina líquida. Se

realizaron cortes de 3 μm y se montaron en portaobjetos electrocargados para el ensayo de inmunohistoquímica y la tinción con hematoxilina y eosina.

5.9.2 Inmunohistoquímica

Se realizó una inmunohistoquímica para la proteína CD31. Descrito de manera breve, las muestras se desparafinaron a 60°C durante 1 hora, posteriormente se incubaron en xilol durante 3 minutos, este paso se repitió dos veces más. Después se incubaron en acetona y etanol absoluto durante 3 minutos cada incubación. La actividad de la peroxidasa endógena fue inhibida con una incubación de 30 minutos en una solución de metanol-H₂O₂ al 0.3%. Las muestras se lavaron con agua destilada durante 3 minutos, el lavado se repitió dos veces más.

La recuperación antigénica se realizó con un buffer de EDTA 1Mm pH 8 a 125°C durante 10 segundos, posteriormente se lavaron las muestras tres veces con agua destilada durante 3 minutos y se incubaron con el anticuerpo anti-CD31 (ab199012) (Abcam plc. Cambridge, MA, USA.) a una dilución 1:200 durante 24 horas a 4°C en cámara húmeda. Finalizando la incubación, se realizaron tres lavados con PBS durante 3 minutos cada uno. Las muestras se incubaron con el anticuerpo goat anti-mouse IgG (HRP) (ab255719) (Abcam plc. Cambridge, MA, USA.) a una dilución 1:500 durante 30 minutos. Al terminar la incubación, se lavaron las muestras una vez con PBS durante 3 minutos y se agregó solución de diaminobencidina y H₂O₂. Se realizó un último lavado con agua destilada y se realizó la contra tinción con hematoxilina de Gilly. Las muestras fueron montadas con resina y cubreobjetos.

Las laminillas fueron examinadas con el microscopio Axio Scan.Z1 slide scanner (Zeiss, Germany) y el análisis de inmunohistoquímica se realizó con el programa ImageJ, IHC Profiler (NIH).

5.9.3 Tinción

Se realizó una tinción hematoxilina y eosina (H&E). Los portaobjetos con las muestras fueron incubados en diferentes soluciones iniciando con xilol durante 3

minutos para desparafinar la muestra, posteriormente se hidrató la muestra con incubaciones en soluciones decrecientes de etanol absoluto (100 %, 96 %, 80 %) seguido de un lavado con agua destilada de 1 minuto cada incubación. Se tiñó con hematoxilina de Harris durante 5 minutos, posteriormente las muestras se incubaron en alcohol ácido e hidróxido de amonio al 1 % durante 1 minuto cada uno. Se contra tiñeron con eosina por 2 minutos y se lavó en agua destilada, se deshidrató la muestra con soluciones crecientes de concentración de etanol, (80 %, 96 % 100 %) alcohol absoluto-xilol y xilol durante dos minutos cada incubación. Finalmente se montó la preparación con resina y un cubreobjetos de vidrio.

5.10 Análisis bioinformático

Se realizó un alineamiento entre el gen *VEGFA* (NCBI Reference Sequence: NM_001171623.1) y el elemento de respuesta a PPAR α . El alineamiento se realizó en el programa multalin (F.Corpet).

5.11 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor con *post hoc* tipo diferencia mínima significativa (DMS) para la comparación entre grupos y se realizó una prueba t pareada para la comparación entre los valores bioquímicos. Ambos análisis estadísticos se realizaron con el programa IBM SPSS *Statistics* versión 23. La significancia estadística considerada fue $p < 0.05$. Los datos fueron expresados como la media \pm error estándar.

6. RESULTADOS

El grupo tratado con atorvastatina mostró una disminución en un 58 % en el nivel de colesterol total después del tratamiento, relacionado con el efecto principal que ejerce el fármaco. Los demás parámetros bioquímicos no mostraron significancia estadística en ninguno de los grupos; sin embargo el grupo tratado con fenofibrato sigue una tendencia a disminuir la concentración de triacilgliceroles totales y en colesterol total, de igual manera relacionado con el efecto principal del fármaco.

Tabla 1 | Parámetros bioquímicos de los grupos tratados

	Atorvastatina (n=6)		Fenofibrato (n=6)	
	Basal	Final	Basal	Final
CT	48.20 ± 6.03	28.72 ± 4.05 *	44.31 ± 2.40	34.45 ± 6.82
TG	66.60 ± 4.30	72.95 ± 4.27	66.61 ± 7.52	50.07 ± 9.14
GLU	115.68 ± 5.26	109.68 ± 3.58	116.50 ± 1.79	117.71 ± 4.99
C-HDL	27.73 ± 3.03	25.46 ± 4.16	28.63 ± 3.07	26.28 ± 6.50
Tg-HDL	44.68 ± 5.57	61.03 ± 11.62	45.32 ± 7.36	45.62 ± 8.36
Ph-HDL	78.05 ± 9.99	86.77 ± 15.51	72.29 ± 8.88	70.65 ± 11.61

Los resultados son expresados como la media (mg/dL) ± EE. CT: Colesterol total, TG: Triacilgliceroles total, GLU: Glucosa, C-HDL: Colesterol HDL, Tg-HDL: Triacilgliceroles HDL, Ph-HDL: Fosfolípidos HDL.

En la tabla 2 se presenta el peso del tejido adiposo visceral. El grupo tratado con fenofibrato presentó una masa menor en un 64% y 70 % de tejido adiposo visceral con respecto al grupo control y atorvastatina respectivamente.

Tabla 2 | Masa del tejido adiposo visceral de conejos.

	Control (n= 6)	Atorvastatina (n=6)	Fenofibrato (n=6)
Masa del TA (g)	110 ± 1.96	100 ± 14.99	70 ± 6.70* ^{\$}

Los resultados son expresados como la media ± EE. * p<0.05 vs control. \$p<0.05 vs atorvastatina.

Por otra parte, el tamaño de los adipocitos de los conejos tratados con atorvastatina fue 64% mayor que en el grupo control, según se determinó por el análisis microscópico del tejido teñido con hematoxilina y eosina (Fig. 9).

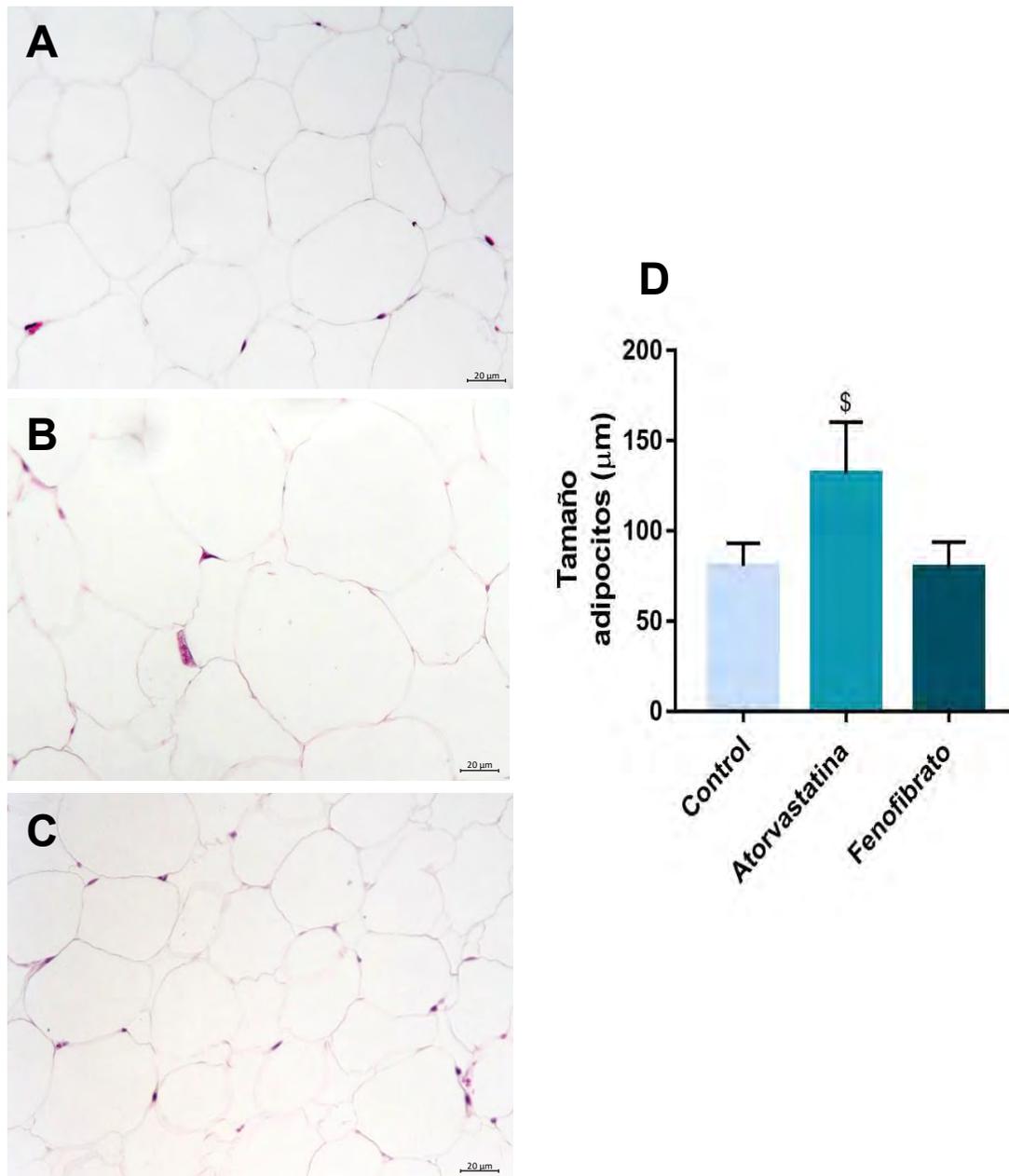


Figura 8. Tinción Hematoxilina y Eosina de tejido adiposo visceral. Secciones histológicas representativas de la tinción hematoxilina y eosina. A, Control; B, Atorvastatina; C, Fenofibrato. Escala: 20μm. D, medición del tamaño de los adipocitos (μm). Los resultados son expresados como la media ± DE. \$p<0.01 vs control.

Se cuantificó la expresión del RNAm de los genes *VEGF*, *FGF2*, *TGF-β* y *TNF-α* en tejido adiposo de los tres grupos de estudio mediante una curva estándar en PCR tiempo real con *GAPDH* como gen endógeno. En los resultados obtenidos se observa un nivel de expresión mayor 100 % y 88 % en la expresión del gen *VEGF* de conejos tratados con fenofibrato con respecto a los grupos control y atorvastatina, respectivamente. En contraste, el nivel de expresión del gen *FGF2* fue 51 % menor en el grupo de fenofibrato comparado con el grupo control; asimismo, en el grupo que recibió atorvastatina también se observó una menor expresión, de un 59% respecto al grupo control (Fig. 10).

El nivel de expresión de los genes *TGF-β* y *TNF-α* no mostró significancia estadística; sin embargo, la expresión de *TGF-β* tiende a ser mayor en el grupo de fenofibrato. En contraste, la expresión de *TNF-α* en el grupo tratado con atorvastatina mostró una ligera tendencia a ser menor con respecto al grupo control.

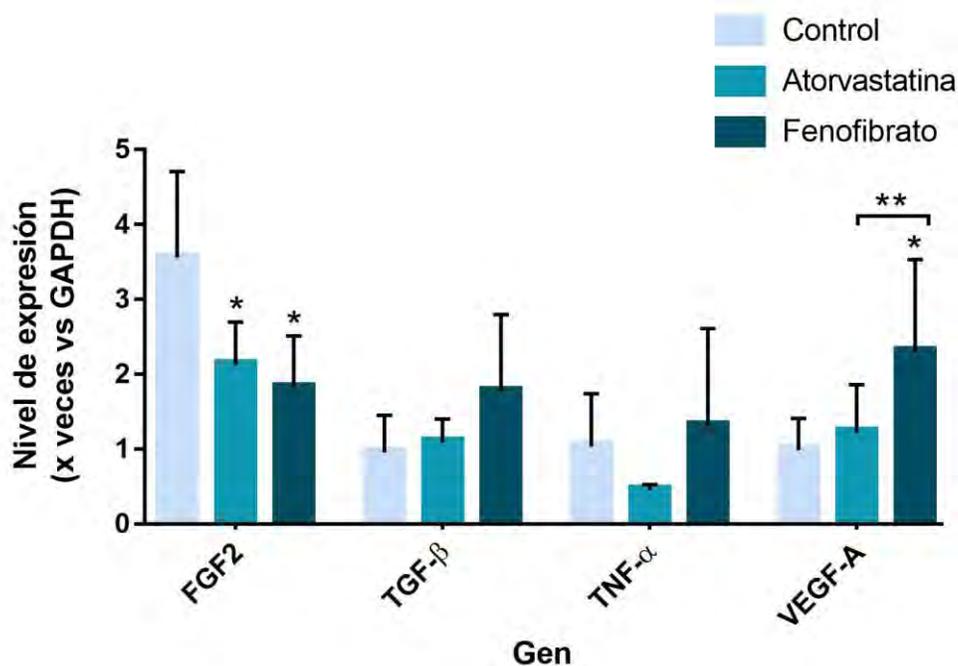


Figura 9. Nivel de expresión del RNAm de los genes estudiados en tejido adiposo visceral. Los resultados son expresados como la media ± DE. *p<0.05 vs control. ** p<0.05 vs tratamientos.

Debido al aumento en la expresión del RNAm de *VEGF* tras la administración con fenofibrato, realizamos el alineamiento del gen *VEGFA* con la secuencia del elemento de respuesta a $PPAR\alpha$ (PPRE) y encontramos que el gen *VEGF* tiene un PPRE (Fig. 11).



Figura 10. Alineamiento del gen *VEGF* con el elemento de respuesta a $PPAR\alpha$. En color rojo se marca el alineamiento entre el PPRE (Inferior) y la secuencia del gen *VEGFA* (superior)

Para corroborar si existe un aumento en la angiogénesis del tejido adiposo visceral después de la administración con fenofibrato y atorvastatina, realizamos la cuantificación de la proteína CD31 (PECAM-1).

En los resultados se observa un nivel de positividad mayor (10 %) de la proteína PECAM-1 en conejos tratados con fenofibrato respecto al grupo control, mientras que el nivel de positividad de PECAM-1 es similar en los conejos tratados con atorvastatina y el grupo control (Fig. 12).

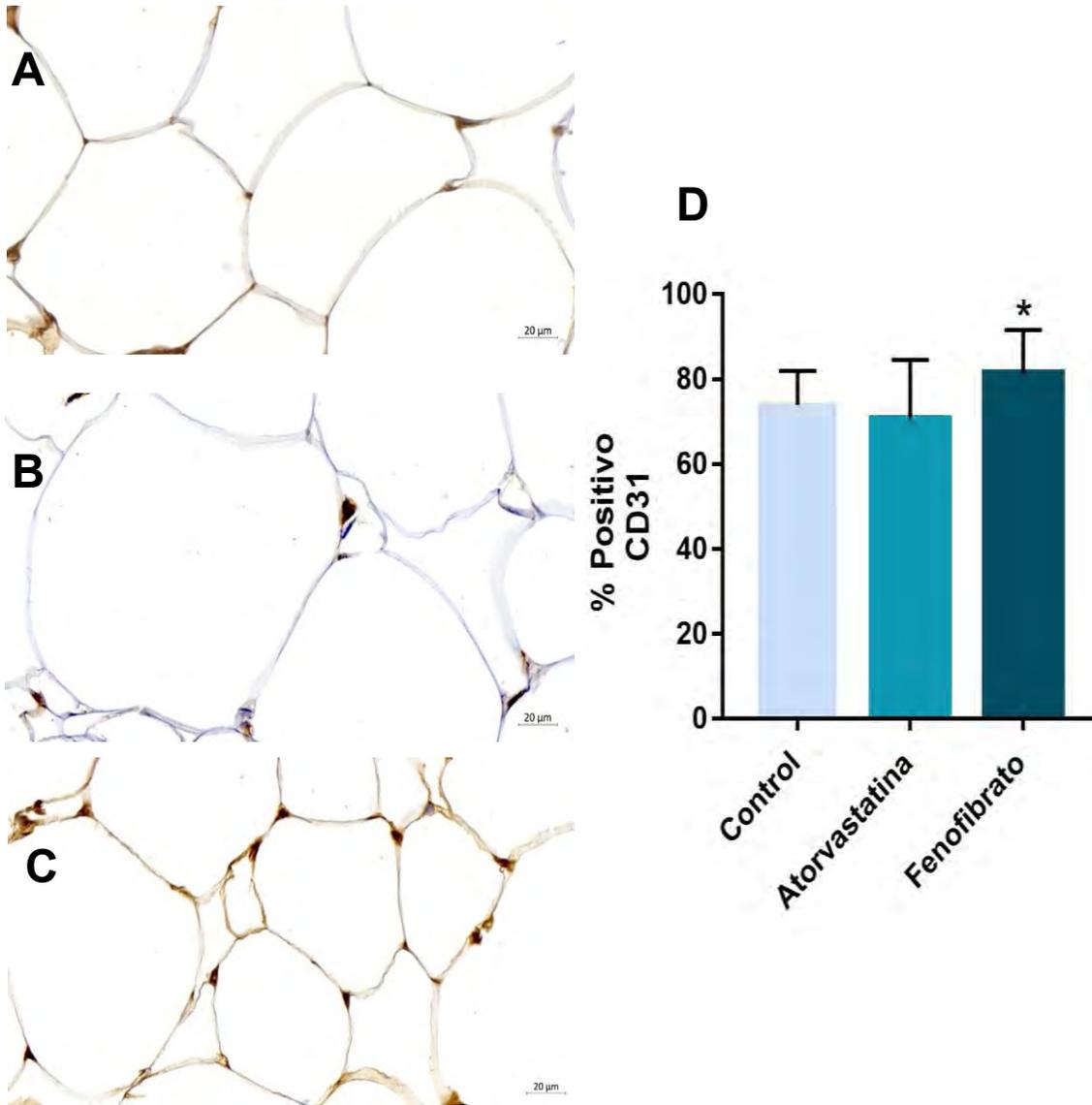


Figura 11. Inmunohistoquímica de la proteína CD31 en tejido adiposo visceral. Secciones histológicas representativas de la inmunohistoquímica de la proteína CD31. A, Control; B, Atorvastatina; C, Fenofibrato. Escala: 20µm. D, Cuantificación del nivel positivo de CD31, los resultados son expresados como la media ± DE. *p<0.05 vs control.

7. DISCUSIÓN

El fenofibrato induce el aumento de la angiogénesis en el tejido adiposo visceral con una menor masa de tejido, mientras que la atorvastatina aumenta el tamaño de los adipocitos sin mostrar una mayor masa del tejido adiposo visceral. Nuestros resultados sugieren que el efecto del fenofibrato sobre la angiogénesis está relacionado con una sobreexpresión del gen *VEGFA*, mientras que los efectos de atorvastatina estarían relacionados con sólo un decremento de la expresión del gen de *FGF2*.

La sobreexpresión de *VEGFA* observada en nuestro estudio por el tratamiento de los conejos con fenofibrato concuerda con el reporte previo de Fauconnet *et al* (2002); tanto este estudio *in vitro* como nuestros resultados, sugirieron que el gen *VEGFA* tiene un elemento de respuesta a PPAR α . Sin embargo, en la región del promotor que Fauconnet *et al*, estudiaron no encontraron el elemento de respuesta; los mismos autores proponen que el gen *VEGFA* tiene un elemento de respuesta en una región del promotor diferente a la estudiada. Nuestro análisis bioinformático demuestra que sí existe un elemento de respuesta a PPAR α en el promotor del gen *VEGFA*. Tomando en cuenta la cuantificación del RNAm y el análisis bioinformático, nuestro estudio demuestra que el fenofibrato ejerce una acción directa en la sobre expresión de *VEGFA*.

Como se mencionó, *VEGFA* tiene un efecto directo sobre la angiogénesis ya que es el principal mediador de ésta; en este mismo sentido, el aumento de la proteína PECAM-1 en el tejido adiposo demuestra que la sobreexpresión del gen *VEGF* se asocia a una mayor angiogénesis, independientemente de la disminución de la expresión de *FGF*. Por lo tanto, nuestros resultados demuestran que la administración de fenofibrato aumenta la angiogénesis en tejido adiposo visceral. La consecuencia de tal efecto podría estar relacionada con una disminución de la hipoxia en el tejido, lo que resultaría en la atenuación del proceso inflamatorio

asociado a la hipertrofia de los adipocitos cuando no hay una irrigación sanguínea adecuada al tejido (Blüer M. (2016).

Además del efecto sobre la vascularización, el fenofibrato indujo una disminución de la masa total del tejido adiposo sin cambios en el tamaño de los adipocitos. Estos hallazgos son consistentes con la capacidad que tiene el fenofibrato de limitar en el desarrollo del porcentaje de adiposidad en ratones tratados en forma crónica con el fármaco (Rachid et al 2015). Ese mismo estudio demostró la transformación de tejido adiposo blanco subcutáneo en tejidos adiposo marrón. En nuestro estudio la morfología aparente de los adipocitos no cambió, sugiriendo que el TA visceral no es susceptible a dicha transformación inducida por el fibrato, o bien, que es un efecto especie-dependiente. Más estudios son necesarios para identificar la posible transformación de TA blanco en TA beige en el conejo tratado con fenofibrato (Rachid et al, 2015).

Todo lo anterior sugiere que el fenofibrato podría aportar beneficios cardiovasculares selectivamente a los pacientes con resistencia a la insulina y DM2 (Halcox et al, 2014), no por su efecto primario de disminuir los triacilgliceroles en plasma (Tenenbaum, y Fisman E, 2012), sino por inducir un tejido adiposo mejor irrigado, menos abundante y posiblemente también más funcional. Estudios en humanos son necesarios para comprobar esta hipótesis. Por otro lado, FGF2 también es otro importante mediador de la angiogénesis; sus principales efectos en ella son la producción de óxido nítrico que estimula la proliferación, migración y diferenciación de células vasculares (Presta et al, 2005). Inconsistente con el aumento en angiogénesis por acción del fenofibrato, el RNAm de *FGF2* disminuyó; realizamos la búsqueda bioinformática del elemento de respuesta en el promotor del gen *FGF2* y no se encontró; sin embargo no descartamos la idea de una proteína reguladora no reportada que inhiba la expresión de *FGF2* por activación de PPAR α . Igualmente, FGF es un factor con múltiples funciones en el tejido adiposo, una de las más importantes es la adipogénesis. Además, el FGF tiene varias isoformas que tienen funciones diversas en el tejido adiposo (Presta et al, 2005). En este sentido, se sugiere que

la isoforma FGF2 no desarrolla una función angiogénica en el tejido adiposo visceral de conejos tratados con fenofibrato.

En cuanto al efecto de la atorvastatina sobre el tejido adiposo, recientemente, estudios epidemiológicos y metaanálisis han asociado la administración de estatinas con la precipitación de diabetes mellitus tipo 2 en sujetos a riesgo (Sattar y Taskinen, 2012) sin embargo el mecanismo aún no se ha establecido.

La efectividad de las estatinas en reducir el riesgo cardiovascular está muy bien demostrado por estudios clínicos en todas las categorías de pacientes, desde prevención secundaria hasta sujetos con bajo riesgo de enfermedad cardiovascular en prevención primaria (Baigent et al, 2005; Baigent et al, 2010; CCT collaborators, 2012; Emberson et al, 2012). Sin embargo, meta-análisis y estudios recientes han generado la advertencia de que las estatinas podían elevar de un 10 a un 47 % el riesgo de desarrollar DM2 (Sattar et al, 2010; Mills et al, 2011; Culver et al, 2012; Wang KL et al, 2012; Carter et al, 2013, Macedo et al, 2014). Dicho riesgo está fundamentalmente asociado con los niveles basales de glucosa plasmática y con el número de factores de riesgo coexistentes en el paciente.

La hipertrofia de los adipocitos sin incremento de la vascularización del tejido adiposo visceral en los conejos tratados con atorvastatina, es congruente con el incremento del riesgo de desarrollo de diabetes en pacientes tratados con estatinas. La hipertrofia de los adipocitos es una de las primeras etapas en la inflamación del tejido adiposo, ya que con el incremento en el tamaño, produce un cambio en el patrón secretor de los mismos; incrementa la secreción de mediadores pro-inflamatorios como MCP-1, leptina e IL-6, mientras que disminuye la secreción de factores anti-inflamatorios o factores que aumentan la sensibilidad a la insulina como adiponectina e IL-10 (Blüer M, 2016).

Por otro lado, Tsukabi et al, demostraron que células de osteosarcoma incubadas con estatinas reducen la expresión de factores angiogénicos, entre los cuales se encuentra *FGF2*, dicho efecto se da por un mecanismo dependiente de la

producción de GGPP. Nuestros resultados indican que no hubo un aumento en la angiogénesis del tejido adiposo visceral, consistente con el estudio mencionado. Sin embargo, el tamaño de los adipocitos aumentó favoreciendo la disfunción del tejido y un estado pro-inflamatorio.

La hipertrofia de los adipocitos y la hipoxia generada por el aumento en el tamaño de ellos puede desencadenar la liberación de ácidos grasos en su interior. En este sentido, se sabe que los ácidos grasos en circulación tienen mayor relación con el desarrollo de resistencia a la insulina que los niveles de TNF- α e IL-6 (Nieto, 2008). El conjunto de ambos factores (hipoxia e hipertrofia) conllevan al desarrollo de resistencia a la insulina, por lo que se sugiere que el mecanismo por el cual las estatinas precipitan el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 es el efecto que causa en el aumento del tamaño de los adipocitos del tejido adiposo visceral.

En resumen, el efecto del fenofibrato a dosis equivalentes a las usadas en el humano sobre el tejido adiposo visceral de conejo fue de un aumento de la vascularización y disminución de la masa tisular. En contraste, la atorvastatina indujo aumento de los adipocitos sin incremento de la vascularización. Los efectos de ambos fármacos son consistentes con las evidencias clínicas en humanos; por lo tanto, nuestros resultados abren nuevos horizontes en la comprensión de los efectos globales de ambos fármacos en la prevención del riesgo cardiovascular. Si estos resultados se corroboran en humanos, se podrá hacer un uso más racional de las estatinas y los fibratos para el manejo del riesgo de enfermedad aterosclerosa coronaria.

8. CONCLUSIÓN

El fenofibrato induce un incremento en la angiogénesis del tejido adiposo visceral de conejo y disminuye la masa del mismo, mientras que la atorvastatina no induce cambios en la angiogénesis, sin embargo aumenta el tamaño de los adipocitos del tejido adiposo visceral de conejos.

9. PERSPECTIVAS

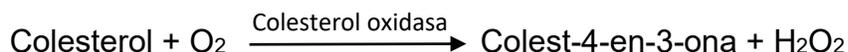
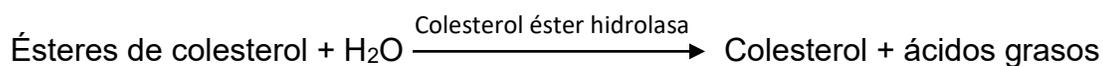
Los datos obtenidos dirigen al desarrollo de estudios que confirmen o descarten la idea resultante sobre el efecto que tienen la atorvastatina y el fenofibrato en el tejido adiposo visceral.

1. Verificar la reproducibilidad de los resultados en ambos tratamientos.
2. Cuantificar los niveles de adiponectina.
3. Cuantificación de los niveles de ácidos grasos libres en los conejos tratados con atorvastatina.
4. Realizar el estudio en un modelo de resistencia a la insulina.

10. APÉNDICES

10.1 APÉNDICE A

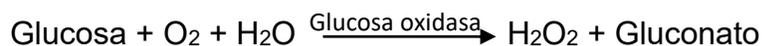
- Reacciones enzimáticas para la determinación de la concentración de colesterol total en plasma



- Reacciones enzimáticas para la determinación de la concentración de triacilglicerolos en plasma



- Reacciones enzimáticas para la determinación de la concentración plasmática de glucosa



- I. En una celda adicionar los siguientes reactivos de acuerdo a la determinación a realizar.

Celda	Estándar	Agua	Muestra
Estándar	10 µL		
Blanco		10 µL	
Muestra			10 µL

*El estándar utilizado depende de la determinación y éstas se realizaron en plasma.

- II. En cada una de las celdas se adiciona 1 mL de reactivo comercial dependiendo la determinación a realizar (Colesterol total, triacilgliceroles o glucosa).
III. Se incuba durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente
IV. Se lee espectrofotométricamente a 500 nm.
V. La concentración del analito se determina con la siguiente fórmula

$$\text{Concentración } \left(\frac{mg}{dL} \right) = \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del estándar}} \times \text{concentración estándar (mg/dL)}$$

10.2 APÉNDICE B

- Retrotranscripción

Para cada reacción de 20 μL se agregan los siguientes componentes

5X VILO	10X VILO	RNA	H₂O libre de nucleasas
4 μL	2 μL	x μL	Cbp 20 μL

x = Concentración de RNA no mayor a 2500 ng.

- I. Adicionar cada uno de los componentes de la reacción a tubos de PCR.
- II. Programar el termociclador con las siguientes condiciones
 - a. 10 minutos a 25°C
 - b. 60 minutos a 42°C
 - c. 5 minutos a 85°C
- III. Determinar la concentración de cDNA espectrofotométricamente (260nm).
- IV. Almacenar el cDNA a -20°C hasta su uso en ensayos de expresión.

10.3 APÉNDICE C

- PCR Tiempo real

Por cada reacción de 20 μL se emplearon los siguientes componentes:

Componente	μL
TaqMan® Universal PCR Master mix (2X)	10
TaqMan® Gene Expression Assay (20X)	1
H ₂ O libre de nucleasas	5
cDNA	4
Volumen final	20

- I. Preparar la mezcla por cada reacción a realizar.
- II. Agregar en la placa el cDNA por triplicado.
- III. Adicionar 16 μL de la mezcla de reacción a cada uno de los pozos.
- IV. Programar el termociclador a las siguientes condiciones:
 - a) 2 minutos a 50°C
 - b) 10 minutos a 95°C
 - c) 40 repeticiones de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C

11. REFERENCIAS

1. Ali A, Hochfeld W, Myburgh R, y Pepper M. (2013). Adipocyte and adipogenesis. *European Journal of Cell Biology*. 92(6-7): 229-236. DOI: 10.1016/j.ejcb.2013.06.001.
2. Ayaser T, Basak M, Arslan K, y Sayan I. (2016). Investigating the correlation of the number of diagnostic criteria to serum adiponectin, leptin, resistin, TNF-alpha, EGFR levels and abdominal adipose tissue. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. 10(2): S165-S169. DOI: 10.1016/j.dsx.2016.03.010.
3. Baigent C, Blackwell L, Emberson J, Holland LE, Reith C, Bhalra N, Peto R, Barnes EH, Keech A, Simes J, Collins R; Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaboration. (2010). Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials. *Lancet*. 376 (9753): 1670-1681. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)61350-5.
4. Baigent C, Keech A, Kearney PM, Blackwell L, Buck G, Pollicino C, Kirby A, Sourjina T, Peto R, Collins R, Simes R; Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaborators. (2005). Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet*. 366 (9493): 1267-1278. DOI:10.1016/S0140-6736(05)67394-1.
5. Berger J. y Moller D. (2002). The Mechanisms of Action of PPARs. *Annual Review of Medicine*. 53(1): 409-435. DOI:10.1146/annurev.med.53.082901.104018
6. Bertolino P, Deckers M, Lebrin F y Dijke P. (2005). Transforming Growth Factor β Signal Transduction in Angiogenesis and Vascular Disorders. *CHEST*. 128:585S-590S. DOI:10.1378/chest.128.6_suppl.585S.
7. Blüer M. (2016). Adipose tissue inflammation: a cause or consequence of obesity-related insulin resistance?. *Clinical Science*. 130: 1603-1614. DOI: 10.1042/CS20160005.
8. Bobryshev Y. (2006). Monocyte recruitment and foam cell formation in atherosclerosis. *Micron*. 37(3): 208-222. DOI: 10.1016/j.micron.2005.10.007.
9. Bournon-Cuellar RA, López-Nuche M. Aterosclerosis y lesión endotelial: ¿proceso irreversible? *Med Int Mex*. 26(6): 590-596.
10. Carter AA, Gomes T, Camacho X, Juurlink DN, Shah BR, Mamdani MM. (2013). Risk of incident diabetes among patients treated with statins: population based study. *BMJ*. 346. DOI:10.1136/bmj.f2610.
11. Cásarro C, Roggerio A, Lázara C, Pacanaro A, Cury V, Benvenuti L, Pádua A, Irigoyen M. (2017). Down-regulation of fibroblast growth factor 2 and its co-receptors heparan sulfate proteoglycans by resveratrol underlies the improvement of cardiac dysfunction in experimental diabetes. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 40: 219-227. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2016.11.015.

12. Catapano A. (1992). Mode of action of fibrates. *Pharmacological Research*. 26(4): 331-340.
13. Cawthorn W y Sethi J (2015) TNF- α and adipocyte biology *FEBS Lett*. 582(1): 117–131. DOI:10.1016/j.febslet.2007.11.051.
14. Chinetti G, Fruchart J, y Staels B. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): Nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflammation Research*. 49(10): 497-505. DOI:10.1007/s000110050622.
15. Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaborators (2012). The effects of lowering LDL cholesterol with statin therapy in people at low risk of vascular disease: meta-analysis of individual data from 27 randomised trials. *Lancet*. 380 (9841): 581-590. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)60367-5.
16. Choy L y Derynck R. (2003). Transforming Growth Factor- β Inhibits Adipocyte Differentiation by Smad3 Interacting with CCAAT/Enhancer-binding Protein (C/EBP) and Repressing C/EBP Transactivation Function. *Journal of Biological Chemistry*. 278(11): 9609-9619. DOI:10.1074/jbc.M212259200.
17. Cooke J. (2003). NO and angiogenesis. *Atherosclerosis supplements*. 4(2003): 56-60.
18. Culver AL, Ockene IS, Balasubramanian R, Olendzki BC, Sepavich DM, Wactawski-Wende J, Manson JE, Qiao Y, Liu S, Merriam PA, Rahilly-Tierny C, Thomas F, Berger JS, Ockene JK, Curb JD, Ma Y. (2012) Statin use and risk of diabetes mellitus in postmenopausal women in the Women's Health Initiative. *Arch Intern Med*. 172 (2): 144-152. DOI: 10.1001/archinternmed.2011.625.
19. Elías I, Franckhauser S y Bosch F. (2012). New insights into adipose tissue VEGF-A actions in the control of obesity and insulin resistance. *Adipocyte*. 2(2): 109-113. DOI:10.4161/adip.22880.
20. Emberson JR, Kearney PM, Blackwell L, Newman C, Reith C, Bhala N, Holland L, Peto R, Keech A, Collins R, Simes J, Baigent C. Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaboration (2012). Lack of effect of lowering LDL cholesterol on cancer: meta-analysis of individual data from 175,000 people in 27 randomized trials of statin therapy. *PLoS One*. 2012, 7(1): e29849-Epub. DOI: 10.1371/journal.pone.0029849.
21. Emmanuel E. y Hasfa H. (2016). Biochemistry of statins. *Advances in Clinical Chemistry*. 73. DOI:10.1016/bs.acc.2015.10.005.
22. Fauconnet S, Lascombe I, Chabannes E, Adessi G, Desvegne B, Wahli W, Bittard H. (2002). Differential Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Expression by Peroxisome Proliferator-activated Receptors in Bladder Cancer Cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 277(26): 23534-23543. DOI:10.1074/jbc.M200172200.

23. Ferrara, N. (1999). Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney International*. 56(3): 794-814. DOI:10.1046/j.1523-1755.1999.00610.x.
24. Goldstein, J. y Brown, M. (1990). Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*. 343(6257): 425-430. DOI:10.1038/343425a0.
25. González M, Vidal H, Herrera E, Bocos C. (2009). Fenofibrate reduces adiposity in pregnant and virgin rats but through different mechanism. *BMB reports* 42(10):679-684.
26. Grainger D. (2007). TGF- β and atherosclerosis in man. *Cardiovascular Research*. 74(2): 213-222. DOI:10.1016/j.cardiores.2007.02.022.
27. Guilherme A, Virbasius J, Puri V y Czech M. (2008). Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 9(5): 367-377. DOI: 10.1038/nrm2391.
28. Halcox J, MA, MB, BChir, MD, FRCP,1 and Misra A, MBBS, MD2. (2014). Type 2 Diabetes Mellitus, Metabolic Syndrome, and Mixed Dyslipidemia: How Similar, How Different, and How to Treat? *Metabolic Syndrome and Related Disorders*. 1-21. DOI:10.1089/met.2014.0049.
29. Hazem E, Remessy A, Payaningal S y Fagan S. (2010). Diverse Effects of Statins on Angiogenesis: New Therapeutic Avenues. *Pharmacotherapy*. 30(2):169-176. DOI: 10.1592/phco.30.2.169.
30. Hoeben A. Landuyt B. Highley S. Wildiers H. Van Oosterom A y Bruijijn E. (2004). Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis. *Pharmacol Rev*. 56: 549–580, 2004. DOI:10.1124/pr.56.4.3.
31. Hopkins P. (2013).Molecular Biology of Atherosclerosis. *Physiological Reviews*. 93(3): 1317-1542. DOI:10.1152/physrev.00004.2012.
32. Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S, Tsukamoto H, y Shimoda T. (2010). Transmembrane TNF: structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology*. 49(7): 1215-1228. DOI:10.1093/rheumatology/keq031.
33. Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K, Miyata Y, Tanaka S, Segawa K, Furukawa S, Tochito Y, Komuro R, Matsuda M y Shimomura L. (2006). Adipose tissue Hypoxia in Obesity and its Impact on Adipocytokine Dysregulation. *Diabetes*: (5): 901-911. DOI: 10.2337/db06-0911.
34. Hutley L, Shurety W, Newell F, McGeary R, Pelton N, Grant J, Herington A, Cameron D, Whitehead J y Prins J. (2004). Fibroblast Growth Factor 1 A Key Regulator of Human Adipogenesis. *Diabetes* 53: 3097-3106.
35. Iacobellis G, Corradi D y Sharma A. (2005) Epicardial adipose tissue: anatomic, biomolecular and clinical relationships with the heart. *Nature clinical practice* 2(10): 536-542. DOI: 10.1038/ncpcardio0319.
36. Javerzat S, Auguste P y Bikfalvi A. (2002). The role of fibroblast growth factors in vascular development. *Trends in Molecular Medicine*. 8(10): 483-489.

37. Jeong S y Yoon M. (2009). Fenofibrate inhibits adipocyte hypertrophy and insulin resistance by activating adipose PPAR α in high fat diet-induced obese mice. *Experimental and Molecular Medicine*. 41(6): 397-405. DOI:10.3858/emm.2009.41.6.045.
38. Johnson K y Wilgus T. (2014) Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in the Regulation of Cutaneous Wound Repair. *Advances in wound care*. 3(10): 647-659. DOI: 10.1089/wound.2013.0517.
39. Junghyo J, Gavrilova O, Pack S , Jou W, Mullen S, Sumner A, Cushman S y Periwal V. (2009). Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth. *PLoS Comput Biol*. 5(3): e1000324. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1000324
40. Karamysheva A. (2015). Mechanism of Angiogenesis. *Biokhimiya* 73(7): 935-948.
41. Khaidakov M, Wang W, Khan J, Kang B, Hermonat P, y Mehta J. (2009). Statins and angiogenesis: Is it about connections? *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 387(3): 543-547. DOI:10.1016/j.bbrc.2009.07.057
42. Kim S, Ahn C, Bong N, Choe S y Lee DK. (2015). Biphasic Effects of FGF2 on Adipogenesis. *PLoS ONE* 10(3): e0120073. DOI:10.1371/journal.pone.0120073
43. Le Blanc S, Simman M, Jakob F, Schutze N, Shilling T. (2015). Fibroblast growth factors 1 and 2 inhibit adipogenesis of human bone marrow stromal cells in 3D collagen gels. *Experimental Cell Research*. 338(2):136-48. DOI: 10.1016/j.yexcr.2015.09.009.
44. Lefterova M. y Lazar, M. (2009). New developments in adipogenesis. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 20(3): 107-114. DOI:10.1016/j.tem.2008.11.005.
45. Libby P. y Aikawa M. (2003). Mechanisms of plaque stabilization with statins. *The American Journal of Cardiology*. 91(4): 4-8.
46. Llevandot J. y Asahara T. (2002) Efecto de las estatinas en la inducción de angiogénesis y vasculogénesis. *Revista Española de Cardiología*. 55(8):838-44
47. Lopes H, Corrêa-Giannella M, Consolim-Colombo F, y Egan B. (2016). Visceral adiposity syndrome. *Diabetol Metab Syndr*. 8(1). DOI: 10.1186/s13098-016-0156-2.
48. Luna M. (2016). Análisis de la expresión de RNAm de genes relacionados con la calcificación e inflamación en tejido adiposo epicárdico. Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
49. Lusis A. (2000). Atherosclerosis. *Nature*. 407. DOI: 10.1038/35025203.
50. Macedo AF, Douglas I, Smeeth L, Forbes H, Ebrahim S. (2014) Statins and the risk of type 2 diabetes mellitus: cohort study using the UK clinical practice research datalink. *BMC Cardiovasc Disord* 14:85. DOI: 10.1186/1471-2261-14-85.
51. Mallat Z, y Tedgui A. (2002). The role of transforming growth factor beta in atherosclerosis: novel insights and future perspectives. *Current Opinion in Lipidology*. 13(5): 523-529.
52. McFarlane S, Muniyappa R, Francisco R, y Sowers J. (2002). Pleiotropic Effects of Statins: Lipid Reduction and Beyond. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 87(4): 1451-1458. DOI:10.1210/jcem.87.4.8412.

53. Mead J, Irvine S, y Ramji D. (2002). Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *Journal of Molecular Medicine*. 80(12): 753-769. DOI: 10.1007/s00109-002-0384-9
54. Mills EJ, Wu P, Chong G, Ghement I, Singh S, Akl EA, Eyawo O, Guyatt G, Berwanger O, Briel M. (2011). Efficacy and safety of statin treatment for cardiovascular disease: a network meta-analysis of 170,255 patients from 76 randomized trials. *QJM*. 104 (2): 109-124. DOI: 10.1093/qjmed/hcq165.
55. Morfoisse F, Renaud E, Hantelys F, Prats A, y Garmy-Susini B. (2015). Role of hypoxia and vascular endothelial growth factors in lymphangiogenesis. *Molecular and Cellular Oncology* 2:4, e1024821 DOI:10.1080/23723556.2015.1024821.
56. Murakami M, y Simons M. (2008). Fibroblast growth factor of neovascularization. *Curr Opin Hematol*. 15(3): 205-220. DOI:10.1097/MOH.0b013e3282f97d98.
57. Neubauer M, Fischbach C, Bauer P, Lieb E, Hacker M, Tessmar J, Shulz M, Goepferich A, Blunck T. (2004). Basic fibroblast growth factor enhances PPAR γ ligand-induced adipogenesis of mesenchymal stem cells. *FEBS Letters*. 557: 277-283. DOI:10.1016/j.febslet.2004.10.020.
58. Nieto I, Fernández S, Krämer D, Vila R, Garcia L, Lorenzo M. (2008). Insulin resistance associated to obesity: the link TNF- α . *Archives of physiology and biochemistry*. 114(3): 183-194. DOI: 10.1080/13813450802181047
59. Rachid TL, Penna-de-Carvalho A, Bringhenti I, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Fenofibrate (PPAR α agonist) induces beige cell formation in subcutaneous white adipose tissue from diet-induced male obese mice. *Mol Cell Endocrinol*. 402:86-94. DOI:10.1016/j.mce.2014.12.027.
60. Ràfols M. (2014). Tejido adiposo: heterogeneidad celular y diversidad funcional. *Endocrinología Y Nutrición*. 61(2): 100-112. DOI:10.1016/j.endonu.2013.03.011
61. Raghavan V. (2012). Insulin Resistance and Atherosclerosis. *Heart Failure Clinics*. 8(4): 575-587. DOI: 10.1016/j.hfc.2012.06.014.
62. Razani B, Chakravarthy M, y Semenkovich C. (2008). Insulin Resistance and Atherosclerosis. *Endocrinology and Metabolism Clinics Of North America*. 37(3): 603-621. doi: 10.1172/JCI29024
63. Rosen E y Spiegelman B. (2014). What We Talk About When We talk About Fat. *Cell*. 156(1): 20-36. DOI:10.1016/j.cell.2013.12.012.
64. Rosen E. y Spiegelman B. (2000). Molecular Regulation of Adipogenesis. *Annual Review of Cell And Developmental Biology*. 16(1): 145-171. DOI:10.1146/annurev.cellbio.16.1.145.
65. Rutkowski J, Stern J y Scherer P. (2015). The cell biology of fat expansion. *The Journal of Cell Biology*. 208(5): 501-512. DOI: 10.1083/jcb.201409063.
66. Sarjeant K y Stephens J. (2012). Adipogenesis. *Cold Spring Perspect Biol*. 4: 1-14. DOI: 10.1101/cshperspect.a008417
67. Sattar N, Preiss D, Murray HM, Welsh P, Buckley BM, de Craen AJ, Seshasai SR, McMurray JJ, Freeman DJ, Jukema JW, Macfarlane PW, Packard CJ, Stott DJ,

- Westendorp RG, Shepherd J, Davis BR, Pressel SL, Marchioli R, Marfisi RM, Maggioni AP, Tavazzi L, Tognoni G, Kjekshus J, Pedersen TR, Cook TJ, Gotto AM, Clearfield MB, Downs JR, Nakamura H, Ohashi Y, Mizuno K, Ray KK, Ford I. (2010) Statins and risk of incident diabetes: a collaborative meta-analysis of randomised statin trials. *Lancet*. 375 (9716): 735-742. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)61965-6.
68. Schoonjans K, Staels B, y Auwerx J. (1996). Role of the Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *Journal of Lipid Research*. 37: 907-925.
69. Semenkovich C. (2006). Insulin resistance and atherosclerosis. *Journal of Clinical Investigation*. 116(7): 1813-1822. DOI: 10.1172/JCI29024
70. Sethi JK y Hotamisligil GS. (1999). The role of TNF- α in adipocyte metabolism. *Cell & developmental biology*. 10(1): 19-29 DOI: 10.1006/scdb.1998.0273
71. Shibuya M. (2011). Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes Cancer*. 2(12): 1097–1105. DOI: 10.1177/1947601911423031
72. Staels B, Dallongeville J, Auwerx J, Schoonjans K., Leitersdorf E, y Fruchart J. (1998). Mechanism of Action of Fibrates on Lipid and Lipoprotein Metabolism. *Circulation*. 98(19): 2088-2093.
73. Staels B, Maes M, y Zambon A. (2008). Fibrates and future PPAR α agonists in the treatment of cardiovascular disease. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*. 5(9): 542-553. DOI:10.1038/ncpcardio1278
74. Stancu C. y Sima A. (2001). Statins: mechanism of action and effects. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 5(4): 378-387.
75. Tan C, Chong H, Tan E, y Tan N. (2012). Getting ‘Smad’ about obesity and diabetes. *Nutr Diab*. 2(3): e29. DOI: 10.1038/nutd.2012.1
76. Tenenbaum A y Fisman E. (2012) Fibrates are an essential part of modern anti-dyslipidemia arsenal: spotlight on atherogenic dyslipidemia and residual risk reduction. *Cardiovascular Diabetology*. 11: 125.
77. Tsubaki M, Yamazoe Y, Yanae M, Satou T, Itoh T, Kaneko J, Kidera Y, Moriyama K, Nishida S. (2011). Blockade of the Ras/MEK/ERK and Ras/PI3K/Akt pathways by statins reduces the expression of bFGF, HGF and TGF- β as angiogenic factors in mouse osteosarcoma. *Cytokine*. 54: 100-107. DOI:10.1016/j.cyto.2011.01.005.
78. Wajant H, Pfizenmaier K, y Scheurich P. (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*. 10(1): 45-65. DOI:10.1038/sj.cdd.4401189.
79. Wang KL, Liu CJ, Chao TF, Huang CM, Wu CH, Chen SJ, Chen TJ, Lin SJ, Chiang CE. (2012) Statins, risk of diabetes, and implications on outcomes in the general population. *J Am Coll Cardiol*. 60 (14): 1231-1238. DOI: 10.1016/j.jacc.2012.05.019.
80. Wang M, Sun H, Xiang Y, Jiang F, Su Y & Zou Z. (2012) Different roles of TGF- β in the multi-lineage differentiation of stem cells. *World Journal of Stem Cells*. 4(5): 28-34. DOI: 10.4252/wjsc.v4.i5.28.

81. Weis M, Heeschen C, Glassford A y Cooke J. (2002). Statins Have Biphasic Effects on Angiogenesis. *American Heart Association*.
82. Zhong J y Ward W. (2010). WY-14643, a Selective PPAR α Agonist, Induces Proinflammatory and Proangiogenic Response in Human Ocular Cells. *International Journal of Toxicology*. 29(5): 496-504. DOI:10.1177/1091581810376674.