



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTOS PLEITRÓPICOS DE LA SIMVASTATINA EN
CÉLULAS PAE CO-CULTIVADAS CON CÉLULAS MADRE
HEMATOPOYÉTICAS DE RATÓN**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

ADAN BARRIOS RIVERA



MÉXICO, D.F.

AÑO 2014



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.

.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: BLAS LOTINA HENNSEN

VOCAL: ANA MARIA VAZQUEZ ALVAREZ

SECRETARIO: VICENTE CASTREJON TELLEZ

1er. SUPLENTE: ELENA GUADALUPE RAMIREZ LOPEZ

2° SUPLENTE: VANESSA REBECA MAYA AMPUDIA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA “IGNACIO CHÁVEZ”

ASESOR DEL TEMA:

DR. VICENTE CASTREJÓN TÉLLEZ

SUSTENTANTE (S):

ADAN BARRIOS RIVERA

Índice

| | | |
|------|--|----|
| 1. | Resumen. | 8 |
| 2. | Abreviaturas. | 9 |
| 3. | Introducción. | 10 |
| 3.1. | Generalidades de las Estatinas. | 10 |
| 3.2. | Historia de las estatinas. | 12 |
| 3.3 | Mecanismo de acción de las estatinas. | 14 |
| 3.4 | Efectos pleiotrópicos de las estatinas. | 16 |
| 3.5 | Las estatinas y la prenilación proteíca. | 16 |
| 3.6 | Efectos derivados de la prenilación proteíca. | 19 |
| 3.7 | Efectos de las estatinas en el endotelio. | 21 |
| 3.8 | Relación de las estatinas con las células progenitoras endoteliales. | 22 |
| 4. | Justificación. | 25 |
| 5. | Hipótesis. | 26 |
| 6. | Objetivo general. | 27 |
| 6.1 | Objetivos particulares. | 27 |

| | | |
|------|--|----|
| 7. | Materiales y Métodos. | 28 |
| 7.1 | Material químico. | 28 |
| 7.2 | Material biológico. | 28 |
| 7.3 | Extracción de Proteína. | 28 |
| 7.4 | Cuantificación de proteína. | 39 |
| 7.5 | Cuantificación de las especies reactivas de oxígeno con DCF. | 39 |
| 7.6 | Separación de proteínas por electroforesis. | 30 |
| 7.7 | Transferencia de proteínas. | 30 |
| 7.8 | Bloqueo de la membrana. | 30 |
| 7.9 | Western Blot. | 31 |
| 7.10 | Inmuno-quimioluminiscencia. | 31 |
| 7.11 | Estandarización del número de células PAE para el co-cultivo. | 31 |
| 7.12 | Extracción de las células hematopoyéticas a partir de sangre periférica y médula ósea. | 33 |
| 7.13 | Selección del medio de cultivo para las células hematopoyéticas. | 34 |
| 7.14 | Co-cultivo de células hematopoyéticas con las células PAE. | 34 |
| 7.15 | Análisis Estadístico | 36 |

| | | |
|-----|--|----|
| 8. | Resultados | 37 |
| 8.1 | Efecto de la simvastatina sobre Rho en las células PAE | 37 |
| 8.2 | Efecto de la simvastatina sobre PPAR en las células PAE | 38 |
| 8.3 | Efecto de la simvastatina sobre la producción de EROS en células PAE | 39 |
| 8.4 | Crecimiento celular de acuerdo al número inicial de células cultivadas. | 40 |
| 8.5 | Estandarización del medio de cultivo para las células hematopoyéticas y el co-cultivo. | 42 |
| 8.6 | Co-cultivos células PAE-células hematopoyéticas. | 44 |
| 9. | Discusión. | 48 |
| 10. | Conclusiones | 55 |
| 11. | Bibliografía | 56 |

1. Resumen

El colesterol es un componente esencial en las membranas celulares y un precursor inmediato de hormonas esteroideas y ácidos biliares. El aumento en su concentración, lo transforma en un factor de riesgo en el desarrollo de problemas cardiovasculares. La enzima clave en la regulación de la síntesis del colesterol, es la HMG-CoA reductasa, la cual puede ser inhibida por las estatinas, que son potentes inhibidores competitivos de esta enzima. Pero los beneficios observados con el uso de las estatinas parecen ir más allá de su efecto sobre los niveles de colesterol. Estos efectos, independientes de la síntesis del colesterol, han sido denominados “*pleiotrópicos*”. Las estatinas, han mostrado tener un efecto sobre la función endotelial, la estabilidad de las placas ateroscleróticas, la disminución del estrés oxidativo, la inflamación, la inhibición de la respuesta trombogénica y la biogénesis celular. También han mostrado efectos en sitios como el sistema inmune, el sistema nervioso central y el hueso. Estos efectos pleiotrópicos están relacionados principalmente, por la inhibición de la síntesis del ácido mevalónico, que a su vez, inhibe la síntesis de intermediarios isoprenoides importantes de la ruta biosintética del colesterol, como son, el pirofosfato de farnesilo (FPP) y el pirofosfato de geranil-geranilo (GGPP), utilizados como moléculas de adhesión durante la modificación postraduccional de varias proteínas, como la subunidad- γ de las proteínas G heterotriméricas; el Hemo-a; las láminas nucleares; o, las proteínas pequeñas de unión a GTP, como Ras y proteínas parecidas a Ras como Rho, Rab, Rac, Ral o Rap. Lo cual, tiene como consecuencia la regulación de otras proteínas, como los PPARs, factores de transcripción inducibles por ligando, y cuya principal función es controlar la transcripción de diversos genes, como son los que codifican para las proteínas desacoplantes (UCP). También se ha observado que las estatinas promueven el aumento del número de células progenitoras endoteliales circulantes (CPE), las cuales aumentan la neo-vascularización inducida por isquemia, aceleran la re-endotelización después de una lesión y mejoran la función cardíaca post-isquémica. De hecho, se ha visto que las estatinas inducen la angiogénesis mediante la promoción de la proliferación, la migración, y la supervivencia de las CPE circulantes.

2. Abreviaturas

| | |
|------------|---|
| HMG-CoA | 3-hidroxi-3-metil-glutaril-Coenzima A |
| HMG-CR | enzima HMG-CoA Reductasa |
| LDL-C | colesterol de baja densidad |
| PF-F/FPP | piro-fosfato de farnesilo |
| PF-GG/GGPP | piro-fosfato de geranil-geranilo |
| GTP | guanidin trifosfato |
| GDP | guanidin difosfato |
| PPARs | receptores activados por proliferadores peroxisomales |
| UCPs | proteínas desacoplantes |
| ERO/ROS | especies reactivas del oxígeno |
| NO | óxido nítrico |
| eNO | enzima óxido nítrico sintasa. |
| CEP | células endoteliales progenitoras |
| DMSO | dimetilsulfoxido |

3. Introducción

3.1 Generalidades de las Estatinas.

El colesterol es un componente esencial de las membranas celulares y un precursor de hormonas esteroideas y ácidos biliares (Brault M, y cols., 2014; Goldstein y Brown, 1990); sin embargo, en cantidades excesivas, el colesterol se convierte en un factor de riesgo importante para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Brault M, y cols., 2014; Iso H, y cols., 1989).

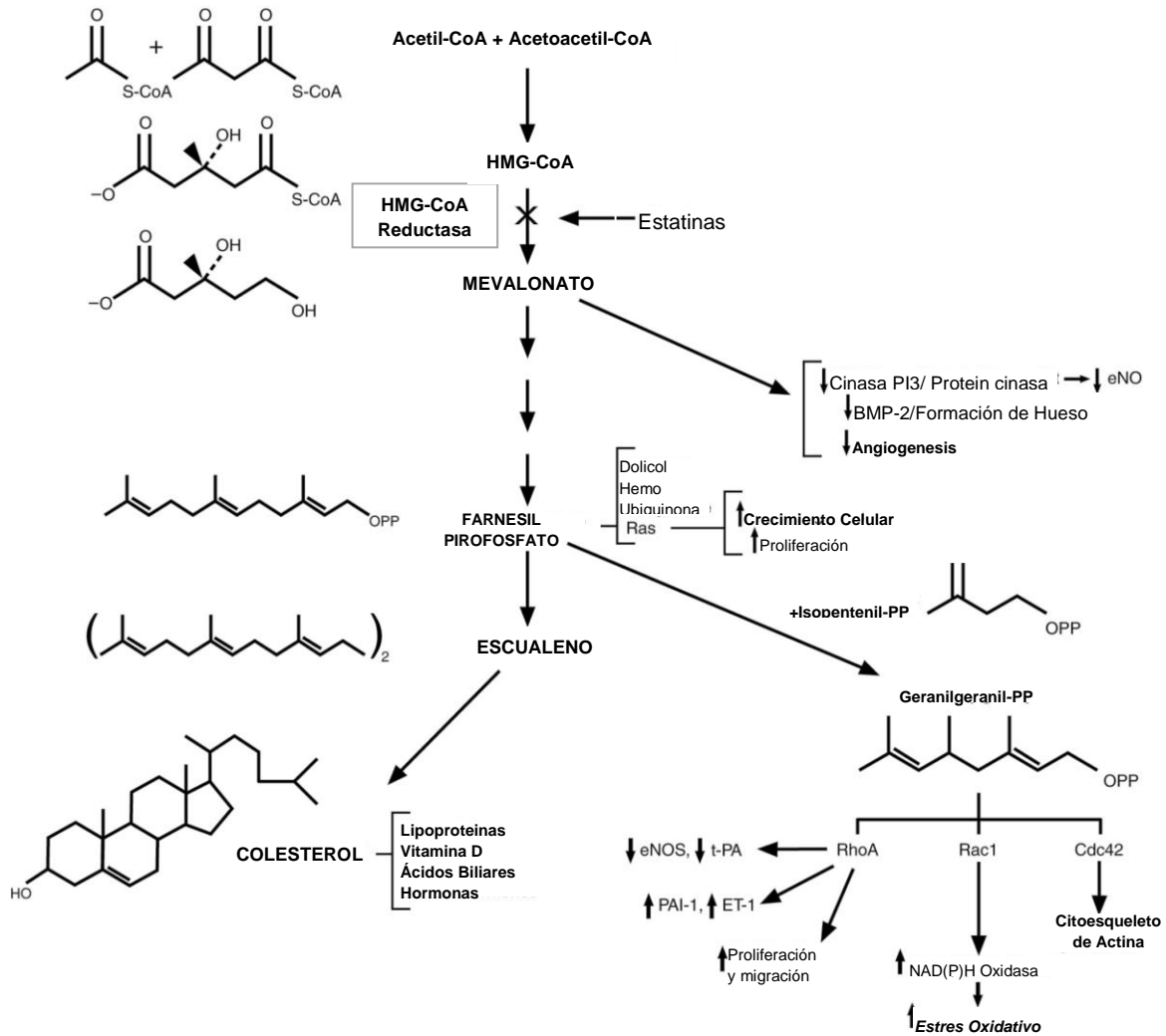


Figura 1. Esquema general de la biosíntesis del colesterol, el sitio de unión de las estatinas y sus efectos sobre las funciones celulares. Inhibición sobre la enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A Reductasa (HMG-CoA Reductasa) (Liao J, Ky Laufs U; 2005).

Aunque el colesterol proveniente de la dieta puede contribuir a los cambios de los niveles de colesterol en el suero, más de dos tercios del colesterol total del organismo son sintetizados en el hígado. Por lo cual, la inhibición de la biosíntesis de colesterol a nivel hepático se convirtió en un blanco importante para reducir los niveles de colesterol en suero (Menter DG, y cols 2011; Panel NCEPE, 2002).

En los últimos años, los inhibidores de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA) (estatinas) se han convertido en la clase más importante de agentes reductores de lípidos, debido principalmente, a que la inhibición de la HMG-CoA reductasa, bloquea el paso limitante de la síntesis de colesterol, lo cual, resulta en la sobre regulación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) en la membrana celular y la reducción de las consecuencias aterogénicas de las LDL (Jasińska M, y cols., 2007).

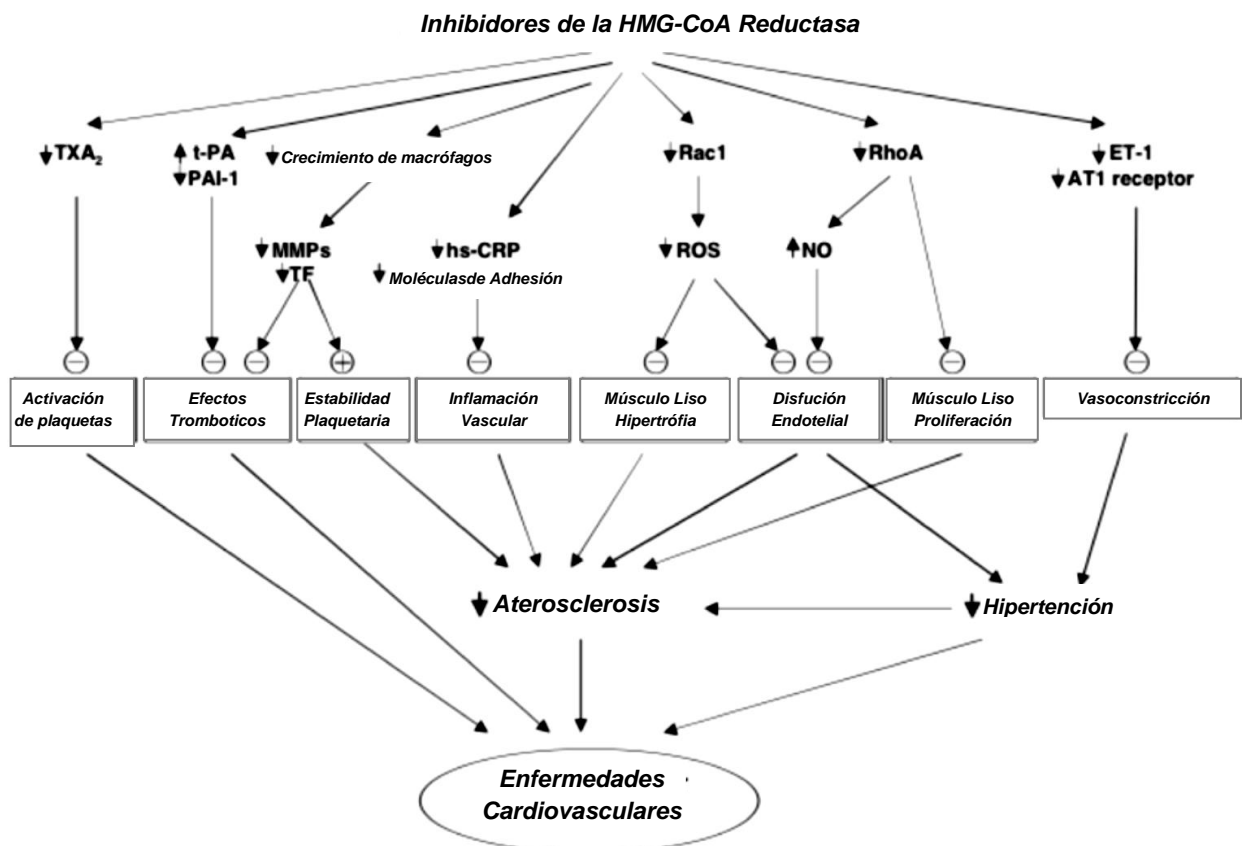


Figura 2. Representación de los principales efectos de las estatinas como inhibidores de la HMG-CoA reductasa y su relación con las enfermedades cardiovasculares (Laufs U y Liao JK, 2003)

Las estatinas son un grupo de fármacos hipolipemiantes, cuya utilización en la clínica, es principalmente para el tratamiento de la hipercolesterolemia y se han convertido en los fármacos de primera elección para la prevención primaria y secundaria contra eventos cardiovasculares (Figura 2). Las estatinas difieren entre sí no solo por su capacidad de unión con la HMG-CoA reductasa, sino también por su lipofilidad, su semivida plasmática, su metabolismo y su permeabilidad tisular. Estas características hacen que una determinada estatina sea más eficaz en un paciente que en otro, aspecto que se desarrollará en la sección de farmacogenética (Laufs U y Liao JK, 2003).

3.2 Historia de las estatinas.

Los inhibidores de la enzima HMG-CoA Reductasa fueron aislados e identificados originalmente como metabolitos fúngicos secundarios. La primer estatina identificada, aislada a partir de cultivos de *Penicillium citrinum*, fue la mevastatina o compactina (Figura 3), en su forma activa, la mevastatina presenta una estructura similar al sustrato natural de la enzima, la HMG-CoA, al ser administrada en ratas, se observó que la mevastatina inhibía la biosíntesis de colesterol con una K_i de 1.4nM, sin embargo, este fármaco también mostro una inaceptable toxicidad hepática y por lo tanto, fue eliminada de los estudios clínicos (Endo A, y cols., 1976).

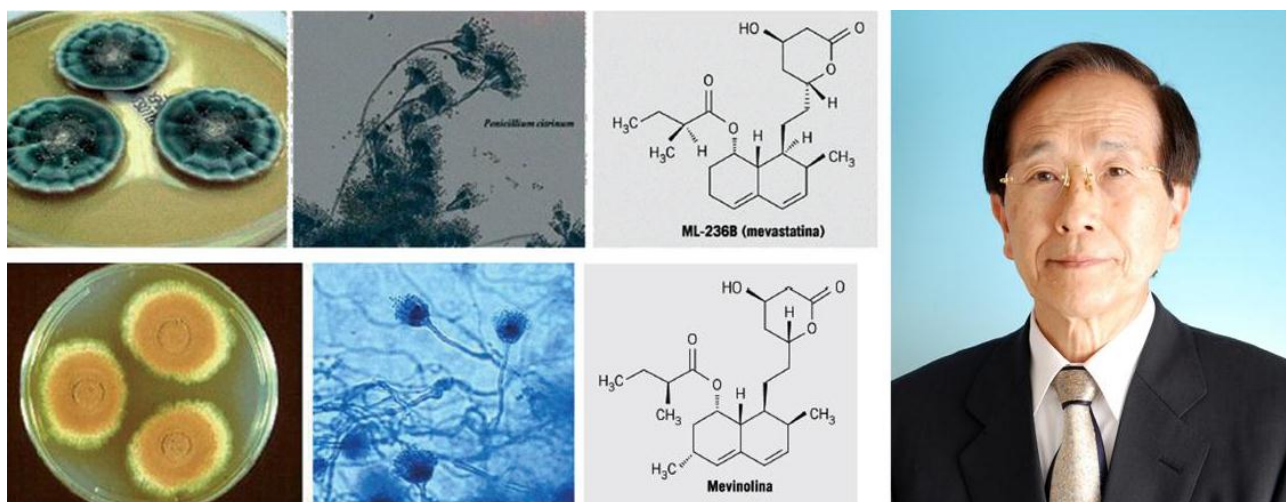


Figura 3. Estructura de la mevastatina o compactina (ML-236B), aislada por el Dr. Akira Endo (Endo A, 1976).

Posteriormente, un metabolito purificado a partir de cultivos de *Aspergillus terreus*, la meviolina o lovastatina, resultó ser un inhibidor más estable y potente que la mevastatina y sin efectos adversos, la lovastatina difiere de la mevastatina por la presencia de un grupo metilo en su estructura, además, inhibe la biosíntesis del colesterol con una K_i de 0.6nM, sin mostrar ningún efecto tóxico, convirtiendo a la lovastatina en el primer fármaco utilizado en humanos para el tratamiento de la hipercolesterolemia (Aguirre I, y cols., 2013; Alberts AW, 1990).

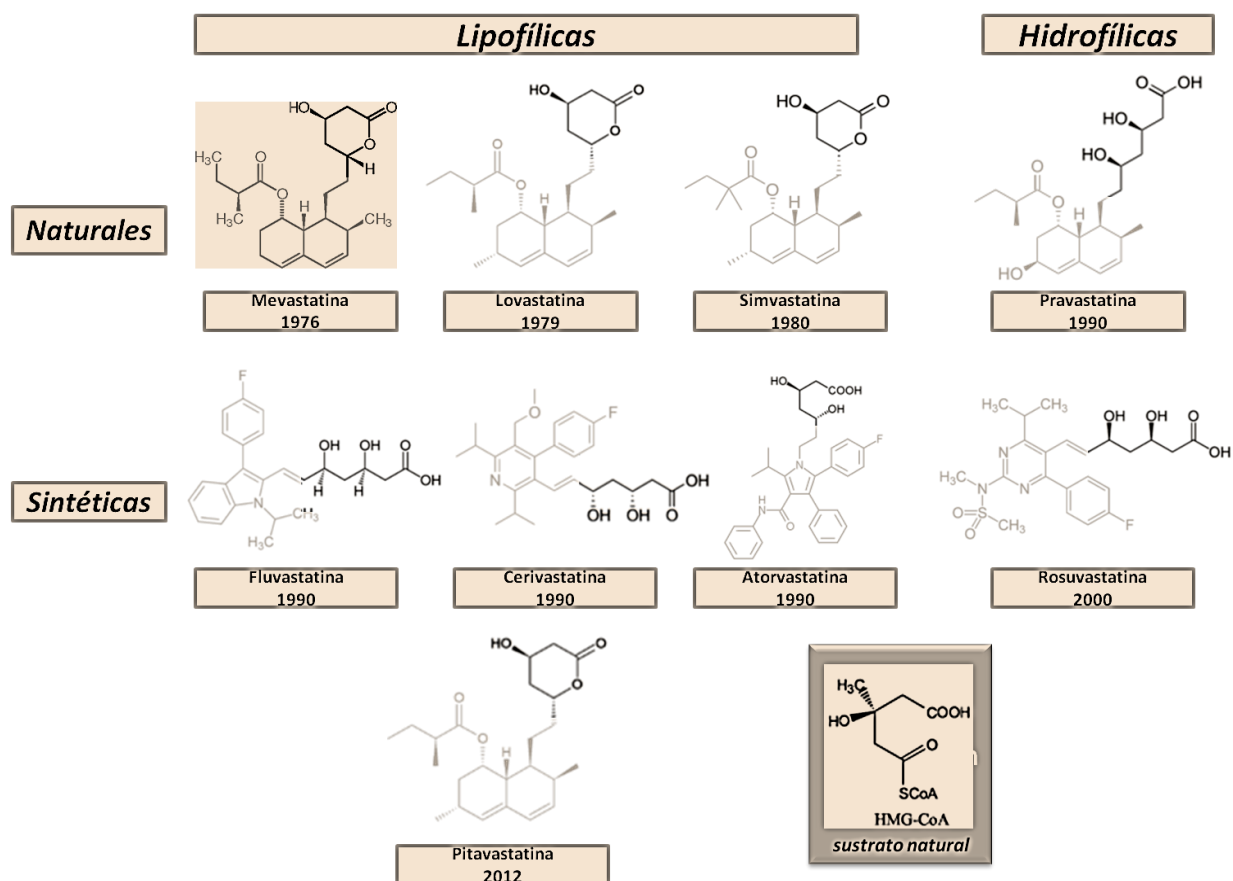


Figura 4. Estructura de las principales estatinas. Todas las estatinas comparten la base estructural del HMG-CoA, sustrato de la enzima HMG-CoA reductasa (Laufs U y Liao JK, 2003).

A partir de este descubrimiento, la extracción a partir de fuentes naturales o, la síntesis de nuevos fármacos con efectos similares a la lovastatina, aprobados clínicamente para su uso en humanos, ha estado en desarrollo, entre los que se encuentran la pravastatina, la simvastatina, la fluvastatina, la atorvastatina, la cerivastatina, la pitavastatina y la rosuvastatina (Sirtori CR, 2014).

De hecho, dependiendo de su estructura las estatinas tienen una permeabilidad diferente en los tejidos, y lo cual tiene como consecuencia algunos efectos secundarios que repercuten en la eficiencia del fármaco en individuos diferentes. De acuerdo a su permeabilidad, se puede clasificar a las estatinas como, lipofílicas, como la simvastatina, que ingresa a las células mediante un mecanismo de difusión pasiva, ó estatinas hidrofílicas, como la pravastatina y la rosuvastatina, cuyo blanco de absorción principal es el hígado (Figura 4).

De manera alternativa también se puede tomar en cuenta el desarrollo de cada miembro de este grupo farmacológico para dividir a este grupo en dos generaciones, la primera liderada por las estatinas naturales, a partir de las cuales se desencadenaron una serie de estudios que permitieron el nacimiento de la segunda generación, las estatinas sintéticas, la más joven de ellas es la pitavastatina (Makuc D, y cols., 2013; Corsini A, 1999).

Al ser las estatinas fármacos anfifílicos, entran a las células, ya sea por interacción directa con la membrana, como es el caso de las estatinas lipofílicas (simvastatina, fluvastatina, atorvastatina) o por medio de proteínas transportadoras, como es el caso de las estatinas hidrofílicas, como la pravastatina, o existen estatinas como la rosuvastatina que presenta un comportamiento intermedio (Sirtori CR, 2014). Las estatinas son predominantemente metabolizadas a sus compuestos hidroxilados, para su excreción biliar, el citocromo P450 (CYP450) isoforma 3A4 sirve como la principal vía para el metabolismo de lovastatina, simvastatina y atorvastatina. La pravastatina se metaboliza por sulfatación y conjugación. La fluvastatina se metaboliza principalmente por el CYP2C9 y en menor medida por el CYP3A4 y CYP2D6. La rosuvastatina se metaboliza principalmente por el CYP2C9 y CYP2C19 (Vaughan C.J, 2003; Davignon J. 2012). La principal ruta metabólica de la pitavastatina es la lactonización/glucuronización y a pesar de ser una estatina lipofílica, no interactúa con el CYP3A4 por la presencia del grupo ciclopropilo en su estructura (Díaz R, y cols., 2011).

3.3 Mecanismo de acción de las estatinas.

Las estatinas actúan inhibiendo reversiblemente a la enzima HMG-CoA reductasa, uniendo sus cadenas laterales al sitio activo de la enzima, bloqueando de esta manera el estado de transición sustrato-producto de la enzima. Todas la familia de estatinas comparten la misma estructura de interacción, por lo cual, inhiben a la enzima por el mismo mecanismo (Figura 5) (Istvan ES, 2002).

La estructura de la porción catalítica de la HMG CoA reductasa de humanos en complejo con diferentes estatinas, ha sido determinada a través de análisis cristalográfico, y lo que se observa, es que el extremo hidrofóbico de las estatinas, interactúa con el sitio activo de la enzima a través de interacciones de Van Der Waals, de hecho, lo que se observa es que los anillos hidrofóbicos de las estatinas están en un contacto muy compacto con las hélices $L\alpha 1$ y $L\alpha 10$ del dominio más grande de la enzima. (Istvan ES, 2002; Istvan ES and Deisenhofer J, 2001).

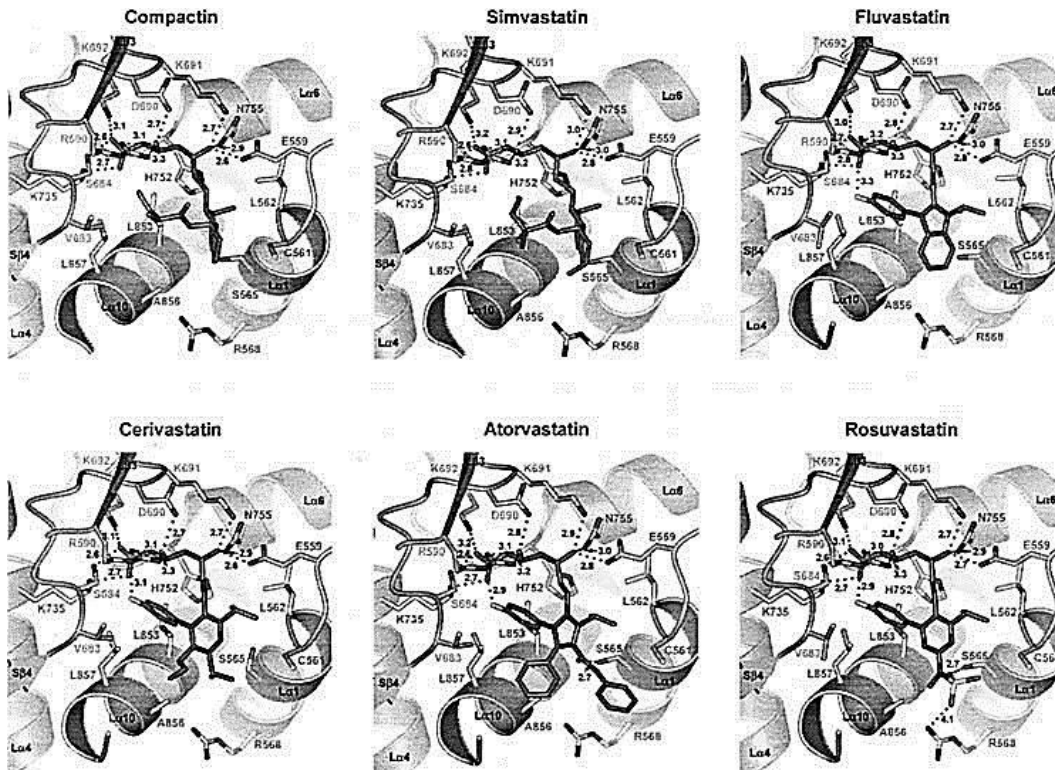


Figura 5. Mecanismo de unión entre la HMG CoA reductasa y diferentes estatinas (Istvan ES and Deisenhofer J, 2001).

De acuerdo a la estructura de cada estatina, existen diferencias no muy marcadas en su interacción con la enzima, por ejemplo, la atorvastatina y rosuvastatina, ambos sintéticos, presentan un gran número de interacciones con la enzima HMG-CoA reductasa.

Con respecto a la HMG-CoA reductasa de mamíferos, las estatinas se unen a la enzima en concentraciones de IC_{50} que van desde 5nM hasta 50nM, lo cual implica un excelente mecanismo de competencia con el sustrato natural, que presenta una K_m de 4 μ M. Específicamente, la simvastatina, posee una IC_{50} de 18.1nM, esto significa que la afinidad por sitio catalítico de este fármaco, es hasta 1000 veces mayor a la del sustrato natural y que la unión esta mediada por un gran número de enlaces de Van der Waals (Istvan ES and Deisenhofer J, 2001).

3.4 Efectos pleiotrópicos de las estatinas.

Los efectos adicionales a la regulación de los niveles de colesterol de las estatinas, llamados "pleiotrópicos", pueden depender de la actividad directa de las estatinas o ser una consecuencia de la inhibición de la biosíntesis y/o la reducción del colesterol plasmático. Estos efectos implican, desde una mejora de la función endotelial, mediante la preservación de la eNOS en células endoteliales, hasta una influencia, aparentemente lejana, en las enfermedades arteriales (Forstermann U and Li H, 2011).

Un ejemplo de los efectos pleiotrópicos de las estatinas, está relacionado con la formación de placas ateroscleróticas en las arterias, las estatinas no solo detienen el proceso de formación de la placa, también ayudan a restablecer la función endotelial al inducir un aumento en la síntesis de NO. La administración de estatinas, puede promover una mejora en los resultados después de un evento cardiovascular en el paciente, lo cual puede ser una consecuencia a la reducción de la vulnerabilidad de la placa, posiblemente mediante la inhibición de la infiltración de los miocitos a la pared arterial y a la reducción en la secreción de metaloproteinasas (Bellosta S, y cols., 2000).

3.5 Las estatinas y la prenilación proteica.

Muchos de los efectos que tienen las estatinas, son consecuencia de la inhibición sobre la síntesis de colesterol, lo que implica la inhibición de la síntesis de intermediarios metabólicos utilizados en diferentes procesos celulares.

Posiblemente, el mecanismo más importante, es la inhibición de la síntesis de mevalonato, una etapa preliminar de la síntesis de los isoprenos, pirofosfato de farnesilo (FPP) y pirofosfato de geranil-geranilo (GGPP)(Burgazli KM, y cols., 2013; Lowy DR and Willumsen BM, 1989).

Los isoprenos son monómeros de cinco carbonos utilizados para la síntesis de moléculas estructuralmente complejas, tales como, el colesterol. Ambas moléculas son utilizadas durante un proceso conocido como prenilación, que consiste en la modificación pos-traducciona l de muchas proteínas que están involucradas con la membrana celular. La interacción de estas proteínas, con los isoprenos, implica su correcta translocación desde el citosol, hacia la membrana celular. De hecho, la correcta ubicación de estas proteínas en la membrana es un requisito para su función biológica.

La prenilación proteica se lleva a cabo en aquellas proteínas que tienen un *motif* CaaX en el carboxilo terminal, donde “C” es una cisteína, “a” es un aminoácido alifático y “X” es cualquier aminoácido, en el genoma humano existen más de 100 proteínas conocidas o que se cree tienen esa secuencia, CaaX, en su carboxilo terminal (Figura6) (Chao-Yung W, y cols., 2008; Hori Y, y cols., 1991).

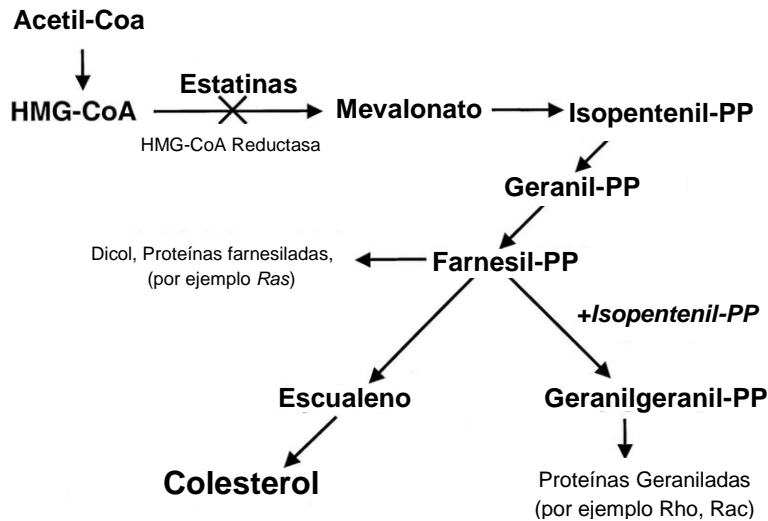


Figura 6. Sitio de interacción de las estatinas en la vía de síntesis de colesterol y de los isoprenos farnesil pirofosfato y geranilgeranil pirofosfato (PP = pirofosfato).

Como ya se ha mencionado, estos intermediarios sirven como importantes lípidos de unión durante la modificación pos-traducciona de una variedad de proteínas, incluyendo, la subunidad γ de las proteínas G heterotrimericas, el grupo Hemo-a, las láminas nucleares, las proteínas pequeñas de unión a GTP, Ras y proteínas parecidas a Ras como son, Rho, Rab, Rac, Ra1 y Rap. De esta manera, la prenilación es un proceso de interacción covalente que promueve la localización celular y el transito intracelular de proteínas asociadas a la membrana (Tanaka S, y cols., 2013; Van Aelst L and D'Souza-Schorey C, 1997).

Los miembros de la familia de proteínas pequeñas de unión a GTP, Ras y Rho, son de las principales proteínas reguladas pos-traduccionalmente por este proceso de prenilación, estas enzimas tienen un peso molecular de entre 20 y 25 kDa. Ras y Rho son proteínas que alternan entre el estado inactivo, unidas a GDP, y el estado activo, unidas a GTP, ambas proteínas requieren estar interaccionando con la membrana celular, y para que esto suceda deben ser preniladas, por ejemplo, en las células endoteliales, la traslocación de Ras, del citosol a la membrana, es dependiente de farnesilación, mientras que, la traslocación de Rho, es dependiente de su geranilgeranilación, el efecto de las estatinas, al inhibir la síntesis de isoprenos, provoca que ambas proteínas, Ras y Rho, se acumulen en el citoplasma de forma inactiva (Figura 7) (Takemoto M and Liao JK, 2001).

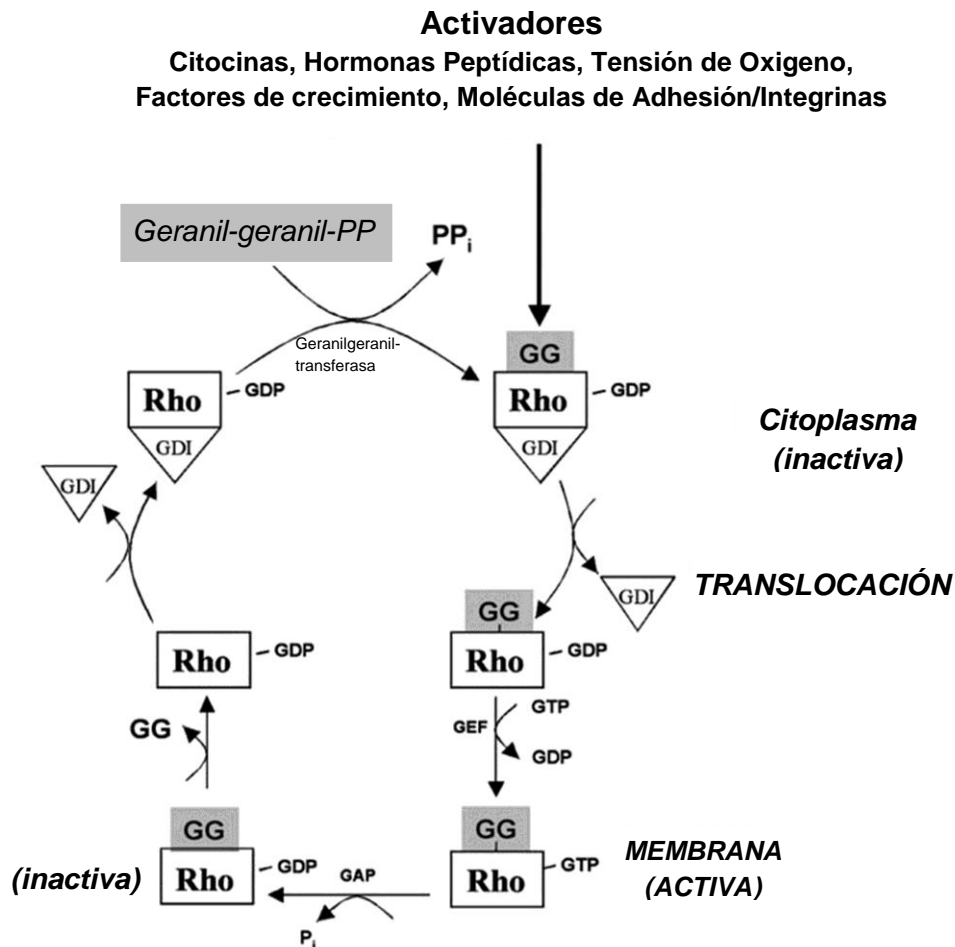


Figura 7. Regulación de la GTPasa Rho por prenilación. La proteína Rho cambia de una forma inactiva unida a GDP en el citosol a una forma activa unida al GTP en la membrana. Este ciclo es controlado por diversos cofactores, incluyendo los Factores de Intercambio de Nucleótidos de Guanina (GEF), proteínas activadoras de GTPasas (GAP), y los inhibidores de la disociación de nucleótido de guanina (GDI). El proceso más importante en la activación de Rho es dependiente de la prenilación, la cual permite la translocación de Rho a la membrana y su subsecuente activación (Liao JK and Laufs U, 2005).

Cada miembro de la familia de GTPasas pequeñas cumple funciones específicas en el organismo, participando en la motilidad, la secreción, y la proliferación celular, de hecho, efectos sinérgicos de estas funciones se pueden observar en sistemas de sobreexpresión de estas enzimas. Por ejemplo, la forma activa de Rho comprende funciones de señalización, secreción y movilidad celular, especialmente cuando las células se someten a la reorganización de la actina de su cito-esqueleto en respuesta a señales extracelulares, como factores de crecimiento, el movimiento celular o la mitosis.

Los efectos biológicos de Rho son mediados por una serie de efectores donde se incluye ROCK (proteín-cinasa asociada a Rho), aunque el papel exacto de muchos de esos efectores permanece aún por elucidar (Bishop AL and Hall A, 2000). ROCK, es uno de los efectores mejor caracterizados, principalmente por su efecto sobre la actina del citoesqueleto, donde se encarga de fosforilar e inhibir a la subunidad de unión a miosina, en la fosfatasa de la cadena ligera de miosina, lo cual, está relacionado con algunos desordenes del sistema cardiovascular. (Liao JK and Laufs U, 2005; Cannon CP, y cols., 2004).

3.6 Efectos derivados de la prenilación proteíca.

La vía Rho/ROCK está implicada en el estrés oxidativo, la rigidez aórtica y los cambios en la presión arterial; además, ROCK regula la supervivencia celular, a través de la fosforilación de la proteína quinasa B/Akt y FOXO, también, puede regular la adipogénesis, la miogénesis, así como, la angiogénesis, la hipertensión, la hipertrofia cardíaca, la fibrosis perivascular y la hipertensión pulmonar (Nohria A, y cols., 2006; Rikitake Y, y cols., 2005).

Los PPARs son Receptores Activados por Proliferadores Peroxisomales que pertenecen a la super-familia de receptores nucleares activados por ligando. Los derivados de ácidos grasos y eicosanoides se identificaron como los ligandos naturales de estos receptores. Las isoformas de PPARs identificadas hasta la fecha son PPAR α , PPAR β/δ , y PPAR γ . Todos los PPARs juegan un papel clave como reguladores de la homeostasis energética mediante la regulación de los genes implicados en el metabolismo de carbohidratos, ácidos grasos, así como, su participación en la regulación de la inflamación.

Las isoformas de PPAR varían también en su selectividad y sensibilidad, por lo tanto, regulan diferentes conjuntos de genes y existen diferentes consecuencias farmacológicas al estimular cada isoforma de PPAR. (Jasińska M, y cols., 2007).

3.7 Efectos de las estatinas en el endotelio.

El endotelio vascular sirve como un importante órgano autocrino y paracrino que regula el estado contráctil de la pared vascular y la composición celular. La hipercolesterolemia altera la función endotelial, y la disfunción endotelial es una de las primeras manifestaciones de la aterosclerosis (Padfield GJ, y cols., 2013). Una característica importante de la disfunción endotelial es la síntesis deteriorada y la liberación del óxido nítrico derivado de las células endoteliales. El óxido nítrico endotelial inhibe varios componentes involucrados en el proceso aterogénico, por ejemplo, regula la relajación vascular, inhibe la agregación de plaquetas, la proliferación del músculo liso vascular y las interacciones endotelio-leucocitos (Andrade FA, y cols., 2014; Lei J, y cols., 2013).

Las estatinas, aumentan la producción de óxido nítrico endotelial mediante la estimulación y la regulación positiva de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) prolongando la vida media del RNA mensajero de esta enzima. Además, se ha observado que las estatinas restauran la actividad de eNOS aún en condiciones de hipoxia o en presencia de LDL oxidadas (ox-LDL-C), dos condiciones que conducen a la disfunción endotelial. Las estatinas también aumentan la expresión de activador de plasminógeno de tipo tisular (t-PA) e inhiben la expresión de la endotelina-1, un potente vasoconstrictor y mitógeno (Hisada T, y cols., 2012; Laufs U, y cols., 1998).

Aunque los efectos de las estatinas sobre la isoprenilación de Ras y Rho puede ser revertida por la presencia de farnesil pirofosfato y geranyl-geranyl pirofosfato, respectivamente, el efecto de las estatinas sobre la expresión de eNOS sólo se revierte por geranyl-geranyl pirofosfato. De hecho, la inhibición directa de la geranyl-geranyl transferasa o de RhoA promueve la expresión de eNOS (Laufs U y Liao JK, 1998).

Otro posible mecanismo del efecto de las estatinas que puede observarse sobre la función endotelial es a través de sus efectos antioxidantes. Por ejemplo, las estatinas aumentan la relajación dependiente del endotelio mediante la inhibición de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como superóxido y radicales hidroxilo.

Aunque la reducción de lípidos por sí mismo puede reducir el estrés oxidativo vascular, algunos de estos efectos antioxidantes de las estatinas parecen ser independientes de la disminución del colesterol.

Por ejemplo, las estatinas atenúan la actividad de la angiotensina II, inducida por la producción de radicales libres en las células musculares lisas, inhibiendo a la proteína Rac1 vía la regulación de la actividad de la NADH oxidasa y de la regulación negativa sobre la expresión del receptor de angiotensina AT1 (Figura 9).

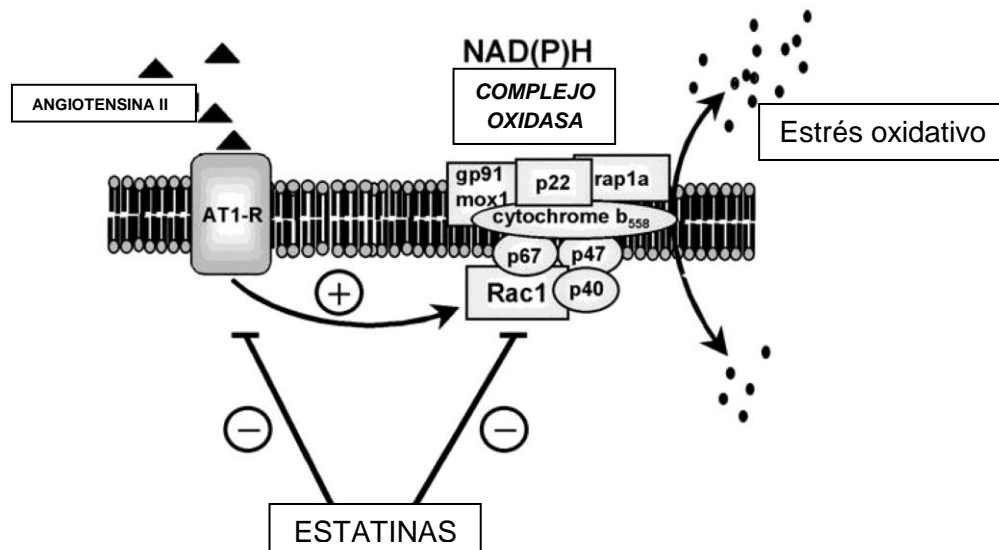


Figura 9. Efecto de las estatinas sobre la actividad de la NAD(P)H oxidasa. (Liao JK y Laufs U, 2005).

3.8 Relación de las estatinas con las células progenitoras.

Las células madre son células indiferenciadas que poseen la habilidad especial de auto-renovarse, de diferenciarse en múltiples linajes celulares y de reconstruir un tejido determinado. La decisión de diferenciarse o de renovarse, por parte de las células madre es cuidadosamente controlada durante la organogénesis, la homeostasis tisular y la regeneración de tejidos.

Por un lado, el desorden funcional de la auto-renovación de las células madre puede conducir a la degeneración progresiva de un tejido, mientras que, la excesiva auto-renovación puede inducir tumor-génesis (Liu J, y cols., 2010;; Wagers AJ and Weissman IL, 2004).

Además, las células madre se han utilizado en los últimos años, en estudios *in vitro* y en terapias basadas en la implantación de células madre en tejidos dañados. Sin embargo, el cultivo primario de células madre conduce a la senescencia replicativa prematura, limitando de este modo la capacidad proliferativa de las células madre. Se han llevado a cabo estudios, tanto experimentales como clínicos, que han puesto de manifiesto el hecho de que las estatinas podrían estar aumentando el número y mejorando el linaje de las células madre diferenciadas, y por otra parte, el efecto de las estatinas puede ser diferente dependiendo del tipo de célula madre a diferenciar (Xu J, y cols., 2009; Suzuki G, y cols., 2009).

Las células progenitoras endoteliales circulantes (CEP) derivan de la médula ósea y contribuyen a la re-endotelización de vasos lesionados, así como, la neovascularización inducida por isquemia; por lo tanto, las CEP circulantes, representan un importante mecanismo de reparación endógena, por el cual el cuerpo se mantiene la integridad del endotelio. Varios estudios clínicos han demostrado que el número y la función de las CPE son afectadas en varias condiciones patológicas. En pacientes con enfermedad arterial coronaria (EAC) y síndrome metabólico, el número de CEP circulantes se reduce significativamente, lo cual, sugiere la importancia de aumentar el número de CPE y de su actividad biológica, durante el padecimiento de estas enfermedades. (Jialal I, y cols., 2010; Umemura T and Higashi Y, 2008).

Se ha demostrado que las estatinas inhiben la senescencia de las CEP y promueven su proliferación, por lo tanto, las estatinas parecen ser un método terapéutico efectivo para revertir los procesos pato-fisiopatológicos de la pérdida de CEP (Assmus B, y cols., 2003).

Los efectos de inhibición de las estatinas, son moduladas por la regulación de varias proteínas del ciclo celular, incluyendo la sobre regulación de las ciclinas y regulación negativa de la p27Kip1, un inhibidor del ciclo celular. Este proceso es dependiente de los intermediarios isoprenoides generados durante la síntesis del mevalonato, el geranil-geranilpifosfato (GGPP) o el pifosfato de farnesilo (FPP), pero independiente de la actividad de la óxido nítrico sintasa, las especies reactivas de oxígeno (ROS) y Rho quinasa (Xu H, y cols., 2013).

4. Justificación

Las células madre se definen comúnmente como células indiferenciadas que poseen la capacidad de auto-renovación y diferenciación en uno o más tipos de células especializadas que conforman el organismo. Se pueden dividir en dos categorías: las células madre embrionarias y las células madre adultas. Las células madre embrionarias, son los primeros progenitores pluripotentes, cuya diferenciación puede ser regulada por en condiciones de cultivo *in vitro*. Estas células pueden dar lugar a células germinales y a una amplia gama de células somáticas más especializadas tanto *in vivo* como *in vitro*. Durante los últimos años, muchos tipos de células madre adultas o progenitoras se han utilizado en mecanismos de terapia celular en sitios con problemas de daño cardíaco. Parte de los obstáculos potenciales en este tipo de terapias, donde se utilizan células madre, son los requerimientos que las células madre utilizan para poder diferenciarse e integrarse al tejido seleccionado, sin generar ningún daño (Guan K and Hasenfuss G, 2007). Durante los últimos años se ha tratado de resolver estos problemas y así, utilizar células madre para la regeneración tisular, después de que esos tejidos son dañados por alguna enfermedad. Los modelos *in vitro* de células endoteliales representan una herramienta valiosa para estudiar el comportamiento del endotelio ante diferentes estímulos fisiológicos y ante agresiones patológicas a las que puede estar expuesto y que conducen a diferentes enfermedades como la diabetes, la obesidad y los problemas cardiovasculares. Los cuales, se caracterizan por presentar problemas de inflamación donde las especies reactivas del oxígeno juegan un papel importante como factores pro-inflamatorios alterando la homeostasis del organismo y promoviendo el desarrollo de estas enfermedades. Se ha observado que las estatinas son capaces de promover la diferenciación de células madre, mediante la inhibición de la síntesis de isoprenos, suprimiendo la activación del sistema Rho/Rho cinasa. Este efecto está asociado con el aumento en la activación y expresión de PPAR γ (Paintlia AS, y cols., 2010.). De tal manera que, desarrollar y estudiar un sistema donde se mantengan creciendo células de origen endotelial y células madre, en nuestro caso hematopoyéticas, nos proporciona un sistema y modelo para estudiar el efecto que tienen fármacos como la simvastatina.

5. Hipótesis

Al inhibir la actividad de la enzima HMG-CoA reductasa, la Simvastatina previene la síntesis de isoprenos, la regulación de los niveles de estos intermediarios metabólicos, presenta efectos directos sobre la diferenciación de células hematopoyéticas y/o endoteliales y sobre la actividad de la familia de proteínas GTPasas, reguladas por prenilación.

6. Objetivo general.

- Analizar el efecto de la Simvastatina sobre la actividad de la GTPasa Rho en células endoteliales y en un co-cultivo de células endoteliales y células hematopoyéticas.

6.1 Objetivos Particulares.

- Determinar el efecto de la Simvastatina, a diferentes concentraciones, sobre la actividad de la enzima Rho en células PAE.
- Analizar el efecto anti-oxidante de la Simvastatina, a diferentes concentraciones, en células PAE.
- Estandarización de un método para el desarrollo de un co-cultivo de células PAE y células hematopoyéticas de ratón.
- Evaluar la integración de las células hematopoyéticas de ratón, co-cultivadas con células PAE.

7. Material y Métodos.

7.1 Material químico.

La simvastatina, el dimetil sulfóxido (DMSO), desoxicolato de sodio (DOC), el 2-mercaptoetanol, la diclorofluoresceína (DCF), la N-etil-maleimida (NEM), el fenilmetano-sulfonil fluoruro (PMSF), la aprotinina, la leupeptina, el Tris, el Filgrastim, el azul de tripano, el TEMED, el NaCl, fueron de Sigma (St. Louis, MO). El reactivo de Bradford, el marcador de peso molecular, el persulfato de amonio (APS) y el dodecil sulfato de sodio (SDS) fueron de Bio-Rad. La acrilamida y la bis-acrilamida fueron de IBI scientific. La glicina fue de Baker. Metanol fue de Amresco. El Tween-20 fue de Caledon. Los anticuerpos anti- α -actina, anti-Rho y anti PPAR γ fueron de Santa Cruz Biotechnology. Los anticuerpos secundarios con HRP fueron de Jackson Immuno Research. El Kit de quimioluminiscencia fue de Millipore. Leche svelty libre de grasa de Nestle®.

7.2 Material biológico.

Las células endoteliales aórticas porcinas (PAE) fueron amablemente proporcionados por el doctor A. Sorkin (Universidad de Colorado en Denver) y se cultivaron a 37 ° C y 5% de CO₂ en medio de Ham F12 que contenía 10% de suero fetal bovino (SFB) o medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute Médium) que contenía 15% de SFB y antibióticos, para ambos medios. También se utilizaron ratones albinos machos de 2 meses de edad, para la obtención de sangre y el aislamiento de las células hematopoyéticas.

7.3 Extracción de Proteína.

La extracción de proteína se llevó a cabo utilizando un buffer de lisis modificado de RIPA (Sefton BM 2005). Que contiene, 25 mM HEPES, 100 mM NaCl, 15 mM Imidazol, 10% Glicerol, 1% Triton-X100, 2.5 mM PMSF, 10 ng aprotinina, 10 ng leupeptina, 12.5 mg/10 ml N-etilmaleimida, 70 mg/10 ml DOC. A las células endoteliales y hematopoyéticas, sembradas en placas de cultivo de seis pozos, se levantan, se centrifugan a 1500rpm durante 4 min y se homogenizan con 0.5mL de buffer de lisis.

El homogenizado se centrifuga a 14,000rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se recupera, descartando el precipitado. Se centrifuga nuevamente el sobrenadante para descartar cualquier residuo y se le determina la concentración de proteína.

7.4 Cuantificación de proteína.

La concentración de proteína se determinó utilizando el método de Bradford^(Bradford MM, 1976). En la Tabla 1 se muestra el proceso utilizado en la realización de las mezclas para determinar y cuantificar la proteína, el tubo número 1 fue el blanco y los tubos 2 al 6 corresponden a la curva patrón con albúmina, del tubo 7 en adelante (dependiendo del número de muestras) corresponde a las muestras problema. La determinación se lleva a cabo midiendo la absorbencia a 590 nm en un espectrofotómetro (Eppendorf).

Tabla 1. Reactivos utilizados para determinar la concentración de proteína por el método de Bradford.

| Tubo | Albumina (1 mg/ml) | Muestra | Reactivo de Bradford (5X) | Agua | Buffer de lisis |
|------|--------------------|-------------|---------------------------|--------|-----------------|
| 1 | 0.0 μ l | xxxxx | 0.1 ml | 0.4 ml | 5.0 μ l |
| 2 | 2.5 μ l | xxxxx | 0.1 ml | 0.4 ml | 5.0 μ l |
| 3 | 5.0 μ l | xxxxx | 0.1 ml | 0.4 ml | 5.0 μ l |
| 4 | 7.5 μ l | xxxxx | 0.1 ml | 0.4 ml | 5.0 μ l |
| 5 | 10.0 μ l | xxxxx | 0.1 ml | 0.4 ml | 5.0 μ l |
| 6 | 12.0 μ l | xxxxx | 0.1 ml | 0.4 ml | 5.0 μ l |
| 7 | xxxxx | 5.0 μ l | 0.1 ml | 0.4 ml | xxxxx |

7.5 Cuantificación de las especies reactivas de oxígeno con DCF.

A las células endoteliales se les cultivó en cajas Petri de 10 ml con medio Ham's F12, al 50 % de confluencia se les agregó un tratamiento con diferentes concentraciones de simvastatina (0.0 μ M, 0.1 μ M, 0.5 μ M, 1.0 μ M, 2.5 μ M, 5.0 μ M, 7.5 μ M y 10 μ M) durante 24 horas. Después de la incubación con simvastatina, se eliminó el medio de cultivo, se lavan las células, sin despegar, con buffer de fosfatos no estéril y se agregaron 10 ml de buffer de fosfatos más 10 μ M diclorofluoresceína (DCF). A los 40 minutos, las células se levantan, se centrifugan a 1500 rpm durante 4 min y se resuspenden en 1ml de PBS. Se cuantifica el número total de células utilizando la cámara de Neubauer.

Finalmente, la fluorescencia del DCF se llevó a cabo por fluorometría, a una longitud de onda de excitación de 475nm y una longitud de onda de emisión de 525nm, a un total de 100,000 células por muestra.

7.6 Separación de proteínas por electroforesis.

Las muestras de proteína separaron por el método de electroforesis propuesto por Laemmli, las cuales se sometieron a un proceso de electroforesis desnaturizante (Laemmli UK, 1970). El gel separador fue al 12% y un gel concentrador al 4%. Se cargó por pozo, 40 µg de proteína total mezclada con un buffer de carga 3x. La mezcla se calienta a 100°C durante 5 minutos. Se carga cada muestra y se incluye en un carril marcador de peso molecular (precision plus protein dual standards). Se le aplica un voltaje de 40 mV durante 215 minutos, para asegurar que las muestras lleguen al gel separador al mismo tiempo, y después se aumentó el voltaje a 95 mV durante 2.5 horas aproximadamente.

7.7 Transferencia de proteínas.

La transferencia de las proteínas (separadas por electroforesis) a una membrana de PVDF, se llevó a cabo por el método de Towbin (Towbin H, y cols., 1979). En la cual se utilizó una cámara húmeda (BIO-RAD), a 4 °C y a 500 mA durante 1 hora y con agitación constante. La membrana de PVDF se activó con metanol al 100%, y se colocó sobre el gel de acrilamida.

7.8 Bloqueo de la membrana

Al finalizar la transferencia, se deja secar la membrana a temperatura ambiente y se vuelve a humedecer con metanol al 100 %, para fijar aún más las proteínas a la membrana. Después se incubó la membrana con una solución de leche al 5 % disuelta en buffer TBS más tween-20 al 0.1 %. La incubación se llevó a cabo durante toda la noche a 4 °C.

7.9 Western Blot.

La identificación de las proteínas se realizó mediante inmunodetección. La membrana de PVDF se incubó con un anticuerpo primario en una solución de TBS-tween, toda la noche, a 4°C. Al final de la incubación, el anticuerpo primario se recupera y la membrana se lava cuatro veces por 10 minutos, con una solución de TBS-Tween 0.1 %. Posteriormente, la membrana se incubó con un anticuerpo secundario unido a HRP disuelto en una solución de TBS-Tween 0.1 %. La incubación con el anticuerpo secundario, se llevó a cabo durante toda la noche. Al término, el anticuerpo secundario se elimina y la membrana se lava cuatro veces por 10 minutos, con una solución de TBS-Tween 0.1 %. La Tabla 2 se muestra los anticuerpos primarios utilizados, su origen y concentración, así como la concentración de los anticuerpos secundarios y su origen.

Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados durante en cada experimento.

| Anticuerpo | Dilución | Origen | Marca |
|-------------------|-----------------|---------------|--------------|
| Rho | 1:1000 | Rabbit | Millipore |
| PPAR γ | 1:1000 | Goat | Santa Cruz |
| α -ACTINA | 1:1000 | Rabbit | Santa Cruz |
| HRP-Rabbit | 1:10000 | Rabbit | Jackson |
| HRP-Goat | 1:10000 | Goat | Jackson |

7.10 Inmunoquimioluminiscencia.

La detección de los anticuerpos unidos a las proteínas de interés, se realizó mediante el uso de un kit de quimioluminiscencia (Millipore). La luminiscencia emitida fue captada mediante la exposición y el revelado de una placa de rayos X en un cuarto oscuro.

7.11 Estandarización del número de células PAE para el co-cultivo.

En placas para cultivo de seis pozos para cultivo se sembraron diferente número de células en cada pozo. La Figura 10 muestra las condiciones, distribución y número de células sembradas en cada pozo.

En la caja 1 sólo se utilizaron 3 pozos, a dos de ellos únicamente se les adicionó medio de cultivo Ham's F-12 y un pozo en el que se sembraron 1562 células PAE. En la caja 2 se utilizaron todos los pozos, y se sembraron diferente número de células. En todos los casos se utilizaron 2mL de medio de cultivo Ham's F-12, en las condiciones ya descritas. A cada caja, se le realizó un análisis del crecimiento, cada 24 horas, bajo el microscopio, registrando el porcentaje de confluencia y capturando la morfología que presentaban durante el crecimiento del cultivo.

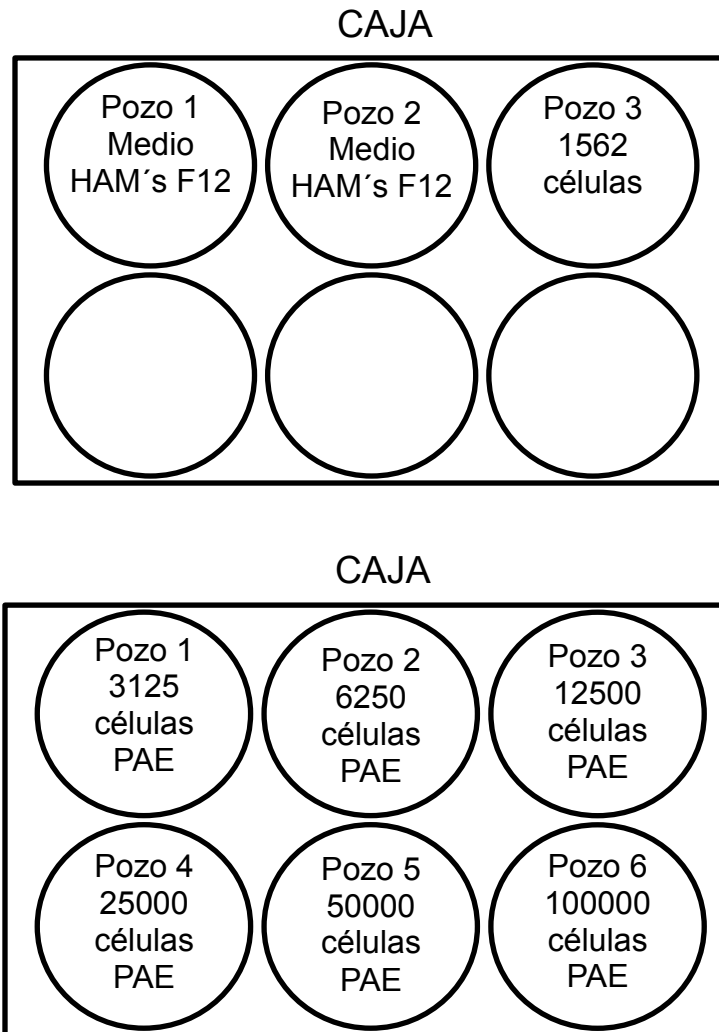


Figura 10. Estandarización de las células PAE sembradas en diferente número.

7.12 Extracción de las células hematopoyéticas a partir de sangre periférica y médula ósea.

La extracción de células hematopoyéticas se llevó a cabo, utilizando 4 ratones macho de 2 meses de edad. Los ratones fueron pesados y marcados para su identificación. Dos de los ratones recibieron un tratamiento que promueve la movilización de las células hematopoyética de la médula ósea. Se les administró el fármaco Filgrastim a una concentración de 300µg/g. Los dos ratones restantes, fueron inyectados con solución salina.

El Filgrastim y la solución salina, se administraron vía sub-cutánea cada 24 horas, durante 4 días. Los ratones fueron sedados con cloroformo, 24 horas después del último tratamiento, y se les realizó disección torácica para exponer el corazón donde se les realizó punción cardiaca para extraer la mayor cantidad de sangre periférica posible.

La sangre se centrifugó a 2500rpm durante 20 minutos, para separar los componentes sanguíneos y se extrajo la fase correspondiente a los leucocitos (Buffy coat). Esa fase se transfirió a un tubo falcón agregándole 10mL de buffer salino, para lizar a los eritrocitos que pudieran estar mezclados con los leucocitos, y se incubó a 37°C durante 5 minutos, después de la incubación se centrifugó a 1500rpm por 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y el botón se re-suspendió en 1mL de medio de cultivo.

Para la extracción de células de médula ósea, se cortaron y limpiaron las patas traseras del animal, posteriormente se les inyectó una solución salina en el interior del hueso, esta solución fue recuperada la solución en un tubo falcón y se centrifugo a 1500rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron en 1mL de medio HAM's F-12.

Se cuantificó el número total de células blancas extraídas, con la cámara de Neubauer, y se procedió a sembrar las células en el medio de cultivo más adecuado para el crecimiento celular.

7.13 Selección del medio de cultivo para las células hematopoyéticas.

Se sembraron 200,000 células hematopoyéticas previamente extraídas de la sangre periférica y de la médula ósea del ratón, en 2mL de medio de cultivo. En este proceso se utilizaron dos medios de cultivo diferentes, Ham's F12 adicionado con 10 % de suero fetal bovino más antibióticos y RPMI adicionado con 10 % de suero fetal bovino al 15% más antibióticos. La Figura 11 muestra las condiciones, distribución y número de células sembradas en cada pozo.

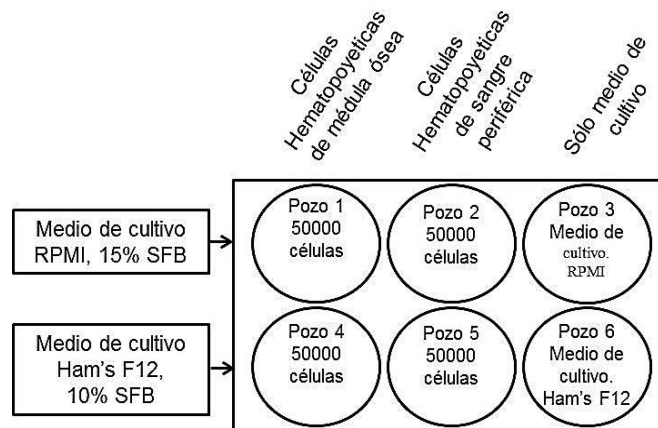


Figura 11. Estandarización del medio de cultivo ideal para el crecimiento las células hematopoyéticas de ratón.

Se realizó el análisis del crecimiento de las células hematopoyéticas bajo el microscopio cada 24 horas, registrando y capturando el crecimiento que presentaban en los medios de cultivo.

7.14 Co-cultivo de células hematopoyéticas con células PAE.

La Figura 12, muestra el diseño realizado para el co-cultivo entre las células hematopoyéticas y las células endoteliales, así como, el tratamiento al cual fueron sometidos con la simvastatina. Se utilizaron un total de 10 cajas de cultivo de seis pozos cada una.

Se sembraron 1000 células PAE en los pozos correspondientes a este tipo celular, 3 horas después, ya que las células se adhirieron a la base del pozo, se cambió el medio de cultivo, para quitar las células muertas o no adheridas y se sembraron las células

hematopoyéticas con 2 mL de medio nuevo en los pozos correspondientes. Las cajas se incubaron durante 7 días. Se realizó un análisis del avance en el crecimiento celular bajo el microscopio cada 24 horas.

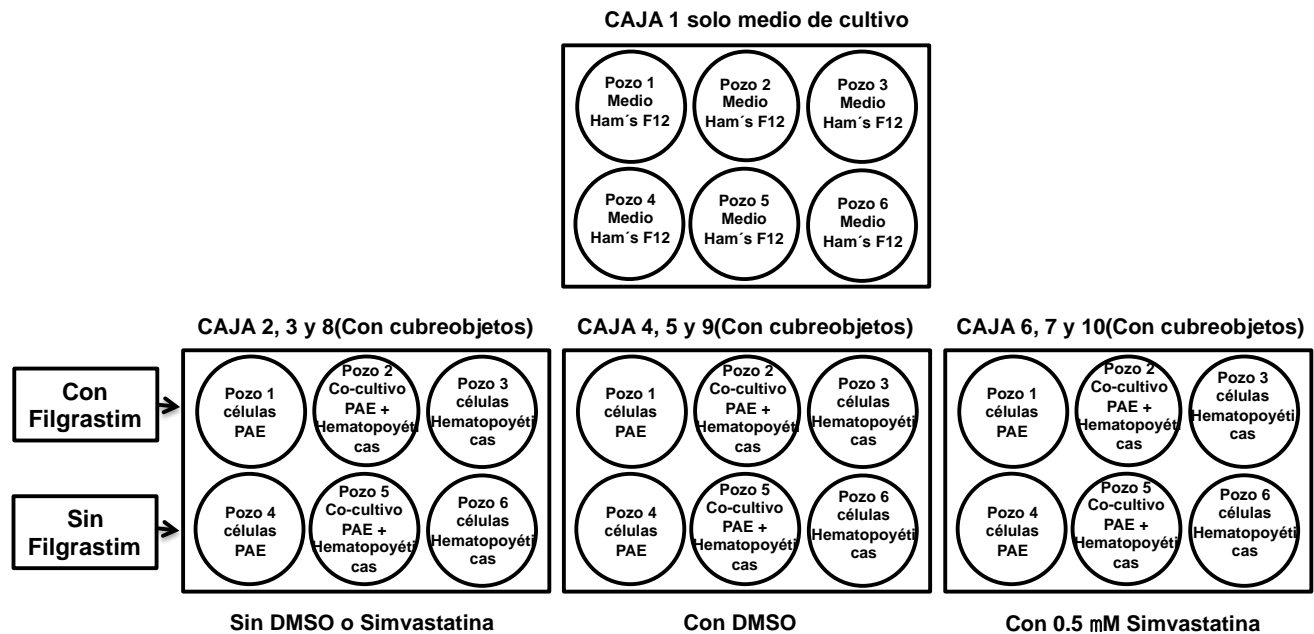


Figura 12. Diseño del co-cultivo de las células hematopoyéticas, movilizadas con Filgrastim y no movilizadas, y las células PAE. Tratamiento con simvastatina.

Al quinto día de incubación se llevaron a cabo los tratamientos: control (Cajas 2, 3 y 8), 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ DMSO (Cajas 4, 5 y 9) y 0.5 μM simvastatina (Cajas 6, 7 y 10). Las cajas se incubaron durante 48 horas. Al término de la incubación, los cultivos de la caja 2 a la 7 se levantaron por Tripsinización, se centrifugaron a 1500rpm durante 4 minutos y se resuspendieron con 1mL de buffer de fosfatos. Se hizo una dilución 1:10 se analizó el porcentaje de viabilidad, tiñendo las células con Azul de Tripano y observándolas al microscopio utilizando la cámara de Neubauer. El resto de cada muestra celular se centrifugó nuevamente y el precipitado de celular fue utilizado para la extracción de proteína y su posterior análisis por electroforesis, Western Blot e inmunodetección.

Las cajas 8, 9 y 10 contenían un cubreobjetos, sobre el cual crecieron las células que recibieron un tratamiento para fijarlas, con para-formaldehído y se tiñeron utilizando la tinción de Giemza, para su análisis por microscopía.

7.15 Análisis estadístico.

Los resultados se expresan como la media (\pm) de la desviación estándar (SD). La comparación entre los datos a diferentes concentraciones de simvastatina se realizó mediante un análisis unidireccional de varianza (ANOVA), en función de observar si los datos se distribuyeron de manera normal o no. Se utilizó el programa Sigama Stat (Jandel Scientific). Se consideraron estadísticamente significativas las diferencias, cuando $P < 0.05$.

8. Resultados

8.1 Efecto de la simvastatina sobre Rho en las células PAE.

Para determinar el efecto de la simvastatina sobre la expresión de la proteína Rho, se sembraron en cajas Petri de 100 mm células PAE y 24 horas antes de alcanzar la confluencia se llevó a cabo el tratamiento con diferentes concentraciones de la simvastatina.

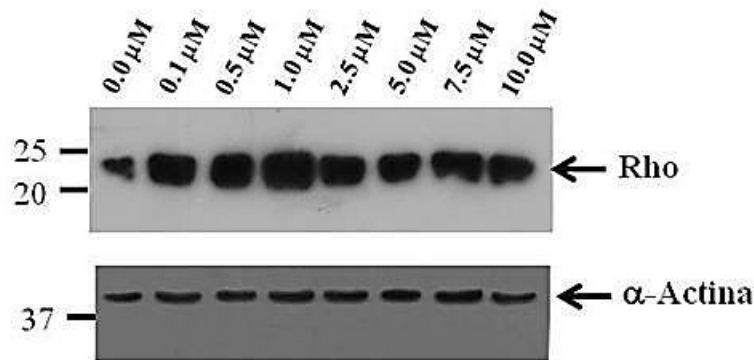


Figura 13. Efecto de la simvastatina, sobre concentración de la GTPasa pequeña Rho en células PAE. Donde se indica, simvastatina 0.0 μM, 0.1 μM, 0.5 μM, 1.0 μM, 2.5 μM, 5.0 μM, 7.5 μM y 10 μM, fueron incubadas durante 24 horas en los cultivos de células PAE. El anticuerpo Anti-Rho rabb 1:1000, fue incubado durante toda la noche, el anticuerpo Anti-α-actina 1:1000 fue incubado durante toda la noche. El anticuerpo secundario 1:10,000, fue incubado durante 2 horas. La figura es representativa de tres experimentos.

La GTPasa pequeña Rho tiene un peso molecular de 22kDa y la detección realizada por el anticuerpo primario muestra a la proteína inactiva o no isoprenilada, lo cual significa que la enzima permanece en el citosol. Lo que se observa después del tratamiento con la simvastatina es que hay un aumento considerable de las concentraciones de proteína Rho citosólica e inactiva, este efecto es mayor cuando las concentraciones de simvastatina son de 0.1 μM, 0.5 μM u 1.0 μM, comparadas contra la cantidad de proteína Rho observada en el tratamiento control 0.0 μM de simvastatina.

8.2 Efecto de la simvastatina sobre PPAR en las células PAE.

Para determinar el efecto de la simvastatina sobre la expresión de la proteína PPAR γ , se sembraron en cajas Petri de 100 mm células PAE y 24 horas antes de alcanzar la confluencia se llevó a cabo el tratamiento con diferentes concentraciones de la simvastatina.

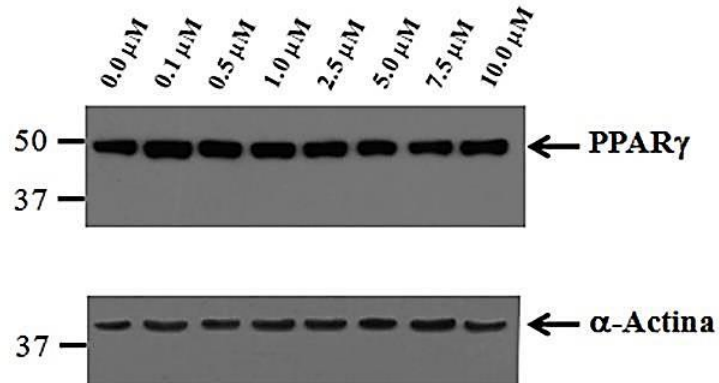


Figura 14. Efecto de la simvastatina, sobre concentración del receptor activado por proliferadores peroxisomales gamma (PPAR γ). Donde se indica, simvastatina 0.0 μ M, 0.1 μ M, 0.5 μ M, 1.0 μ M, 2.5 μ M, 5.0 μ M, 7.5 μ M y 10 μ M, fueron incubadas durante 24 horas en los cultivos de células PAE. El anticuerpo Anti-PPAR γ goat 1:1000, fue incubado durante toda la noche, el anticuerpo Anti- α -actina 1:1000 fue incubado durante toda la noche. El anticuerpo secundario 1:10,000, fue incubado durante 2 horas. La figura representativa de tres experimentos.

El receptor activado por proliferadores peroxisomales gamma (PPAR γ) tiene un peso molecular de 50kDa y lo que observamos con el anticuerpo primario muestra la diferencia en concentración de proteína. Después del tratamiento con la simvastatina, hay un aumento de la cantidad de proteína PPAR γ cuando las concentraciones de simvastatina fueron de 0.1 μ M, 0.5 μ M u 1.0 μ M, comparadas contra la cantidad de PPAR γ observada en el tratamiento control 0.0 μ M de simvastatina.

8.3 Efecto de la simvastatina sobre la producción de EROS en las células PAE.

Se determinó la producción de especies reactivas del oxígeno a siete diferentes concentraciones de simvastatina mediante la cuantificación de la fluorescencia emitida por DCF-DA, un fluoróforo di-acetilado que se ingresa a la célula por difusión pasiva, ya en el citosol, esterasas inespecíficas cortan los grupos del compuesto, impidiendo que la molécula pueda salir de la célula.

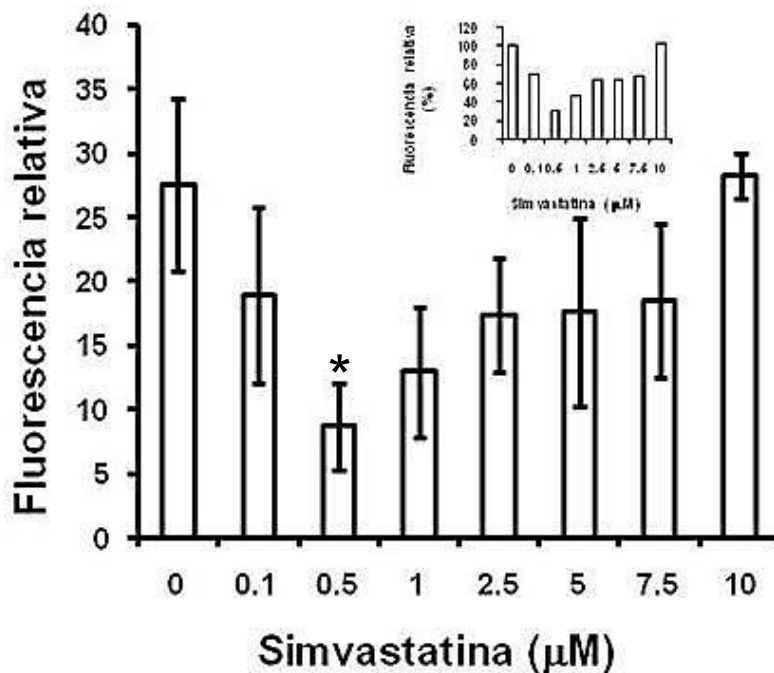


Figura 15. Detección de producción de especies reactivas a diferentes concentraciones de simvastatina. Donde se indica, simvastatina 0.0 µM, 0.1 µM, 0.5 µM, 1.0 µM, 2.5 µM, 5.0 µM, 7.5 µM y 10 µM, fueron incubadas durante 24 horas en los cultivos de células PAE. Posterior a la incubación, se eliminó el medio de cultivo, se agregó PBS con 10 µM DCF y se incubó a 37° durante 40 minutos. La cuantificación de la fluorescencia se realiza en un total de 100,000 células endoteliales. Las barras representan la media ± SD de 3 experimento diferentes. * P < 0.05 vs otras concentraciones de simvastatina.

Las especies reactivas del oxígeno, presentes en el medio, interaccionan con el DCF des-acetilado mediante una reacción de óxido-reducción. El reactivo oxidado, se excita a una longitud de onda de 475nm, el resultado de la excitación del compuesto, es la emisión de fluorescencia a 525nm.

Por lo tanto, la cantidad de fluorescencia emitida es directamente proporcional a la producción de especies reactivas del oxígeno en el interior de la célula.

Después del tratamiento con la simvastatina se observó que la producción de especies reactivas del oxígeno disminuyó marcadamente a concentraciones de 0.1 a 5 μM principalmente a la concentración de 0.5 μM , comparadas con el experimento control.

8.4 Crecimiento celular de acuerdo al número inicial de células cultivadas.

Se registró el crecimiento del cultivo celular durante un periodo de cinco días. En la Tabla 3, se muestran los datos obtenidos de los conteos. Se incluyeron dos pozos control, uno con solo medio de cultivo Ham's F12 (pozo 1) y otro con medio de cultivo más 2 μL de DMSO estéril (pozo 2). El pozo 3 contenía un total de 1,562 células PAE, el porcentaje de confluencia máxima para este cultivo fue de 10%.

Tabla 3. Crecimiento celular

| Pozo | Número de células | Porcentaje Celular por cada día | | | | |
|------|------------------------|---------------------------------|--------|-----------|--------|---------|
| | | Lunes | Martes | Miércoles | Jueves | Viernes |
| 1 | Medio Ham's F12 | 0 % | 0 % | 0 % | 0 % | 0 % |
| 2 | Medio Ham's F12 + DMSO | 0 % | 0 % | 0 % | 0 % | 0 % |
| 3 | 1562 células | 1 % | 1 % | 2 % | 5 % | 10 % |
| 4 | 3125 células | 1 % | 5% | 10% | 25% | 50% |
| 5 | 6250 células | 5 % | 10% | 20% | 40% | 60% |
| 6 | 12500 células | 10 % | 15% | 30% | 50% | 80% |
| 7 | 25000 células | 15 % | 25% | 40% | 60% | 90% |
| 8 | 50000 células | 25% | 40% | 60% | 85% | 100% |
| 9 | 100000 células | 40% | 60% | 90% | 100% | 100% |

Tabla 3. Crecimiento celular. Cajas de cultivo celular con seis pozos. La tabla indica el porcentaje de crecimiento (confluencia) de los cultivos de células endoteliales, registrados cada 24 horas, de manera cuantitativa.

En el pozo 4 de sembraron un total de 3,125 células PAE y el porcentaje máximo de confluencia observada fue del 50%.

En los pozos 5, 6 y 7 se registró una confluencia máxima de 60%, 80% y 90% respectivamente. En el pozo 8 se sembraron 50,000 células, que adquirieron un 100% de confluencia al final del periodo de evaluación. En el pozo 9 se sembraron 100,000 células endoteliales, este cultivo comenzó con un porcentaje de confluencia del 40% alcanzando el 100% solo cuatro días después del día de siembra (Figura 16).

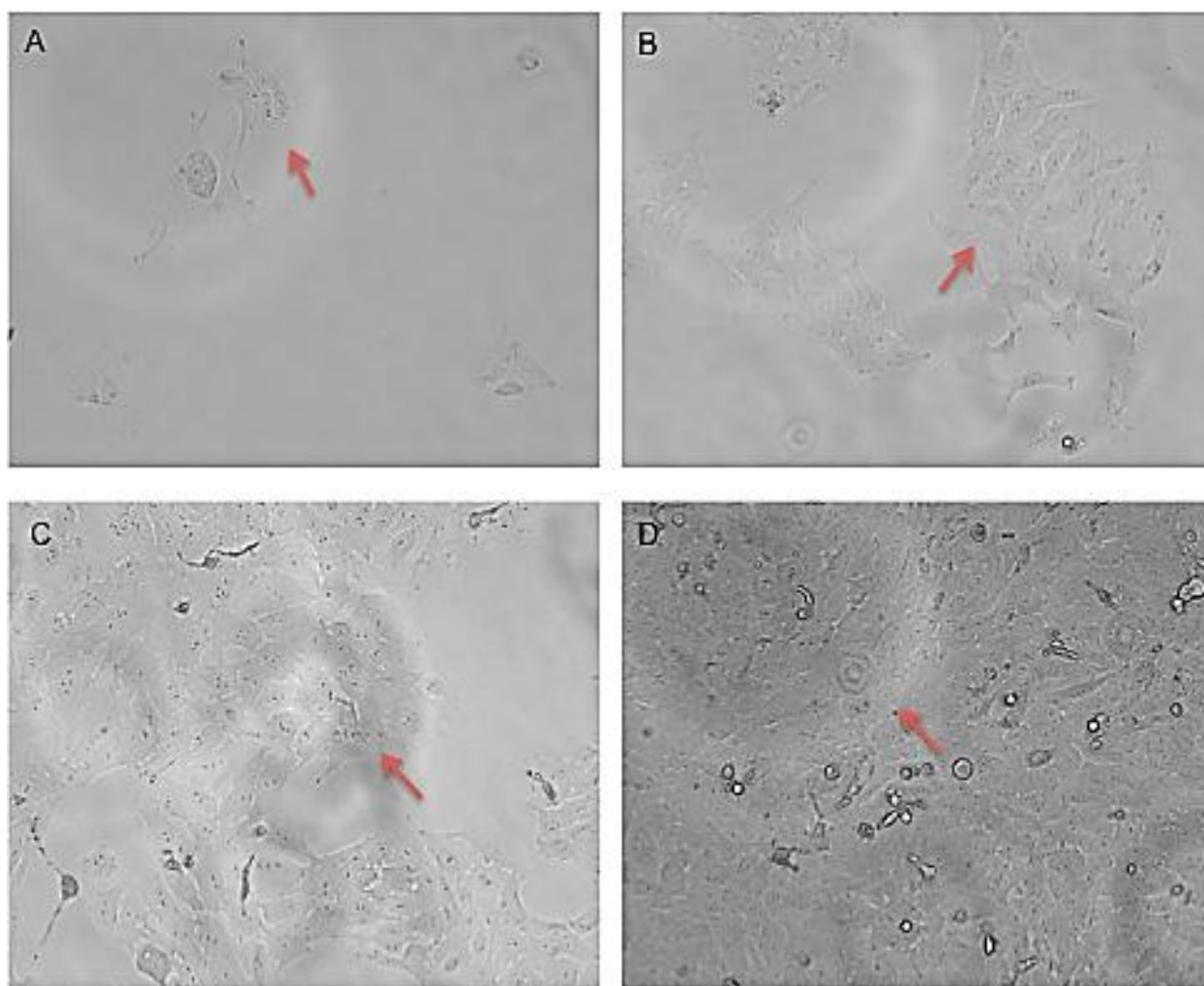


Figura 16. Registro y análisis microscópico del crecimiento y la morfología de los cultivos de células PAE en un periodo establecido de cinco días. Las imágenes fueron tomadas a un cultivo celular con 1,562 células PAE, en medio Ham's F12 más 10 % SFB y antibióticos, incubado a 37°C. Imagen A: adquirida a las 24 horas de incubación. Imagen B: Tomada a los 3 días de incubación. Imagen C: tomada a los 4 días de incubación. Imagen D: a los 5 días de incubación. Las imágenes se tomaron con el objetivo 20X en el microscopio de fluorescencia FLiod™ Cell Imaging Station (Life Technologies™)

En suspensión, las células endoteliales adquieren una forma circular, después de las primeras 2 horas de siembra, las células se adhieren a la base del pozo de cultivo. A las 48 horas de incubación, en la Imagen A, se observa como las células comienzan a dividirse y a formar colonias aisladas. En la Imagen B, observamos que las colonias crecen en número manteniendo una pequeña separación entre célula y célula. En la Imagen C observamos la distribución celular es mayor y mucho más compacta observándose que el crecimiento celular comienza a cubrir la superficie total del pozo. En la Imagen D ya no existen espacios vacíos, es decir, se observa un cultivo al 100% de confluencia. En este punto, las células endoteliales han logrado cubrir la totalidad de la superficie del pozo. Después de este punto, el ciclo de división celular se detiene por falta de nutrientes y espacio, las células en el cultivo comienzan a morir y finalmente pierden la capacidad de adherirse a la superficie.

En comparación con los otros pozos, que conforme al aumentó en el número de células sembradas, la confluencia se alcanzó más rápidamente, decidimos trabajar con este número de células (1562) para llevar a cabo el co-cultivo con las células hematopoyéticas, y asegurar que el crecimiento celular de las endoteliales no fuese mayor que las hematopoyéticas.

8.5 Estandarización del medio de cultivo para las células hematopoyéticas y el co-cultivo.

Los cultivos de células hematopoyéticas de ratón se llevaron a cabo en dos medios diferentes de cultivo, medio RPMI adicionado con antibióticos y 15 % de suero fetal bovino, y medio Ham's F12 adicionado con antibióticos y 10 % de suero fetal bovino. Como se puede apreciar en las imágenes, las células hematopoyéticas se adhieren completamente a la superficie del pozo de cultivo, presentan una morfología circular y un tipo de crecimiento muy disperso.

En el cultivo de las células con medio Ham's F12 se observa un crecimiento con tendencia a formar agrupaciones que parecen collares.

En contraste, el cultivo de células con medio RPMI presenta un crecimiento con agrupaciones en forma de racimo (*clusters*). En ambos casos las células se encuentran adheridas a la superficie del pozo de cultivo (Figura 17).

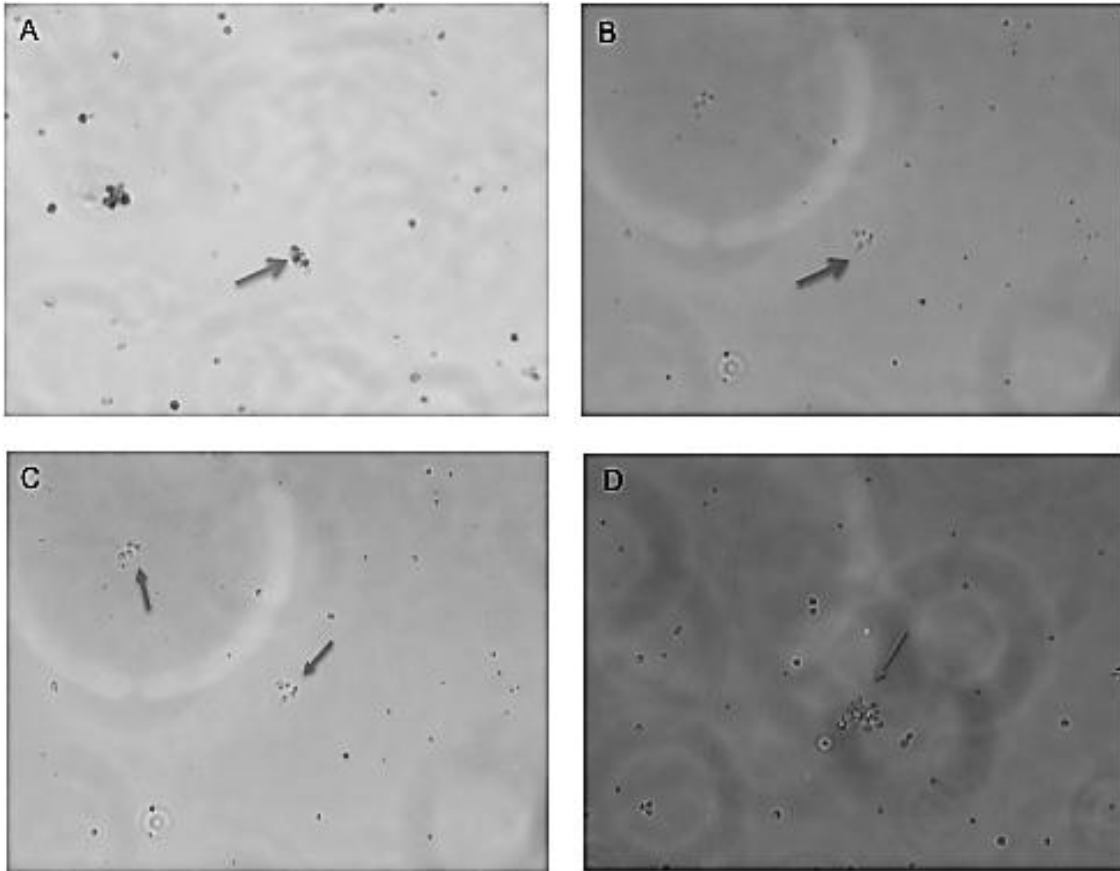


Figura 17. Registro y análisis microscópico del crecimiento de células hematopoyéticas de médula ósea o sangre periférica de ratón, en dos medios de cultivo diferentes. Las imágenes fueron tomadas a un cultivo celular con 20000 células. Imagen A: células hematopoyéticas de sangre en medio RPMI a los 7 días de cultivo; Imagen B: células hematopoyéticas de médula ósea en medio RPMI a los 7 días de cultivo; Imagen C: células hematopoyéticas de sangre periférica en medio Ham's F12 a los 7 días de cultivo; Imagen D: células hematopoyéticas de médula ósea en medio Ham's F12 a los 7 días de cultivo. Las imágenes se tomaron con el objetivo 20X en el microscopio de fluorescencia FLiod™ Cell Imaging Station (Life Technologies™)

En ambos casos las células se encuentran adheridas a la superficie del pozo de cultivo. Con este experimento se decidió utilizar el medio Ham's F12 para llevar a cabo el co-cultivo, porque las células hematopoyéticas no presentaron ningún cambio en su morfología o crecimiento.

8.6 Co-cultivos células PAE-células hematopoyéticas.

La Figura 18 muestra un cultivo de 1000 células PAE (A) y un co-cultivo con 20000 células hematopoyéticas (B), después de 5 días de incubación. Las células se fijan con paraformaldehído al 4 % y se tiñen mediante la técnica de Tinción de *Giemza*. Las imágenes se tomaron con el objetivo 20X. En la imagen 18A, observamos un cultivo de células endoteliales como control, las uniones células son estrechas y la morfología de cada una es compacta y bien definida. En la imagen 18B, observamos algunos cambios morfológicos que se presentan en las células endoteliales en presencia de células hematopoyéticas. Las células PAE, comienzan a formar cuerpos más alargados y se observan más dispersas, además, las prolongaciones de cada célula, que las mantienen unidas entre sí, se tornan más largas y finas.

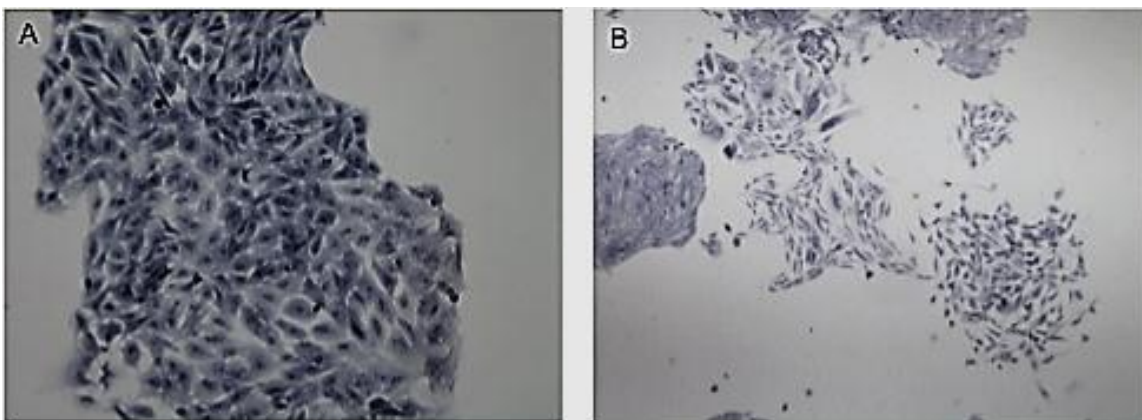


Figura 18. Registro y análisis microscópico del co-cultivo entre células hematopoyéticas y células PAE. Las imágenes fueron tomadas a un cultivo celular con 1000 y 20000 células, PAE y hematopoyéticas iniciales. Imagen A: células PAE a los 5 días de cultivo; Imagen B: Co-cultivo, células PAE (1000) con células hematopoyéticas (20000) a los 5 días de cultivo. . Las imágenes se tomaron con el objetivo 20X en el microscopio de fluorescencia FLioid™ Cell Imaging Station (Life Technologies™).

La Figura 19, muestra un cultivo de 1000 células PAE (A) y un co-cultivo con 20000 células hematopoyéticas (B), después de 5 días de incubación. Las imágenes fueron tomadas en vivo con el objetivo 20X. Es decir, la toma de la imagen se realizó a células durante su crecimiento, las células se dejaron crecer hasta 7 días después de su siembra.

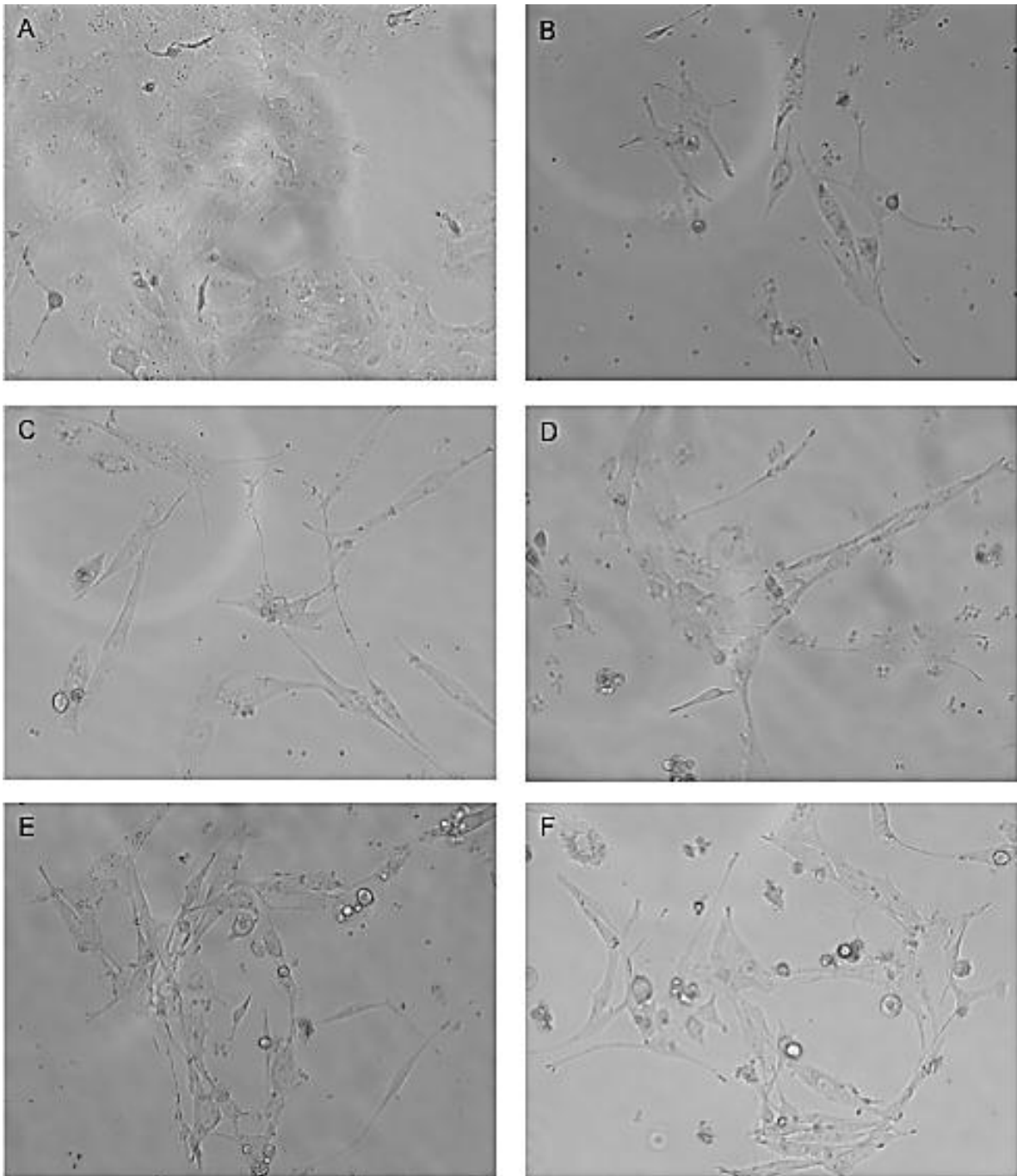


Figura 19. Registro y análisis microscópico del co-cultivo entre células hematopoyéticas y células PAE. Las imágenes fueron tomadas a un cultivo celular con 1000 y 20000 células, PAE y hematopoyéticas iniciales. Imagen A: células PAE a los 5 días de cultivo; Imagen B, C, D, E y F: Co-cultivo, células PAE (1000) con células hematopoyéticas (20000) a los 5 días de cultivo. . Las imágenes se tomaron con el objetivo 20X en el microscopio de fluorescencia FLiod™ Cell Imaging Station (Life Technologies™)

Se observa un cambio en la morfología de las células endoteliales cuando se cultivan en presencia de células hematopoyética, las células PAE, presentan un alargamiento de su estructura, parecido a lo que sucede cuando hay regeneración de los vasos, esas prolongaciones terminan en una unión estrecha con la célula adyacente, que puede ser una célula endotelial o una célula hematopoyética.

En la Figura 20 se muestra el porcentaje de viabilidad celular obtenido al final de cada tratamiento. La viabilidad celular para cada cultivo se determinó utilizando 0.3 % de Azul de Tripán. En general, los resultados muestran que no hay daño celular en cada uno de los cultivos, excepto, en cultivo con solo células hematopoyéticas, para estos cultivos, la viabilidad fue de aproximadamente 50 % de muerte celular en presencia de simvastatina, estos resultados son similares, en las células con o sin Filgrastim 300µg/g.

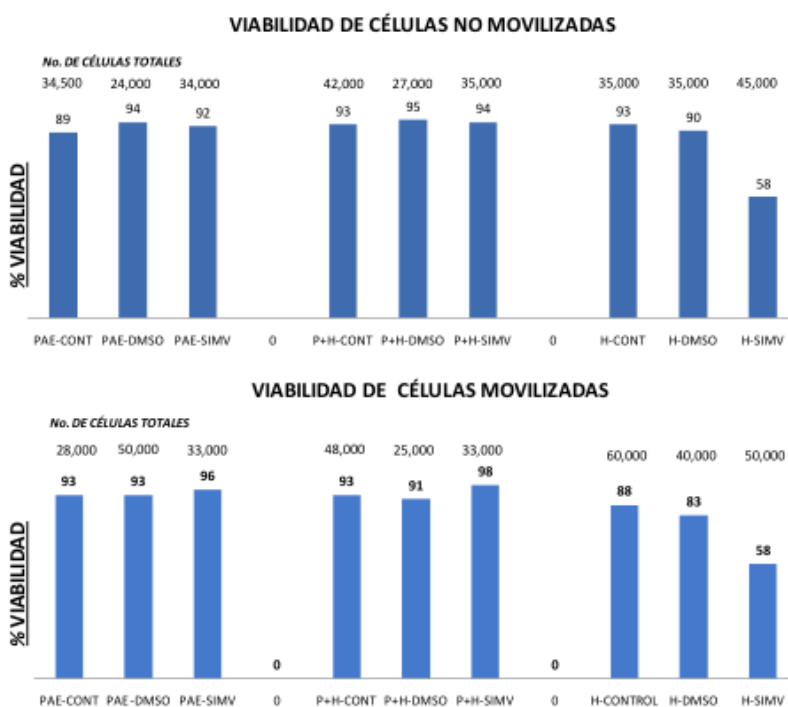


Figura 20. Viabilidad celular para cada cultivo y tratamiento. El número sobre cada columna indica el porcentaje. El número sobre el porcentaje indica el número final de células. Cada columna indica el tipo de cultivo y tratamiento. La n, es de dos experimentos diferentes es por eso que no se agregó la barra de desviación.

La Figura 21 muestra la cantidad de proteína total obtenida a partir de la lisis celular a la que fueron sometidos los diferentes cultivos. Los resultados indican que a partir de los cultivos con células PAE y los co-cultivos se obtuvo un buen rendimiento de proteína, pero en el caso de las células hematopoyéticas, la cantidad de proteína obtenida fue sumamente reducida o nula, por otra parte, el volumen final de proteína total para cada muestra fue insuficiente. Es por eso que no hemos realizado aún (estamos en ese proceso), la inmunodetección, debido a que en algunos casos, aunque la proteína es alta no es suficiente el volumen requerido para llevar a cabo la separación por electroforesis.

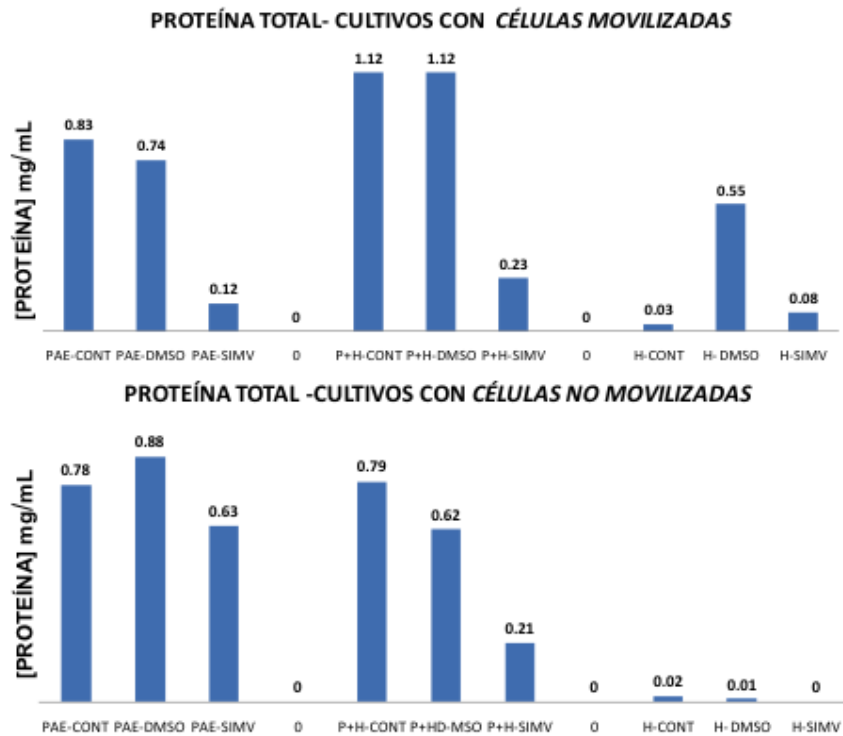


Figura 21. Cuantificación de proteína para cada cultivo y tratamiento. El número sobre cada columna indica el la concentración de proteína mg/mL. La n, es de dos experimentos diferentes es por eso que no se agregó la barra de desviación.

9 Discusión.

Las estatinas inhiben las síntesis del mevalonato, previniendo la síntesis de isoprenos, entre ellos, el pirofosfato de geranil-geranilo, una molécula hidrofóbica y esencial para la activación de proteínas como la GTPasa pequeña Rho. Ese proceso de activación consiste en la unión del isopreno al carbono terminal de la enzima, lo cual permite el acoplamiento de la enzima en la membrana citoplásmica y de esa manera llevar a cabo su función, como es la activación de la proteína ROCK. Cuando se inhibe la síntesis de los isoprenos por la simvastatina, se limita el proceso de activación de la enzima Rho, por lo tanto, las concentraciones de la enzima en su forma inactiva, aumentan en el citosol (Yano M, y cols., 2007).

Este efecto se observa en la Figura 13, donde el anticuerpo primario, que utilizamos, reconoce específicamente la fracción de enzima no isoprenilada e inactiva en el citosol. El análisis de la figura nos indica que las concentraciones de la proteína Rho no isoprenilada aumentan principalmente en las concentraciones de Simvastatina de 0.1 μ M, 0.5 μ M ó 1.0 μ M, en comparación con las concentraciones de proteína Rho (no isoprenilada) presente en el experimento control (0.0 μ M simvastatina). Esto es debido a la disminución en la síntesis de isoprenos que previenen la translocación de la enzima hacia la membrana plasmática, la unión del isopreno al carbono terminal de la enzima permite su acoplamiento a la membrana. La simvastatina reduce los niveles de isoprenos, por lo tanto, la cantidad de proteína no isoprenilada en el citosol aumenta. Sin embargo, a mayores concentraciones de Simvastatina, 2.5 μ M, 5.0 μ M, 7.5 μ M ó 10 μ M, el efecto de la Simvastatina sobre la enzima Rho disminuye. Posiblemente porque al aumentar la concentración de este fármaco sobre las células endoteliales, comienza a observarse un efecto tóxico, aún más, en presencia de concentraciones por encima de 20 μ M de Simvastatina, las células comienzan a perder su capacidad para adherirse a la superficie. Los efectos benéficos que presentan las estatinas están asociados solo a bajas concentraciones terapéuticas, por el contrario, un aumento sobre la dosis terapéutica establecida, implica la aparición de efectos adversos y/o tóxicos.

El efecto de la simvastatina sobre la GTPasa Rho, implica que se está llevando a cabo la regulación de otras proteínas involucradas en la cascada de señalización, en la que participa esta enzima, como es el efecto que tiene sobre su efector principal, ROCK I y II, y a su vez, sobre proteínas involucradas en distintos procesos celulares, como el crecimiento celular o la transcripción (Tanaka S, y cols., 2013).

Uno de esos sistemas de regulación, involucra a los PPARs (receptores activados por proliferadores peroxisomales) que están relacionados con la regulación de genes involucrados en la homeostasis energética celular, como el desacoplamiento mitocondrial, o la inhibición de la transcripción de genes implicados en procesos pro-inflamatorios como el factor nuclear $\kappa\beta$ (NF $\kappa\beta$) o el factor de necrosis tumoral α (TNF α) (McCarey DW, y cols., 2005). Estudios recientes, han reportado que la actividad de estos receptores, como es PPAR γ , se inhibe por fosforilación, que es parte de la acción de Rho. Recientemente, ha sido descrito el efector inmediato de la enzima Rho, conocido como ROCK, sin embargo, aún no se ha esclarecido por completo esta vía de señalización o el mecanismo exacto de la fosforilación de los recetores PPAR γ . (Yano M, y cols., 2007).

El tratamiento con Simvastatina, sobre los cultivos de células endoteliales, inhibe la conversión de HMG-CoA en mevalonato, y la síntesis de isoprenos, interfiriendo en la activación de la enzima Rho, este mecanismo de la Simvastatina, paralelo a la inhibición de la síntesis de colesterol, permite la activación de los receptores PPAR γ . Los receptores PPAR γ , que participan directamente sobre la activación de los genes de dos proteínas importantes, la enzima Oxido Nitrico Sintasa (eNOs) y las proteínas desacoplantes mitocondriales UCPs. La eNOs es esencial para la síntesis de óxido nítrico (NO) y la regulación de la función endotelial, así como su regeneración y crecimiento. Por otro lado, las proteínas UCPs, específicamente, las proteínas UCP2, están involucradas en la modulación de la producción de especies reactivas del oxígeno, durante el proceso de fosforilación oxidativa en las mitocondrias, que es uno de los principales sitios de liberación de especies reactivas a oxígeno en las células.

(Villarroya F, y cols., 2006).

En la Figura 14, se observa que la presencia de simvastatina en células endoteliales, principalmente a concentraciones bajas, 0.1 μM , 0.5 μM y 1 μM , promovió un aumento en la concentración y la actividad de PPAR γ , lo que está relacionado con la disminución de la proteína Rho activa, es decir, no se lleva a cabo la fosforilación de PPAR γ por la cascada regulada por Rho, aumentando así, la actividad de PPAR γ en la célula.

Aún nos falta determinar el mecanismo a través del cual, la inactivación de Rho, regula la cantidad de proteínas como los PPARs, la cual, puede deberse a una regulación sobre la expresión proteica. Lo cierto es, que el tratamiento con la simvastatina tiene también efecto sobre la cantidad la producción de especies reactivas del oxígeno en el endotelio.

El cual, está asociado al desarrollo de enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis o la insuficiencia cardiaca. Se ha demostrado que las estatinas aumentan la actividad de los sistemas enzimáticos antioxidantes, en particular, la enzima superóxido dismutasa extracelular (SODext) presente en el endotelio y la actividad de la tioredoxina endotelial. (Sorrentino S and Landmesse U, 2005). Por lo que la simvastatina puede actuar como un antioxidante, mediante el aumento de los mecanismos de defensa antioxidantes endógenos. (Chopra V, y cols., 2007).

En la Figura 15 se observa el efecto de la simvastatina sobre la producción de especies reactivas a oxígeno totales determinada con el fluoróforo DCF, quien interacciona con los radicales libres, oxidándose, lo cual, permite relacionar esta oxidación de manera directa con la cantidad de radicales libres presentes en la célula después de un evento. Lo que observamos fue que la simvastatina mostró un efecto protector sobre la producción de radicales libres, especialmente en la concentración de 0.5 μM , donde la cantidad de especies reactivas del oxígeno disminuyó de manera significativa, de acuerdo al análisis estadístico, obteniendo un valor $P < 0.05$, comparando esta concentración contra el respectivo control.

Estos resultados indican que la concentración más efectiva de Simvastatina se encuentra entre 0.1 μM y 1 μM , siendo 0.5 μM , la concentración en la que se observa un mayor efecto sobre las células endoteliales, en ambos casos, en la inactivación de la enzima GTPasa Rho y en la disminución de la producción de especies reactivas del oxígeno.

Resultados determinados por western blot, de la enzima desacoplante mitocondrial (UCP2), sugieren que esta regulación se debe a un aumento en la cantidad de esta enzima en presencia de simvastatina, proponiendo un mecanismo importante de regulación positiva de la simvastatina que hasta ahora no se había sido observado.

La modulación de la producción de especies reactivas del oxígeno presenta un beneficio potencial en la supervivencia de las células endoteliales, preservando las funciones vitales en el interior de la célula y evitando procesos perjudiciales, desde la lipoperoxidación de lípidos presentes en las membranas, hasta la activación de una muerte programada mediante la vía de las caspasas.

En la actualidad, muchos tipos de células madre adultas o progenitoras se han utilizado en mecanismos de terapia celular en sitios con problemas de daño cardiaco. Parte de los obstáculos potenciales en este tipo de terapias, donde se utilizan células madre, son los requerimientos que las células madre utilizan para diferenciarse y que las células nuevas puedan integrarse al tejido seleccionado, sin generar algún tipo de daño (Guan K and Hasenfuss G, 2007). Los modelos de células endoteliales *in vitro* representan una herramienta valiosa en el estudio del endotelio ante diferentes estímulos fisiológicos y ante agresiones patológicas. Los cuales, se caracterizan por presentar problemas de inflamación donde las especies reactivas del oxígeno juegan un papel importante como factores pro-inflamatorios. Se ha observado que las estatinas son capaces de promover la diferenciación de células madre, a través de un mecanismo dependiente de la inhibición de la vía de síntesis de isoprenos, consecuencia del tratamiento con estatinas, dicho proceso, es a su vez, dependiente de la inhibición del sistema Rho/Rho cinasa. Este efecto está asociado con el aumento en la activación y expresión de PPAR γ (Paintlia AS, y cols., 2010).

De tal manera que, desarrollar y estudiar un sistema donde se mantengan creciendo células de origen endotelial y células madre, resulta muy importante.

En primera instancia, se determinó el número de células endoteliales necesarias para que los co-cultivos tuvieran una duración mínima de diez días (Tabla 3, Figura 16). Esto se logró, registrando el crecimiento continuo de siete cultivos con diferente número de células endoteliales. La duración máxima registrada del crecimiento de los cultivos, fue de 10 días, con un total de 1,562 células PAE utilizadas durante la siembra, este cultivo inicio con un porcentaje de confluencia del 1% al inicio de la incubación, en el día 4, presentaba un porcentaje de confluencia del 10%, finalmente, en el décimo día de incubación, el porcentaje de confluencia alcanzado fue del 100%.

Conforme aumenta el número de células sembradas de manera inicial, más rápido alcanzan el estado de confluencia (Tabla 3, Figura 16). Este ensayo nos permitió determinar que 1000 células PAE es una buena aproximación para establecer el número de células endoteliales necesarias para realizar los co-cultivos.

El siguiente paso, fue establecer el medio de cultivo ideal para el crecimiento de las células hematopoyéticas de ratón. Se realizó un ensayo con dos medios de cultivo diferente, en el primero, las células hematopoyéticas fueron incubadas con el medio de cultivo RPMI, adicionado con antibióticos y suero fetal bovino al 15%, este, es un medio de cultivo esencial, diseñado para el cultivo de células en suspensión y en una atmósfera al 5% de dióxido de carbono (Figura 17 A, B). El segundo, fue el medio de cultivo Ham's F12 adicionado con antibióticos y suero fetal bovino al 10% (Figura 17 C, D), este es un medio de cultivo enriquecido, diseñado para el cultivo de células endoteliales, además, este medio favorece la adherencia de las células a la superficie de crecimiento. Las células hematopoyéticas de ratón fueron extraídas a partir de dos fuentes principales, células hematopoyéticas presentes en sangre periférica (Figura 17 A, C) y células hematopoyéticas adheridas a la médula ósea (Figura B, D), ambas, cultivadas por agotamiento de células blancas. En todos los casos, las células hematopoyéticas mostraron una capacidad innata para adherirse a la superficie de crecimiento, sin embargo, solo las células hematopoyéticas extraídas a partir de sangre

periférica y cultivadas en el medio Ham's F12 presentaron el mejor desarrollo y crecimiento, después de 7 días de incubación, se observa una tendencia a presentar agrupaciones en forma de collares, un desarrollo típico para el inicio de la formación de colonias de células hematopoyéticas. En contraste, el cultivo de células hematopoyéticas con medio RPMI presenta un desarrollo con agrupaciones en forma de racimo, además, las células se observan planas y es difícil distinguir cada una de ellas. Por, lo tanto, en base a los datos obtenidos a partir de estos experimentos, se estableció que el medio de cultivo más apto para el desarrollo y crecimiento de los co-cultivos es el medio Ham's F12, no solo por ser el medio indicado para células endoteliales, sino también, porque este medio permite y facilita la adherencia de las células hematopoyéticas a la superficie.

Para el desarrollo de los co-cultivos, las células hematopoyéticas fueron extraídas a partir de la sangre periférica y cultivadas por agotamiento de células blancas.

Previamente, mediante la administración de Filgrastim (300 $\mu\text{g/g}$) a cada ratón, cuya función es activar la proliferación y liberación de las células hematopoyéticas hacia el torrente sanguíneo. Las células hematopoyéticas se sembraron con una diferencia de 3 horas en comparación con las células PAE, este espacio entre la siembra de cada tipo de célula, permite a las células endoteliales adherirse completamente a la superficie, de esta manera, se puede eliminar el medio de cultivo con las células endoteliales que al no adherirse a la superficie, pierden su función y mueren, impidiendo así, que esto sea una variable más que afecte el crecimiento y desarrollo de los co-cultivos (Figuras 18 y 19).

El registro microscópico de los cultivos, nos permite observar los cambios que se presentan en la morfología de las células endoteliales cuando crecen en presencia de células hematopoyéticas. Las prolongaciones presentes en las células endoteliales se vuelven más pronunciadas, los cuerpos se tornan más alargados y existe una clara interacción entre las células endoteliales y las células hematopoyéticas.

Las células hematopoyéticas suelen presentarse principalmente sobre la parte terminal de las prolongaciones de las células endoteliales, lo que nos indica, que las células hematopoyéticas están involucradas en el crecimiento de estas prolongaciones.

Está establecido que la proliferación y la diferenciación de las células hematopoyéticas está involucrada con la reparación del endotelio denudado, activando la proliferación de las células endoteliales mediante la liberación de factores que estimulan su crecimiento.

Un aspecto importante de la interacción establecida entre ambos tipos celulares es el contacto directo que se presentan entre las células. Hasta el momento desconocemos si las células endoteliales tienen algún efecto sobre las células hematopoyéticas, los estudios continúan, aunque, es claro que los cambios principales deben ser al nivel molecular.

En otro punto a destacar, como se observa en la Figura 20, no un hay daño en los co-cultivos cuando se mide la viabilidad celular, excepto, en células hematopoyéticas en presencia de simvastatina.

En experimentos con células endoteliales se determinó que 0.5 μ M de Simvastatina es una de las concentraciones más efectivas para inhibir la actividad de la enzima Rho (Figuras 13, 14 15).

En nuestro caso, el inicio del estudio de la interacción entre estos dos tipos de células, ha comenzado a mostrar resultados interesantes, sin embargo, también es evidente que el siguiente paso es determinar los principales mecanismos a traes de los cuales se presenta la interacción entre células endoteliales y las células hematopoyéticas.

10 Conclusiones.

- El tratamiento con simvastatina en las células endoteliales de aorta de cerdo, inhibe la conversión de HMG-CoA a Mevalonato, suprimiendo la síntesis de isoprenos, lo cual repercute en la activación de la GTPasa pequeña, Rho, induciendo un aumento en su concentración a nivel citosólico de manera inactiva.
- Este efecto sobre Rho, favorece el aumento de la actividad y la síntesis de los Receptores Activados por Proliferadores Peroxisomales, PPAR γ , factores de transcripción encargados de regular la expresión de genes involucrados en la modulación de las concentraciones de especies reactivas del oxígeno en el interior de las células, como son las proteínas desacoplates.
- Y a su vez, este efecto repercute en la disminución de especies reactivas a oxígeno.
- El desarrollo de un co-cultivos de células endoteliales y células hematopoyéticas, proporciona un sistema *in vivo*, de regeneración celular así como de su diferenciación.
- El desarrollo de técnicas de aislamiento de células madre, proporciona también una herramienta para el desarrollo de procesos como la regeneración celular.
- El empleo de fármacos como la simvastatina ayuda a mejorar estas técnicas de co-cultivo, debido a su papel en la regulación de sistemas proteicos intracelulares que modulan, la generación de energía, la transcripción génica y la diferenciación celular.
- Aún falta mucho por hacer en este proyecto, hasta ahora hemos observamos avances prometedores para la generación de los modelos regenerativos que involucran a las células madre maduras, como las hematopoyéticas, así como, en los efectos que la simvastatina tiene en la fisiología celular.

12. Bibliografía

1. Aguirre I, Hijona E, Macarulla MT, Gracia A, Larrechi I, Bujanda L, Hijona L, Portillo MP. Several statins increase body and liver fat accumulation in a model of metabolic síndrome. *Journal of Physiology and Pharmacology*. (2013), 64(3): 281-288.
2. Alberts AW. Lovastatin and simvastatin—inhibitors of HMG CoA reductase and cholesterol biosynthesis. *Cardiology* (1990), 77:14–21; Alberts AW. Discovery, biochemistry and biology of lovastatin. *Am. J. Cardiol.* (1988), 62:10J–15J.
3. Andrade FA, Restini CB, Grando MD, Ramalho LN, Bendhack LM. Vascular Relaxation Induced by C-Type Natriuretic Peptide Involves the Ca²⁺/NO-Synthase/NO Pathway. *PLoS One*. (2014), 9(5):e95446.
4. Assmus B, Urbich C, Aicher A, Hofmann WK, Haendeler J, Rossig L, Spyridopoulos I, Zeiher AM, Dimmeler S. HMG-CoA reductase inhibitors reduce senescence and increase proliferation of endothelial progenitor cells via regulation of cell cycle regulatory genes. *Circulation Research*. (2003), 92:1049–1055.
5. Bellosta S, Ferri N, Bernini F, Paoletti R, Corsini A. Non-lipid-related effects of statins. *Ann Med*. (2000), 32:164–76.
6. Bishop AL and Hall A. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem. J* (2000), 348:241–255.
7. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. (1976), 72: 248-254.
8. Brault M, Ray J, Gomez YH, Mantzoros CS, Daskalopoulou SS Statin treatment and new-onset diabetes: A review of proposed mechanisms. *Metabolism*. (2014), pii: S0026-0495(14)00053-5.

9. Brault M, Ray J, Gomez YH, Mantzoros CS, Daskalopoulou SS. Statin treatment and new-onset diabetes: A review of proposed mechanisms. *Metabolism*. (2014), pii: S0026-0495(14)00053-5.
10. Bugge A, Siersbaek M, Madsen MS, Göndör A, Rougier C, Mandrup S. A novel intronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma enhancer in the uncoupling protein (UCP) 3 gene as a regulator of both UCP2 and -3 expression in adipocytes. *J Biol Chem*. (2010), 285(23):17310-7.
11. Burgazli KM, Bui KL, Mericililer M, Albayrak AT, Parahuleva M, Erdogan A. The effects of different types of statins on proliferation and migration of HGF-induced Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs). *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. (2013), 17: 2874-2883.
12. Cannon CP, Braunwald E, McCabe CH, Rader DJ, Rouleau JL, Belder R, Joyal SV, Hill KA, Pfeffer MA, Skene AM;. Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes. *N. Engl. J. Med* (2004), 350:1495–1504.
13. Chao-Yung W, Ping-Yen L, Liao JK. Pleiotropic effects of statin therapy: molecular mechanisms and clinical results. *Trends Mol Med*. (2008), 14(1): 37–44.
14. Chopra V, Choksi PU, Cavusoglu E. Beyond Lipid Lowering: The Anti-Hypertensive Role of Statins *Cardiovasc Drugs Ther* (2007) 21:161–169
15. Corsini A, Bellosta S, Baetta R, Fumagalli R, Paoletti R, Bernini F. New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. *Pharmacol. Ther.* (1999), 84:413–428.
16. Díaz R, Serrano C, Fierro G, Rodríguez A, García-Norro H, López, Panisello R, Minguez V, Colás C, Pascual F, Verdes-Montenegro A. Pitavastatina: una nueva alternativa en el tratamiento de la dislipemia. *Clinica e Investigación en Arteriosclerosis*. (2012), 24(1):30-39

17. Endo A, Kuroda M, Tsujita Y. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinium*. *J. Antibiot. (Tokyo)* (1976), 29:1346–1348.
18. Forstermann U and Li H. Therapeutic effect of enhancing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and preventing enos uncoupling. *Br J Pharmacol.* (2011), 164:213–23.
19. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature.* (1990), 343(6257):425-30.
20. Guan K and Hasenfuss G. Do stem cells in the heart truly differentiate into cardiomyocytes?. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* (2007), 43: 377–387.
21. Hisada T, Ayaori M, Ohruji N, Nakashima H, Nakaya K, Uto-Kondo H, Yakushiji E, Takiguchi S, Terao Y, Miyamoto Y, Adachi T, Nakamura H, Ohsuzu F, Ikewaki K, Sakurai Y. Statin inhibits hypoxia-induced endothelin-1 via accelerated degradation of HIF-1 α in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res.* (2012), 95(2):251-9.
22. Hori Y, Kikuchi A, Isomura M, Katayama M, Miura Y, Fujioka H, Kaibuchi K, Takai Y. Post-translational modifications of the C-terminal region of the rho protein are important for its interaction with membranes and the stimulatory and inhibitory GDP/GTP exchange proteins. *Oncogene.* (1991), 6: 515-522.
23. Illingworth DR, Tobert JA. HMG-CoA reductase inhibitors. *Adv. Protein Chem* 2001;56:77–114.
24. Iso H, Jacobs DR Jr, Wentworth D, Neaton JD, Cohen JD. Serum cholesterol levels and six-year mortality from stroke in 350,977 men screened for the multiple risk factor intervention trial. *N Engl J Med.* (1989), 320(14):904-10.
25. Istvan ES and Deisenhofer J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science.* (2001), 292:1160-4.

26. Istvan ES. Structural mechanism for statin inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Am Heart J.* (2002), 144(6 Suppl):S27-32.
27. Jasińska M, Owczarek J, Orszulak-Michalak D. Statins: a new insight into their mechanisms of action and consequent pleiotropic effects. *Pharmacological Reports.* (2007), 59: 483-499.
28. Jean D. Pleiotropic effects of pitavastatin. *British Journal of Clinical Pharmacology.* (2012) 73(4):518-35
29. Jialal I, Devaraj S, Singh U, Huet BA. Decreased number and impaired functionality of endothelial progenitor cells in subjects with metabolic syndrome: implications for increased cardiovascular risk. *Atherosclerosis.* (2010), 211:297–302.
30. Laemmli UK. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature.* (August 1970), 227 (5259): 680–685.
31. Laufs U and Liao JK. Isoprenoid Metabolism and the Pleiotropic Effects of Statins. *Curr Atheroscler Rep.* (2003), 5(5): 372-378.
32. Laufs U and Liao JK. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J. Biol. Chem* (1998), 273:24266–24271.
33. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* (1998), 97:1129–1135.
34. Lei J, Vodovotz Y, Tzeng E, Billiar TR. Nitric oxide, a protective molecule in the cardiovascular system. *Nitric Oxide.* (2013), 35:175-85.
35. Liao JK and Laufs U. Pleiotropic Effects of Statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* (2005), 45: 89–118.

36. Liu J, Sato C, Cerletti M, Wagers A. Notch signaling in the regulation of stem cell self-renewal and differentiation. *Current Topics in Developmental Biology* (2010), 92, 367–409.
37. Lowy DR and Willumsen BM. Protein modification: new clue to Ras lipid glue. *Nature*. (1989), 341: 384-385.
38. Makuc D, Fabris J, Časar Z, Plavec J. Conformational Analysis of Geometric Isomers of Pitavastatin Together with Their Lactonized Analogues. *Molecules*. (2013), 18:13283-13296.
39. McCarey DW, Sattar N, McInnes IB. Do the pleiotropic effects of statins in the vasculature predict a role in inflammatory diseases? *Arthritis Res Ther* (2005), 7:55-61.
40. Menter DG, Ramsauer VP, Harirforoosh S, Chakraborty K, Yang P, Hsi L, Newman RA, Krishnan K. Differential Effects of Pravastatin and Simvastatin on the Growth of Tumor Cells from Different Organ Sites. *PLoS ONE*. (2011), 6(12): e28813. doi:10.1371/journal.pone.0028813.
41. Nohria A, Grunert ME, Rikitake Y, Noma K, Prsic A, Ganz P, Liao JK, Creager MA. Rho kinase inhibition improves endothelial function in human subjects with coronary artery disease. *Circ. Res* (2006), 99:1426–1432.
42. Padfield GJ, Tura-Ceide O, Freyer E, Barclay GR, Turner M, Newby DE, Mills NL. Endothelial progenitor cells, atheroma burden and clinical outcome in patients with coronary artery disease. *Heart*. (2013), 99(11):791-8.
43. Paintlia AS, Paintlia MK, Singh AK, Singh I. Activation of PPAR- γ and PTEN Cascade Participates in Lovastatin-mediated Accelerated Differentiation of Oligodendrocyte Progenitor Cells. *Glia*. (2010); 58(14):1669–1685.

44. Panel NCEPE. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *Natl. Heart Lung Blood Inst. Natl. Inst. Health.* (2002), 02-5215:3143–3421.
45. Rikitake Y, Oyama N, Wang CY, Noma K, Satoh M, Kim HH, Liao JK. Decreased perivascular fibrosis but not cardiac hypertrophy in ROCK1^{+/-} haploinsufficient mice. *Circulation* (2005), 112:2959–2965.
46. Sefton BM. Labeling cultured cells with ³²Pi and preparing cell lysates for immunoprecipitation. (2005). Unit 18.2. F. M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl (eds.) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc.
47. Sirtori CR. The pharmacology of statins. *Pharmacol Res.* (2014), Mar 20. pii: S1043-6618(14)00025-5.
48. Sorrentino S, Landmesse U. Nonlipid lowering Effects of Statins Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine (2005); 7:459–466.
49. Suzuki G, Iyer V, Cimato T, Canty Jr, JM. Pravastatin improves function in hibernating myocardium by mobilizing CD133⁺ and cKit⁺ bone marrow progenitor cells and promoting myocytes to reenter the growth phase of the cardiac cell cycle. *Circulation Research.* (2009), 104:255–264, 210p following 264.
50. Takemoto M and Liao JK. Pleiotropic Effects of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (2001), 21:1712-1719.
51. Tanaka S, Fukumoto Y, Nochioka K, Minami T, Kudo S, Shiba N, Takai Y, Williams CL, Liao JK, Shimokawa H. Statins exert the pleiotropic effects through small GTP-binding protein dissociation stimulator upregulation with a resultant Rac1 degradation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (2013), 33(7):1591-600.

52. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology*. (1979), 24:145-9. 1979.
53. Umemura T and Higashi Y. Endothelial progenitor cells: therapeutic target for cardiovascular diseases. *Journal of Pharmacological Sciences*. (2008), 108:1–6.
54. Van Aelst L, D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev*. (1997), 11:2295–2322.
55. Vaughan CJ, Gotto AM. Update on Statins: 2003 *Journal of The American Heart Association* 110(7):886-92.
56. Villarroya F, Iglesias R, Giralt M. PPARs in the Control of Uncoupling Proteins Gene Expression *PPAR Research* (2006); 2007: 74364.
57. Wagers AJ and Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell*. (2004), 116, 639–648.
58. Xu H, Yang YJ, Yang T, Qian HY. Statins and stem cell modulation. *Ageing Res Rev*. (2013), 12(1):1-7.
59. Xu J, Liu X, Chen J, Zacharek A, Cui X, Savant-Bhonsale S, Liu Z, Chopp M. Simvastatin enhances bone marrow stromal cell differentiation into endothelial cells via notch signaling pathway. *American Journal of Physiology – Cell Physiology* (2009), 296:C535–C543.
60. Yano M, Matsumura T, Senokuchi T. Statins Activate Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Through Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase -Dependent Cyclooxygenase-2 Expression in Macrophages. *Journal of The American Heart Association*. (2007), 100: 1442-1451.