

# Efecto de la inhibición de la HMG-CoA reductasa sobre la proteína inductora de disfunción endotelial en conejos hipercolesterolémicos

Ana M. Jiménez, Inmaculada Millás, Jerónimo Farré, Antonio García-Méndez, Petra Jiménez, María M. Arriero, Elena García-Colis, Raimundo de Andrés, Juan Gómez, Santos Casado y Antonio López-Farré

Laboratorio de Investigación Cardiovascular e Hipertensión. Fundación Jiménez Díaz. Madrid. España.

**Introducción y objetivos.** Recientemente se ha demostrado en nuestro laboratorio que las células endoteliales en cultivo expresan proteínas citosólicas que forman complejos con el ARNm de la óxido nítrico sintasa endotelial (NOSe) en la región 3' que no codifica para proteína (3'-UTR). Esta unión fue asociada con la desestabilización del ARNm de dicha enzima. El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de estas proteínas citosólicas y el nivel de expresión de la proteína NOSe en la pared vascular de conejos hipercolesterolémicos como un modelo *in vivo* de disfunción endotelial.

**Métodos y resultados.** La relajación dependiente del endotelio a acetilcolina estuvo reducida en segmentos aórticos de conejos hipercolesterolémicos comparados con los conejos control. El tratamiento de los conejos hipercolesterolémicos con simvastatina (25 mg/kg peso/día) restauró la relajación dependiente del endotelio. La expresión de NOSe se encontró reducida en la pared vascular de los conejos hipercolesterolémicos, lo cual se acompañó de un aumento en la capacidad de unión de la proteína citosólica de 60 kDa y de una reducción en la estabilidad del ARNm de la NOSe. El tratamiento con simvastatina aumentó la expresión de NOSe y redujo la interacción de la proteína citosólica a la región 3'-UTR del ARNm de la NOSe.

**Conclusiones.** Estos resultados demuestran una relación entre la presencia de la proteína de 60 kDa y la abundancia de NOSe en la pared vascular y la funcionalidad endotelial.

**Palabras clave:** Endotelio. Óxido nítrico. ARNm. Hipercolesterolemia.

## Effect of HMG-CoA Reductase Inhibition on Endothelial Dysfunction-Inducing Protein in Hypercholesterolemic Rabbits

**Introduction and objectives.** In our laboratory, we recently obtained evidence that cultured bovine endothelial cells contain cytosolic proteins that form complexes with the 3'-untranslated region of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) mRNA and are associated with its destabilization. The aim of this study was to determine the presence of such proteins and the level of eNOS expression in hypercholesterolemic rabbits as an *in vivo* model of endothelial dysfunction.

**Methods and results.** Endothelium-dependent relaxation in response to acetylcholine was reduced in aortic segments from hypercholesterolemic rabbits compared with controls. Treatment of hypercholesterolemic rabbits with simvastatin (25 mg/kg body weight/day) restored endothelium-dependent relaxation. Aortic eNOS expression was reduced in hypercholesterolemic rabbits and was accompanied by enhanced binding activity of a 60-KDa cytosolic protein and reduced stability of eNOS mRNA. Simvastatin treatment upregulated eNOS expression and reduced the interaction of cytosolic protein with the 3'-untranslated region of eNOS mRNA.

**Conclusions.** These results demonstrate the presence of a 60-KDa protein that binds to eNOS mRNA and reduces eNOS expression in the vascular wall.

**Key words:** Endothelium. Nitric oxide. mRNA. Hypercholesterolemia.

Full English text available at: [www.revespcardiol.org](http://www.revespcardiol.org)

Este trabajo fue realizado mediante una beca de investigación de la Sociedad Española de Cardiología y una beca School grant de los laboratorios Merck Sharp & Dohme. P. Jiménez, A. García-Méndez, M.M. Arriero y E. García-Colis son becarios de la Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz.

Correspondencia: Dr. A. López-Farré.  
Laboratorio de Investigación Vascular e Hipertensión.  
Fundación Jiménez Díaz.  
Avda. de los Reyes Católicos, 2. 28040 Madrid. España.  
Correo electrónico: [alopez@fjd.es](mailto:alopez@fjd.es)

Recibido el 18 de abril de 2002.  
Aceptado para su publicación el 24 de junio de 2002.

## INTRODUCCIÓN

El óxido nítrico es un gas generado en las células endoteliales mediante la actividad enzimática de la óxido nítrico sintasa endotelial (NOSe)<sup>1,2</sup>. El NO generado por la actividad de la NOSe es responsable de la respuesta vasodilatadora dependiente del endotelio<sup>3</sup> la cual se ha demostrado que está reducida en modelos animales y en pacientes hipercolesterolémicos<sup>4,6</sup>.

## ABREVIATURAS

Ach: acetilcolina.  
ARN: ácido ribonucleico.  
ARNm: ácido ribonucleico mensajero.  
HMG-CoA: hidroximetilglutaril-coenzima A.  
LDL: lipoproteínas de baja densidad.  
kDa: kilodalton.  
NO: óxido nítrico.  
NOSe: óxido nítrico sintasa endotelial.  
NPS: nitroprusiato sódico.  
3'-UTR: región 3' que no traduce para proteína.

Aunque inicialmente la proteína NOSe fue definida como una enzima constitutiva, con posterioridad se demostró que tanto las citocinas como las LDL oxidadas pueden reducir la expresión de la NOSe mediante desestabilización de su ARNm<sup>7,8</sup>. Existen evidencias *in vitro* que demuestran que los inhibidores de la HMG-CoA reductasa protegen la expresión de la NOSe mediante la estabilización de su ARNm, incluso en condiciones en las que los valores de colesterol no se modifican, aunque el mecanismo por el cual estos fármacos protegen la expresión de NOSe no se ha descrito todavía<sup>9</sup>.

Uno de los mecanismos de control de la estabilidad de los ARNm ocurre mediante su interacción con proteínas citosólicas. Dentro de diferentes ARNm existen secuencias específicas a las cuales pueden unirse estas proteínas. Algunas de estas secuencias se han identificado dentro de la región 3' que no se traduce a proteína (3'-UTR) de los ARNm<sup>10,11</sup>. Nuestro laboratorio ha demostrado recientemente que células endoteliales bovinas en cultivo y neutrófilos aislados contienen proteínas citosólicas que forman complejos con la región 3'UTR del ARNm de la NOSe<sup>12,13</sup>. La interacción de estas proteínas con el ARNm de la NOSe se asocia con la desestabilización del ARNm de la enzima NOSe<sup>12</sup>. Por tanto, estas proteínas citosólicas podrían estar directamente involucradas en la génesis de la disfunción endotelial. Sin embargo, no existen estudios sobre los valores de estas proteínas citosólicas en una situación *in vivo* de disfunción endotelial.

El objetivo de este estudio fue determinar la expresión de la NOSe y la presencia de las proteínas citosólicas que se unen específicamente a la región 3' no codificante del ARN de la NOSe en la pared arterial de conejos hipercolesterolémicos. Como ya hemos comentado, las estatinas han demostrado que son eficaces para prevenir la disfunción endotelial durante la hipercolesterolemia y protegen la expresión de la NOSe en células endoteliales en cultivo<sup>9</sup>. Por tanto, en

la segunda parte de este estudio se analizó el efecto del tratamiento con simvastatina, un nuevo inhibidor de la actividad de la HMG-CoA reductasa<sup>14,15</sup>, sobre estos parámetros.

## MATERIALES Y MÉTODO

### Protocolo experimental

El protocolo de experimentación fue aprobado por el Comité Ético Institucional de Experimentación Animal. Los experimentos se realizaron en conejos blancos New Zealand, con un peso de  $2,5 \pm 0,3$  kg. Los conejos fueron alojados individualmente a  $20 \pm 3$  °C con ciclos de luz y de oscuridad de 12 h cada uno. Un grupo de 15 conejos fue alimentado con dieta estándar para su especie durante 6 semanas (grupo control normocolesterolémico). Otro grupo de 15 conejos fue alimentado con dieta estándar durante 3 semanas, seguido de otras 3 semanas más con la dieta estándar suplementada con simvastatina (25 mg/kg peso corporal/día) (C + Simv). Un grupo de 45 conejos fue alimentado con dieta estándar para conejos enriquecida con colesterol, que contenía un 0,5% de colesterol y un 6% de aceite de coco, durante 3 semanas (Epinay's, Francia). Tras ese tiempo, los conejos hipercolesterolémicos fueron divididos al azar en 3 grupos experimentales de 15 conejos cada uno. Uno de estos grupos fue alimentado con una dieta estándar para conejos enriquecida con colesterol durante 3 semanas (HC). Otro grupo fue alimentado con dieta estándar enriquecida con colesterol más simvastatina (25 mg/kg peso corporal/día), que fue administrado junto con la dieta durante las últimas 3 semanas (H + Simv). El último grupo de 15 conejos, tras 3 semanas de dieta enriquecida con colesterol, se sometió a una regresión dietética, es decir, una dieta estándar durante otras 3 semanas (Reg). La dieta fue restringida a 120 g/día. Después de las 6 semanas, los animales fueron anestesiados con pentobarbital (30 mg/kg), aislándose la aorta torácica.

### Estudios de vasodilatación

Los segmentos de aorta torácica fueron divididos en 3 porciones, una de las cuales fue inmediatamente congelada en nitrógeno líquido para las determinaciones de biología molecular. Las otras dos porciones de aorta torácica fueron suspendidas en un baño de órganos gaseado con un 5% O<sub>2</sub> y un 95% de CO<sub>2</sub>, que contenía una solución de Krebs-Henseleit (en mol/l: NaCl 115; KCl 4,6; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2; CaCl<sub>2</sub> 2,5; NaHCO<sub>3</sub>; glucosa 11,1, y EDTA 0,02, pH 7,4, como se ha descrito anteriormente<sup>16</sup>.

Los segmentos aórticos fueron conectados a un transductor de fuerza isométrica acoplado a un ordenador (Power Lab 400, AD Instruments, Casterhill, NSW, Australia). Los segmentos fueron tensados a una fuer-

za de resistencia de 2 g y equilibrados durante 1 h. La relajación dependiente del endotelio se determinó mediante la adición de dosis crecientes de acetilcolina (ACh) de  $10^{-9}$  a  $10^{-4}$  mmol/l y la relajación independiente del endotelio se determinó mediante la adición de dosis crecientes de nitroprusiato sódico (NPS) de  $10^{-9}$  a  $10^{-5}$  mmol/l. Previamente, las aortas se contrajeron con fenilefrina ( $10^{-5}$  mmol/l)<sup>15</sup>. Las curvas dosis-respuesta fueron calculadas de forma acumulativa. Todos los experimentos se llevaron a cabo en presencia de indometacina ( $10^{-5}$  mol/l), impidiendo así los posibles efectos mediados por la activación de la ciclooxigenasa.

### Determinación de la expresión de proteína NOSe

Los niveles de expresión de la proteína NOSe fueron analizados por Western blot, como se describe previamente<sup>17</sup>. Las aortas congeladas fueron homogeneizadas y solubilizadas en tampón de Laemmli, que contiene 2-mercaptoetanol. Las proteínas fueron separadas en un gel desnaturante de SDS/10% poliacrilamida<sup>18</sup>. El análisis por Western blot se desarrolló utilizando un anticuerpo monoclonal contra la proteína NOSe (Transducción Laboratories, Lexington, KE) en concentración de (1:2.500). La proteína NOSe fue detectada mediante luminiscencia (ECL, Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido) y evaluada por densitometría (Molecular Dynamics, Sunnyvale, California). Para la determinación del peso molecular se utilizaron marcadores preteñidos (Sigma Chemicals, St Louis, MO). Como control de carga se incubaron las membranas con un anticuerpo frente a la betaactina (Calbiochem, Alemania).

### Sondas de la región 3' NO codificante

Oligonucleótidos complementarios del cADN de la NOSe bovina (Genbank accession number BT-NIOXSY) fueron obtenidos de Bio-synthesis Inc. (Lewisville, Texas), como se ha descrito con anterioridad<sup>12</sup>. Se utilizó el oligonucleótido 1 (5'-GGATCTA-GAACGCTAT CACGAGGACATT-3') y el oligonucleótido 2 (5'-AGGAAGCTTAGTAGGTCTCC TAACTTCTG-3') para obtener la sonda pNOS-UTR-L. Esta sonda cubre una región de 166 bases de la región codificante del ARNm de la NOSe y 393 bases de la región 3'-UTR (desde el nucleótido 3485 al 4012). Los productos amplificados por PCR obtenidos a partir del uso de estos dos oligonucleótidos como primers fueron purificados mediante electroforesis en agarosa y digeridos con Xba I y Hind III para después ligarlos a pGEM4Z (Promega, Madison, Wis).

Para producir ARN de una sola cadena, los plásmidos fueron linealizados con las correspondientes enzimas de restricción y transcritos con T7 ARN polimerasa.

El ARN se marcó radiactivamente con <sup>32</sup>P-CTP (Amersham Iberica, Madrid;  $10^9$  cpm/ $\mu$ g) de acuerdo con las especificaciones del equipo utilizado (Promega Biotech, Madison; WI).

### Análisis por Northern blot

Para determinar el grado de estabilidad del ARNm de la NOSe, los segmentos aórticos obtenidos de los distintos grupos de conejos fueron incubados *ex vivo* durante diferentes períodos en medio RPMI en presencia de actinomicina D (10  $\mu$ g/ml), un inhibidor de la transcripción, durante 1 h. Transcurrido ese tiempo se lavaron con medio RPMI nuevo y se incubaron en este mismo medio durante diferentes períodos. El ARN total fue aislado según el método de Chomazyski y Sachi<sup>19</sup>. El análisis del Northern blot se realizó usando como ADN complementario la sonda UTR-L-ARN marcada radiactivamente ( $5 \pm 10^5$  cpm/ml)<sup>12</sup>. Como control de carga del gel se utilizó la tinción con bromuro de etidio para determinar los ARN de 28S y de 18S.

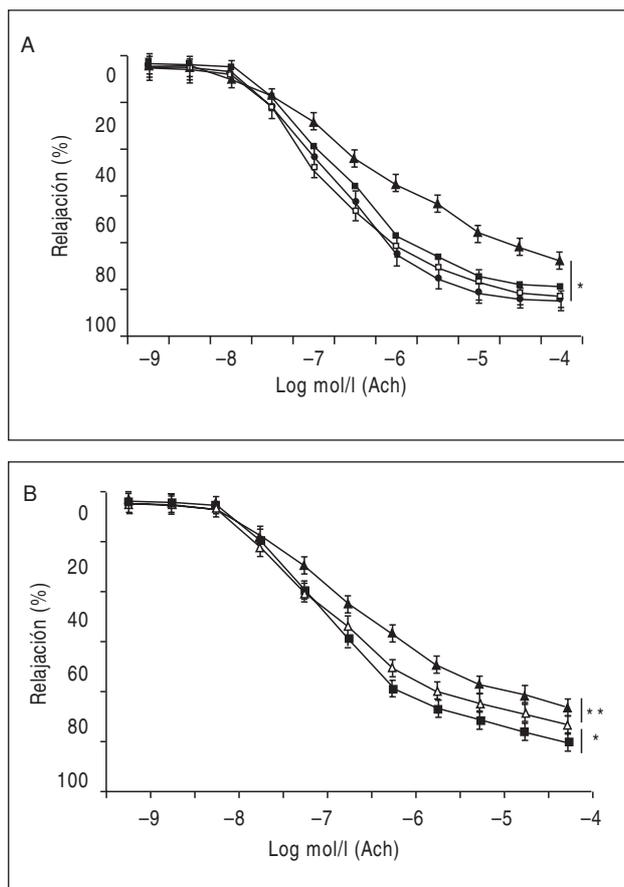
### Ensayo de movilidad electroforética

Se prepararon extractos citoplasmáticos de las diferentes aortas. Para ello, las aortas fueron homogeneizadas y resuspendidas en solución hipotónica (25 mol/l Tris-HCl [pH 7,9], 0,5 mmol/l EDTA, y 1 mmol/l PMSF) y sometidas posteriormente a cuatro ciclos de calor y frío seguidos por centrifugación a 12.000 g  $4^\circ\text{C}$  durante 15 min. Los sobrenadantes fueron recogidos y congelados a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su utilización.

Como se describe<sup>12</sup>, los lisados citoplasmáticos (10  $\mu$ g) fueron incubados con  $5-10 \times 10^4$  cpm de radiactividad de la sonda UTR-L en 15 mmol/l HEPES (pH 7,9), 10 mmol/l KCl, 5 mmol/l  $\text{Cl}_2\text{Mg}$ , 1 mmol/l DTT, 1  $\mu$ g/ml levadura ARNt, 40 unidades de ARN-sin (Promega Biotech, Madison; WI) y 10% de glicerol en un volumen total de 15  $\mu$ l durante 10 min a  $25^\circ\text{C}$ . A continuación se añadieron 20 unidades de ARN-asa T1 (Gibco-BRL, Dieselstrasse, Alemania) y esta mezcla de reacción fue incubada durante 30 min a  $37^\circ\text{C}$ . Las muestras fueron sometidas a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 4% en  $0,25 \times$  TBE (Tris-Borate-EDTA). El gel fue secado y revelado con películas Kodak X-OMAT-S.

### Ensayo de unión proteína-ARN (*cross-linking*)

De los diferentes grupos en estudios se incubaron 10  $\mu$ g de los lisados citoplasmáticos obtenidos de segmentos aórticos que fueron incubados con  $10^5$  cpm de ARN en el tampón anteriormente descrito en un volumen total de 20  $\mu$ l durante 10 min a  $25^\circ\text{C}$ . Las muestras se irradiaron con luz ultravioleta en hielo en un Stratlinker (Stratagene LTD, Cambridge, Reino



**Fig. 1.** A: respuesta vasodilatadora a acetilcolina (Ach) en conejos sometidos a una dieta estándar (control, círculo cerrado), conejos con una dieta rica en colesterol (triángulo cerrado), conejos con una dieta rica en colesterol tratados con simvastatina (cuadrado cerrado) y conejos alimentados con una dieta estándar tratados con simvastatina (cuadrado abierto). B: respuesta a Ach en conejos control (círculo cerrado), conejos sometidos a la regresión dietética (triángulo abierto) e hipercolesterolemicos tratados con simvastatina (cuadrado cerrado). Los resultados se expresan como porcentaje de relajación con respecto a la contracción con fenilefrina ( $10^{-5}$  mol/l). \* $p < 0,05$  con respecto a los segmentos obtenidos de conejos controles; \*\* $p < 0,05$  con respecto a los segmentos obtenidos de los conejos hipercolesterolemicos.

Unido) durante 20 min. A continuación se realizó una digestión por ARN-asa (20  $\mu$ g de ARN-asa A y 20 unidades de ARN-asa T1 durante 30 min) a 37 °C. Las muestras se calentaron durante 10 min a 70 °C en tampón de Laemmli sin 2-mercaptoetanol y fueron sometidas a electroforesis en un gel desnaturizante de SDS-PAGE. Los gels fueron expuestos durante 3-5 días en películas Kodak con dos intensificadores.

### Métodos estadísticos

Los resultados son expresados como medida  $\pm$  EEM. A menos que se especifique, cada uno de estos estudios se realizó con un mínimo de 10 conejos. La comparación se hizo utilizando el test ANOVA o la

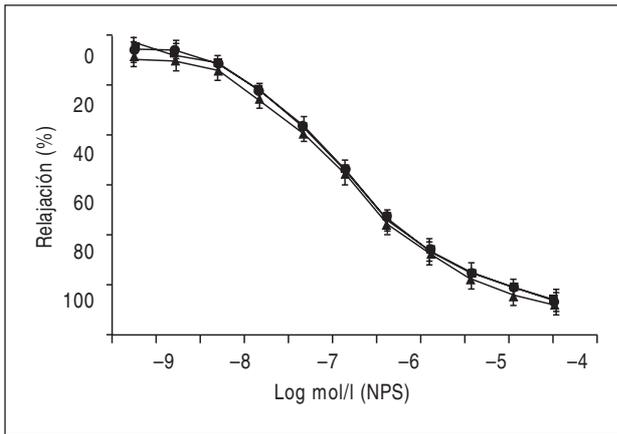
prueba de la t de Student para datos apareados o no apareados, según fuera apropiado. La corrección por Bonferroni por comparación múltiple fue usada para determinar los niveles de significación de los valores de p. Se consideró significativa una  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### Estudios de vasodilatación

La Ach produjo una relajación dependiente de la dosis en los segmentos de aorta precontraídos con fenilefrina obtenidos de conejos alimentados con una dieta estándar (grupo control) (fig. 1). Las relajaciones dependientes de acetilcolina fueron significativamente reducidas en segmentos de aorta de conejos alimentados con una dieta rica en colesterol (fig. 1). Así, la EC<sub>50</sub> para los segmentos de conejos controles fue de  $2 \times 10^{-7}$  mol/l y la de los conejos alimentados con una dieta rica en colesterol fue de  $0,9 \times 10^{-6}$  mol/l ( $p < 0,05$ ). Además, se obtuvo una mayor respuesta a la Ach en los segmentos de aorta obtenidos de conejos control que en los conejos alimentados con una dieta rica en colesterol (fig. 1). El tratamiento con simvastatina de los conejos alimentados con una dieta rica en colesterol normalizó la relajación inducida por acetilcolina (fig. 1). El tratamiento con simvastatina de conejos alimentados con la dieta estándar no modificó la respuesta vasodilatadora a Ach (EC<sub>50</sub>  $10^{-7}$  mol/l) con respecto a los conejos control. No se observaron diferencias significativas en la respuesta vasorrelajadora independiente del endotelio al NPS entre los segmentos aórticos obtenidos de conejos control y los alimentados con colesterol tratados con simvastatina (fig. 2).

Las concentraciones de colesterol en el plasma en los animales alimentados con colesterol fueron mayores que en los conejos control (control,  $37 \pm 3$  mg/dl; alimentados con colesterol,  $905 \pm 28$  mg/dl;  $p < 0,05$ ). El tratamiento con simvastatina redujo los valores de colesterol plasmático, aunque permanecieron significativamente más elevados que en conejos control ( $570 \pm 20$  mg/dl;  $p < 0,05$ ). Posteriormente se analizó la importancia de los cambios del colesterol observados con el tratamiento con simvastatina sobre la relajación dependiente del endotelio. Para ello, un grupo de conejos fueron alimentados con la dieta hipercolesterolemia durante 3 semanas, seguida de 3 semanas en las que volvieron a recibir la dieta normocolesterolemica. Las concentraciones de colesterol en el plasma en estos conejos fueron significativamente reducidas en comparación con los conejos alimentados con colesterol durante 6 semanas ( $600 \pm 23$  mg/dl;  $p < 0,05$ ). Este efecto se acompañó de una mejora en la relajación dependiente del endotelio en respuesta a la Ach, aunque esta mejora fue menor que la observada en los conejos tratados con simvastatina (fig. 1).



**Fig. 2.** La gráfica representa la respuesta vasodilatadora a nitroprusiato (NPS) en conejos sometidos a una dieta estándar (control, círculo cerrado), conejos con una dieta rica en colesterol (triángulo cerrado), conejos con una dieta rica en colesterol tratados con simvastatina (cuadrado cerrado) y conejos alimentados con una dieta estándar tratados con simvastatina (cuadrado abierto). Los resultados se expresan como porcentaje de relajación con respecto a la contracción con fenilefrina ( $10^{-5}$  mol/l).

### Expresión de NOSe en la pared vascular

En segmentos aórticos de conejos alimentados con colesterol se observó una reducción significativa de la expresión de proteína NOSe con respecto a la encontrada en los animales control y en los controles tratados con simvastatina (fig. 3). El tratamiento con simvastatina protegió la expresión de NOSe en la pared vascular (fig. 3).

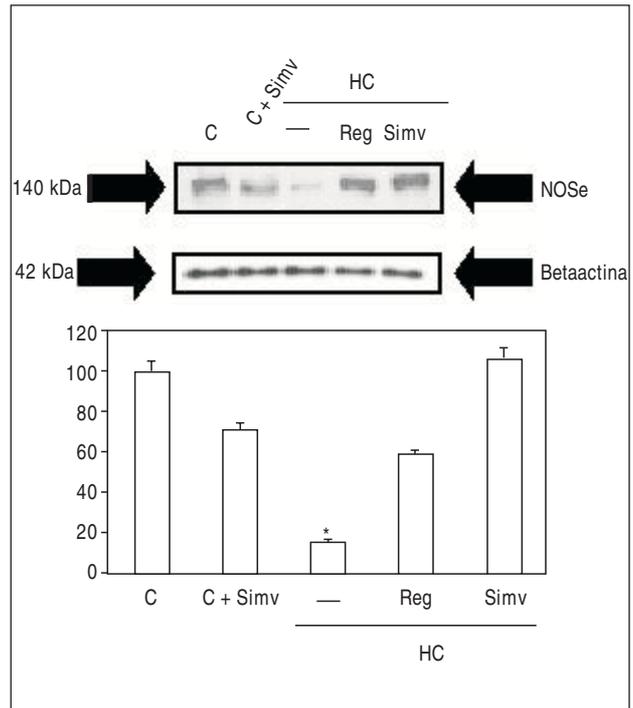
La expresión de NOSe fue también mejorada en los conejos sometidos a regresión de la dieta, aunque ésta fue significativamente menor ( $p < 0,05$ ) que en los conejos hipercolesterolémicos y tratados con simvastatina (fig. 3).

### Estabilidad de ARNm de NOSe *ex vivo*

Con el objetivo de determinar la vida media del ARNm de la NOSe se midieron los valores de ARNm de NOSe en segmentos de aorta incubados *ex vivo* en presencia de actinomicina D.

La vida media del ARNm de la NOSe en la pared vascular de conejos alimentados con una dieta estándar fue mayor que la de los conejos alimentados con dieta rica en colesterol (fig. 4). El tratamiento con simvastatina prolongó la vida media del ARNm de la NOSe en los conejos alimentados con colesterol (fig. 4).

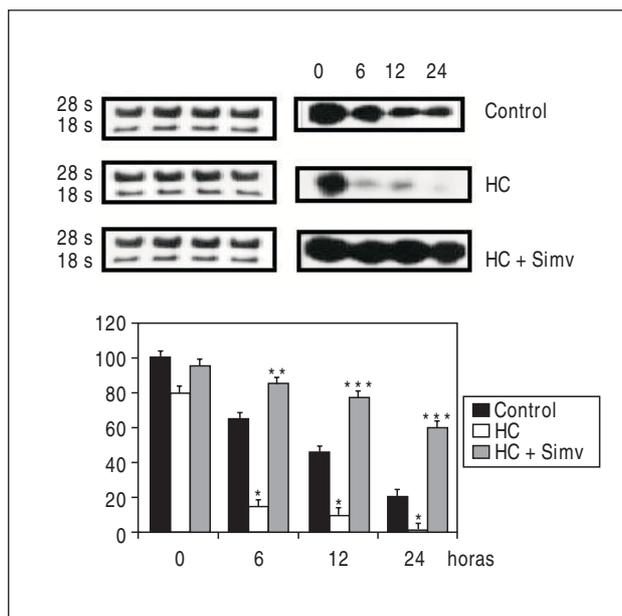
Es interesante mencionar que los valores basales de ARNm de NOSe fueron mayores en la pared de los conejos controles que de los conejos alimentados con dieta rica en colesterol (fig. 4).



**Fig. 3.** Expresión de la proteína NOSe mediante Western blot en segmentos aórticos de conejos con una dieta estándar (C), conejos alimentados con una dieta estándar tratados con simvastatina (C + Simv), conejos sometidos a una dieta rica en colesterol (HC), conejos con una dieta rica en colesterol tratados con simvastatina (Simv) y conejos sometidos a regresión en una dieta normocolesterolémica (Reg). La gráfica de barras presenta la medida densitométrica del Western blot corregida por la expresión de betaactina como control de carga. Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM de 12 conejos diferentes por cada grupo experimental. \*  $p < 0,05$  con respecto a los conejos control.

### Presencia de proteínas citosólicas que se unen a la región 3' no codificante del ARNm de la NOSe

La adición de extractos citoplasmáticos de aorta obtenidos de conejos control a la sonda marcada radiactivamente conteniendo el extremo 3'-UTR del ARNm de la NOSe, sonda UTR-L, resultó en la aparición de una banda retardada, la cual también apareció en los extractos citosólicos de las aortas de los conejos control tratados con simvastatina (fig. 5). El complejo de unión de la sonda entre UTR-L y las proteínas citosólicas de aorta se incrementó cuando los extractos citosólicos de aorta fueron obtenidos de conejos hipercolesterolémicos (fig. 5). El tratamiento con simvastatina redujo significativamente la interacción de las proteínas citosólicas a la sonda UTR-L marcado radiactivamente. De igual forma, los conejos control tratados con simvastatina redujeron la unión con respecto a los controles. La actividad de unión de los extractos citosólicos al UTR-L también fue reducida en los conejos con regresión a una dieta estándar, aunque continuó siendo mayor que la observada en los conejos tratados con simvastatina ( $p < 0,05$ ) (fig. 5).

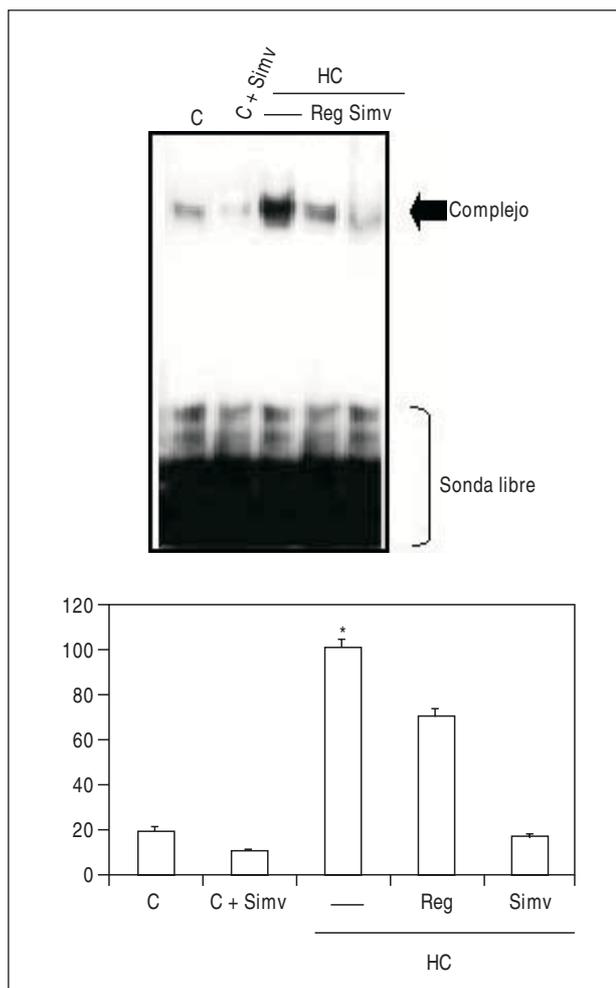


**Fig. 4.** Análisis por Northern blot de la expresión del ARNm de la NOSe en muestras aórticas de conejos controles, conejos con dieta rica en colesterol (HC) y de conejos con dieta rica en colesterol tratados con simvastatina (HC + Simv), incubados *ex vivo* en presencia del inhibidor de la transcripción actinomomicina D (10 µg/ml). Se confirmó la igualdad de carga del ARN con bromuro de etidio determinando los ARN de 28 s y 18 s. Los resultados se expresan como media ± EEM. \*p < 0,05 respecto al control; \*\*p < 0,05 respecto a los HC.

El tratamiento de los extractos citosólicos de aorta con proteinasa K (87 µg/ml) previamente a su incubación con la sonda UTR-L impidió la formación del complejo, lo que indicó la participación de proteínas en la interacción de estos extractos citosólicos con la región 3'-UTR del ARNm de NOSe.

#### Identificación de la proteína citosólica que se une a la región 3' no codificante del ARNm de la NOSe

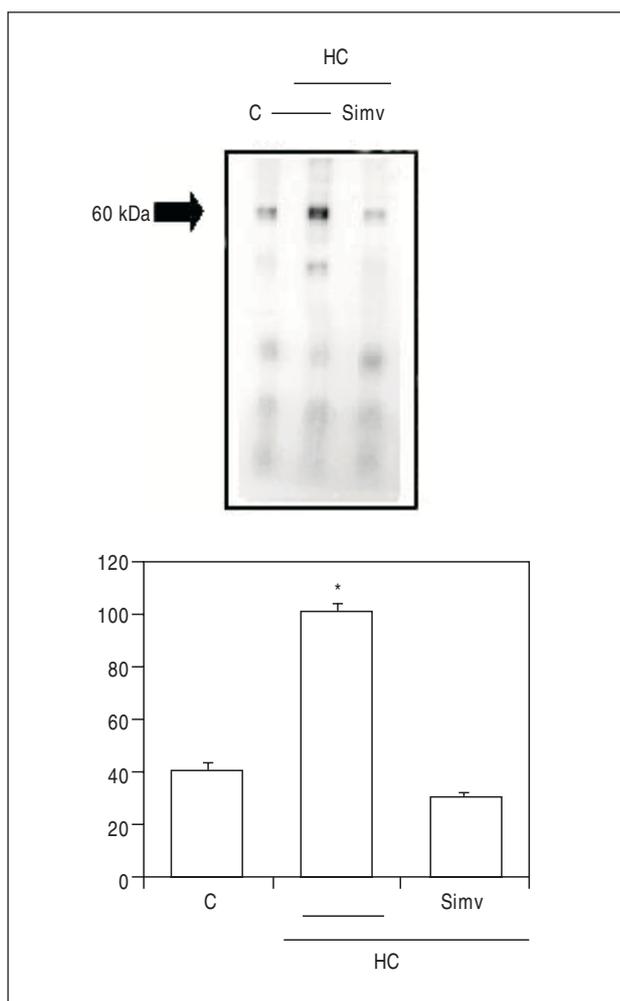
La identificación de las proteínas citosólicas implicadas en la unión con el extremo 3'-UTR del ARNm de la NOSe se llevó a cabo fijando previamente la unión de las proteínas citosólicas al ARNm mediante luz ultravioleta, apareciendo una banda específica con un peso molecular aparente de 60 kDa cuando se incubaron con extractos citosólicos de aorta con la sonda UTR-L. La intensidad de la banda de 60 kDa fue mayor en los extractos citosólicos obtenidos de los segmentos aórticos de conejos alimentados con una dieta rica en colesterol (fig. 6). El tratamiento con simvastatina de los conejos hipercolesterolémicos redujo el nivel de unión de la proteína citoplasmática de 60 kDa (fig. 6). Estos resultados indican que las aortas de conejo expresan la proteína EDIP.



**Fig. 5.** Ensayo en gel de retardo con el que analizamos la presencia de proteínas citosólicas que se unen a la región 3'-UTR del ARNm de la NOSe en segmentos aórticos de conejos control (C), conejos alimentados con dieta estándar tratados con simvastatina (C + Simv), conejos con una dieta rica en colesterol (HC), conejos con una dieta rica en colesterol tratados con simvastatina (Simv) y conejos sometidos a dieta hipercolesterolémica seguida de dieta normocolesterolémica, dieta regresiva (Reg). En la gráfica de barras se observa la densitometría del gel de retardo. Los resultados se expresan como la media ± EEM de los segmentos de 12 conejos diferentes para grupo experimental. \*p < 0,05 con respecto a los conejos control.

## DISCUSIÓN

Este trabajo demuestra la existencia de un nuevo mecanismo implicado en la disfunción del sistema del NO en conejos hipercolesterolémicos. Estos animales presentan una disfunción en la respuesta vasodilatadora dependiente del endotelio, la cual está asociada a una expresión menor de la proteína NOSe en el endotelio. Por otra parte, extractos citosólicos de la pared vascular contienen proteínas, particularmente una proteína citosólica con un peso molecular aparente de 60 kDa, que interaccionan con la región 3'-UTR del ARNm de la NOSe. La reducción en la actividad de unión de la proteína citosólica de 60-kDa fue asociada con una mayor estabilidad del



**Fig. 6.** Identificación de la proteína citosólica que se une a la región 3'-UTR del ARNm de la NOSe mediante unión por UV y electroforesis en SDS-PAGE. El ensayo de unión se realizó con UTR-L de ARN y extractos citosólicos de aorta obtenidos de conejos controles, de conejos hipercolesterolémicos y de conejos hipercolesterolémicos tratados con simvastatina. La gráfica de barras representa el valor densitométrico de las bandas. Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM de 6 conejos distintos por grupo experimental. \* $p < 0,05$  con respecto a los conejos control.

ARNm de NOSe y una mayor expresión de la proteína NOSe, además de una mejora en la respuesta vasodilatadora dependiente del endotelio.

### Regulación del ARNm de la NOSe por EDIP

Los valores de NOSe en células endoteliales en cultivo pueden ser regulados por citocinas y LDL oxidadas, mediante la desestabilización del ARNm de la NOSe<sup>7,8,12</sup>. En un trabajo previo hemos demostrado que en el citosol de células endoteliales bovinas en cultivo existen proteínas que interactúan con la región 3' no codificante del ARNm de NOSe y están asociadas con una reducción de la estabilidad del ARNm de NOSe<sup>12</sup>. En este estudio hemos demostrado

que en una situación *in vitro* de disfunción endotelial también aparecen estas proteínas citosólicas. El incremento en la actividad de unión de estas proteínas citosólicas fue inversamente proporcional al valor de proteína NOSe, la estabilidad del ARNm de NOSe *ex vivo* y la respuesta vasodilatadora dependiente del endotelio.

Los estudios de unión del complejo proteína-ARN demostraron que la proteína citosólica tenía un peso molecular aparente de 60 kDa. Este peso molecular está dentro del rango observado en otras proteínas citosólicas que se unen a la región 3'-UTR de otros ARNm, como ocurre con el receptor de la transferrina<sup>20</sup>. Hemos denominado a la proteína citosólica de 60 kDa como proteína inductora de disfunción endotelial (en inglés EDIP).

La mejora en la funcionalidad endotelial observada en los conejos tratados con simvastatina se acompañó de una reducción en la actividad de unión de las proteínas citosólicas de la pared vascular al ARNm de la NOSe; es decir, una disminución en el valor de la proteína citosólica de 60 kDa, un incremento en la estabilidad del ARNm de la NOSe *ex vivo* y un marcado incremento de la expresión de la proteína NOSe en la pared vascular. Estos resultados sugieren una asociación entre la actividad de unión de la proteína citosólica EDIP y el nivel de expresión de la proteína NOSe.

### Papel del colesterol en los efectos de la simvastatina

La simvastatina mejoró completamente estos parámetros, aunque las concentraciones de colesterol en el suero permanecieron elevadas con respecto a los conejos control hipercolesterolémicos. En este sentido, en los conejos sometidos a una regresión de la dieta también se observó una reducción equivalente de colesterol a la de los que recibieron simvastatina. Sin embargo, la mejora en la funcionalidad endotelial, la protección en la expresión de NOSe y el nivel de interacción de los extractos citosólicos al ARNm de la NOSe mejoraron más tras el tratamiento con el inhibidor de la HMG-CoA reductasa. En conjunto, estos resultados sugieren un efecto de la simvastatina más allá de su acción hipocolesterolémica. En este sentido, se ha demostrado recientemente que la mejora de la función endotelial por tratamiento con simvastatina no se correlacionó con la disminución en el colesterol<sup>11</sup>. Además, un estudio *in vitro* de nuestro grupo ha demostrado que la simvastatina previene *in vitro* la expresión de la NOSe y la presencia de la proteína EDIP en células endoteliales bovinas estimuladas con factor de necrosis tumoral alfa en condiciones en las que el colesterol no se modificó<sup>21</sup>.

Por tanto, esto significaría la existencia de un componente dependiente del colesterol y de uno indepen-

diente en la protección de la expresión de la NOSe por simvastatina en la pared vascular.

### Relación de la proteína EDIP con estos mecanismos de protección de las estatinas

Los resultados de este trabajo no descartan la existencia de otros factores que podrían estar involucrados en la inducción de la disfunción del endotelio. En este sentido, recientemente se ha implicado a las proteínas Rho en el efecto protector de las estatinas sobre la funcionalidad endotelial<sup>22</sup>. Esto se debe a que las proteínas Rho tienen un papel importante en la regulación del tráfico de proteínas mediante el citoesqueleto celular, por lo que podría estar involucrado el factor Rho en la colocación de la proteína EDIP con el mensajero de la NOSe. En esta misma línea, las estatinas han demostrado proteger la biodisponibilidad del NO inhibiendo la formación de radicales libres por la pared vascular<sup>23</sup>.

No obstante, no sabemos si este u otros mecanismos están involucrados en la regulación de la presencia o actividad de la proteína EDIP. Esto garantiza la realización de futuros estudios.

En resumen, este trabajo demuestra por primera vez la existencia de la proteína EDIP en una situación *in vivo* de disfunción endotelial; esta proteína EDIP de 60 kDa que sería la responsable de la desestabilización del ARNm de la NOSe y, por ello, de la disfunción endotelial asociada a la hipercolesterolemia. Esta proteína EDIP podría ser una diana terapéutica para proteger la funcionalidad del endotelio.

### AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen a Begoña Larrea su labor como secretaria.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Moncada S, Higgs A. The L-arginine nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993;329:2002-12.
2. Sessa WC. The nitric oxide synthase family of proteins. *J Vasc Res* 1994;31:131-43.
3. Busse R, Mulsch A, Fleming I, Hecker M. Mechanisms of nitric release from the vascular endothelium. *Circulation* 1993;87:18-25.
4. Zeiher AM, Drexler H, Saurbier B, Just H. Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans: effects of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia and hypertension. *J Clin Invest* 1993;92:652-62.
5. Chappell SP, Lewis MJ, Henderson AH. Effect of lipid feeding on endothelium-dependent relaxation in rabbit aortic preparations. *Cardiovasc Res* 1987;21:34-8.
6. Osborne JA, Siegman MJ, Sedar AW, Mooers SU, Lefer AM. Lack of endothelium-dependent relaxation in coronary resistance arteries of cholesterol-feed-rabbits. *Am J Physiol* 1989;256:C591-C7.
7. Yoshizumi M, Perella MA, Burnett JC, Lee ME. Tumor necrosis factor downregulates and endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Circ Res* 1993;73:205-9.
8. Liao JK, Shin WS, Lee WY, Clark SL. Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1995;270:319-24.
9. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 1998;97:1129-35.
10. Jackson RJ. Cytoplasmic regulation of mRNA function: the importance of the 3'-untranslated region. *Cell* 1993;74:9-14.
11. Zhon B, Malter JS. Regulation of mRNA stability and its relevance to disease. *Lab Invest* 1991;65:610-21.
12. Alonso J, Sánchez de Miguel L, Montón M, Casado S, López-Farré A. Endothelial cytosolic proteins bind to the 3'-untranslated region of endothelial nitric oxide synthase mRNA: regulation by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Mol Cell Biol* 1997;17:5719-26.
13. De Frutos T, de Miguel L, García Durán M, González-Fernández F, Rodríguez-Feo JA, Montón M, et al. Expression of an endothelial-type nitric oxide synthase isoform in human neutrophils: modification by tumor necrosis factor- $\alpha$  during acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:800-7.
14. Treasure CB, Klein JL, Weintraub WS, Talley JD, Stillabower ME, Kosinski AS, et al. Beneficial effects of cholesterol-lowering therapy on the coronary endothelium in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 1995;332:481-7.
15. Anderson TJ, Meredith IT, Yeung AC, Frei B, Selwyn AP, Ganz P. The effect of cholesterol-lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasomotion. *N Engl J Med* 1995;332:483-8.
16. Gallego MJ, García-Villalón S, López-Farré A, García JL, Garrón MP, Gómez B, et al. Mechanisms of the endothelial toxicity of cyclosporine A (CyA). *Circ Res* 1994;74:477-84.
17. De Frutos T, Sánchez de Miguel L, García-Durán M, González-Fernández F, Rodríguez-Feo JA, Montón M, et al. Nitric oxide generated by smooth muscle cells decreases nitric synthase expression in cocultured endothelial cells: involvement of TNF- $\alpha$ . *Am J Physiol* 1999;277:H1317-H25.
18. Cernadas MR, Sánchez de Miguel L, García-Durán M, González-Fernández F, Millás I, Montón M, et al. Expression of constitutive and inducible nitric oxide synthases in the vascular wall of young and aging rats. *Circ Res* 1998;83:279-86.
19. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-9.
20. Müllner EW, Kühn LC. A stem-loop in the 3'-untranslated region mediates iron-dependent regulation of transferrin receptor mRNA stability. *Cell* 1989;53:815-25.
21. González-Fernández F, Jiménez A, López-Blaya A, Velasco S, Arriero M, Celdrán A, et al. Cerivastatin prevents tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced downregulation of endothelial nitric oxide synthase: role of endothelial cytosolic proteins. *Atherosclerosis* 2001;155:61-70.
22. Laufs U, Liao JK. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem* 1998;273:24266-71.
23. Stokes KY, Clanton EC, Rwsell JM, Ross CR, Granger DN. NAD(P) H oxidase-derived superoxide mediates hypercholesterolemia-induced leukocyte-endothelial adhesion. *Circ Res* 2001;88:499-505.