

## *Disfunción endotelial en la aterosclerosis: papel protector de las estatinas*

**O. Hernández-Perera y S. Lamas**

Centro de Investigaciones Biológicas. Instituto Reina Sofía de Investigaciones Nefrológicas (IRSIN). Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid.

### RESUMEN

*La aterosclerosis es un trastorno crónico de la pared del vaso caracterizado por la acumulación de macrófagos, la proliferación de células musculares lisas y la elaboración de matriz extracelular en la íntima. Se ha observado que una función deficiente de la vía L-arginina-óxido nítrico (NO)-GMPc o bien un exceso de endotelina-1 (ET-1) es responsable, al menos en parte, de la disfunción endotelial asociada a la arteriosclerosis. Esta disfunción del endotelio constituye una de las primeras etapas del desarrollo de la aterosclerosis. En los últimos años se han empleado con éxito los inhibidores del enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa (estatinas) en el tratamiento de las dislipemias y la aterosclerosis. Estos fármacos reducen los niveles de colesterol a través de la inhibición de la síntesis de mevalonato, el precursor de los esteroides en la célula. Estudios clínicos recientes han sugerido la idea de que, además de su papel como agentes hipocolesterolemiantes, las estatinas pueden mejorar la función endotelial por mecanismos adicionales. Basándonos en estas observaciones, hemos estudiado el efecto potencial de las estatinas sobre la expresión de los factores vasoactivos ET-1 y NO en células endoteliales de aorta bovina (CEAB). Nuestros resultados demuestran que la Atorvastatina y la Simvastatina reducen significativamente la síntesis de ET-1 y la expresión de su precursor, la pre-proET-1. Asimismo, el efecto inhibitor de la expresión del RNAm de la pre-proET-1 persiste en la presencia de concentraciones proaterogénicas de lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDLox). Aunque estos fármacos por sí mismos no modifican significativamente la expresión de la NO sintasa endotelial, son capaces de reducir claramente la inhibición de la expresión provocada por las LDLox en CEAB. Por lo tanto, las estatinas podrían modular el tono vascular a través de la modificación de la expresión de factores endoteliales vasoactivos.*

**Palabras clave:** *Estatinas, endotelina, óxido nítrico, HMG-CoA reductasa, endotelio.*

## ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN ATHEROSCLEROSIS: PROTECTIVE ROLE OF STATINS

### SUMMARY

*Atherosclerosis is a chronic disease of the vascular wall characterized by macrophage accumulation, vascular smooth muscle cell proliferation and extracellular matrix intimal formation. A deficient function in the L-arginine-nitric oxide (NO)-cGMP pathway or an excess of endothelin-1 (ET-1) have been related with the endothelial dysfunction associated to arteriosclerosis. This derangement is one of the first steps in the atherogenic process. Inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase (statins) have been successfully employed in the treatment of dyslipidemia and atherosclerosis. These drugs reduce cholesterol levels by inhibiting mevalonate synthesis, a precursor step in the sterol biosynthetic pathway. Recent clinical studies have reported that, aside from their cholesterol lowering action, statins may ameliorate endothelial function by additional mechanisms. Based on these observations, we have studied the potential effect of statins on the expression of the endothelial vasoactive factors, ET-1 and NO in bovine aortic endothelial cells (BAEC). Our results show that Atorvastatin and Simvastatin significantly reduce the synthesis of ET-1 and the expression of the pre-proET-1 mRNA. This effect is also evident in the presence of proatherogenic concentrations of oxidized low density lipoproteins (oxLDLs). Although no significant modification of endothelial NO synthase levels was observed in the presence of these drugs alone, they clearly reduced oxLDL-mediated inhibition in BAEC. Thus, statins may contribute to the regulation of vascular tone by modifying the expression of endothelial vasoactive factors.*

Key words: **Statins, endothelin, nitric oxide, HMG-CoA reductase, endothelium.**

### INTRODUCCION

En los últimos 15-20 años se ha demostrado que el endotelio juega un papel importante en la regulación del tono vascular y, por tanto, de la presión sanguínea. Dicha capacidad se basa en el control paracrino ejercido por las células endoteliales sobre la capa de células musculares lisas adyacentes, mediante la secreción de factores vasoactivos. Entre éstos destaca la endotelina-1 (ET-1), que es un potente péptido vasoconstrictor, y el óxido nítrico (NO) y la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) que producen vasodilatación. Probablemente, la liberación basal de NO sea la encargada de mantener un tono vasodilatador en condiciones normales. La NO sintasa endotelial es la responsable de catalizar la transformación de L-arginina a L-citrulina y NO. Dicho enzima presenta un modelo de regulación complejo, tanto a nivel transcripcional como post-traducciona (ver trabajo de Feron y Michel en este mismo número).

En la aterosclerosis, se ha observado una función deficiente de la vía L-arginina-NO-cGMP o bien un exceso de ET-1, explicando, al menos en parte, la disfunción endotelial presente en los vasos ateroscleróticos.

Se ha atribuido un papel preponderante en el inicio y progresión del proceso aterogénico a las lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDL<sub>ox</sub>). Estas actúan produciendo daño endotelial directamente, aumentando la adherencia y migración al espacio subendotelial de monocitos y linfocitos T y estimulando la diferenciación y activación de macrófagos.

Desde hace algunos años, se ha introducido una nueva clase de fármacos en el tratamiento de la aterosclerosis, los inhibidores del enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa, más conocidos como estatinas. La HMG-CoA reductasa es el enzima limitante de la síntesis de colesterol en el hígado. Su inhibición provoca una reducción de los niveles de colesterol y de LDL plasmáticos y una menor susceptibilidad de las LDL a ser oxidadas, lo cual se traduce en el tratamiento beneficioso de la hiperlipidemia y la enfermedad coronaria y en la prevención de la formación de nueva placa de aterosclerosis.

Estudios clínicos recientes han sugerido la idea de que, además de su papel como agentes hipocolesterolemiantes, las estatinas pueden mejorar la función endotelial por mecanismos adicionales. Este

concepto ha surgido de la observación de que los efectos beneficiosos derivados del tratamiento con estos fármacos se manifiestan mucho antes de que pueda observarse algún efecto en la regresión de las placas ateromatosas. Sin embargo, aún no se conoce bien la base fisiológica de dichas observaciones.

### **BREVE RECORRIDO POR LA ATEROSCLEROSIS: DE LA HIPERCOLESTEROLEMIA A LA FORMACION DE LA PLACA DE ATEROMA**

La aterosclerosis es la causa más frecuente de morbilidad y mortalidad en los países occidentales. Los niveles elevados de colesterol sérico o hipercolesterolemia, y más específicamente de colesterol de la fracción de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), constituyen uno de los principales factores de riesgo de desarrollo del proceso aterogénico. Estas lipoproteínas son captadas por el endotelio, donde pueden ser modificadas químicamente, dando lugar a las LDL oxidadas (LDL<sub>ox</sub>). Una vez formadas, las LDL<sub>ox</sub> pueden dañar directamente el endotelio produciendo disfunción endotelial. Las LDL<sub>ox</sub> alteran la membrana celular y pueden modificar su permeabilidad, facilitando así la entrada pasiva de partículas lipoprotéicas en la íntima de la arteria. Uno de los parámetros asociados con la disfunción de la célula endotelial es el aumento de la adherencia y migración al espacio subendotelial de los monocitos y linfocitos T. Éste se produce como consecuencia de la expresión en el endotelio de moléculas específicas de adhesión como la selectina E, la molécula de adhesión intracelular-1 (ICAM-1) y la molécula de adhesión de la célula vascular (VCAM-1), y de proteínas quimiotácticas como la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1) y el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF)<sup>1</sup>. Una vez que los monocitos y los linfocitos T alcanzan la íntima, las LDL<sub>ox</sub> de origen endotelial y otras sustancias asociadas con la aterogénesis van a participar en la transformación del monocito a macrófago y su ulterior activación. La captación de LDL<sub>ox</sub> por los macrófagos no está regulada por el nivel intracelular de colesterol, lo que permite la acumulación excesiva de colesterol esterificado en vesículas lipídicas que se depositan en el citoplasma y que confieren al macrófago el aspecto de célula espumosa. La presencia masiva de células espumosas en la íntima constituye la primera lesión morfológicamente visible, la estría grasa. Los macrófagos activados y las células espumosas van a liberar una gran variedad de moléculas: mitógenos como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), citocinas como

el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y la interleucina-1 (IL-1) y sustancias quimiotácticas como M-CSF y MCP-1. Estas moléculas inducen el reclutamiento de nuevos monocitos y linfocitos y la migración de células del músculo liso de la media hacia la íntima vascular, donde estimulan su proliferación, la síntesis de tejido conectivo y la liberación de factores de crecimiento y mediadores de inflamación. Asimismo, los macrófagos activados liberan especies reactivas derivadas del oxígeno como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y O<sub>2</sub><sup>-</sup>, con gran capacidad para oxidar las LDL del vaso. En la lesión aterosclerótica temprana, los factores liberados por el endotelio, el músculo liso y las células espumosas van a actuar de forma autocrina y paracrina, provocando una amplificación en cascada de los fenómenos descritos hasta este momento.

Debido a la acumulación elevada de macrófagos en la íntima del vaso, el endotelio sufre una distorsión mecánica, que se acompaña de la lesión química producida por los lípidos oxidados, los radicales libres del oxígeno y las proteasas liberadas por los macrófagos. De este modo, los macrófagos pueden erosionar la superficie endotelial, causando microulceraciones. La lesión del endotelio permite a las plaquetas adherirse a la pared arterial, liberando nuevos mitógenos y citocinas que contribuyen a la migración y proliferación del músculo liso. Finalmente, la estría grasa se transforma en una placa fibrosa que irrumpe en el interior del vaso y que, en función del grado de desarrollo que ésta alcance, limitará en menor o mayor grado el flujo sanguíneo. La degeneración necrótica de la placa ateromatosa, debida a la acumulación de lípidos y residuos de células muertas en un estadio más avanzado de la patología, favorece la trombosis característica de las placas complejas.

En resumen, la hipercolesterolemia induce disfunción endotelial y ésta, a su vez, va a suponer el comienzo del proceso aterogénico. Sin embargo, quedan aún por definir los mecanismos específicos de daño endotelial. A continuación se describe el papel del endotelio como principal regulador del tono vascular para después analizar las anomalías de esta función asociadas con la aterosclerosis.

### **EL ENDOTELIO COMO REGULADOR DEL TONO VASCULAR**

El endotelio vascular no es simplemente una barrera física que separa la sangre de la pared vascular. Además, contribuye de forma esencial a la acción antitrombótica y antifibrinolítica, puede controlar la proliferación vascular, actuar en la vigilan-

cia inmunitaria y regular el tono y la reactividad vascular. Esta multiplicidad de acciones determina que las repercusiones fisiopatológicas derivadas de la disfunción del endotelio sean también variadas, participando en la patogénesis de diversas enfermedades vasculares como la hipertensión arterial y la arteriosclerosis.

Las células endoteliales sintetizan diversas sustancias vasoactivas de acción paracrina que regulan el tono de las células musculares lisas subyacentes. Estos factores endoteliales pueden ejercer efectos vasodilatadores, como el NO, la PGI<sub>2</sub> y el factor hiperpolarizante derivado del endotelio, o vasoconstrictores, como la ET-1 y el tromboxano A<sub>2</sub>.

### NO y PGI<sub>2</sub>

El NO se genera en las células a través de la oxidación del aminoácido L-arginina con oxígeno molecular, siendo el otro coproducto de esta reacción biológica la L-citrulina<sup>2</sup>. Esta reacción está catalizada por un grupo de enzimas, las NO sintasas (NOS), que requieren para su actividad múltiples cofactores, entre los que se incluyen la tetrahidrobiopterina, hemo, NADPH, FAD, FMN y calmodulina. Se han identificado al menos tres diferentes isoformas del enzima: i) la NOS neuronal, implicada en neurotransmisión, ii) la NOS inducible por citocinas y productos bacterianos, descrita inicialmente en macrófagos aunque también presente en otros tipos celulares en respuesta a la infección, la inflamación, la lesión de tejidos, etc. y iii) la NOS endotelial (NOSe), responsable de la liberación del NO en el árbol vascular, cuyos efectos fisiológicos principales son mantener un tono vascular vasodilatador y evitar la agregación plaquetaria.

La NOSe se expresa de forma constitutiva en el endotelio, si bien está sujeta a un complejo patrón de regulación tanto a nivel transcripcional como post-traducciona<sup>3,4</sup>. Es la única de las tres isoformas que permanece anclada a la membrana plasmática, siendo esta localización crucial para preservar su actividad biológica. Esta se activa a través del influjo de Ca<sup>2+</sup> controlado por canales específicos de la membrana plasmática. Estos canales se abren en respuesta a diversos estímulos de tipo humoral: bradiquinina, acetilcolina, trombina, ADP, ATP e histamina. Más común parece ser el control que se ejerce a través del flujo sanguíneo<sup>5</sup>: cuando aumenta la tensión o las fuerzas de rozamiento que soportan los vasos se abren dichos canales, permitiendo la activación de la NOSe a través de su unión a la Ca<sup>2+</sup>/calmodulina. El NO producido en las células endoteliales difunde en todas las direcciones. Cuan-

do alcanza el músculo liso vascular adyacente, se estimula la síntesis de GMP cíclico (GMPc) a través de la activación de la guanilato ciclasa soluble. Este aumento de GMPc provoca, por un proceso complejo y relativamente poco conocido, un descenso de los niveles intracelulares de Ca<sup>2+</sup>, la relajación de la musculatura lisa vascular y la dilatación del vaso, que se manifiesta como una disminución de la presión arterial (fig. 1). El NO de las células endoteliales también difunde hacia la luz del vaso, donde inhibe la adhesión de las plaquetas al endotelio y su agregación por un mecanismo dependiente del aumento de los niveles de GMPc intraplaquetarios.

Otros efectos fisiológicos relevantes del NO derivado del endotelio son la inhibición de la adherencia y quimiotaxis de los monocitos y de la proliferación de las células del músculo vascular.

La PGI<sub>2</sub> es un prostanoide bicíclico dienoico, derivado del ácido araquidónico (AA) mediante la acción de varios enzimas. Se sintetiza predominantemente en el endotelio y se libera a nivel extracelular, actuando de forma paracrina sobre las plaquetas y las células musculares lisas. Inhibe la agregación y activación plaquetaria y promueve la relajación del músculo liso vascular. Parte de la acción de la PGI<sub>2</sub> parece tener lugar a través de receptores de membrana acoplados a proteínas G capaces de activar la adenilato ciclasa, conduciendo al aumento subsiguiente de AMP cíclico intracelular (fig. 1). La PGI<sub>2</sub> también es sintetizada en plaquetas y células musculares lisas, contribuyendo a regular los efectos antes mencionados.

La PGI<sub>2</sub> no se almacena en la célula, sino que es sintetizada y liberada cuando las células están sometidas a diversos estímulos como bradiquinina, acetilcolina o angiotensina II. Asimismo, su síntesis está incrementada por estímulos de tipo mecánico como las fuerzas de rozamiento vascular. Por lo tanto, los estímulos que desencadenan la síntesis de PGI<sub>2</sub> van a ser análogos a aquellos que potencian la liberación de NO, permitiendo una acción concertada de ambos agentes en la relajación de la fibra muscular lisa del vaso y en la inhibición de la agregación plaquetaria<sup>2</sup>.

### La ET-1

La ET es uno de los péptidos vasoconstrictores más potentes hasta ahora caracterizados<sup>6</sup>. Se han descrito hasta el momento tres isopéptidos denominados ET-1, ET-2 y ET-3, que tan sólo se diferencian en su estructura en algún aminoácido. Las células endoteliales sólo sintetizan ET-1 en forma de un propépti-

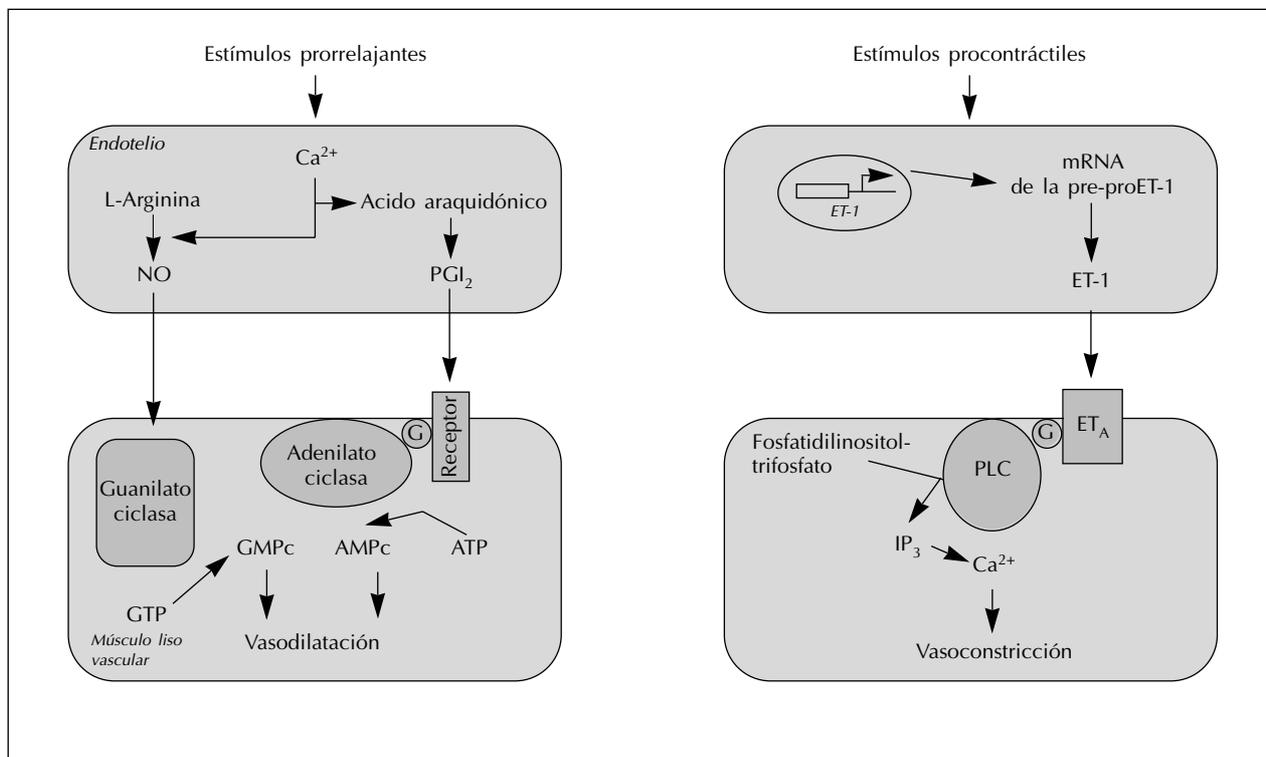


Fig. 1.—Modulación del tono del músculo liso vascular por el endotelio. La célula endotelial libera factores endoteliales prorrelajantes como NO y  $PGI_2$ , o procontráctiles como la ET-1, dependiendo del tipo de estímulo recibido. Estos agentes vasoactivos desencadenan la síntesis y/o liberación de sustancias que modulan el tono la célula muscular lisa adyacente, produciendo vasodilatación o vasoconstricción.

do de 201 aminoácidos, la pre-proET-1, que posteriormente sufre una serie de escisiones proteolíticas. Mediante la acción de una endopeptidasa específica de pares de aminoácidos básicos da lugar a la Big-ET-1 de 38 aminoácidos, que finalmente sufre una segunda proteólisis por la llamada enzima convertidora de endotelina (ECE), dando lugar a la ET-1 de 21 aminoácidos. Puesto que la ET-1 no se almacena dentro de la célula, tanto la regulación de la transcripción de la pre-proET-1 como sus modificaciones proteolíticas posteriores constituyen los elementos clave de regulación de la síntesis de este péptido. Su biosíntesis está regulada por estímulos de naturaleza química o mecánica, entre los que se incluye la trombina, angiotensina II, vasopresina, factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), ionóforo de  $Ca^{2+}$ , ésteres de forbol y fuerzas de rozamiento vascular.

La ET-1 actúa sobre dos tipos de receptores  $ET_A$  y  $ET_B$  que se encuentran ampliamente distribuidos en los lechos vasculares. Los  $ET_A$  se encuentran en las células del músculo liso y median la contracción inducida por ET-1<sup>7</sup>. Los receptores  $ET_B$  se encuentran

en las células endoteliales y median la liberación de NO y  $PGI_2$  inducida por ET-1 y ET-3, produciendo por tanto relajación vascular que podría modular su acción vasoconstrictora. Una vez producida la unión de la ET-1 a su receptor específico de la célula muscular lisa, se produce una activación de la fosfolipasa C y un aumento de los niveles citoplasmáticos de inositol trifosfato. Este suceso desencadena un aumento de la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  y la contracción de la fibra del músculo liso vascular (fig. 1).

Por otra parte, la ET es un potente agente mitogénico de diversos tipos celulares, estimulando la síntesis de DNA. Este efecto está mediado, en parte, por la estimulación de la expresión de determinados protooncogenes como *c-fos* y *c-myc*-1<sup>8</sup>.

#### ALTERACIONES EN LAS VIAS DE SÍNTESIS DE FACTORES ENDOTELIALES VASOACTIVOS EN LA ATEROSCLEROSIS

Como ya se ha mencionado con anterioridad el NO, además de sus propiedades vasodilatadoras, es

capaz de inhibir la adhesividad y agregación plaquetaria, la adherencia y quimiotaxis de los monocitos y la proliferación de las células musculares lisas del vaso. Estos procesos celulares están intrínsecamente relacionados con el desarrollo de la aterogénesis, lo que ha llevado a especular con la idea de que el NO pudiera ser una molécula endógena antiaterogénica.

En modelos animales y en humanos, la vasodilatación inducida por acetilcolina y por otros factores prorrorelajantes dependientes de endotelio está disminuida en los vasos ateroscleróticos<sup>9</sup>. Además, la hipercolesterolemia, en ausencia de aterosclerosis franca, inhibe la vasodilatación dependiente de endotelio. La suplementación en la dieta con el precursor de la síntesis del NO, la L-arginina, puede revertir la disfunción endotelial inducida por la hipercolesterolemia y reducir la extensión del área de la placa y el grosor de la íntima<sup>10,11</sup>.

Se ha observado que la exposición *in vitro* de vasos normales a las LDLox inhibe la vasodilatación dependiente del endotelio en unos minutos, efecto que parece estar mediado por la lisolecitina, uno de los principales componentes de las LDLox pero no de las LDL nativas<sup>12</sup>. Estudios realizados *in vitro* en cultivos celulares, han demostrado que las LDLox también impiden la estimulación de la síntesis de GMPc inducida por NO, probablemente mediante la acción de lípidos oxidados abundantes en estas lipoproteínas<sup>13</sup>. Aparte de estos efectos, donde parece estar incrementada la degradación del NO, se ha observado que a concentraciones elevadas de LDLox se puede inhibir la expresión de la NOSe y la síntesis de NO en células endoteliales en cultivo<sup>14</sup>. También se ha puesto de manifiesto una reducción de la expresión de la NOSe en vasos de humanos y animales hipercolesterolémicos<sup>15,16</sup>.

Actualmente hay múltiples evidencias que relacionan la ET con el desarrollo del proceso aterogénico<sup>8</sup>. En estudios realizados *in vivo* se ha observado que la ET sérica aumenta en la hipercolesterolemia y la aterosclerosis<sup>17</sup>. Se ha documentado la presencia de ET y sus receptores en células endoteliales, macrófagos y células del músculo liso de lesiones ateroscleróticas<sup>18</sup>. Asimismo, la infusión exógena de ET acelera la acumulación de células de músculo liso en la neoíntima después de provocar daño vascular con balón, mientras que la administración de antagonistas de sus receptores, ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub>, reduce dicho proceso. Los antagonistas del receptor ET<sub>A</sub> también inhiben la acumulación de células espumosas durante la hipercolesterolemia.

Mediante estudios realizados *in vitro* en cultivos celulares se ha podido demostrar que las LDLox pueden inducir la síntesis de ET inmunorreactiva en ma-

crófagos y células endoteliales<sup>19</sup>. En las células del músculo liso, la ET actúa como un mitógeno de forma directa o bien de forma indirecta a través de la inducción de PDGF, factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e interleucina-8 (IL-8). También induce la producción de quimiocinas (MCP-1, IL-8) en macrófagos, la expresión de moléculas de adhesión (selectina E, ICAM-1, VCAM-1) en células endoteliales y la síntesis de tejido conectivo (fibronectina, colágeno) en células de músculo liso vascular.

Todos estos hallazgos analizados en conjunto indican que la ET arterial puede facilitar la diapédesis del monocito, estimular la migración y proliferación de las células del músculo liso vascular, y promover la síntesis de tejido conectivo, todos ellos procesos obligados en la formación de la placa aterosclerótica.

El mecanismo hipotético que se presenta en la **figura 2** está basado en la información disponible hasta el momento e ilustra cómo la ET podría promover el desarrollo de las primeras etapas de la aterosclerosis.

Obviamente, la ET no es el eslabón central del proceso aterosclerótico. Más bien, constituye parte de una amplia red de interacciones de factores vasoactivos, prostaglandinas, leucotrienos, factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas. Aunque es cierto que la ET induce la transcripción de genes y la síntesis proteica de muchos mediadores de inflamación y factores de crecimiento, también es verdad que estos últimos estimulan la expresión de la ET, produciéndose una fuerte amplificación de los procesos que desencadenan la patología.

Resumiendo, el desequilibrio entre factores vasodilatadores-antiproliferativos y vasoconstrictores-proliferativos que tiene lugar en la disfunción endotelial, participa en el desarrollo de la aterosclerosis. Puesto que el NO tiene efectos inhibidores sobre algunos procesos clave de la aterogénesis, la ET y otros agentes mitogénicos podrían ejercer una acción proliferativa exagerada cuando la disponibilidad de NO en los lechos vasculares se encuentra reducida por la hipercolesterolemia<sup>15</sup> (**fig. 2**).

### **LAS ESTATINAS NO SOLO ACTUAN COMO AGENTES HIPOCOLESTEROLEMIANTES**

En el momento actual, la lucha contra la aterosclerosis y sobre todo su prevención, se basa en la reducción de la colesterolemia por varios procedimientos entre los que se encuentran la limitación del colesterol en la dieta y el tratamiento farmacológico para inhibir la absorción intestinal y la síntesis hepática de colesterol.

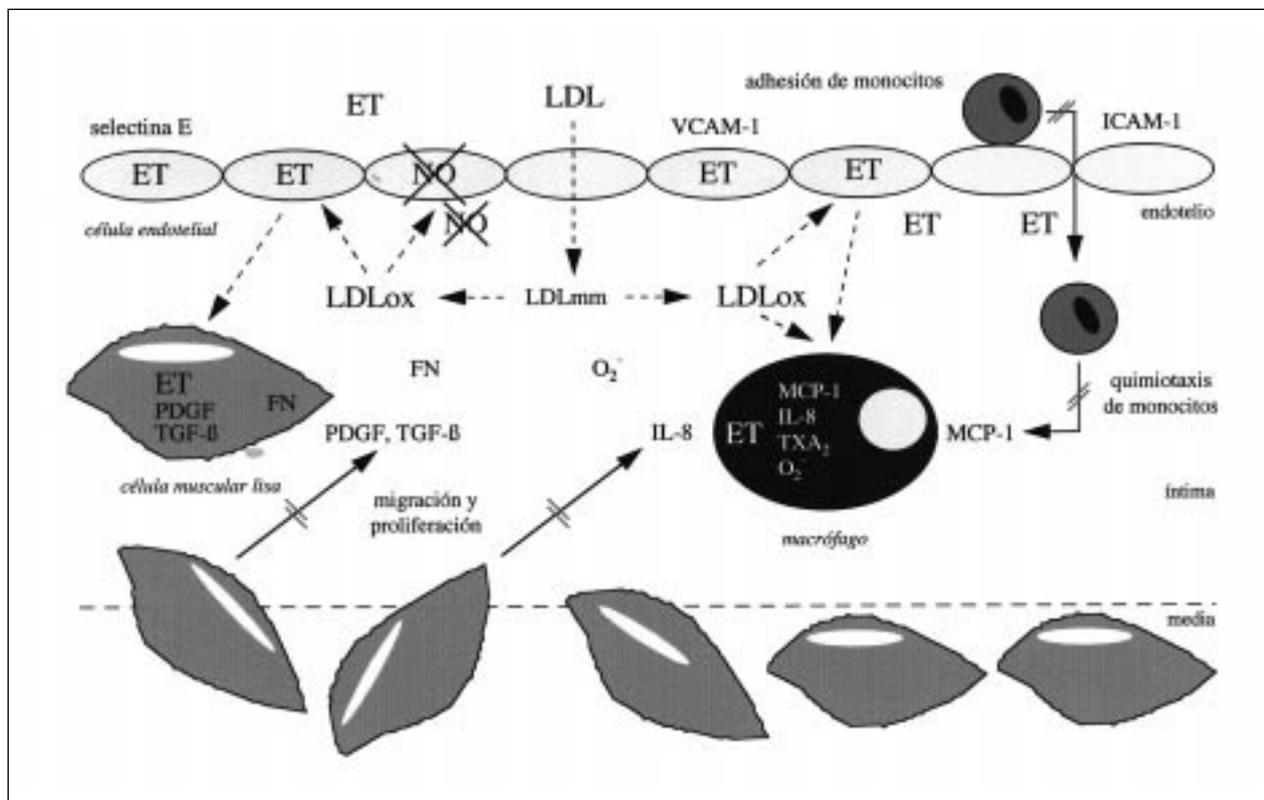


Fig. 2.—Modelo hipotético ilustrando cómo las alteraciones de la síntesis de ET y NO promueven la aterosclerosis. Las LDL después de atravesar la pared arterial se transforman en LDL mínimamente modificadas (LDLmm) y, finalmente, en LDL oxidadas (LDLox). Estas últimas estimulan la síntesis y secreción de ET en las células endoteliales y en los macrófagos residentes en la íntima. La ET potencia la síntesis de selectina E, VCAM-1, e ICAM-1 en el endotelio e induce a los macrófagos a producir MCP-1, que facilita el reclutamiento de monocitos en la pared arterial. La ET estimula su propia síntesis y la liberación de factores de crecimiento y mediadores de inflamación en las células musculares lisas de la íntima y los macrófagos, promoviendo la migración y proliferación de las células musculares lisas de la media. También se incrementa la generación de fibronectina (FN) por las células del músculo liso. Los macrófagos estimulados por la ET liberan especies reactivas derivadas del oxígeno que pueden incrementar la oxidación de las LDL del vaso. Las LDLox también inhiben la síntesis y aceleran la degradación del NO. Dado que el NO inhibe la quimiotaxis de monocitos y la migración y proliferación de las células musculares lisas (representado en la figura por //), la reducción de la disponibilidad del NO en el vaso se traduce en una mayor acción proaterogénica de la ET. TXA<sub>2</sub>: tromboxano A<sub>2</sub>.

La introducción de los inhibidores del enzima HMG-CoA reductasa (estatinas) ha revolucionado el tratamiento farmacológico de las dislipidemias debido a su elevada eficacia y tolerabilidad<sup>20</sup>. Actualmente, las de mayor interés desde un punto de vista clínico son la lovastatina, la pravastatina, la simvastatina, la fluvastatina y la atorvastatina (fig. 3A). El mecanismo de acción de estos fármacos se basa en la inhibición competitiva y reversible de la transformación del HMG-CoA a mevalonato (fig. 3B), que es el precursor de los esteroides celulares, como el colesterol, y también de los lípidos isoprenoides<sup>21,22</sup>. Entre estos últimos se encuentra el dolicol, necesario para la glicosilación de proteínas, las ubiquinonas de la cadena respiratoria mitocondrial, la isopentenil adenina, que interviene en la modificación

de ciertas formas de RNAt, y los isoprenoides farnesil y geranilgeranil pirofosfato que participan en la modificación post-traduccional de ciertas proteínas y en particular de las proteínas G como la proteína Ras. No debe resultar extraño, por tanto, que las estatinas, además de su capacidad para inhibir la síntesis hepática de colesterol, también sean capaces de modificar otras funciones celulares. Como ya se ha indicado, la aterosclerosis es un trastorno crónico de la pared del vaso caracterizado por la presencia de monocitos, macrófagos y linfocitos T en las lesiones, así como por la proliferación de las células musculares lisas y elaboración de matriz extracelular. Se han acumulado un gran número de evidencias que han permitido establecer el papel antiaterogénico de las estatinas a través de

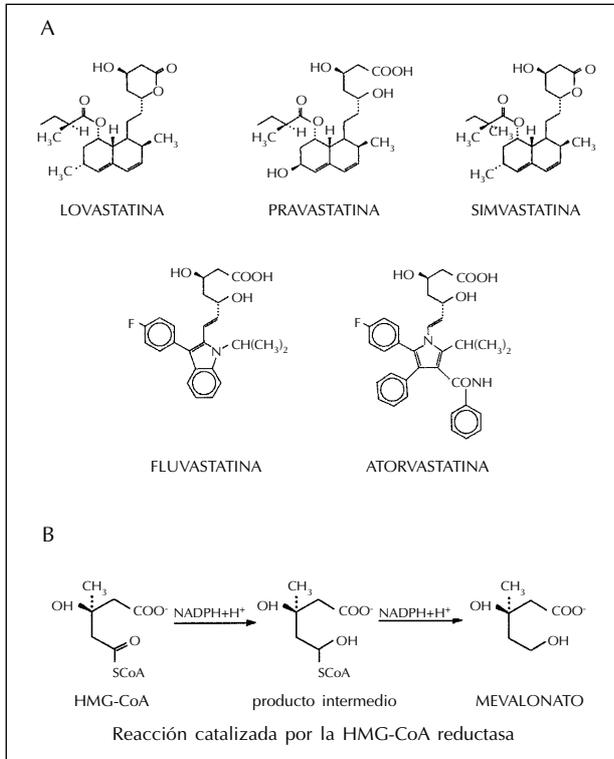


Fig. 3.—Estructura química de diversos inhibidores de la HMG-CoA reductasa (A) y reacción enzimática que inhiben (B).

su acción en la pared vascular<sup>23</sup>. Se ha demostrado que la pravastatina inhibe la síntesis de colesterol en macrófagos tanto *in vivo* como *in vitro*. Asimismo, la atorvastatina, simvastatina y lovastatina reducen el contenido de células espumosas en las lesiones ateroscleróticas de animales hipercolesterolémicos<sup>24</sup>.

Las estatinas también pueden influir en la transcripción del DNA y la proliferación celular. Por ejemplo, la simvastatina bloquea la inducción de la síntesis de DNA estimulada por el PDGF en células mesangiales, la fluvastatina y la lovastatina inhiben la proliferación de las células del músculo liso, y la pravastatina reduce la migración transendotelial y la quimiotaxis de los monocitos<sup>25</sup>. La lovastatina inhibe la citotoxicidad de las células asesinas naturales inducida por IL-2. Estos efectos se pueden revertir con mevalonato pero no con colesterol. Estos hallazgos indican que parte de las acciones beneficiosas adyuvantes al tratamiento de las dislipemias y aterosclerosis con las estatinas podrían estar mediadas por la reducción de precursores del colesterol, y no simplemente por su acción sobre los niveles de LDL<sup>23</sup>. En este sentido, se ha observado que el tratamiento con estatinas mejora la vasomotricidad y la respuesta a agonistas dependientes del endote-

lio en pacientes hipercolesterolémicos. En uno de estos estudios, la perfusión coronaria mejoró después del tratamiento de 12 semanas con fluvastatina, sugiriendo que no es un proceso atribuible a la regresión de la placa de ateroma, ya que ésta se observa después de períodos de tratamiento prolongados<sup>26</sup>. La base de esta mejoría radica probablemente en la normalización de la función endotelial. Asimismo, las estatinas reducen la morbilidad y mortalidad cardiovascular en pacientes con y sin arteriopatía coronaria<sup>27,28</sup>. Este efecto también se manifiesta de forma precoz durante el tratamiento hipolipemiente, antes de apreciarse remodelado alguno de la placa.

En síntesis, cada vez resulta más evidente que el descenso relativamente temprano de la mortalidad observada en los ensayos clínicos con estatinas no se puede atribuir a una reducción del volumen de la placa y de los lípidos que contiene o a la reducción de la aterosclerosis coronaria, fenómenos dependientes de los niveles de colesterol. Existen evidencias experimentales de que las estatinas poseen efectos sobre la función inmunológica y la proliferación celular independientes de las concentraciones plasmáticas de las LDL. Cabría esperar que la mejoría de la respuesta cardiovascular a agonistas dependientes del endotelio reduzca el estrés hemodinámico sobre las placas y disminuya la probabilidad de rotura aguda y trombosis.

De acuerdo con estos antecedentes, hemos estudiado en primer lugar el efecto potencial de las estatinas por sí mismas sobre la expresión de los factores vasoactivos ET-1 y NO en células endoteliales de aorta bovina (CEAB) y, en segundo lugar, el posible papel de estos fármacos en un modelo experimental donde se simulaban condiciones proaterogénicas mediante la exposición de las células endoteliales a LDLox. Como se describe a continuación, nuestros resultados demuestran que las estatinas reducen significativamente la síntesis de ET-1 y la expresión de su precursor, la pre-proendotelina-1. Asimismo, estos fármacos reducen claramente la inhibición de la expresión de la NOSe mediada por LDLox.

## EFFECTOS DE LAS ESTATINAS SOBRE LA EXPRESIÓN DE FACTORES ENDOTELIALES VASOACTIVOS

### Las estatinas inhiben la expresión de la ET-1

*Las estatinas inhiben la expresión del transcrito de la pre-proET-1 de forma dependiente de la con-*

centración y del tiempo de tratamiento. Mediante análisis de Northern blot se determinó que las dos estatinas empleadas en este trabajo, atorvastatina y simvastatina, redujeron significativamente la expresión de la pre-proET-1 después de 24 h de tratamiento. Este efecto fue máximo ( $52 \pm 15\%$  de inhibición por atorvastatina y  $57 \pm 12\%$  de inhibición por simvastatina) con la concentración de  $10 \mu\text{M}$  y era observable a partir de la concentración de  $2 \mu\text{M}$  de atorvastatina ( $44 \pm 16\%$  de inhibición) y de  $5 \mu\text{M}$  de simvastatina ( $37 \pm 13\%$  de inhibición). Asimismo, la inhibición de la expresión del RNAm de la pre-proET-1 ejercida por ambas estatinas era detectable a las 8 h y máxima entre las 16 y 24 h de exposición a los fármacos, con una ligera recuperación después de 48 h que resultó significativa en el caso de la atorvastatina. A continuación, realizamos experimentos encaminados a establecer alguna correlación entre los niveles de pre-proET-1 y los niveles de ET-1 existentes. Los tratamientos con atorvastatina o con simvastatina provocaron una reducción significativa de los niveles de ET-1 (25% por atorvastatina y 50% por simvastatina aproximadamente), como se determinó por ELISA en el medio de cultivo condicionado durante un período de tiempo de 4 h en CEAB pretratadas con alguno de los dos fármacos durante 24 h.

Las estatinas no modificaron significativamente la estabilidad del RNAm de la pre-proET-1, sugiriendo que probablemente la inhibición de su expresión se produce a nivel transcripcional (datos de los autores). Además, el mevalonato, pero no el colesterol, revirtió la reducción de la expresión de la pre-proET-1 mediada por estatinas (datos de los autores). Este hecho sugiere que algún metabolito del mevalonato aparte del colesterol podría desempeñar un papel en el control de los niveles basales del RNAm de la pre-proET-1.

El efecto inhibitor de las estatinas sobre los niveles de RNAm de la pre-proET-1 se mantiene en presencia de factores proaterogénicos. A continuación exploramos si el efecto de la estatinas sobre los niveles de pre-proET-1 podían modificarse por la presencia de LDLox, un conocido agente patogénico en el desarrollo de la aterosclerosis. Las estatinas resultaron eficaces ejerciendo un efecto inhibitor de la expresión de la pre-proET-1 en presencia de un rango de concentraciones de LDLox ( $1\text{-}50 \mu\text{g/ml}$ , 24 h) que son comparables a los niveles a los que las células endoteliales están expuestas *in vivo* (fig. 4). A concentraciones elevadas de LDLox, la atorvastatina mantuvo de forma ligeramente más efectiva que la simvastatina dicho efecto inhibitor.

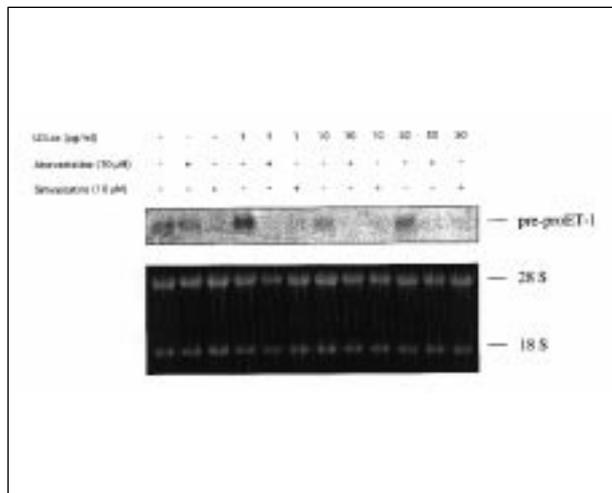


Fig. 4.—El efecto inhibitor de las estatinas sobre la expresión de la pre-proET-1 persiste en presencia de LDLox. Análisis de Northern blot ( $10 \mu\text{g}$  de RNA total/calle) mostrando la expresión del RNAm de la pre-proET-1 en células endoteliales de aorta bovina (CEAB), después de 24 h de tratamiento con las concentraciones indicadas de LDLox y en ausencia o presencia de  $10 \mu\text{M}$  de atorvastatina o simvastatina. La tinción de las subunidades 28S y 18S del RNA ribosomal con bromuro de etidio sirvió como control de la carga total del RNA.

#### Las estatinas impiden la acción de las LDLox sobre la expresión de la NOSe

Las estatinas no modifican la síntesis de NO. No se encontraron efectos significativos por atorvastatina ni por simvastatina sobre la actividad de la NOSe (medida como conversión de L-[ $^{14}\text{C}$ ]arginina en L-[ $^{14}\text{C}$ ]citrulina) en homogeneizados totales de CEAB a ninguna de las concentraciones y tiempos de tratamientos analizados ( $0,1\text{-}10 \mu\text{M}$ ,  $12\text{-}36$  h). Tampoco se encontraron cambios en la actividad enzimática de la NOSe en células intactas tratadas con atorvastatina ( $10 \mu\text{M}$ , 24 h), como se determinó por acumulación de  $\text{NO}_2^-$  o por conversión de L-[ $^{14}\text{C}$ ]arginina en L-[ $^{14}\text{C}$ ]citrulina en presencia del ionóforo de calcio A23187. Finalmente, no se detectaron cambios en la expresión de la proteína de la NOSe en inmunoblots después del tratamiento con atorvastatina o simvastatina. Asimismo, la distribución subcelular de la NOSe, que se ha descrito que puede condicionar su actividad enzimática, no varió después del tratamiento con alguno de estos fármacos (datos de los autores).

Las estatinas previenen la inhibición de la expresión del RNAm de la NOSe mediada por LDLox. A continuación investigamos si la presencia de LDL nativa u oxidada modificaba la expresión del RNAm de la NOSe y si este proceso podría ser regulado

por el co-tratamiento con estatinas (fig. 5). La LDLox pero no la LDL nativa, inhibió la expresión del RNAm de la NOSe en CEAB de forma dependiente de la concentración (hasta un 45% de inhibición) y tras 24 h de tratamiento (ver figura 5A). Esta inhibición estaba acompañada por un descenso significativo de la actividad de la NOSe en células intactas estimuladas con el ionóforo de calcio A23187 (control:  $6,7 \pm 0,3$  vs. LDLox a  $50 \mu\text{g/ml}$ :  $3,9 \pm 0,2$  pmol/mg protein/min). No obstante, el efecto inhibitorio de la expresión basal del RNAm de la NOSe ejercido por la LDLox (hasta concentraciones de  $10 \mu\text{g/ml}$ ), se redujo claramente en presencia de atorvastatina o simvastatina ( $10 \mu\text{M}$ , 24h; ver figura 5B). La simvastatina también previno la inhibición de la proteína de la NOSe inducida por  $10 \mu\text{g/ml}$  de LDLox (datos de los autores).

**CONCLUSIONES**

Los datos aquí presentados llaman la atención sobre el hecho de que las estatinas, además de su efecto reductor de los niveles plasmáticos de colesterol, puedan modificar la expresión de factores endoteliales vasoactivos, concretamente la ET-1 y la NOSe. Aunque somos conscientes de las limitaciones de los modelos de estudio *in vitro*, resulta tentador especular con la idea de que las estatinas puedan ser capaces de modular la expresión de facto-

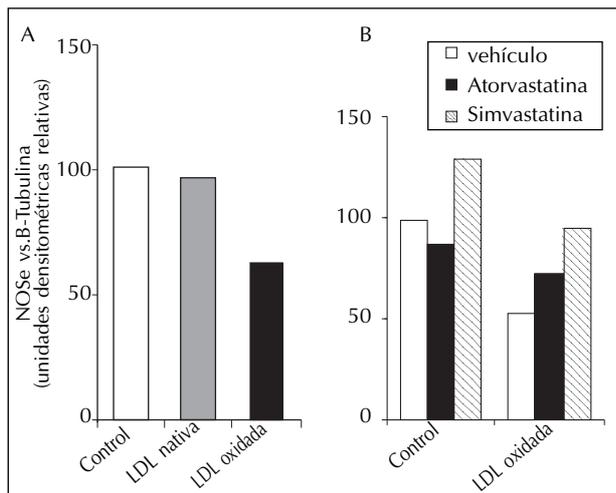


Fig. 5.—Las estatinas reducen el efecto inhibitorio de las LDLox sobre la expresión de la NOSe. Gráficas de barras de los datos obtenidos mediante análisis densitométrico del transcrito de la pre-proET-1, expresados relativos al control y corregidos por la cantidad de RNAm de la  $\beta$ -tubulina. A: CEAB expuestas durante 24h a  $10 \mu\text{g/ml}$  de LDL nativa u oxidada. B: Células tratadas con vehículo, atorvastatina o simvastatina ( $10 \mu\text{M}$ , 24 h) en ausencia o presencia de LDLox ( $10 \mu\text{g/ml}$ ).

res vasoactivos en un escenario proaterogénico, modificando el balance de vasoconstricción a vasodilatación (fig. 6). Estos efectos podrían contribuir a explicar la mejoría de la función endotelial que se ha observado durante el tratamiento de la aterosclerosis con estos fármacos. Nuestras observaciones a nivel celular deben proporcionar una base para emprender futuros estudios en modelos *in vivo*.

**Agradecimientos**

Agradecemos a la Dra. Therese Resink (Kantonsspital, Basel, Suecia) y al Dr. José M. Mostaza (Hospital Carlos III, Madrid) la donación y colaboración

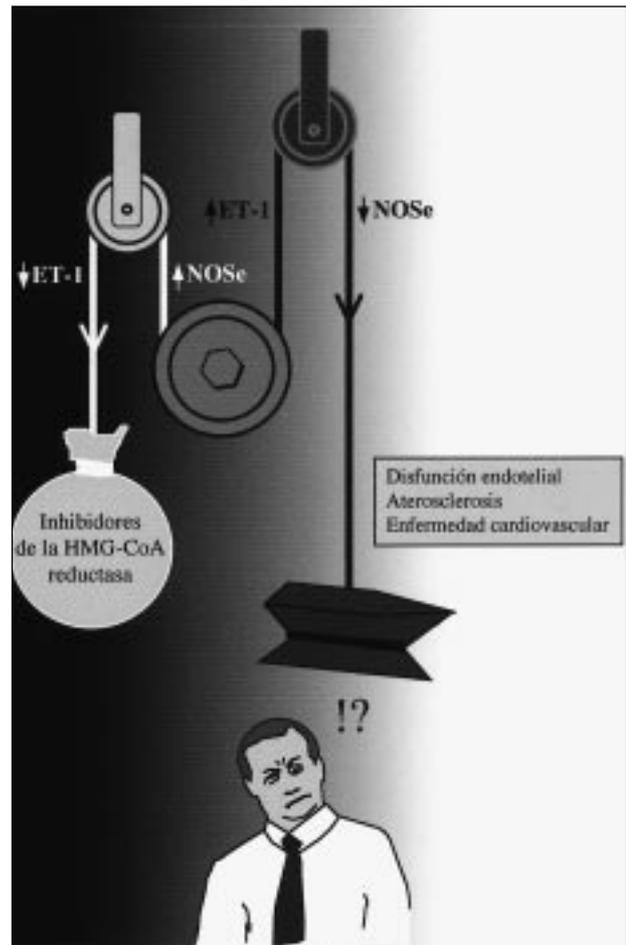


Fig. 6.—Las estatinas podrían regular la respuesta vasomotora a través de la modificación de la expresión de factores endoteliales vasoactivos como la ET-1 y la NOSe. Este efecto podría contribuir a explicar los beneficios clínicos tempranos del tratamiento hipolipemiante con estatinas.

en la obtención de las LDL nativas y oxidadas, y a los colegas del laboratorio por sus aportes a la discusión.

Este trabajo ha sido financiado por Parke-Davis España, y en parte por la CICYT (SAF 97-0035) y la Unión Europea (BIOMED 2, BMH1-CT92-1893). Octavio Hernández Perera es becario del Programa de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia (FP94). Parte de este trabajo se ha presentado de forma resumida en la 66 edición de los Congresos de la Sociedad Europea de Aterosclerosis (Florenca, 1996) y en el XI Simposium Internacional de Aterosclerosis (París, 1997).

### Bibliografía

1. Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362: 801-809, 1993.
2. Moncada S, Higgs A: The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329: 2002-2012, 1993.
3. Lamas S, Michel T: Molecular biological features of nitric oxide synthase isoforms. En: *Nitric Oxide and the Lung*. Vol. 98. Zapol WM, Bloch KD, editors. Marcel Dekker, Inc., New York 59-73, 1997.
4. Michel T, Feron O: Nitric oxide synthases: which, where, how and why? *J Clin Invest* 100: 2146-2152, 1997.
5. Rees DD, Palmer RMJ, Moncada S: Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 3375-3378, 1989.
6. Hirata Y: Endothelin peptides. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 5: 12-15, 1996.
7. Webb D: Physiological role of the endothelin system in human cardiovascular and renal hemodynamics. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 6: 69-73, 1997.
8. Kowala MC: The role of endothelin in the pathogenesis of atherosclerosis. En: *Advances in Pharmacology*. Vol. 37. August JT, Anders MW, Murad F, Coyle JT, editors. Academic Press, Inc., San Diego 299-318, 1997.
9. Harrison DG, Armstrong ML, Freiman PC, Heistadd DD: Restoration of endothelium: Im-dependent relaxation by dietary treatment of atherosclerosis. *J Clin Invest* 80: 1808-1811, 1987.
10. Cooke JP, Singer AH, Tasao P, Zera P, Rowan RA, Billingham ME: Antiatherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit. *J Clin Invest* 90: 1168-1172, 1992.
11. Creager MA, Gallagher SJ, Giererd XJ, Coleman SM, Dzau VJ, Cooke JP: L-arginine improves endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest* 90: 1248-1253, 1992.
12. Kugiyama K, Kerns SA, Morrisett JD, Roberts R, Henry PD: Impairment of endothelium-dependent arterial relaxation by lysolecithin in modified low-density lipoproteins. *Nature* 344: 160-162, 1990.
13. Chin JH, Azhar S, Hoffman BB: Inactivation of endothelial derived relaxing factor by oxidized lipoproteins. *J Clin Invest* 89: 10-18, 1992.
14. Liao JK, Shin WS, Lee WY, Clark SL: Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chim* 270: 319-324, 1995.
15. Mathew V, Cannan CR, Miller VM, Barber DA, Hasdai D, Schwartz RS, Holmes DRJ, Lerman A: Enhanced endothelin-mediated coronary vasoconstriction and attenuated basal nitric oxide activity in experimental hypercholesterolemia. *Circulation* 96: 1930-1936, 1997.
16. Wilcox JN, Subramanian RR, Sundell CL, Tracey WR, Pollock JS, Harrison DG, Marsden PA: Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 17: 2479-2488, 1997.
17. Lerman A, Edwards BS, Hallett JW, Heublein DM, Sandberg SM, Burnett Jr JC: Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N Engl J Med* 325: 997-1001, 1991.
18. Jones GT, Van Rij AM, Solomon C, Thomson IA, Packer SGK: Endothelin-1 is increased overlying atherosclerotic plaques in human arteries. *Atherosclerosis* 124: 25-36, 1996.
19. Boulanger MC, Tanner FC, Béa M, Hajn AWA, Werner A, Lüscher TF: Oxidized low density lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium. *Circ Res* 70: 1191-1197, 1992.
20. Witztum JL: Drugs used in the treatment of hyperlipoproteinemias. En: *Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Gilman AG, editors. McGraw-Hill, New York 875-897, 1996.
21. Goldstein JL, Brown MS: Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343: 425-430, 1990.
22. Grünler J, Ericsson J, Dallner G: Branch-point reactions in the biosynthesis of cholesterol, dolichol, ubiquinone and prenylated protein. *Biochim Biophys Acta* 1212: 259-277, 1994.
23. Vaughan CJ, Murphy MB, Buckley BM: Statin do more than just lower cholesterol. *Lancet* 348: 1079-82, 1996.
24. Bocan TMA, Mazur MJ, Muller SB, Brown EQ, Sliskovic DR, O'Brien Pm, Creswell MW, Lee H, Uhlendorf PD, Roth BD, Newton RS: Antiatherosclerotic activity of inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in cholesterol-fed rabbits: a biochemical and morphological evaluation. *Atherosclerosis* 111: 127-142, 1994.
25. Duzendorfer S, Rothbucher D, Schratzberger P, Reinisch N, Kähler CM, Wiedermann CJ: Mevalonate-dependent inhibition of transendothelial migration and chemotaxis of human peripheral blood neutrophils by pravastatin. *Circ Res* 81: 963-969, 1997.
26. Eichstädt HW, Eskötter H, Hoffman I, Amthauer HW, Weidinger G: Improvement of myocardial perfusion by short-term fluvastatin therapy in coronary artery disease. *Am J Cardiol* 76 (2): 122A-125A, 1995.
27. Scandinavian simvastatin survival study group: Randomised trial of cholesterol lowering in 444 patients with coronary heart disease: the scandinavian simvastatin survival study (4S). *Lancet* 344: 1383-1389, 1994.
28. Shepherd J, Cobbe SM, Ford I: Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolaemia. *N Engl J Med* 333: 1301-1307, 1995.