

La atorvastatina modula a la trombospondina en células endoteliales umbilicales humanas

V. Martínez-Sales^a, V. Vila^a, E. Réganon^a, V. Alfonso^a y M. Ferrando^b

^aCentro de Investigación. Hospital Universitario La Fe. Valencia. España

^bDepartamento de Obstetricia y Ginecología. Hospital Universitario La Fe. Valencia. España.

El objetivo del presente trabajo es determinar el efecto de la atorvastatina sobre la síntesis y liberación de trombospondina en células endoteliales umbilicales humanas y su regulación por los metabolitos de la vía del mevalonato. Los resultados muestran que la atorvastatina disminuye el contenido celular de trombospondina y su liberación, de forma dependiente de la dosis, en células endoteliales. El mevalonato revierte totalmente el efecto inhibitorio producido por la atorvastatina sobre el contenido y la liberación de la trombospondina celular. El farnesil pirofosfato y el geranylgeranyl pirofosfato revierten el efecto inhibitorio producido por la atorvastatina en el contenido celular de trombospondina; sin embargo, ni el farnesil pirofosfato ni el geranylgeranyl pirofosfato revierten el efecto inhibitorio producido por la atorvastatina en la liberación de trombospondina. En conclusión, la atorvastatina regula negativamente a la trombospondina, en células endoteliales umbilicales humanas, a través de la inhibición del mevalonato.

Palabras clave:

Atorvastatina. Trombospondina. Mevalonato. Células endoteliales.

Este trabajo ha sido financiado en parte por la Fundación Española de Aterosclerosis/Beca Pfizer 2004 y el proyecto BM.017.2002, Generalitat Valenciana.

Correspondencia: Dra. V. Martínez-Sales.
Centro de Investigación. Hospital Universitario La Fe.
Avda. Campanar, 21. 46009 Valencia. España.
Correo electrónico: martinez_vicsal@gva.es

Recibido el 30 de marzo de 2005 y aceptado el 2 de junio de 2005.

ATORVASTATIN MODULATES THROMBOSPONDIN IN HUMAN ENDOTHELIAL CELLS

The aim of this study was to evaluate the effect of atorvastatin on thrombospondin synthesis and secretion in human umbilical endothelial cells and its regulation by mevalonate or its derivatives. Our results show that atorvastatin decreased endothelial cell thrombospondin content and secretion in a dose-dependent manner. Mevalonate totally reversed the inhibitory effect produced by atorvastatin on the content and secretion of cellular thrombospondin. Farnesyl pyrophosphate and geranylgeranyl pyrophosphate reversed the inhibitory effect produced by atorvastatin on the cellular content of thrombospondin but did not prevent the inhibitory effect of atorvastatin on thrombospondin secretion. In conclusion, atorvastatin down-regulates thrombospondin in human endothelial cells through mevalonate inhibition.

Key words:

Atorvastatin. Thrombospondin. Mevalonate. Endothelial cells.

Introducción

Se ha demostrado que las estatinas, inhibidores de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa, reducen la morbilidad y mortalidad cardiovascular, no sólo por su efecto reductor del colesterol plasmático, sino también mediante mecanismos pleiotrópicos. En este sentido, se ha descrito que las estatinas pueden mejorar la disfunción endotelial¹ y modular la angiogénesis².

Las estatinas inhiben la biosíntesis del mevalonato. El mevalonato es un precursor del colesterol, así

como de isoprenoides intermediarios, tales como el farnesil pirofosfato (FPP) y el geranilgeranil pirofosfato (GGPP), que intervienen en la modificación postransduccional de una gran variedad de proteínas implicadas en procesos de señalización celular³. Las estatinas, al inhibir la HMG-CoA reductasa, originan un agotamiento de las reservas intracelulares de isoprenoides. Por tanto, las estatinas también regulan la actividad de las proteínas intracelulares que deben ser preniladas, para participar en procesos de transducción de señal celular. En este sentido, se ha descrito que las estatinas pueden modular la formación de nuevos vasos sanguíneos²; sin embargo, los resultados publicados referentes a su contribución a la angiogénesis son contradictorios. Las estatinas, dependiendo de su concentración, ejercen un efecto bifásico en la actividad angiogénica de las células endoteliales umbilicales humanas, a bajas concentraciones aceleran la proliferación celular, la migración y la diferenciación, manifestando un efecto proangiogénico, mientras que a altas concentraciones inhiben estas funciones^{4,5}.

La angiogénesis está regulada por un delicado balance entre factores pro y antiangiogénicos. Entre los factores inhibidores de la angiogénesis se encuentran la trombospondina (TSP)⁶. La TSP es una proteína multifuncional que tiene efectos complejos y específicos según el tipo celular⁶. La TSP es una glucoproteína sintetizada por una gran variedad de tipos celulares, incluidas las células endoteliales⁷. El papel de la TSP en la angiogénesis depende de su concentración tisular, de la concentración de ciertos agonistas angiogénicos, de la localización de la TSP en el tejido y de su estado proteolítico⁷. Las observaciones referentes a que la trombospondina puede inhibir la angiogénesis por diferentes vías (migración, proliferación, formación del tubo, apoptosis de la célula endotelial) en células en cultivo⁸ plantean diversas cuestiones sobre el mecanismo por el cual la TSP regula la angiogénesis y sobre cuál es la vía de señalización intracelular, activada por los inhibidores de la angiogénesis. Dado que el efecto de las estatinas en el metabolismo del colesterol se realiza inhibiendo reacciones de prenilación de proteínas que intervienen en las vías de señalización celular, consideramos que sería de interés estudiar la influencia de la atorvastatina en el binomio angiogénesis-trombospondina.

El objetivo del presente trabajo es determinar el efecto de la atorvastatina en la síntesis y liberación de trombospondina por las células endoteliales umbilicales humanas en cultivo y su posible regulación por los metabolitos de la vía del mevalonato.

Material y método

Células endoteliales umbilicales humanas

Las células endoteliales se obtuvieron de cordones umbilicales humanos procedentes del Centro Maternal de nuestro hospital. La obtención y el cultivo de las células endoteliales de vena de cordón umbilical lo realizamos siguiendo básicamente el método descrito por nosotros⁹. Como medio de cultivo se utilizó medio 199 con 15 mM HEPES suplementado con 20% de suero bovino fetal (SBF), 1% de factor de crecimiento celular endotelial, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato sódico, 50 µU/ml de penicilina, 50 mg/ml estreptomycin. Los subcultivos se obtuvieron a partir de monocapas confluentes del cultivo primario, tratadas con 0,25% de tripsina, 0,1% de EDTA en 10 mM tampón fosfatos, 150 mM de NaCl, pH 7,4 (PBS). Todas las experiencias se realizaron en el primer o segundo subcultivo.

Tratamiento de las células con atorvastatina

Monocapas confluentes de células endoteliales (placas de 96 pocillos) se incubaron en medio de cultivo con 2% de SBF durante 24 h. A continuación las células endoteliales se trataron con atorvastatina (Calbiochem) a concentraciones comprendidas entre 0,001 y 10 µM, durante los tiempos indicados en cada experimento. Para analizar la influencia de los metabolitos intermedios de la biosíntesis del colesterol, las células se incubaron con 1 µM de atorvastatina y 300 µM de mevalonato (Sigma), 20 µM de FPP (Sigma) o 20 µM de GGPP (Sigma) durante 24 h. Mevalonato, FPP y GGPP se añadieron al cultivo al mismo tiempo que la atorvastatina. En todas las experiencias se realizaron controles en paralelo. Al final de las incubaciones los sobrenadantes se recogieron y se congelaron a -80 °C. Las células se lavaron 3 veces con PBS y, después de un ciclo de congelación y descongelación, se lisaron con 50 µl/pocillo de 1% tritón X-100, 5 mM EDTA en PBS, pH 7,5, conteniendo 1 mM PMSF, durante 2 h, con agitación, a 4 °C.

Determinación de la concentración de trombospondina

Los niveles de TSP en el sobrenadante del cultivo y en el lisado celular, se cuantificaron mediante la técnica de ELISA indirecto. Brevemente, la placa de ELISA (MaxiSorp surface, Nunc) se incubó durante toda la noche con 100 µl/pocillo de TSP (20-40 µg/ml, obtenida en nuestro laboratorio a partir de plaquetas). Las muestras y los estándares de TSP se diluyeron con 5% de albúmina bovina en PBS y se incubaron durante toda la noche con el anticuerpo policlonal específico para TSP, dilución 1:1.000 (NeoMarkers Lab Vision Corporation). Al final de la incubación, 100 µl/pocillo de cada muestra se añadieron a la placa y se incubaron durante 2 h. La detección se realizó añadiendo a cada pocillo 100 µl del conjugado IgG-peroxidasa, dilución 1:2.000 (*peroxidase HRP-conjugated goat antirabbit IgG*, Amersham), como segundo anticuerpo, e incubando durante 2 h, a temperatura ambiente. Como sustrato se utilizó una solución de orto-fenildiamino-dihidrocloruro (OPD) a la concentración de 0,4 mg/ml en tampón acetato 0,12 M, pH 4 con 0,04% H₂O₂ de 30% p/v (preparada inmediatamente antes de su uso). A cada pocillo se añadieron 200 µl de la solución de OPD, incubándose a continuación durante 10 min. La reacción se paró con 4 M H₂SO₄. La densidad óptica (DO) se leyó a las longitudes de onda de 492 y 620 nm, en un lector de placas para ELISA (AThermo Labsystems). La conversión de lecturas de DO a concentración de TSP (ng/ml) se realizó mediante la obtención de una curva estándar, con un rango de concentración de 12 a 400 ng/ml de TSP (Sigma). El contenido proteico

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/9146710>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/9146710>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)