

## Papel dos microRNAs 221/222 na Liberação de Óxido Nítrico Induzida por Estatinas em Células Endoteliais Humanas

Role of microRNAs 221/222 on Statin Induced Nitric Oxide Release in Human Endothelial Cells

Alvaro Cerda<sup>1,2</sup>, Cristina Moreno Fajardo<sup>1</sup>, Rodrigo Gouveia Basso<sup>1</sup>, Mario Hiroyuki Hirata<sup>1</sup>, Rosario Dominguez Crespo Hirata<sup>1</sup>

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo<sup>1</sup>, SP - Brasil; Centro de Biologia Molecular y Farmacogenética - Centro de Excelencia en Estudios Genéticos e Inmunológicos - Universidad de La Frontera<sup>2</sup>, Temuco - Chile

### Resumo

**Fundamento:** O óxido nítrico (NO) tem sido amplamente associado com proteção cardiovascular através de melhoria da função endotelial. Recentemente, novas evidências sobre a modulação do NO na liberação de microRNAs (miRs) têm sido relatadas, o que poderia estar envolvido com efeitos pleiotrópicos dependentes de estatinas, incluindo propriedades anti-inflamatórias relacionadas com a função do endotélio vascular.

**Objetivos:** Avaliar os efeitos dos medicamentos redutores de colesterol, incluindo os inibidores da síntese de colesterol, atorvastatina e simvastatina, e o inibidor da absorção de colesterol, ezetimiba, na liberação de NO, expressão do mRNA do NOS3 e miRs potencialmente envolvidos na biodisponibilidade do NO.

**Métodos:** Células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) foram expostas à atorvastatina, simvastatina ou ezetimiba (0 a 5,0  $\mu$ M). As células foram submetidas à extração do RNA total e quantificação relativa de mRNA do NOS3 e dos miRs-221,-222 e -1303 por qPCR. A liberação de NO foi medida em sobrenadantes por ozônio-quimioluminescência.

**Resultados:** Ambas as estatinas aumentaram os níveis de NO e a expressão do mRNA do NOS3, mas nenhum efeito foi observado em relação ao tratamento com ezetimiba. A atorvastatina, simvastatina e ezetimiba regularam negativamente a expressão do miR-221, enquanto que o miR-222 reduziu somente após o tratamento com atorvastatina. A magnitude da redução de miR-221 e miR-222 após tratamento com estatinas correlacionou com o incremento nos níveis de mRNA do NOS3. Nenhuma influência foi observada sobre a expressão do miR-1303 após os tratamentos.

**Conclusão:** A liberação de NO pelas células endoteliais é aumentada por estatinas, mas não pelo inibidor da absorção de colesterol ezetimiba. Nossos resultados fornecem novas evidências sobre a participação dos miRs regulatórios 221/222 na liberação de NO mediada por estatinas. Embora a ezetimiba não tenha modulado os níveis de NO, a regulação negativa do miR-221 poderia envolver efeitos potenciais sobre a função endotelial. (Arq Bras Cardiol. 2015; 104(3):195-201)

**Palavras-chave:** Óxido Nítrico; Colesterol; Inibidores de Hidroximetilglutaril-CoA Redutases; Células Endoteliais; microRNAs.

### Abstract

**Background:** Nitric oxide (NO) has been largely associated with cardiovascular protection through improvement of endothelial function. Recently, new evidence about modulation of NO release by microRNAs (miRs) has been reported, which could be involved with statin-dependent pleiotropic effects, including anti-inflammatory properties related to vascular endothelium function.

**Objectives:** To evaluate the effects of cholesterol-lowering drugs including the inhibitors of cholesterol synthesis, atorvastatin and simvastatin, and the inhibitor of cholesterol absorption ezetimibe on NO release, NOS3 mRNA expression and miRs potentially involved in NO bioavailability.

**Methods:** Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were exposed to atorvastatin, simvastatin or ezetimibe (0 to 5.0  $\mu$ M). Cells were submitted to total RNA extraction and relative quantification of NOS3 mRNA and miRs -221, -222 and -1303 by qPCR. NO release was measured in supernatants by ozone-chemiluminescence.

**Results:** Both statins increased NO levels and NOS3 mRNA expression but no influence was observed for ezetimibe treatment. Atorvastatin, simvastatin and ezetimibe down-regulated the expression of miR-221, whereas miR-222 was reduced only after the atorvastatin treatment. The magnitude of the reduction of miR-221 and miR-222 after treatment with statins correlated with the increment in NOS3 mRNA levels. No influence was observed on the miR-1303 expression after treatments.

**Conclusion:** NO release in endothelial cells is increased by statins but not by the inhibitor of cholesterol absorption, ezetimibe. Our results provide new evidence about the participation of regulatory miRs 221/222 on NO release induction mediated by statins. Although ezetimibe did not modulate NO levels, the down-regulation of miR-221 could involve potential effects on endothelial function. (Arq Bras Cardiol. 2015; 104(3):195-201)

**Keywords:** Nitric Oxide; Cholesterol; Hydroxymethylglutaryl-CoA Reductase Inhibitors; Endothelial Cells; microRNAs.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Alvaro Cerda •

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 Bl. 17, Butantã. CEP 05508-000, São Paulo, SP – Brasil

E-mail: [alvarocerda@usp.br](mailto:alvarocerda@usp.br); [tmalvarocerda@gmail.com](mailto:tmalvarocerda@gmail.com)

Artigo recebido em 09/07/14; revisado em 01/09/14; aceito em 18/09/14.

DOI: 10.5935/abc.20140192

## Introdução

A dislipidemia é um fator-chave na patogênese da aterosclerose através da relação entre o excesso de colesterol e a composição de lipídios da placa. O conteúdo de colesterol está associado com o processo inflamatório através da modulação de citocinas inflamatórias, moléculas de adesão e outras moléculas relacionadas com a função endotelial na aterosclerose precoce<sup>1</sup>.

O óxido nítrico (NO) tem sido amplamente associado com proteção cardiovascular através da melhoria da função endotelial<sup>2,3</sup>. Vários mecanismos têm sido descritos como reguladores da expressão da sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS) e liberação de NO no endotélio, incluindo a regulação transcricional e pós-transcricional do gene que codifica a eNOS (*NOS3*), assim como modificações pós-transcripcionais<sup>4,5</sup>. A regulação pós-transcricional mediada por pequenos RNAs não codificantes demonstrou também ter participação neste processo e, desta forma, novas evidências sobre a modulação do NO por micro-RNAs (miRs) têm sido relatadas. Um exemplo de regulação de NO mediada por miRs é observado com os miRs-221/222 que foram relacionados à redução do mRNA do *NOS3* e redução da liberação do NO pelas células endoteliais<sup>6</sup>.

Terapias para reduzir o colesterol têm sido em grande parte relacionadas com redução do risco de doenças cardiovasculares. Entre elas, as estatinas são reconhecidas como os principais medicamentos para reduzir o colesterol, diminuindo o conteúdo de colesterol através da inibição da 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA redutase (HMG-CoA redutase), uma enzima com função-chave na biossíntese do colesterol endógeno<sup>7</sup>. Por outro lado, a ezetimiba também reduz o conteúdo de colesterol interagindo com o Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1), o que resulta em uma absorção reduzida de colesterol<sup>8</sup>. Além disto, uma série de efeitos pleiotrópicos foram descritos com a terapia com estatina, incluindo propriedades anti-inflamatórias relacionadas com a função do endotélio vascular<sup>9</sup>. Os mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos anti-inflamatórios da estatina, e se estes são dependentes da redução do colesterol intracelular, são fatos ainda controversos.

Neste estudo, nós analisamos os efeitos dos medicamentos redutores de colesterol, incluindo os inibidores da síntese do colesterol, atorvastatina e sinvastatina, e do inibidor da absorção do colesterol ezetimiba na liberação de NO, expressão do mRNA do *NOS3* e seus efeitos sobre a expressão de miRs relacionados com a modulação do mRNA do *NOS3*: miR-221, miR-222, bem como o miR-1303, um miR previsto por ferramentas de que tem interação com o mRNA do *NOS3*.

## Métodos

### Cultura de células, tratamentos e análise da viabilidade celular

Células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 44 mmol/L de bicarbonato

de sódio, 100 µg/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina. As células foram cultivadas a 37°C em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

Entre a quarta e a oitava passagem, as células foram tratadas com atorvastatina (gentilmente fornecida pela Pfizer Pharmaceuticals Ltd., Guarulhos, SP, Brasil), sinvastatina (Sigma, St Louis, MO, EUA) ou ezetimiba (gentilmente cedida pela Merck/Schering-Plough, NJ, EUA). A atorvastatina foi dissolvida em metanol, enquanto que a sinvastatina e a ezetimiba foram dissolvidas em etanol. A sinvastatina foi ativada pela incubação com 0.1N de solução de NaOH a 50°C durante 2 h, seguida de neutralização em pH 7,0 e ajuste da concentração para 5,6 mM. A concentração final de metanol ou etanol no meio de cultura não excedeu 0,1% e 0,2%, respectivamente.

A toxicidade dos medicamentos foi avaliada pela medida da porcentagem de células com perda de integridade de membrana e fragmentação de DNA. Sobre a integridade de membrana, as células ( $5 \times 10^5$ ) foram tratadas com cada medicamento e a porcentagem de células viáveis foi determinada por citometria de fluxo utilizando solução de iodeto de propídio (50 mg/mL em solução salina tamponada com fosfato), que intercala com o DNA e é incapaz de passar através de membranas intactas. Para o ensaio de fragmentação de DNA, a porcentagem de DNA fragmentado foi detectada por citometria de fluxo após as células ( $5 \times 10^5$ ) serem incubadas durante 2 h com uma solução hipotônica (citrato de sódio a 0,1% e Triton X-100 a 0,1%) contendo 50 mg/mL de iodeto de propídio.

Células (em número de 10.000) foram analisadas por citometria de fluxo (FACSCanto II, Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA). A fluorescência vermelha (iodeto de propídio) foi avaliada usando filtro a585 nm. Os dados foram adquiridos e analisados com o software FACS/Cell Quest (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA).

HUVEC ( $1,0 \times 10^6$  células/mL) foram tratadas com atorvastatina, sinvastatina ou ezetimiba por 24 h. As células foram incubadas durante 6 h (18 h após o início do tratamento com os medicamentos) com 10 ng/mL de TNF $\alpha$  humano (Invitrogen – Life Technologies, CA, EUA) para estimular uma resposta inflamatória, simulando a inflamação crônica observada na aterosclerose precoce. Após incubações, sobrenadantes das culturas celulares foram separados e as células foram submetidas à extração do RNA.

### Medição do óxido nítrico

A concentração de NO no sobrenadante de HUVEC tratadas com medicamentos para redução do colesterol foi determinada por ozônio-quimioluminescência usando o Sievers NO Analyzer 280 (GE Analytical Instruments, CO, EUA).

### Isolamento de RNA total

A extração do RNA das HUVEC foi realizada utilizando o kit de isolamento mirVana miRNA (Ambion Inc., TX, EUA), que separa o RNA total, incluindo a fração de miRNA, de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. A concentração de RNA foi medida por espectrofotometria usando NanoDrop® (NanoDrop Technologies Inc., DE,

EUA) e a integridade do RNA foi ainda avaliada usando o Bioanalyzer®2100 (Agilent Technologies, CA, EUA). Amostras com número de integridade do RNA (NIR) inferior a 5 não foram utilizadas para os experimentos com mRNA.

### Quantificação do mRNA do NOS3

O cDNA para a quantificação relativa do *NOS3* (NM\_000603.4) foi produzido a partir de 1 µg de RNA total com Superscript™ II Reverse Transcriptase (Life Technologies, CA, EUA). A expressão do mRNA do *NOS3* foi medida por PCR quantitativo (qPCR) em tempo real usando o sistema SYBR® Green. As sequências de iniciadores para transcrição de *NOS3* são descritas da seguinte forma: direto, 5'-TCCCCGGGTCCTGTGTATG-3'; e reverso, 5'-TCCATCAGGGCAGCTGCAAA-3'. Os ensaios de qPCR foram realizados em placas de 96 poços com o 7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies, CA, EUA).

Seis genes de referência [ubiquitina C (*UBC*), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPD*), beta-2-microglobulina (*B2M*), hipoxantina fosforibosil transferase I (*HPRTI*), subunidade A do complexo desidrogenase succinato (*SDHA*) e hidroximetilbilano sintase (*HMBS*)] foram testados e analisados com o software geNorm<sup>10</sup> para a escolha do gene com menor variabilidade para nosso modelo celular sob cada condição experimental. O gene mais estável nas condições experimentais foi o *HMBS*, e as sequências de primers utilizadas para este gene endógeno foram as seguintes: direto, 5'-GGCAATGCGGCTGCAA-3'; e reverso, 5'-GGGTACCCACGCGAATCAC-3'.

Todas as amostras foram analisadas em duplicata. A quantificação relativa da expressão gênica foi analisada com o método comparativo Ct usando a fórmula  $2^{-\Delta\Delta C_t^{11}}$  em células tratadas com o veículo estimulado por 6 horas com TNFα (10 ng/mL) como calibrador.

### Análise dos microRNAs

Os miR-221 e miR-222 (MI00000298 e MI00000299, respectivamente) foram selecionados de relatos anteriores da literatura, enquanto que o miR-1303 (MI0006370) foi escolhido usando ferramentas de bioinformática. A análise preditiva usando TargetScan ([www.targetscan.org](http://www.targetscan.org)) mostrou que o miR-1303 é um miR conservado com um elevado score para a interação mRNA-miR (percentil do *context score*: 99) e esta previsão foi adicionalmente confirmada usando os bancos de dados para predição do miRNA alvo, miRDB ([www.mirdb.org](http://www.mirdb.org)) e Target Miner ([www.isical.ac.in/~bioinfo\\_miu](http://www.isical.ac.in/~bioinfo_miu)).

A quantificação relativa de miR foi realizada por *stem loop* TaqMan® RT-qPCR (Life Technologies, CA, EUA). Primers *stem loop* específicos foram utilizados para sintetizar o cDNA a partir de 10 ng de RNA total utilizando o kit de transcrição de micro-RNA (Life Technologies, CA, EUA). Ensaios pré-desenhados foram adquiridos da Life Technologies para realizar a quantificação relativa usando o RNU24 como referência endógena. O RNU24 foi selecionado como a referência endógena mais estável entre 4 pequenos RNAs nucleolares (RNU24, RNU6B, RNU58, RNU44), que foram avaliados usando o *software* geNorm<sup>10</sup>.

### Análise estatística

Análises estatísticas foram realizadas com a utilização do Prism v5.0 para Windows (Graph Pad Software Inc., CA, EUA) e SPSS v. 15 para Windows (SPSS Inc., Madrid, Espanha). Os dados são apresentados como média ± EPM, e as diferenças entre as médias foram testadas por ANOVA unidirecional seguida pelo pós-teste de Tukey comparando cada tratamento com controle. O nível de significância estatística foi definido para  $p < 0,05$ .

### Resultados

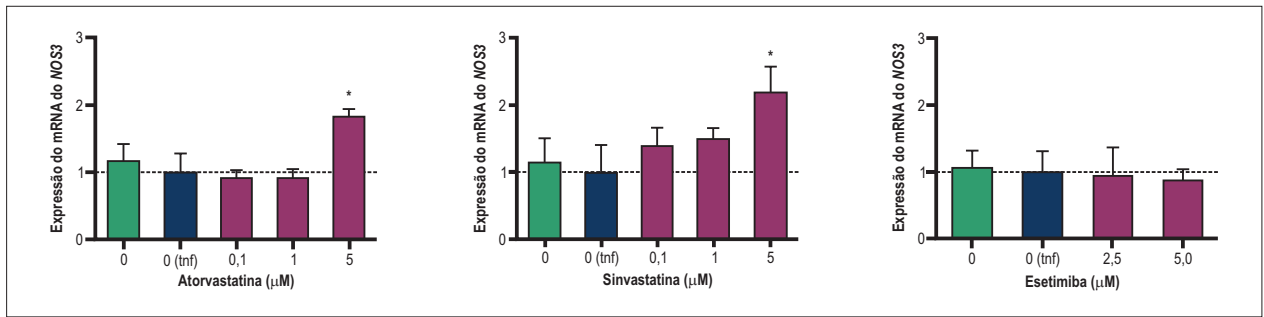
Após 24 horas de tratamento com estatinas, as HUVEC apresentaram aumento na perda de integridade da membrana (11% e 12% para a atorvastatina e sinvastatina, respectivamente) e aumento na fragmentação de DNA (31% e 28% para a atorvastatina e sinvastatina, respectivamente) em concentrações iguais ou acima de 10 µM. A viabilidade celular não foi afetada por qualquer tratamento – atorvastatina, sinvastatina ou ezetimiba – após a exposição por 24 h de até 5 µM de cada medicamento (dados não mostrados).

A estimulação da resposta inflamatória pelo TNFα não modificou a expressão do mRNA do *NOS3* ou a liberação de NO pelas células endoteliais, como observado nas Figuras 1 e 2, respectivamente. A atorvastatina e a sinvastatina aumentaram o mRNA do *NOS3* a 5 µM após 24 h ( $p < 0,05$ ), enquanto que nenhum efeito no mRNA do *NOS3* foi observado para a ezetimiba (Figura 1). Ambas as estatinas induziram a liberação de NO das HUVEC quando incubadas durante 24 h com 5 µM ( $p < 0,05$ ), enquanto que a ezetimiba não modificou a concentração de NO no sobrenadante (Figura 2).

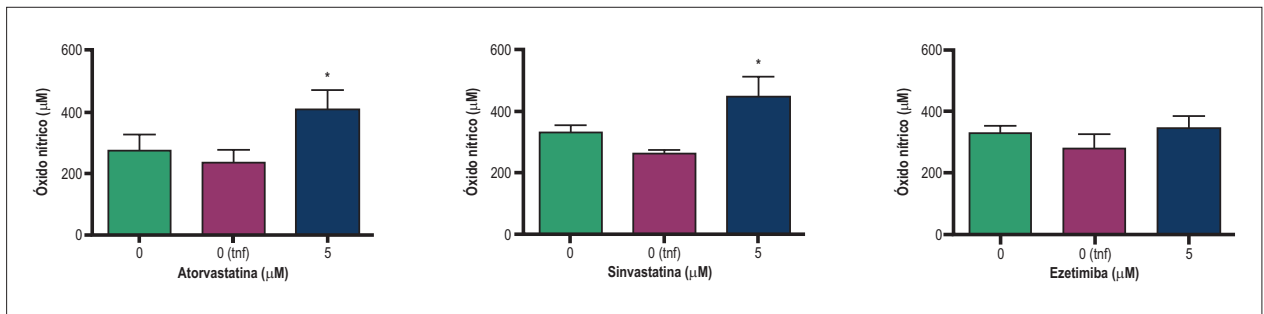
Os efeitos da atorvastatina, sinvastatina e ezetimiba na expressão de miR-221, miR-222 e miR-1303 são mostrados na Figura 3. A atorvastatina reduziu a expressão do miR-221 em concentrações de 1 e 5 µM e a expressão do miR-222 a 5 µM. A sinvastatina regulou negativamente somente o miR-221 a 5 µM após 24 h de tratamento, enquanto que a ezetimiba também reduziu a expressão do miR-221 a 5 µM. Além disto, a variação do miR-221 após o tratamento com 5 µM de atorvastatina e sinvastatina correlacionou negativamente com a expressão do mRNA do *NOS3* ( $r^2$ : -0,989 e 0,915 para atorvastatina e sinvastatina, respectivamente;  $p < 0,05$ ; dados não apresentados). A magnitude da variação do *NOS3* também correlacionou negativamente com a mudança do miR-222 após tratamento com estatina ( $r^2$ : -0,992 e 0,890 para atorvastatina e sinvastatina, respectivamente;  $p < 0,05$ ; dados não apresentados). Por outro lado, o miR-1303 não mostrou diferenças estatísticas após qualquer um dos tratamentos.

### Discussão

Neste estudo, a inibição da síntese do colesterol por estatinas, mas não a inibição da absorção do colesterol pela ezetimiba, modulou a liberação de NO pelas células endoteliais. Os nossos resultados mostram uma correlação entre a expressão do mRNA do *NOS3* e a liberação de NO por HUVEC tratadas com estatinas, como observado



**Figura 1** – Influência da atorvastatina, sinvastatina e ezetimiba na expressão do mRNA do NOS3 em HUVEC. As colunas e barras de erro representam a média e EPM e foram comparadas com o veículo de controle estimulado com TNFα [0 (tnf); linha pontilhada] por ANOVA unidirecional seguida do pós-teste de Tukey. As HUVEC foram tratadas durante 24 h e estimuladas com TNFα humano (10 ng/mL) 6 h antes da extração do RNA. Os dados foram obtidos de 4-6 experimentos independentes e a expressão do mRNA foi calculada usando o método do Ct comparativo utilizando-se o HMBS como referência endógena. (\*),  $p < 0,05$ .



**Figura 2** – Influência da atorvastatina, sinvastatina e ezetimiba na liberação de NO em HUVEC. As colunas e barras de erro representam a média e EPM e foram comparadas por ANOVA unidirecional seguida do pós-teste de Tukey. As células HUVEC foram tratadas durante 24 h e estimuladas com TNFα humano [10 ng/mL; 0 (tnf)] 6 h antes do isolamento do sobrenadante para medida do NO. Os dados foram obtidos a partir de 5 experimentos independentes e o NO foi medido por ozônio-quimioluminescência. (\*),  $p < 0,05$ .

anteriormente em culturas de células endoteliais expostas ao tratamento com fluvastatina<sup>12</sup>. Além disso, estudos anteriores também sugeriram que a regulação da eNOS e a liberação de NO por estatinas também são dependentes de modificações pós-transacionais. Por exemplo, Aoki e cols.<sup>12</sup> mostraram que além da regulação positiva do mRNA do NOS3, a fluvastatina também modifica o padrão de fosforilação das células endoteliais. Uma modificação pós-translacional semelhante foi observada em artérias isoladas de ratos tratados com sinvastatina<sup>13</sup>, o que também causou um aumento na fosforilação da eNOS na Ser<sup>1177</sup> através da regulação da PKB/Akt, processo que leva a um aumento na atividade enzimática e aumento na liberação de NO<sup>14</sup>.

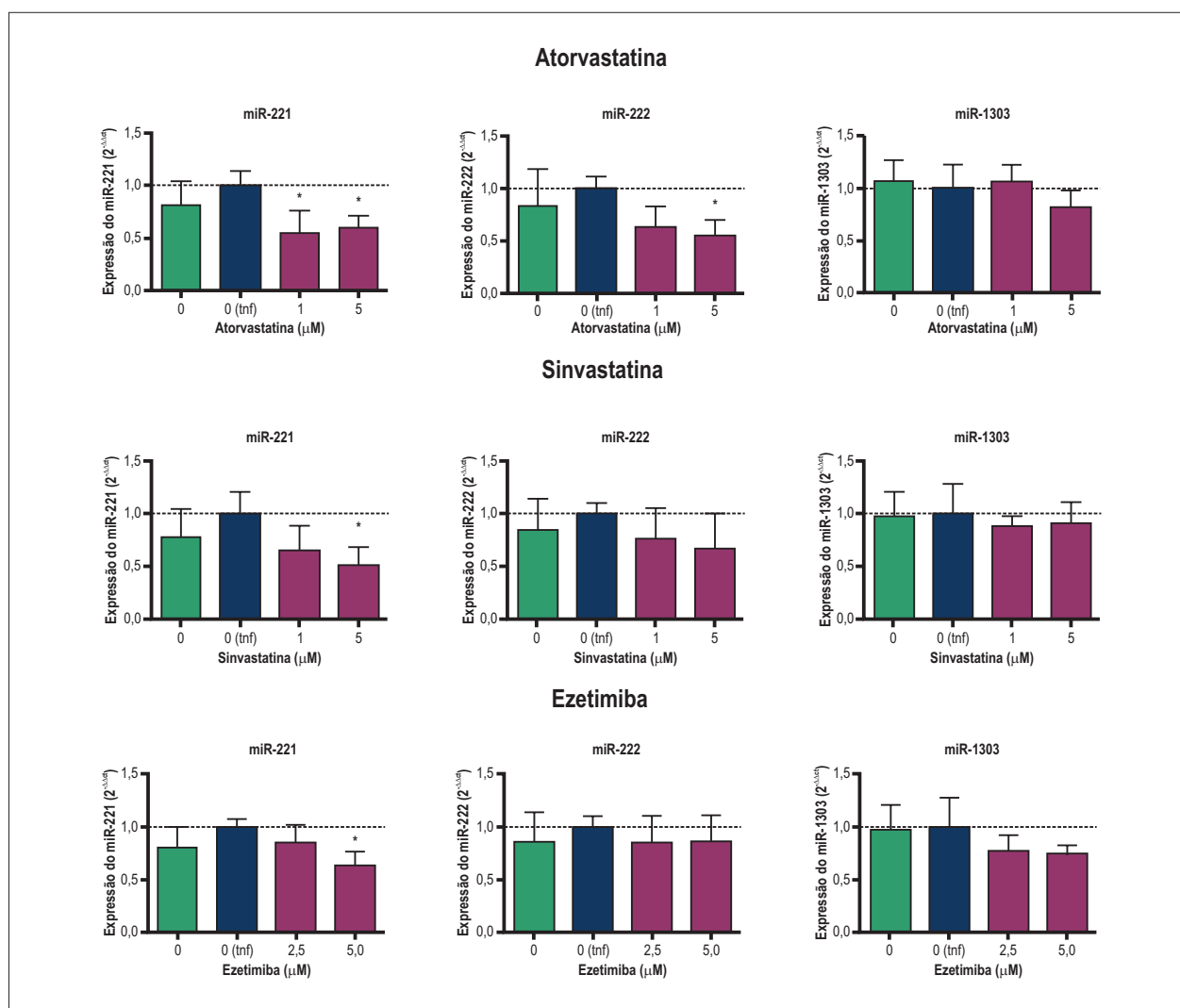
A modulação do NO por estatinas foi proposta como um mecanismo central pelo qual estes medicamentos podem exercer seus efeitos anti-inflamatórios no endotélio vascular. Devido a esta hipótese, estudos anteriores usando um modelo animal nocaute para o NOS3 foram realizados para avaliar se os efeitos pleiotrópicos das estatinas são dependentes da modulação da eNOS. A atorvastatina não reduziu a ativação NFκB ou o tamanho do infarto em camundongos eNOS<sup>-/-</sup> submetidos à oclusão da artéria coronária em comparação a camundongos do tipo selvagem<sup>15</sup>. De maneira semelhante, a rosuvastatina não atenuou as interações leucócito-endotélio em vênulas peri-intestinais de camundongos eNOS<sup>-/-</sup><sup>16</sup>. Estes dados sugerem que os efeitos anti-inflamatórios

observados com as estatinas exigem a liberação de NO pelo endotélio vascular; no entanto, dados recentes mostraram que os efeitos anti-inflamatórios das estatinas estavam também presentes em animais eNOS deficientes, assim como em camundongos eNOS<sup>-/-</sup> tratados com atorvastatina que apresentaram ativação plaquetária semelhante à de camundongos do tipo selvagem<sup>17</sup>.

Apesar dos resultados controversos sobre o papel da eNOS nos efeitos anti-inflamatórios induzidos por estatinas, é indubitável que uma liberação aumentada de NO no endotélio vascular por estes ou outros tratamentos é benéfica na redução do risco de doenças cardiovasculares. O surgimento de novos mecanismos moleculares de regulação da expressão de mRNA do NOS3 e a liberação do NO, como a regulação pós-transcricional por miRs, são muito interessantes para a compreensão deste processo e exploração de novos alvos terapêuticos.

Neste estudo, nós avaliamos o efeito das estatinas – atorvastatina e sinvastatina – bem como do inibidor de absorção de colesterol ezetimiba sobre a expressão de miR-221, miR-222 e miR-1303. A atorvastatina reduziu a expressão do miR-221 e miR-222, enquanto que a sinvastatina regulou negativamente somente o miR-221. Curiosamente, a ezetimiba também reduziu a expressão do miR-221, mostrando que a expressão deste miR poderia ser dependente da regulação





**Figura 3** – Influência da atorvastatina, sinvastatina e ezetimiba na expressão do miR-221, miR-222 e miR-1303 em HUVEC. As colunas e barras de erro representam a média e o EPM e foram comparadas com o veículo de controle estimulado com TNF $\alpha$  (0 tnf; linha pontilhada) por ANOVA unidirecional seguida do pós-teste de Tukey. As HUVEC foram tratadas durante 24 h e estimuladas com TNF $\alpha$  humano (10 ng/mL) 6 h antes da extração do RNA. Os dados foram obtidos a partir de 4 experimentos independentes e a expressão do mRNA foi calculada com o método do Ct comparativo utilizando-se o RNU24 como referência endógena. (\*),  $p < 0,05$ .

do colesterol intracelular, independentemente do mecanismo pelo qual o conteúdo de colesterol é modulado. Por outro lado, nenhum dos tratamentos modificou a expressão do miR-1303, demonstrando que a modulação do NOS3 e liberação de NO por estatinas não são dependentes deste miR, embora uma interação miR:mRNA tenha sido prevista pelas ferramentas de bioinformática. Uma limitação do nosso estudo é que nós focamos apenas sobre os efeitos das terapias para redução do colesterol na modulação do NO mediada por miRNA e não avaliamos os efeitos dos medicamentos sobre o nível de proteína eNOS ou suas modificações pós-transcricionais. Propomos aqui um mecanismo pelo qual as estatinas contribuem para a modulação da liberação do NO no endotélio vascular. No entanto, este mecanismo deve ser considerado um de uma série de ações mediadas por estatinas para melhorar a função endotelial.

Os miRs-221 e -222 têm demonstrado participação na progressão das doenças cardiovasculares<sup>18</sup>, como observado em lesões da artéria carótida de rato após angioplastia nas quais sua expressão aumentou<sup>19</sup>. Da mesma forma, os miRs-221/222 aumentaram em células progenitoras endoteliais de pacientes com doença arterial coronariana (DAC), e em pacientes com 12 meses de tratamento com atorvastatina mas não com pravastatina, diminuiu a expressão de miRs-221/222<sup>20</sup>. Estes resultados estão de acordo com a redução destes miRs mediada por estatinas em nosso estudo.

Células endoteliais transfectadas com miRs-221/222 mostraram uma redução no nível de proteína eNOS e liberação de NO<sup>21</sup>. No entanto, o mecanismo direto pelo qual estes miRs podem exercer este efeito é desconhecido, porque não há nenhuma região-alvo para miRs-221/222 na molécula de mRNA do NOS3, gerando uma interação

de mRNA:miR de acordo com a análise preditiva pela ferramentas de bioinformática. Portanto, é importante destacar que a modulação da eNOS pelos miRs-221/222 carece de uma explicação molecular, embora tenha sido demonstrada empiricamente. Por outro lado, Liu e cols. propuseram que os miRs-221/222 poderiam modular a proliferação de células de músculo liso no endotélio por visar a p27 (Kip1) e a p57 (Kip2)<sup>19</sup>. No entanto, nenhuma relação entre os miRs-221/222 com a modulação do NOS3 e liberação de NO foi relatada naquele estudo.

Uma importante extensão do nosso trabalho foi a avaliação do efeito sobre a expressão dos miRs estudados por um medicamento redutor de colesterol não estatina, a ezetimiba. Embora a maioria dos efeitos benéficos da ezetimiba em humanos se relacionem à sua capacidade de reduzir a absorção de colesterol no intestino, a influência desta droga em outros tecidos como o endotélio vascular é uma questão importante a ser investigada. Desta forma, a redução da expressão do miR-221 poderia ser considerada um importante indicador de possíveis efeitos pleiotrópicos da terapia com ezetimiba. Um estudo recente também avaliou o efeito da ezetimiba em um tecido extra-intestinal e mostrou que a ezetimiba inibe a diferenciação de monócito a macrófago induzida por PMA, e os autores sugeriram que um dos mecanismos envolvidos neste processo poderia ser a regulação dos miRs -155,-222,-424 e-503 pela ezetimiba neste modelo celular<sup>22</sup>. Embora a expressão do miR-222 não tenha sido modificada pela ezetimiba em nosso trabalho, as diferenças nos modelos celulares devem ser consideradas nesta divergência. Além disto, a redução da síntese de isoprenoides por estatinas – descritas como o principal mecanismo pelo qual estes medicamentos poderiam exercer seus efeitos anti-inflamatórios<sup>9</sup> – poderia também influenciar as diferenças observadas entre os inibidores da síntese e absorção de colesterol na modulação do NO endotelial observada neste estudo. Por outro lado, a redução observada do miR-221 sem um incremento na liberação de NO pela ezetimiba levou-nos a pensar que a redução deste miR não é necessariamente o único mecanismo de modulação da via do NO. No entanto, é possível propor que o uso da ezetimiba em uma terapia de combinação com uma estatina poderia resultar em mais

benefícios sobre a função endotelial; no entanto, outros estudos são necessários para elucidar esta hipótese.

## Conclusão

A regulação negativa dos miRs-221/222 induzida por estatina é um nova via potencial pela qual o tratamento para redução do colesterol poderia exercer seus efeitos benéficos na liberação de NO pelo endotélio humano. Além disto, a redução observada do miR-221 pela ezetimiba deve ser investigada no futuro como uma contribuição potencial deste fármaco na função endotelial, quando usado em uma terapia de combinação.

## Agradecimentos

O presente estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Projeto no. 15353/2010-8), São Paulo, Brasil. A. Cerda é beneficiário de uma bolsa da CAPES-Brasil. R.G. Basso, M.H. Hirata e R.D.C. Hirata são beneficiários de bolsas do CNPq-Brasil.

## Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa, análise e interpretação dos dados e revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Cerda A, Hirata MH, Hirata RDC; obtenção de dados: Cerda A, Moreno FC, Basso RG; Análise estatística e redação do manuscrito: Cerda A; obtenção de financiamento: Cerda A, Hirata RDC.

## Potencial Conflito de Interesse

Não há potenciais conflitos de interesse relevantes reportados para este artigo.

## Fontes de Financiamento

O presente estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

## Vinculação Acadêmica

Este artigo é parte de tese de Doutorado de Alvaro Cerda pela Universidade de São Paulo.

## Referências

1. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105(9):1135-43.
2. Förstermann U, Münzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation*. 2006;113(13):1708-14.
3. Lei J, Vodovotz Y, Tzeng E, Billiar TR. Nitric oxide, a protective molecule in the cardiovascular system. *Nitric Oxide*. 2013;35:175-85.
4. Searles CD. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006;291(5):C803-16.
5. Qian J, Fulton D. Post-translational regulation of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelium. *Front Physiol*. 2013;4:347.
6. Suárez Y, Fernández-Hernando C, Pober JS, Sessa WC. Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells. *Circ Res* 2007;100(8):1164-73.
7. Mangravite LM, Thorn CF, Krauss RM. Clinical implications of pharmacogenomics of statin treatment. *Pharmacogenomics J*. 2006;6(6):360-74.
8. Bays HE, Neff D, Tomassini JE, Tereshakovec AM. Ezetimibe: cholesterol lowering and beyond. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2008;6(4):447-70.
9. Mihos CG, Salas MJ, Santana O. The pleiotropic effects of the hydroxymethyl-glutaryl-CoA reductase inhibitors in cardiovascular disease: a comprehensive review. *Cardiol Rev*. 2010;18(6):298-304.

## Artigo Original

10. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002;3(7):RESEARCH0034.
11. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
12. Aoki C, Nakano A, Tanaka S, Yanagi K, Ohta S, Jojima T, et al. Fluvastatin upregulates endothelial nitric oxide synthase activity via enhancement of its phosphorylation and expression and via an increase in tetrahydrobiopterin in vascular endothelial cells. *Int J Cardiol.* 2012;156(1):55-61.
13. Rossoni LV, Wareing M, Wenceslau CF, Al-Abri M, Cobb C, Austin C. Acute simvastatin increases endothelial nitric oxide synthase phosphorylation via AMP-activated protein kinase and reduces contractility of isolated rat mesenteric resistance arteries. *Clin Sci (Lond).* 2011;121(10):449-58.
14. Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh R, et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature.* 1999;399(6736):597-601. Erratum in: *Nature* 1999;400(6746):792.
15. Ye Y, Martinez JD, Perez-Polo RJ, Lin Y, Uretsky BF, Birnbaum Y. The role of eNOS, iNOS, and NF-kappaB in upregulation and activation of cyclooxygenase-2 and infarct size reduction by atorvastatin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;295(1):H343-51.
16. Stalker TJ, Lefer AM, Scalia R. A new HMG-CoA reductase inhibitor, rosuvastatin, exerts anti-inflammatory effects on the microvascular endothelium: the role of mevalonic acid. *Br J Pharmacol.* 2001;133(3):406-12.
17. Ni R, Peleg T, Gross PL. Atorvastatin delays murine platelet activation in vivo even in the absence of endothelial NO synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(11):2609-15.
18. Pan ZW, Lu YJ, Yang BF. MicroRNAs: a novel class of potential therapeutic targets for cardiovascular diseases. *Acta Pharmacol Sin.* 2010;31(1):1-9.
19. Liu X, Cheng Y, Zhang S, Lin Y, Yang J, Zhang C. A necessary role of miR-221 and miR-222 in vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia. *Circ Res.* 2009;104(4):476-87.
20. Minami Y, Satoh M, Malsawa C, Takahashi Y, Tabuchi T, Itoh T, et al. Effect of atorvastatin on microRNA 221 / 222 expression in endothelial progenitor cells obtained from patients with coronary artery disease. *Eur J Clin Invest.* 2009;39(5):359-67.
21. Rippe C, Blimline M, Magerko KA, Lawson BR, LaRocca TJ, Donato AJ, et al. MicroRNA changes in human arterial endothelial cells with senescence: relation to apoptosis, eNOS and inflammation. *Exp Gerontol.* 2012;47(1):45-51.
22. Muñoz-Pacheco P, Ortega-Hernández A, Miana M, Cachafeiro V, Fernández-Cruz A, Gómez-Garre D. Ezetimibe inhibits PMA-induced monocyte/macrophage differentiation by altering microRNA expression: a novel anti-atherosclerotic mechanism. *Pharmacol Res.* 2012;66(6):536-43.