

# Arrays de ADNc y aterosclerosis

M. Alegret

Unidad de Farmacología. Departamento de Farmacología y Química Terapéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona. Barcelona. España.

---

La aterosclerosis es una enfermedad multifactorial cuya complejidad dificulta la comprensión completa de todos los mecanismos que pueden participar en su inicio y desarrollo. Además de la implicación de diversos tipos celulares (células endoteliales, células musculares lisas, macrófagos y otras células inflamatorias), una gran variedad de procesos fisiopatológicos (acumulación de lípidos, migración y apoptosis de células, inflamación, fenómenos trombóticos) pueden producirse en el entorno de la lesión, de forma más o menos intensa según el grado de su desarrollo. Por otra parte, a pesar de la utilización de fármacos hipocolesterolimiantes altamente efectivos, las enfermedades cardiovaseulares relacionadas con el proceso aterosclerótico constituyen la principal causa de muerte en Europa, Estados Unidos y la mayor parte de Asia<sup>1</sup>. Por ello, existe la necesidad de identificar todos aquellos posibles mediadores de la formación y evolución de las lesiones ateroscleróticas, lo que contribuirá a un mayor conocimiento de esta enfermedad y permitirá proponer nuevas dianas terapéuticas para su tratamiento y prevención.

Hasta hace relativamente poco tiempo, la aproximación utilizada para esta finalidad consistía en el estudio individual de los posibles genes o proteínas conectados con la aterosclerosis. Sin duda, este proceso era tan lento y costoso como buscar una aguja en un pajar. La reciente elucidación del genoma humano<sup>2,3</sup> y la existencia de herramientas como las matrices (*arrays*) de ADNc han abierto enormes posibilidades para estudiar de forma global la expresión de genes implicados en el desarrollo de diversas enfermedades, incluida la aterosclerosis.

---

Correspondencia: Dra. Marta Alegret Jordà.  
Unidad de Farmacología. Facultad de Farmacia.  
Avda. Diagonal, 643. 08028 Barcelona. España.  
Correo electrónico: alegret@ub.edu

Recibido el 10 de junio de 2004 y aceptado el 10 de julio de 2004.

La utilización de las tecnologías de matrices de ADNc ha permitido, en los últimos años, la identificación de cientos de genes candidatos en la aterosclerosis<sup>4</sup>. Los estudios se han realizado en células musculares lisas<sup>5,6</sup> o en células endoteliales<sup>7,8</sup> expuestas a estímulos proaterogénicos, así como en muestras procedentes de lesiones ateroscleróticas<sup>9-11</sup>. En particular, resultan de gran interés los experimentos que utilizan monocitos/macrófagos<sup>12-14</sup>, dado el papel clave de estas células en el origen, la progresión y la rotura de las placas ateroscleróticas<sup>15</sup>. La activación de los macrófagos y la formación de células espumosas son procesos mediados por cambios en la expresión génica en respuesta a diversos estímulos. Es posible generar células espumosas *in vitro* mediante el tratamiento de macrófagos derivados de monocitos humanos (HMDM) o de líneas celulares como las células THP-1 con lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas o acetiladas<sup>16</sup>. Estas formas de LDL modificadas ejercen diversos efectos sobre los macrófagos en el ARNm, la proteína y la función celular, que son predictivos de lo que sucede en la situación real *in vivo*, es decir, durante la formación de las células espumosas. La utilización de matrices en dichos modelos *in vitro* permite el análisis global de los cambios en la expresión génica, así como la identificación de posibles dianas farmacológicas en este tipo celular.

En este último aspecto, la genómica puede resultar una herramienta muy útil, no sólo para proponer dianas que sirvan de base para la búsqueda de nuevos fármacos dirigidos específicamente contra ellas, sino también para ampliar nuestros conocimientos sobre el mecanismo de acción de fármacos ya conocidos. En el presente número de CLÍNICA E INVESTIGACIÓN EN ARTERIOSCLEROSIS, Artieda et al<sup>17</sup> publican un interesante trabajo en el que, utilizando cultivos primarios de macrófagos humanos tratados con LDL oxidadas en ausencia o en presencia de atorvastatina, se analizan las diferencias en el perfil de expresión génica mediante

el uso de micromatrices de ADNc. Las micromatrices utilizan portas de cristal de dimensiones muy pequeñas como soporte para los ADNc o secuencias EST, y el número de genes aplicados es del orden de decenas de miles. Así, en el estudio de Artieda et al se estudian en conjunto más de 22.000 genes, de los cuales aproximadamente un 40% se expresan en el tipo celular utilizado. En cuanto al sistema de detección del nivel de expresión de cada gen, en la tecnología de micromatrices se utilizan colorantes fluorescentes, por lo que se requiere equipos de lectura e instalaciones de elevado coste económico.

En contraposición, las macromatrices consisten en membranas de nailon donde se depositan fragmentos de ADNc que serán hibridados a sondas radiactivas [<sup>32</sup>P] obtenidas de tejidos o células tratadas en diferentes condiciones. La intensidad de las marcas (*spots*) correspondientes a cada gen es proporcional al nivel de expresión de este gen en la célula en una situación determinada. Las membranas para la realización de estos estudios de matrices pueden obtenerse comercialmente, y la realización de este tipo de análisis puede realizarse de forma bastante sencilla en un laboratorio de biología molecular con instalaciones para utilizar un Phosphorimager con el que determinar cuantitativamente la radiactividad incorporada en cada punto de la membrana. Aunque el número de genes que se analiza es mucho más reducido en comparación con las micromatrices, hay membranas específicamente diseñadas en las que los ADNc de los genes implantados tienen relación con el metabolismo o la situación particular que se quiera analizar. Entre ellas se hallan las membranas que contienen ADNc relacionados directamente con el sistema cardiovascular, que pueden resultar de gran utilidad en el estudio concreto de la aterosclerosis en células relevantes en esta enfermedad, como los monocitos y los macrófagos. En nuestra experiencia, la utilización del *Atlas Human Cardiovascular Array* (Clontech) en macrófagos THP-1 tratados con LDL oxidadas nos ha permitido identificar 29 genes (un 5% del total de genes que contiene la membrana) cuya expresión ha resultado modificada por el tratamiento con atorvastatina<sup>18</sup>.

Sin embargo, a pesar de ser herramientas muy potentes, las matrices de ADNc tienen una serie de problemas potenciales que deben ser tenidos en cuenta antes de llegar a conclusiones acerca de los resultados obtenidos. Por ejemplo, puede haber errores en la fabricación de los chips que comprometan la fiabilidad de los fragmentos de ADNc inmovilizados en su superficie. De hecho, en algunos

estudios se ha comprobado que un porcentaje importante de los genes aplicados en la micromatriz no se corresponde con las secuencias correctas<sup>19</sup>. Por otra parte, en el caso de genes con secuencias prácticamente idénticas pueden producirse errores de discriminación; así, una sonda implantada correspondiente a una isoforma determinada de un gen puede no distinguir correctamente entre varias isoformas con un elevado grado de homología entre ellas. Por último, cuando se comparan los resultados de distintos tipos de matrices suelen existir notables diferencias en los perfiles de expresión obtenidos. Por todo ello, aunque las matrices son herramientas de cribado muy valiosas, resulta aconsejable confirmar los datos obtenidos mediante técnicas más tradicionales, como PCR o Northern blot.

Quizá la aplicación más interesante de las técnicas de matrices es el diseño de chips concretos que contienen la combinación de genes deseada para cada laboratorio con intereses específicos. Así, en el reciente XVII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Arteriosclerosis se han presentado los resultados de la puesta a punto y validación de una matriz diseñada para contener unos 200 genes implicados en el metabolismo lipídico y el ciclo celular<sup>20</sup>. A pesar de las limitaciones antes comentadas, la utilización de este tipo de matrices puede ser de gran utilidad para la comprensión global de la enfermedad aterosclerótica y abrir nuevas vías para su prevención y tratamiento.

## Bibliografía

1. Van Duin M, Woolson H, Mallinson D, Black D. Genomics in target and drug discovery. Biochem Soc Trans 2003;31:429-32.
2. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 2001;409:860-921.
3. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. Science 2001;291:1304-51.
4. Herrmann J. New kits on the blot: can we microarray the future of atherosclerosis? Cardiovasc Res 2003;60:220-2.
5. Sukhanov S, Hua SY, Delafontaine P. Global analysis of differentially expressed genes in oxidized LDL-treated human aortic smooth muscle cells. Biochem Biophys Res Commun 2003;306:443-9.
6. Johnson CD, Balagurunathan Y, Lu KP, Tadesse M, Falahatpisheh MH, Carroll RJ, et al. Genomic profiles and predictive biological networks in oxidant-induced atherogenesis. Physiol Genomics 2003;13:263-75.
7. Ohura N, Yamamoto K, Ichioka S, Sokabe T, Nakatsuka H, Baba A, et al. Global analysis of shear stress-responsive genes in vascular endothelial cells. J Atheroscler Thromb 2003;10:304-13.
8. Virgili F, Ambra R, Muratori F, Natella F, Majewicz J, Minihane AM, et al. Effect of oxidized low-density lipoprotein on differential gene expression in primary human endothelial cells. Antioxid Redox Signal 2003;5:237-47.

9. Faber BC, Heeneman S, Daemen MJ, Cleutjens KB. Genes potentially involved in plaque rupture. *Curr Opin Lipidol* 2002;13:545-52.
10. Hiltunen MO, Tuomisto TT, Niemi M, Brasen JH, Rissanen TT, Toronen P, et al. Changes in gene expression in atherosclerotic plaques analyzed using DNA array. *Atherosclerosis* 2002;165:23-32.
11. Randi AM, Biguzzi E, Falciani F, Merlini P, Blakemore S, Bramucci E, et al. Identification of differentially expressed genes in coronary atherosclerotic plaques from patients with stable or unstable angina by cDNA array analysis. *J Thromb Haemost* 2003;1:829-35.
12. Schiffman D, Mikita T, Tai JT, Wade DP, Porter JG, Seilhamer JJ, et al. Large scale gene expression analysis of cholesterol-loaded macrophages. *J Biol Chem* 2000;275:37324-32.
13. Andersson T, Borang S, Larsson M, Wirta V, Wennborg A, Lundberg J, et al. Novel candidate genes for atherosclerosis are identified by representational difference analysis-based transcript profiling of cholesterol-loaded macrophages. *Pathobiology* 2001;69:304-14.
14. Ohki R, Yamamoto K, Mano H, Lee RT, Ikeda U, Shimada K. Identification of mechanically induced genes in human monocytic cells by DNA microarrays. *J Hypertens* 2002;20:685-91.
15. Li AC, Glass CK. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nat Med* 2002;8:1235-42.
16. Jessup W, Kritharides L. Metabolism of oxidized LDL by macrophages. *Curr Opin Lipidol* 2000;11:473-81.
17. Artieda M, Cenarro A, Tejedor D, Gañán A, Álvarez P, Junquera C, et al. Perfil de expresión génica de macrófagos humanos en cultivo en respuesta a atorvastatina. *Clin Invest Arterioscler* 2004;16:175-84.
18. Llaverias G, Noe V, Penuelas S, Vázquez-Carrera M, Sánchez RM, Laguna JC, et al. Atorvastatin reduces CD68, FABP4, and HBP expression in oxLDL-treated human macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;318:265-74.
19. Kothapalli R, Yoder SJ, Mane S, Loughran TP Jr. Microarray results: how accurate are they? *BMC Bioinformatics* 2002;3:22-32.
20. Martínez-Botas Mateo J, Fernández Hernando C, Sánchez García J, Pastor Rojo O, Gómez-Coronado Cáceres D, Lasunción Ripa MA. Estudio de la expresión génica mediante matrices de ADNc en células deficientes de colesterol y paradas en G2/M. *Clin Invest Arterioscl* 2004;16:2.