

# Estudio farmacogenómico mediante *microarrays* en monocitos de pacientes con hiperlipemia familiar combinada tratados con atorvastatina

Jordi Pou<sup>a</sup>, Gemma Llaverias<sup>a</sup>, Emilio Ros<sup>b</sup>, Daniel Zambón<sup>b</sup>, Montserrat Cofán<sup>b</sup>, Juan Carlos Laguna<sup>a</sup> y Marta Alegret<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Unidad de Farmacología. Departamento de Farmacología y Química Terapéutica e Instituto de Biomedicina (IBUB). Universidad de Barcelona. CIBER Diabetes y Enfermedades Metabólicas asociadas (CIBERDEM). Instituto de Salud Carlos III. Barcelona. España.

<sup>b</sup>Unidad de Lípidos. Servicio de Endocrinología y Nutrición. IDIBAPS. Hospital Clínic. Barcelona. CIBER Fisiopatología Obesidad y Nutrición (CIBERONBN). Instituto de Salud Carlos III. Barcelona. España.

---

**Introducción y objetivo.** La hiperlipemia familiar combinada (HFC) es la hiperlipemia genética más común, y una causa frecuente de enfermedad cardiovascular prematura. Sin embargo, el origen genético de esta enfermedad todavía no se conoce totalmente. En el presente estudio, analizamos el perfil de expresión génica en monocitos de sangre periférica en un grupo de individuos control y en un grupo de pacientes con HFC antes y después del tratamiento con atorvastatina (ATV), con el objetivo de estudiar y profundizar en los mecanismos genéticos asociados a esta enfermedad, e identificar posibles dianas terapéuticas nuevas.

**Métodos y resultados.** Se aislaron monocitos de sangre periférica de individuos control y de pacientes con HFC, del mismo sexo y edad, antes y después del tratamiento con ATV. El perfil de expresión génica se obtuvo usando los *microarrays* GeneChip Human Genome U133A de Affymetrix, y los cambios en la expresión de los

Este estudio ha sido parcialmente subvencionado con fondos de la Fundació Privada Catalana de Nutrició i Lípids, Fundación Ramón Areces, CICYT (SAF2004-03045), Unión Europea FEDER, FIS (RTIC C01/01 y G03/181). Una comunicación referente a esta línea de trabajo fue presentada en el XIX Congreso Nacional de la SEA (Santander, 2006) y galardonada con una mención especial.

Los CIBER Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM) y Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERONBN) son iniciativas del Instituto de Salud Carlos III.

Correspondencia: Dra. M. Alegret Jordà.  
Unidad de Farmacología. Facultad de Farmacia.  
Diagonal 643. 08028 Barcelona. España.  
Correo electrónico: alegr@ub.edu

Recibido el 6 de marzo de 2008 y aceptado el 12 de marzo de 2008.

genes seleccionados se validaron posteriormente con la técnica de retro-transcripción de la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real. Nuestros resultados mostraron cambios en la expresión de numerosos genes implicados en funciones clave del macrófago, especialmente en la respuesta inflamatoria (*MNDA*, *IL1R2*, *ALCAM*, *LRIG1* y *DR3*), el control de la composición de la matriz extracelular (*FN1*, *SDC2* y *TFPI2*) y el metabolismo lipídico (*CD36*).

**Conclusiones.** Nuestros resultados indican que la HFC afecta de forma directa o indirecta al perfil de expresión génica en monocitos de sangre periférica. Los cambios en la expresión de algunos genes (*MNDA*, *CD36*, *TFPI2*, *LRIG1* y *DR3*) podrían atribuirse al entorno proinflamatorio que rodea los monocitos en la HFC, que es parcialmente revertido por el tratamiento con ATV. Por otra parte, los cambios en la expresión génica que no revierten tras el tratamiento con ATV podrían relacionarse con anomalías metabólicas del tejido adiposo (valores bajos de adiponectina y elevación de ácidos grasos libres y triglicéridos) que no se corrigen con este tratamiento.

**Palabras clave:**  
Hiperlipemia familiar combinada. Monocito. Macrófago. Atorvastatina. *Microarrays*.

---

## PHARMACOLOGICAL STUDY IN MONOCYTES OF PATIENTS WITH FAMILIAL COMBINED HYPERLIPIDEMIA TREATED WITH ATORVASTATIN USING MICROARRAYS

**Introduction and objective.** The genetic origin of familial combined hyperlipidemia (FCH) is not

well understood. We used peripheral blood monocytes as a suitable target for differential gene expression assessment in FCH.

**Methods and results.** Peripheral blood monocytes were isolated from male FCH patients basally and after atorvastatin treatment. Sex-, age- and adiposity-matched controls were also studied. Analysis of gene expression was performed using the GeneChip Human Genome U133A microarrays. Changes in the expression of selected genes were confirmed by real time RT-PCR. Our results showed the differential expression of genes involved in key macrophage functions, specially regarding the inflammatory response (*MNDA*, *IL1R2*, *ALCAM*, *LRIG1* and *DR3*), extracellular matrix control (*FN1*, *SDC2* and *TFPI2*) and lipid metabolism (*CD36*).

**Conclusions.** Monocyte gene expression profiling can provide insight into the pathogenesis of FCH. The results suggest that alterations in the expression of some genes (*MNDA*, *CD36*, *TFPI2*, *LRIG1* and *DR3*) may be related to a proinflammatory environment in FCH monocytes, which is partially reversed by atorvastatin. However, metabolic dysfunction in adipose tissue may account for lower adiponectin and higher FFA and triglyceride plasma levels in FCH, which are not corrected by treatment. These abnormalities could also trigger changes in gene expression that atorvastatin cannot modify.

**Key words:**

Familial combined hyperlipidaemia. Monocyte expression profiling. Macrophage. Atorvastatin. Microarrays.

La hiperlipemia familiar combinada (HFC) es la hiperlipemia genética más común en humanos, ya que afecta al 1-3% de la población general, y se asocia a un riesgo muy elevado de presentar enfermedad cardiovascular prematura<sup>1</sup>. El perfil lipídico de la HFC se caracteriza por hipercolesterolemia y/o hipertrigliceridemia, valores elevados de apolipoproteína (apo) B y de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (cLDL), valores reducidos de colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (cHDL) y la presencia de lipoproteínas de baja densidad (LDL) pequeñas y densas (sdLDL)<sup>2</sup>. Básicamente, la anomalía metabólica presente en esta enfermedad es la sobreproducción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), que puede ser consecuencia de un incorrecto metabolismo de los ácidos grasos libres (AGL)<sup>3</sup>. El incremento del estrés oxidativo y la inflamación son otras características que se asocian con este trastorno que pueden contribuir a un desarrollo acelerado de aterosclerosis<sup>4</sup>.

Se han relacionado un cierto número de regiones cromosómicas (1q21-23, 11p14.1-q12.1 y 16q22-24.1) con la patogenia de la HFC<sup>5</sup>, pero la base genética de esta enfermedad no se ha elucidado totalmente en la actualidad. Los *arrays* de expresión génica son herramientas muy útiles para estudiar los mecanismos moleculares subyacentes en la HFC, así como para aumentar el conocimiento sobre los mecanismos de acción de los fármacos utilizados actualmente para el tratamiento de esta enfermedad. Entre estos fármacos destacan los inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa, o estatinas. En el presente trabajo, se han estudiado las diferencias en el perfil de expresión génica en monocitos aislados de sangre periférica, procedentes de pacientes con HFC y de individuos sanos. Por otro lado, los pacientes con HFC se trataron con atorvastatina durante 4 semanas, período tras el cual se analizó el perfil de expresión génica nuevamente. El estudio se ha llevado a cabo en monocitos sanguíneos debido a que son células clave en el proceso aterogénico<sup>6</sup>.

## Métodos

### Pacientes

Se seleccionó a 12 varones asintomáticos con HFC en la Unidad de Lípidos del Hospital Clínic de Barcelona. El diagnóstico de HFC se realizó según Eurlings et al<sup>7</sup> en individuos con dislipemia mixta asociada a unos valores séricos de apo B 1,20 g/l; transmisión monogénica de hiperlipemia con fenotipo variable relativo a las lipoproteínas; ausencia de niños hipercolesterolemicos en la familia; historia familiar de enfermedad cardiovascular prematura, y ausencia del genotipo apo E 2/2. Se seleccionó a un grupo control de 12 varones sanos, con una edad y adiposidad similares al grupo HFC, entre los miembros del personal y los médicos del hospital. Todos los participantes dieron su consentimiento, previa información escrita del protocolo aprobado por el comité examinador local.

### Diseño del estudio

Los pacientes con HFC mantuvieron un período de 4 semanas previas al estudio en las cuales no tomaron ningún fármaco hipolipemiante. Pasado este período, se trataron con atorvastatina (40 mg/día) durante 4 semanas. Las muestras sanguíneas se recogieron una única vez en el grupo control, mientras que en los pacientes HFC se recogieron muestras de sangre al principio y después de las 4 semanas de tratamiento con atorvastatina.

### Parámetros plasmáticos

A excepción de la determinación de glucosa sanguínea y de lípidos, que se realizó en el momento de la extracción, las muestras séricas y plasmáticas se conservaron a -80 °C, utilizando ácido edético (EDTA, del inglés *ethylene diamine tetraacetic*) como anticoagulante, para analizarlas al final del estudio. La glucosa sérica se analizó con el método de la glucosa oxidasa. El colesterol y los triglicéridos se cuantificaron utilizando métodos enzimáticos. El cHDL se determinó por precipitación con ácido fosfotungstico y cloruro de magnesio. El

cLDL se estimó utilizando la ecuación de Friedewald et al<sup>8</sup>, excepto en los pacientes con triglicéridos > 300 mg/dl, en los que éste se midió mediante ultracentrifugación<sup>7</sup>. Las apo A-1 y B y la lipoproteína A se determinaron por turbidimetría. En los individuos con diagnóstico clínico de HFC, el genotipo de apo E se determinó por el método de Wenham et al<sup>9</sup>. Los AGL se determinaron por métodos colorimétricos enzimáticos (Wako, Neuss, Alemania). La leptina y la adiponectina se determinaron por ensayo radioimmunológico (Linco Research, St Charles, MO, Estados Unidos), y la proteína C reactiva mediante inmunofelometría. La fibronectina (FN) y los receptores solubles de factor de necrosis tumoral (sTNF-R) se cuantificaron por técnicas de ELISA (Bender MedSystems GmbH, Viena, Austria). Todos los análisis se realizaron por duplicado.

#### Obtención de monocitos a partir de sangre periférica

La fracción celular mononucleada se aisló a partir de 50 ml de sangre periférica mediante centrifugación en gradiente de densidad mediante el reactivio Ficoll-Paque (Amersham Biosciences Corp., Pisacataway, Estados Unidos). Las células se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) sin calcio ni magnesio, pH 7,4, y se resuspendieron en medio RPMI-1640 (25 mM HEPES, 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina, 1% de glutamina, 1% de aminoácidos no esenciales y 2% de piruvato sódico). Para purificar los monocitos por adhesión en placas de cultivo, las células se sembraron a una densidad de  $0,8 \times 10^6$  células/ml, y después de 2 h a 37 °C a un 5% de CO<sub>2</sub>, se lavaron con PBS con el fin de eliminar las células no adhrentes. Este método proporcionó unas preparaciones de monocitos con una pureza superior al 92%, como se pudo comprobar por citometría de flujo usando un sistema bicolor (CD14-FITC/CD64-PE) de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Estados Unidos).

#### Aislamiento del ácido ribonucleico total e hibridación con el array

El ARN total se aisló de los monocitos usando Trizol (Invitrogen Corp.), y posteriormente se purificó usando el *kit* RNeasy (Qiagen Inc, Valencia, Estados Unidos), cuantificado por espectofotometría a 260 nm, y su pureza se comprobó a partir de la relación de absorbancias a 260-280 nm. La integridad del ARN se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa.

Se prepararon un total de 9 grupos de muestras (*pools*), 3 por cada condición: control (CT), HFC antes del tratamiento (HFC) y después del tratamiento con atorvastatina (HFC + ATV). Cada *pool* se preparó con la misma cantidad de ARN procedente de cultivos individuales de monocitos. Los *pools* de ARN se utilizaron para analizar el perfil de expresión génica usando el *Gene-Chip Human Genome U133A 2.0 Array* de Affymetrix.

#### Procesamiento de los datos y análisis estadístico

Los arrays se escanearon y las imágenes obtenidas se cuantificaron de acuerdo con el procedimiento estándar de Affymetrix, con el fin de obtener la intensidad de señal para cada gen en cada array. Los valores de expresión se normalizaron utilizando el método RMA (del inglés *robust multi-array average*)<sup>10</sup>. Antes de analizar los datos, éstos se filtraron para eliminar genes de señal baja y genes de variabilidad baja. La selección de genes diferencialmente expresados en las diferentes condiciones se basó en un modelo lineal de análisis con moderación empírica de Bayes de las variancias estimadas, siguiendo la metodología desarrollada por Smyth<sup>11</sup>. Se

consideraron diferencialmente expresados los genes cuya variación mostró un valor de  $p \leq 0,01$ .

#### Retro-transcripción de la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

Con el fin de confirmar los patrones de expresión de los genes sobreexpresados y reprimidos, se seleccionaron una serie de genes para un análisis posterior usando la técnica de retro-transcripción de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. Para ello, el ácido desoxirribonucleico (ADN) complementario se sintetizó a partir de las mismas muestras de ARN utilizadas en los arrays, mezclando 0,5 µg de ARN total, 125 ng de *random hexamers* en presencia de 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dithiothreitol, 200 U de transcriptasa reversa (*Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase*), 20 U de ARNsin, 0,5 mM de cada dNTP (Sigma), y tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8,3). Las muestras se incubaron a 37 °C durante 60 min. La PCR a tiempo real se realizó utilizando un sistema Perkin-Elmer ABI Prism 7700 y sondas TaqMan (tabla 1) procedentes de Applied Biosystems, Foster City, Estados Unidos. Como control interno, se utilizó el gen de la gliceralehído-3-fosfato deshidrogenasa. Para el análisis de los datos se utilizó el *sequence detector software* (SDS 1.9.1). Para cada curva de amplificación se obtuvo un valor de umbral ( $C_T$ ), y después de normalizar por el gen de referencia *GAPDH*, se calculó la relación de expresiones para cada gen, basada en la diferencia entre las  $C_T$  de la muestra y el control correspondiente. El análisis estadístico se realizó por el método t test utilizando el programa GraphPad Instat.

**Tabla 1. Sondas TaqMan®**

Nombre del gen	Símbolo	Identificador de sonda
<i>Activated leukocyte adhesion cellular molecule</i>	ALCAM	Hs00233455_m1
<i>CD163</i>	CD163	Hs00174705_m1
<i>CD36</i>	CD36	Hs00169627_m1
<i>CD96</i>	CD96	Hs00175524_m1
<i>Fibronectin 1</i>	FN1	Hs00415006_m1
<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	GAPDH	Hs99999905_m1
<i>Grancalcin</i>	GCA	Hs00201854_m1
<i>Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 13</i>	GNA13	Hs00183573_m1
<i>Interleukin 1 receptor, type II</i>	IL1R2	Hs00174759_m1
<i>Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1</i>	LRIG1	Hs00394267_m1
<i>Microphthalmia-associated transcription factor</i>	MITF	Hs00165156_m1
<i>Myeloid cell nuclear differentiation antigen</i>	MNDA	Hs00159210_m1
<i>Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3</i>	NOR 1	Hs00545007_m1
<i>Syndecan 2</i>	SDC2	Hs00299807_m1
<i>Tissue factor pathway inhibitor 2</i>	TFPI2	Hs00197918_m1
<i>Translocase of outer mitochondrial membrane 70 homolog A</i>	TOMM 70A	Hs00207896_m1
<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25</i>	DR3	Hs00237054_m1

## Resultados

### Características clínicas

En la tabla 2 se resumen las características clínicas de los 2 grupos del estudio. Los pacientes HFC y los individuos control presentaron valores similares de presión sanguínea y de glucemia, pero diferencias marcadas en cuanto al perfil lipídico. Los valores de AGL fueron más altos en el grupo HFC que en los CT, mientras que las concentraciones plasmáticas de adiponectina resultaron ser menores.

### Tratamiento con atorvastatina

En la tabla 2 se muestran los cambios en las concentraciones de lípidos y de lipoproteínas séricas en el grupo HFC después de 4 semanas de tratamiento con atorvastatina a una dosis de 40 mg/día. Los cambios en el colesterol total (-39%), cLDL (-47%), cHDL (4%), triglicéridos (-36%), y apo B (-34%) fueron todos estadísticamente significativos. No se observaron cambios por lo que respecta a adiposidad, presión sanguínea, glucemia y valores circulantes de leptina y adiponectina.

### Genes diferencialmente expresados

Nuestros resultados mostraron la expresión diferencial de 82 genes diferencialmente expresados en monocitos de pacientes HFC respecto a los del grupo CT, de los cuales 46 se encontraban reprimidos y 36, sobreexpresados. Cuando se comparó el perfil de expresión génica en monocitos de pacientes HFC antes y transcurridas las 4 semanas de tratamiento con atorvastatina (HFC + ATV frente a HFC), se hallaron 88 genes diferencialmente expresados, 36 reprimidos y 52 sobreexpresados.

Con el objetivo de validar estos resultados, se seleccionaron diversos genes, a partir del cambio de expresión observado y/o a su función, para un análisis posterior mediante PCR a tiempo real (tablas 3 y 4).

### Genes diferencialmente expresados en monocitos de pacientes HFC frente a control

Uno de los genes más reprimidos en los pacientes HFC según el análisis de los arrays fue *myeloid cell*

**Tabla 2. Características de los grupos del estudio y efectos del tratamiento durante 4 semanas con atorvastatina en los pacientes de hiperlipemia familiar combinada**

Variables	Control (n = 12)	HFC (n = 12)		p*	p**
		Valores basales	Tratamiento		
Edad, años	55 ± 12	54 ± 10	—	0,881	—
Índice de masa corporal, kg/m <sup>2</sup>	27,1 ± 2,6	26,9 ± 2,6	26,9 ± 2,5	0,850	0,523
Peso, kg	76,7 ± 6,2	78,8 ± 9,2	78,9 ± 9	0,519	0,536
Perímetro abdominal, cm	98 ± 8	97 ± 8	97 ± 8	0,762	0,339
PA sistólica, mmHg	2 (17)	2 (17)	—	—	—
PA diastólica, mmHg	128 ± 12	132 ± 11	132 ± 11	0,404	0,449
Perímetro abdominal, cm	82 ± 7	84 ± 10	83 ± 9	0,576	0,413
Control de la glucemia					
Glucosa circulante, mg/dl	88 ± 6	90 ± 8	88 ± 4	0,592	0,385
Insulina circulante, mU/l	18,0 ± 13,1	16,9 ± 5,5	16,2 ± 5,2	0,791	0,665
Ácidos grasos libres, µmol/l	213 (111-289)	371 (228-642)	388 (248-532)	0,013	0,386
Lípidos, mg/dl					
Colesterol total	210 ± 29	338 ± 50	206 ± 34	< 0,001	< 0,001
cLDL	137 ± 20	234 ± 47	123 ± 31	< 0,001	< 0,001
cHDL	53 ± 9	47 ± 7	49 ± 7	0,054	< 0,001
Triglicéridos	91 (69-107)	250 (206-292)	159 (135-195)	< 0,001	0,002
Apolipoproteína B, g/l	1,06 ± 0,13	1,58 ± 0,24	1,04 ± 0,16	< 0,001	< 0,001
Apolipoproteína AI, g/l	1,36 ± 0,17	1,30 ± 0,12	1,34 ± 0,09	0,390	0,084
Moléculas señalizadoras					
Leptina, ng/ml	9,4 ± 4,7	11,6 ± 4,9	11,7 ± 4,7	0,274	0,939
Adiponectina, µg/ml	6,7 ± 2,1	4,8 ± 1,7	5,0 ± 2,2	0,023	0,597
Proteína C reactiva ultrasensible, mg/l	2,25 (1,57-3,70)	2,20 (1,07-3,07)	1,40 (0,90-2,70)	0,887	0,037
sTNF-R 60 kDa, ng/ml	2,42 (1,78-3,11)	2,27 (1,98-2,60)	2,15 (1,71-2,35)	0,551	0,041
sTNF-R 80 kDa, ng/ml	6,05 (4,85-11,56)	5,08 (4,08-6,72)	6,18 (4,35-7,26)	0,211	0,407
Fibronectina, µg/ml	45,3 ± 15,7	45,7 ± 18,8	29,3 ± 14,2	0,902	0,045

\*Las diferencias entre los grupos control y HFC se hallaron mediante el test t de datos no apareados o el test de Mann-Whitney.

\*\*Las diferencias en el grupo HFC antes y después del tratamiento se hallaron mediante el test t de datos apareados o el test de Wilcoxon.

cHDL: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad; cLDL: colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad; HFC: hiperlipemia familiar combinada; PA: presión arterial; sTNF-R: receptor soluble del factor de necrosis tumoral.

Datos expresados como media ± desviación estándar o mediana (rango intercuartílico).

**Tabla 3. Selección de genes diferencialmente expresados en monocitos de pacientes con hiperlipemia familiar combinada respecto a los individuos control**

Nombre	Símbolo	HFC + frente a CT (cociente)	p	Número de acceso GenBank	Función
<i>Myeloid cell nuclear differentiation antigen</i> <i>CD36</i>	<i>MNDA</i>	0,33	0,0001	NM_002432	Crecimiento y diferenciación/defensa celular/apoptosis
	<i>CD36</i>	0,42	0,0058	NM_000072	Transporte y metabolismo de lípidos/adhesión celular/coagulación
<i>Grancalcin</i>	<i>GCA</i>	0,43	0,0013	NM_012198	Unión a calcio/adhesión celular/inflamación
<i>Interleukin 1 receptor, type II</i> <i>CD163</i>	<i>IL1R2</i>	0,43	0,0004	NM_004633	Respuesta inmunitaria/inflamación
	<i>CD163</i>	0,47	0,0011	NM_004244	Receptor <i>scavenger</i> /metabolismo de hemoglobina/inflamación
<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25</i>	<i>DR3</i>	1,48	0,0099	U94510	Apoptosis/inflamación
	<i>LRIG1</i>	1,80	0,0040	AB050468	Señalización vía EGFR/crecimiento celular
<i>Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1</i>	<i>MITF</i>	1,95	0,0070	NM_000248	Crecimiento y diferenciación/regulación de transcripción/inflamación
<i>Syndecan 2</i>	<i>SDC2</i>	2,50	0,0002	AL577322	Proteína de unión a citoesqueleto/adhesión célula-célula y célula-matriz
<i>Activated leukocyte cell adhesion molecule</i> <i>Fibronectin 1</i>	<i>ALCAM</i>	2,60	0,0003	AA156721	Respuesta a patógenos/inflamación/adhesión celular
	<i>FN1</i>	2,60	0,0002	BC005858	Componente estructural de ECM/adhesión celular
<i>Tissue factor pathway inhibitor 2</i>	<i>TFPI2</i>	3,80	0,0009	L27624	Remodelación de ECM/inhibidor de serina proteasas

La tabla muestra el nombre, la expresión relativa respecto la situación control, el valor de p y el número de acceso de GenBank de una selección de genes que resultaron expresados diferencialmente en monocitos de pacientes con HFC respecto a los controles. La última columna indica la categoría funcional a la que pertenece cada gen. Los resultados son la media de 3 experimentos independientes realizados para cada condición.

CT: individuos control; ECM: extracellular matrix; EGFR: receptor para el factor de crecimiento epidérmico; HFC: hiperlipemia familiar combinada.

*nuclear differentiation antigen (MNDA)*, con una relación de expresión génica entre HFC y CT (cociente) de 0,33. Los resultados obtenidos por PCR a tiempo real confirmaron la disminución de expresión de *MNDA* (cociente de 0,42). También se utilizó este método para confirmar la represión del receptor de tipo 2 de la interleucina 1 (*IL1R2*), con un cociente del array de 0,43, y un cociente de PCR de 0,37. Otros genes cuya expresión resultó disminuida fueron grancalcina (cociente del array 0,43, cociente de PCR 0,46), *CD36* (cociente del array 0,42, cociente de PCR 0,52) y *CD163* (cociente de 0,47, en ambos casos).

Diversos genes relacionados con la matriz extracelular, y el desarrollo y estabilidad de la placa de ateroma también resultaron modificados en los pacientes HFC respecto al grupo CT. Así, la expresión del gen inhibidor de la vía del factor tisular 2 (*TFPI 2*), resultó incrementada 3,8 veces según los resultados del array, y 6,5 veces según los resultados obtenidos por PCR a tiempo real. También resultaron sobreexpresados los genes *FN 1* (cociente del array 2,6, co-

ciente de PCR 2,45) y *syndecan 2 (SDC2*, cociente del array 2,5, cociente de PCR 2,49). Otros genes cuya expresión fue significativamente más alta en muestras de monocitos de pacientes con HFC que en controles fueron *activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM*, cociente de array 2,6, cociente de PCR 2,76), *leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains (LRIG1*, cociente del array 1,80, cociente de PCR 2,52), y *microphthalmia-associated transcription factor (MITF*, cociente del array 1,95, cociente de PCR 2,55). Además, se analizó la expresión del miembro 25 de la superfamilia de receptores de TNF (TNFRSF 25, también denominado *death receptor 3 [DR3]*), que resultó incrementada por ambos métodos (cociente del array 1,48, cociente de PCR 1,84).

#### *Genes diferencialmente expresados en monocitos de pacientes HFC después del tratamiento con atorvastatina*

Tres de los genes que se sobreexpresaron en los pacientes con HFC, *TFPI2*, *LRIG1* y *DR3*, resulta-

**Tabla 4. Selección de genes diferencialmente expresados en monocitos de pacientes con hiperlipemia familiar combinada (HFC) después del tratamiento con atorvastatina (HFC + ATV) comparados con la situación basal (HFC)**

Nombre	Símbolo	HFC + ATV frente a HFC (cociente)	p	Número de acceso GenBank	Función
<i>Matrix metallopeptidase 10</i>	<i>MMP10</i>	0,51	0,0018	NM_002425	Remodelación de ECM
<i>CD96</i>	<i>CD96</i>	0,52	0,0007	NM_005816	Respuesta inmunitaria
<i>Tissue factor pathway inhibitor 2</i>	<i>TFPI2</i>	0,58	0,0025	L27624	Remodelación de ECM/inhibidor de serina proteasas
<i>Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1</i>	<i>LRIG1</i>	0,59	0,0032	AB050468	Señalización vía EGFR/crecimiento celular
<i>Lipoprotein lipase</i>	<i>LPL</i>	0,61	0,0071	BF672975	Metabolismo de ácidos grasos
<i>Translocase of outer mitochondrial membrane 70 A</i>	<i>TOMM70A</i>	0,71	0,0090	NM_014820	Unión a proteínas
<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25</i>	<i>DR3</i>	0,72	0,0097	U94510	Apoptosis/inflamación
<i>Interleukin 1 receptor, type II</i>	<i>IL1R2</i>	1,47	0,0094	NM_004633	Respuesta inmunitaria/inflamación
<i>ATP-binding cassette, sub-family A, member 1</i>	<i>ABCA1</i>	1,57	0,0083	AF285167	Transporte de colesterol
<i>Interferon, alpha-inducible protein 6</i>	<i>IFI6</i>	1,66	0,0084	NM_022873	Respuesta inmunitaria
<i>Interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U)</i>	<i>IFITM3</i>	1,73	0,0051	BF338947	Respuesta inmunitaria
<i>Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 13</i>	<i>GNA13</i>	2,14	0,0028	NM_006572	Señalización (proteínas G)
<i>Myeloid cell nuclear differentiation antigen</i>	<i>MNDA</i>	2,12	0,0016	NM_002432	Crecimiento y diferenciación/defensa celular/apoptosis
<i>CD36</i>	<i>CD36</i>	2,30	0,0019	BE968792	Transporte y metabolismo de lípidos/adhesión celular/coagulación

La tabla muestra el nombre, la expresión relativa respecto la situación control, el valor de p y el número de acceso de GenBank de una selección de genes que resultaron expresados diferencialmente en monocitos de pacientes con HFC respecto a los controles. La última columna indica la categoría funcional a la que pertenece cada gen. Los resultados son la media de 3 experimentos independientes realizados para cada condición. ECM: extracellular matrix; EGFR: receptor para el factor de crecimiento epidérmico.

ron reprimidos en respuesta al tratamiento con atorvastatina. Así, según los resultados obtenidos a partir del análisis de arrays, la relación de expresión entre los grupos HFC + ATV y HFC (cociente) fue de 0,58, 0,59 y 0,72, respectivamente. Estos resultados se confirmaron por PCR a tiempo real (cociente de 0,29 para *TFPI2* y 0,51 para *LRIG1* y *DR3*). Otros genes reprimidos debido al tratamiento y elegidos para la validación fueron *CD96* y la translocasa de la membrana externa mitocondrial 70A (*TOMM70A*) (cociente de array 0,52 y 0,71, respectivamente). Para ambos genes, se observó también una menor expresión cuando se analizó por PCR, aunque de forma menos evidente (0,73 y 0,81, respectivamente).

Por otra parte, la expresión de los genes *CD36* y *MNDA*, que es más baja en muestras de HFC respecto los CT, resultó incrementada tras el trata-

miento con atorvastatina. Estos resultados también se confirmaron por PCR a tiempo real: *CD36* (cociente de array 2,30, cociente de PCR 1,67); *MNDA* (cociente de array 2,312 cociente de PCR 1,79). En cambio, la expresión de *guanine nucleotide binding protein α 13 (GNA13)*, *nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3 (NOR1)*, e *IL1R2*, que resultó incrementada por el tratamiento según los resultados de los arrays, no resultó significativamente modificada cuando se analizó por PCR a tiempo real.

## Discusión

La patogenia y las anomalías genéticas que se asocian a la HFC no se conocen completamente. En este estudio, se examinó el perfil de expresión génica en monocitos de individuos control sanos normolipémicos y de pacientes afectados por HFC,

antes y después de un tratamiento de 4 semanas con atorvastatina.

Aparte de las diferencias en el perfil lipídico, y pese a una adiposidad similar, los pacientes HFC mostraron valores elevados de AGL y reducidos de adiponectina, en comparación con los CT (tabla 2). Estos resultados coinciden con los de Van der Vleuten et al<sup>12</sup>, que muestran que los valores de adiponectina están reducidos en pacientes HFC, independientemente de la adiposidad, y sugieren un papel del tejido adiposo en la patofisiología de esta enfermedad<sup>4</sup>. Los valores de proteína C reactiva se hallan incrementados de forma similar en pacientes HFC y en el grupo control, hecho que se podría explicar por la asociación positiva entre el sobre peso/obesidad y las concentraciones de PCR<sup>13</sup>. El tratamiento con atorvastatina redujo las concentraciones de lípidos plasmáticos, así como los valores de proteína C reactiva y de otras moléculas inflamatorias (tabla 2), efecto que se relaciona con las propiedades antiinflamatorias de las estatinas<sup>14</sup>.

En cuanto al perfil de expresión génica, el análisis muestra la expresión diferencial de 82 genes en el grupo HFC en comparación con el grupo CT, y de 88 genes en el grupo HFC tras el tratamiento con atorvastatina en comparación con la situación basal. Muchos de los genes que se hallaron diferencialmente expresados están relacionados con funciones clave en el macrófago y el desarrollo de aterosclerosis, como la respuesta inflamatoria e inmunitaria, el control de la composición de la matriz extracelular (ECM) y el metabolismo lipídico.

Uno de los genes cuya expresión resultó más reprimida en los monocitos de los pacientes con HFC

fue *MNDA* (fig. 1), miembro de la familia de proteínas inducibles por interferón p200, que se encuentra implicada en la regulación del crecimiento y la diferenciación celular<sup>15</sup>. Se ha descrito que proteínas de esta familia interactúan con un elevado número de factores de transcripción proinflamatorios, como por ejemplo AP-1 y NF-κB<sup>16</sup>. Resulta interesante que *MNDA* fue también uno de los genes más reprimidos en un estudio de expresión génica en macrófagos expuestos a LDL oxidadas<sup>17</sup>. El significado biológico de estos cambios todavía se desconoce, pero dado que *MNDA* promueve la supervivencia celular, la represión de este gen en la formación de la célula espumosa podría acelerar la muerte de estas células<sup>18</sup>, uno de los eventos clave en el desarrollo de la placa de ateroma.

El entorno proinflamatorio presente en la HFC podría afectar a la expresión de diversos genes que responden a este estímulo, o bien que se encuentran relacionados con la cascada inflamatoria. La interleucina (IL) 1 es una citocina multifuncional, cuya vía de señalización se inicia con la unión al receptor tipo 1 de IL-1 (IL1R1). La señalización mediante IL-1 activa la síntesis de sustancias vasoactivas, factores de crecimiento y citocinas; esta vía proinflamatoria se regula mediante el receptor de tipo 2 (IL1R2), un receptor *decoy* que no transduce la señal, y que es la forma predominante de receptor de IL-1 en monocitos<sup>19</sup>. Nuestros resultados indican una disminución de la expresión de IL1R2 en monocitos de pacientes con HFC (fig. 1), lo que facilitaría la señalización a través de IL1R1 y la progresión de la cascada inflamatoria. La represión de IL1R2 podría ser consecuencia de la inflamación

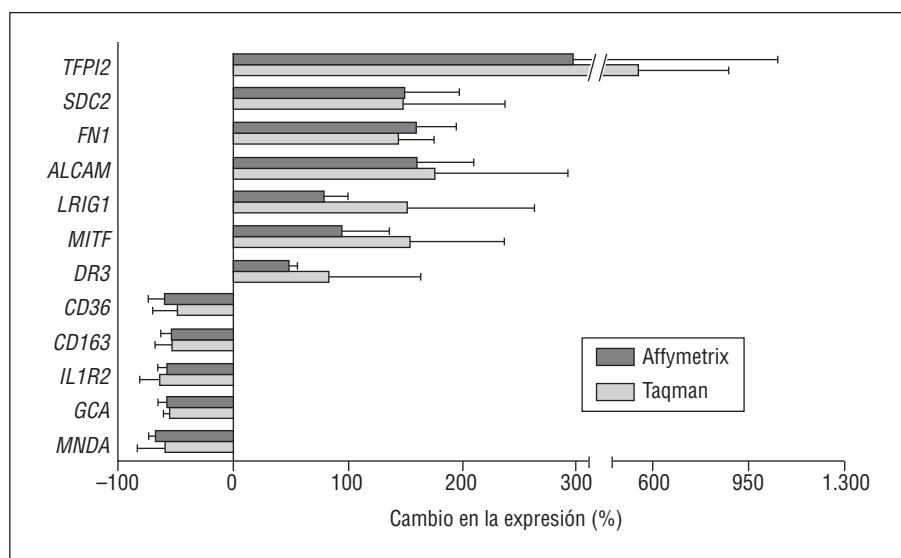


Figura 1. Validación de los genes diferencialmente expresados en las muestras de hiperlipemia familiar combinada comparadas con los controles. Comparación de los resultados obtenidos mediante el array de Affymetrix (negro) y reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (Taqman) (gris). Los valores se expresan en porcentaje de incremento o reducción en la expresión génica en comparación con su correspondiente control.

característica de la HFC, ya que se ha observado que la transcripción de *IL1R2* disminuye debido a señales proinflamatorias<sup>19</sup>.

En contraste con la represión de los genes mencionados anteriormente, los monocitos de los pacientes con HFC mostraron un incremento en la expresión de *ALCAM*, *LRIG1*, y *TNFRSF25* (o *DR3*) (fig. 1). *ALCAM* pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas, actúa como molécula de adhesión y se encuentra relacionado con la respuesta inflamatoria e inmunitaria<sup>20</sup>. El incremento de la expresión de *ALCAM* observado en nuestro estudio puede atribuirse también al entorno inflamatorio en el que se hallan los monocitos en la HFC, ya que de forma similar se ha descrito un aumento en la expresión de este gen en células del linaje monocítico en pacientes con artritis reumatoide<sup>21</sup>. Por otra parte, el aumento en la expresión de *ALCAM* puede estar relacionado con la formación de lesiones ateroscleróticas, ya que se ha observado un aumento en la expresión de este gen en ratones *knockout* para apo E<sup>20</sup>.

*LRIG1* modula la transducción de señal mediada por receptores de factores de crecimiento; de forma específica, *LRIG1* actúa como un regulador negativo de la familia de receptores tirosina-cinasa ErbB, entre los cuales se incluye el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)<sup>22</sup>. La quimiotaxis de monocitos y macrófagos es una de las etapas clave en el desarrollo de aterosclerosis, y está mediada, entre otros factores, por EGFR<sup>23</sup>. La activación de EGFR genera en la célula múltiples mecanismos de atenuación que sirven para controlar la amplitud y la duración de la señal. Uno de estos, denominado atenuación tardía, consiste en la inducción transcripcional de *LRIG1*, que conlleva la ubiquitinización y posterior degradación de EGFR<sup>24</sup>. Si se considera el papel de este receptor en la aterosclerosis<sup>23</sup>, el incremento de la expresión de *LRIG1* en los monocitos de pacientes con HFC podría ser un mecanismo adaptativo para bloquear un exceso de señalización por EGF.

El miembro 25 de la superfamilia del receptor del TNF también se denomina *death receptor 3* (*DR3*) por su implicación en la inducción de la apoptosis<sup>25</sup>. La expresión de *DR3* se encuentra incrementada en los monocitos de pacientes con HFC en relación con los del grupo control (fig. 1). A parte de su papel en la apoptosis, la activación de *DR3* estimula el factor proinflamatorio NF- $\kappa$ B<sup>26</sup> y la expresión de citocinas y quimiocinas proinflamatorias, así como de metaloproteinasas de matriz<sup>27</sup>, lo que indica su implicación en la aterogénesis. De hecho, Kang et al<sup>28</sup> demostraron la expresión de *DR3* en placas de ateroma,

colocalizando con macrófagos y células espumosas. Estos autores también observaron que monocitos de sangre periférica expresaban valores bajos de *DR3*, pero la expresión se inducía después de un estímulo proinflamatorio<sup>28</sup>, situación que también se produce en los monocitos en la HFC, y que podría explicar nuestros resultados.

Otros genes diferencialmente expresados en las muestras de pacientes HFC en comparación con el grupo control están relacionados con la composición y la remodelación de la ECM. La fibronectina (FN) es uno de los principales componentes de la ECM<sup>29</sup>, y *syndecan-2* (SDC2) es un proteoglucano heparán-sulfato que participa en los procesos de adhesión célula-célula y célula-matriz<sup>30</sup> y que interactúa y se une a la FN<sup>31</sup>. Ambos genes se hallan sobreexpresados en los monocitos de los pacientes HFC (fig. 1). La FN producida localmente por las células en el entorno de la lesión puede depositarse en la ECM y estimular la adhesión de monocitos<sup>32</sup>. El incremento de la expresión de SDC2 podría potenciar la capacidad adhesiva de estas células a la pared vascular<sup>33</sup>. Así pues, el incremento observado en ambos genes en nuestro estudio, contribuiría al desarrollo de aterosclerosis en la HFC. Otro de los genes que se halla modificado en monocitos de pacientes con HFC, es *tissue factor pathway inhibitor-2* (*TFPI2*), un inhibidor de las serín-proteasas relacionado con la remodelación de la ECM (fig. 1). Los datos sobre la expresión de *TFPI2* en lesiones ateroscleróticas son contradictorios, puesto que se ha descrito tanto sobreexpresión<sup>34</sup> como represión<sup>35</sup>. El incremento hallado en nuestro estudio podría tener implicaciones en el desarrollo y la estabilidad de la placa, ya que *TFPI2* inhibe la plasmina y de forma directa o indirecta produce la inactivación de metaloproteinasas<sup>34</sup>.

Algunos genes relacionados con el metabolismo lipídico también resultaron diferencialmente expresados en los monocitos de pacientes HFC. *CD36*, un receptor *scavenger* que modula la captación de lipoproteínas modificadas y de células apoptóticas en monocitos y macrófagos<sup>36</sup>, resultó reprimido casi un 50% (fig. 1). Diversos estudios in vitro han demostrado que la exposición a LDL modificadas incrementa la expresión de *CD36* en macrófagos<sup>37,38</sup>, y que la expresión de *CD36* es elevada en macrófagos cargados de lípidos en las placas de ateroma humanas<sup>39,40</sup>. En nuestro estudio, se examinó la expresión de *CD36* en monocitos circulantes, no en macrófagos totalmente diferenciados y cargados de lípidos, hecho que quizás podría explicar la diferencia con los estudios anteriores. En los escasos trabajos en los que se ha evaluado la expre-

sión de ARNm de *CD36* en monocitos circulantes de pacientes, no se han observado incrementos en condiciones proaterogénicas<sup>41</sup>. Por otro lado, diversos estudios han mostrado que la expresión de *CD36* en monocitos/macrófagos se encuentra reprimida por numerosos mediadores inflamatorios<sup>36</sup>. La reducción de la expresión de *CD36* observada en nuestro estudio podría, en consecuencia, reflejar el entorno proinflamatorio que rodea a los monocitos circulantes en la HFC.

En cuanto a los resultados obtenidos en pacientes HFC tras el tratamiento con atorvastatina, nuestra atención se centró particularmente en los genes cuya expresión se modificó con el tratamiento en sentido contrario al cambio de expresión observado en la comparación de HFC con los individuos CT. Así, la represión de *CD36* y *MNDA* revirtió después del tratamiento (fig. 2). Del mismo modo, *TFPI2*, *LRIG1* y *DR3*, cuya expresión estaba aumentada en los pacientes HFC al inicio del tratamiento, resultaron reprimidos después del tratamiento (fig. 2). Teniendo en cuenta que la modificación en la expresión génica posiblemente se halle relacionada con el fenotipo inflamatorio de los pacientes HFC no tratados, la reversión hacia los valores control podría deberse a los efectos antiinflamatorios de la atorvastatina, que se observan por la reducción de los valores de proteína C reactiva después del tratamiento (tabla 2).

No obstante, no todos los cambios en la expresión génica se revirtieron con el tratamiento. El

tratamiento con atorvastatina tampoco normalizó los valores bajos de adiponectina ni los valores elevados de AGL. Por otra parte, las concentraciones de triglicéridos plasmáticos se redujeron, pero no llegaron a alcanzarse los valores del grupo control (tabla 2). Estos resultados indican que el tratamiento con atorvastatina no es capaz de corregir ciertas alteraciones de la HFC asociadas a anomalías metabólicas del tejido adiposo. Es posible que algunos de los cambios en la expresión génica observados en nuestro estudio sean consecuencia directa o indirecta de estos efectos metabólicos que el tratamiento con atorvastatina no corrige. Ello explicaría que el tratamiento con atorvastatina, a través de sus efectos antiinflamatorios, sea capaz de revertir o corregir en parte algunos de los cambios en la expresión génica observados en la HFC, mientras que otros genes cuyos cambios en la expresión podrían reflejar anomalías del tejido adiposo no resulten modificados por el tratamiento.

En resumen, nuestros resultados muestran diferencias en la expresión génica de monocitos de pacientes con HFC en comparación con los del grupo CT, algunas de las cuales modula el tratamiento con atorvastatina. El entorno inflamatorio local, y también las anomalías metabólicas en el tejido adiposo, podrían relacionarse con muchos de los cambios de expresión observados en la HFC. El presente estudio ha demostrado que los análisis de expresión génica son útiles a la hora de profundizar en una enfermedad compleja como es el caso de la HFC. Sin embargo, a partir de nuestros resultados, basados en una muestra relativamente pequeña de pacientes e individuos CT, no podemos saber si los cambios observados son respuesta a defectos genéticos primarios, respuestas adaptativas, o ambas cosas.

### Agradecimientos

Queremos agradecer a los pacientes y al grupo control su colaboración y participación en este estudio.

### Bibliografía

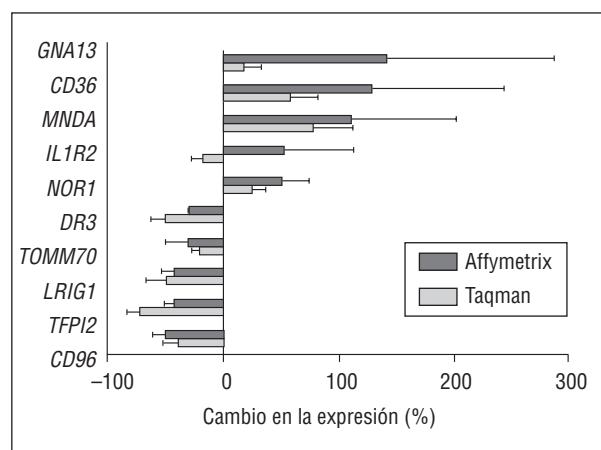


Figura 2. Validación de los genes diferencialmente expresados en las muestras de hiperlipemia familiar combinada después del tratamiento con atorvastatina comparadas con la situación basal. Comparación de los resultados obtenidos mediante el array de Affymetrix (negro) y reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (Taqman) (gris). Los valores se expresan en porcentaje de incremento o reducción en la expresión génica en comparación con su correspondiente control.

1. Hopkins PN, Heiss G, Ellison RC, Province MA, Pankow JS, Eckfeldt JH, et al. Coronary artery disease risk in familial combined hyperlipidemia and familial hypertriglyceridemia: a case-control comparison from the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study. *Circulation*. 2003;108:519-23.
2. Ayyobi AF, McGladdery SH, McNeely MJ, Austin MA, Motulsky AG, Brunzell JD. Small, dense LDL and elevated apolipoprotein B are the common characteristics for the three major lipid phenotypes of familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:1289-94.
3. Meijssen S, Castro-Cabezas M, Twickler TB, Jansen H, Erkelens DW. In vivo evidence of defective postprandial and postabsorptive free fatty acid metabolism in familial combined hyperlipidemia. *J Lipid Res*. 2000;41:1096-102.

4. De Graaf J, Veerkamp MJ, Stalenhoef AF. Metabolic pathogenesis of familial combined hyperlipidaemia with emphasis on insulin resistance, adipose tissue metabolism and free fatty acids. *J R Soc Med*. 2002;95 Suppl 42:46-53.
5. Lee JC, Lusis AJ, Pajukanta P. Familial combined hyperlipidemia: upstream transcription factor 1 and beyond. *Curr Opin Lipidol*. 2006;17:101-9.
6. Osterud B, Bjorklid E. Role of monocytes in atherosclerosis. *Physiol Rev*. 2003;83:1069-112.
7. Eurlings PM, Van der Kallen CJ, Geurts JM, Kouwenberg P, Boeckx WD, De Bruin TW. Identification of differentially expressed genes in subcutaneous adipose tissue from subjects with familial combined hyperlipidemia. *J Lipid Res*. 2002;43:930-5.
8. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972; 18:499-502.
9. Wenham PR, Price WH, Blandell G. Apolipoprotein E genotyping by one-stage PCR. *Lancet*. 1991;337:1158-9.
10. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*. 2003;4:249-64.
11. Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol*. 2004;3:3.
12. Van der Vleuten, Van Tits LJ, Den HM, Lemmers H, Stalenhoef AF, De Graaf J. Decreased adiponectin levels in familial combined hyperlipidemia patients contribute to the atherogenic lipid profile. *J Lipid Res*. 2005;46:2398-404.
13. Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, Wener MH, Harris TB. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA*. 1999;282:2131-5.
14. Davignon J. Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins. *Circulation*. 2004;109:III39-III43.
15. Asefa B, Klarman KD, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Kehler JR. The interferon-inducible p200 family of proteins: a perspective on their roles in cell cycle regulation and differentiation. *Blood Cells Mol Dis*. 2004;32:155-67.
16. Min W, Ghosh S, Lengyel P. The interferon-inducible p202 protein as a modulator of transcription inhibition of NF-kappa B, c-Fos, and c-Jun activities. *Mol Cell Biol*. 1996;16:359-68.
17. Shiffman 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.
18. Briggs RC, Atkinson JB, Miranda RN. Variable expression of human myeloid specific nuclear antigen MNDA in monocyte lineage cells in atherosclerosis. *J Cell Biochem*. 2005;95:293-301.
19. Mantovani A, Locati M, Vecchi A, Sozzani S, Allavena P. Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines. *Trends Immunol*. 2001;22:328-36.
20. Ikeda K, Quertermous T. Molecular isolation and characterization of a soluble isoform of activated leukocyte cell adhesion molecule (CD166) on monocyte-lineage cells and in rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis Rheum*. 1998;41:2221-9.
21. Levesque MC, Heinly CS, Whichard LP, Patel DD. Cytokine-regulated expression of activated leukocyte cell adhesion molecule (CD166) on monocyte-lineage cells and in rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis Rheum*. 1998;41:2221-9.
22. Laederich MB, Funes-Duran M, Yen L, Ingalla E, Wu X, Carraway KL III, et al. The leucine-rich repeat protein LRIG1 is a negative regulator of Erbb family receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem*. 2004;279:47050-6.
23. Lamb DJ, Modjtahedi H, Plant NJ, Ferns GA. EGF mediates monocyte chemotaxis and macrophage proliferation and EGF receptor is expressed in atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis*. 2004; 176:21-6.
24. Rubin C, Gur G, Yarden Y. Negative regulation of receptor tyrosine kinases: unexpected links to c-Cbl and receptor ubiquitylation. *Cell Res*. 2005;15:66-71.
25. Borysenko CW, Furey WF, Blair HC. Comparative modeling of TNFRSF25 (DR3) predicts receptor destabilization by a mutation linked to rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;328:794-9.
26. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Yu GL, Lyons RH, Garg M, Duan DR, et al. Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. *Science*. 1996;274:990-2.
27. Bobik A, Kalinina N. Tumor necrosis factor receptor and ligand superfamily family members TNFRSF14 and LIGHT: new players in human atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21: 1873-5.
28. Kang YJ, Kim WJ, Bae HU, Kim DI, Park YB, Park JE, et al. Involvement of TL1A and DR3 in induction of pro-inflammatory cytokines and matrix metalloproteinase-9 in atherosclerosis. *Cytokine*. 2005;29:229-35.
29. Magnusson MK, Mosher DF. Fibronectin: structure, assembly, and cardiovascular implications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:1363-70.
30. Carey DJ. Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochem J*. 1997;327 (Pt 1):1-16.
31. Kusano Y, Oguri K, Nagayasu Y, Munesue S, Ishihara M, Saiki I, et al. Participation of syndecan 2 in the induction of stress fiber formation in cooperation with integrin alpha5beta1: structural characteristics of heparan sulfate chains with avidity to COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *Exp Cell Res*. 2000;256:434-44.
32. Laouar A, Collart FR, Chubb CB, Xie B, Huberman E. Interaction between alpha 5 beta 1 integrin and secreted fibronectin is involved in macrophage differentiation of human HL-60 myeloid leukemia cells. *J Immunol*. 1999;162:407-14.
33. Kolset SO, Salmivirta M. Cell surface heparan sulfate proteoglycans and lipoprotein metabolism. *Cell Mol Life Sci*. 1999;56:857-70.
34. Crawley JT, Goulding DA, Ferreira V, Severs NJ, Lupu F. Expression and localization of tissue factor pathway inhibitor-2 in normal and atherosclerotic human vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:218-24.
35. Tuomisto TT, Korkeela A, Rutanen J, Viita H, Brasen JH, Riekkinen MS, et al. Gene expression in macrophage-rich inflammatory cell infiltrates in human atherosclerotic lesions as studied by laser microdissection and DNA array: overexpression of HMG-CoA reductase, colony stimulating factor receptors, CD11A/CD18 integrins, and interleukin receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:2235-40.
36. Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest*. 2001;108:785-91.
37. Han J, Nicholson AC. Lipoproteins modulate expression of the macrophage scavenger receptor. *Am J Pathol*. 1998;152:1647-54.
38. Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell*. 1998;93:229-40.
39. Nakata A, Nakagawa Y, Nishida M, Nozaki S, Miyagawa J, Nakagawa T, et al. CD36, a novel receptor for oxidized low-density lipoproteins, is highly expressed on lipid-laden macrophages in human atherosclerotic aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999; 19:1333-9.
40. Nakagawa-Toyama Y, Yamashita S, Miyagawa J, Nishida M, Nozaki S, Nagaretani H, et al. Localization of CD36 and scavenger receptor class A in human coronary arteries—a possible difference in the contribution of both receptors to plaque formation. *Atherosclerosis*. 2001;156:297-305.
41. Fuhrman B, Koren L, Volkova N, Keidar S, Hayek T, Aviram M. Atorvastatin therapy in hypercholesterolemic patients suppresses cellular uptake of oxidized-LDL by differentiating monocytes. *Atherosclerosis*. 2002;164:179-85.