

## CLÍNICA E INVESTIGACIÓN EN ARTERIOSCLEROSIS

[www.elsevier.es/arterio](http://www.elsevier.es/arterio)



### ORIGINAL

## Modificación del comportamiento celular bajo el efecto de estatinas en células de pared arterial (I). Cambios en la dinámica celular

Jesús Millán Núñez-Cortés<sup>a,b,\*</sup>, Luis Alvarez-Sala Walther<sup>a,b</sup>,  
Carlos Recarte Garcia-Andrade<sup>a,b</sup>, Maria Ferrer Civeira<sup>a</sup>,  
Granada Alvarez Novés<sup>c</sup> e Ysmael Alvarez Rodriguez<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Medicina Interna, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid, España

<sup>b</sup> Unidad de Riesgo Cardiovascular y Lípidos, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid, España

<sup>c</sup> Laboratorio de Investigación Biomédica, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid, España

Recibido el 6 de febrero de 2012; aceptado el 13 de abril de 2012

Disponible en Internet el 30 de mayo de 2012

### PALABRAS CLAVE

Efectos pleiotrópicos;  
Estatinas;  
Actina

**Resumen** Los inhibidores de la 3-HMG-CoA-reductasa (estatinas) son fármacos cuyos beneficios clínicos en la prevención de las enfermedades cardiovasculares están ampliamente demostrados. Una parte de tales beneficios, y particularmente los que pueden tener lugar de forma más inmediata, se deben a efectos que pueden ser independientes del descenso de los niveles de colesterol y de cLDL. Estos efectos se conocen como efectos pleiotrópicos.

En el presente trabajo, mediante cultivos de células implicadas en el proceso aterogénico —fibroblastos, monocitos, células endoteliales y células musculares lisas— sometidos a distintos tipos y dosis de estatinas, hemos intentado evidenciar los cambios en el comportamiento celular.

Nuestros resultados apoyan la idea de que se producen cambios subsiguientes a la adición de las estatinas en el medio de cultivo, y que afectan tanto a la adhesividad celular como a la movilidad y —en el caso de las células musculares lisas— a la contractilidad. Estos cambios pueden explicar, al menos en parte, algunos de los efectos distintos a los directamente relacionados con el efecto hipocolesterolemizante. En el fondo de tales cambios se pueden encontrar modificaciones en el metabolismo intracelular.

© 2012 Elsevier España, S.L. y SEA. Todos los derechos reservados.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [jesus.millan@salud.madrid.org](mailto:jesus.millan@salud.madrid.org) (J. Millán Núñez-Cortés).

**KEYWORDS**

Pleiotropic effects;  
Statins;  
Actin

**Alterations in cell behaviour under the effect of statins in arterial wall cells (I).  
Changes in cell dynamics**

**Abstract** 3-HMG-CoA-reductase inhibitors (statins) are drugs which have been widely demonstrated to have clinical benefits in the prevention of cardiovascular diseases. Some of these benefits, particularly those that may take place immediately, are due to effects that may be independent of the decrease in cholesterol and LDL-cholesterol levels. These effects are known as pleiotropic effects.

In the present study, using cultures of the cells involved in the atherogenic process: fibroblasts, monocytes, endothelial cells and smooth muscle cells submitted to different types and doses of statins, we have attempted to demonstrate the changes in cell behaviour.

Our results support the idea that subsequent changes are produced on the addition of statins into the culture medium, and which affect cell adhesiveness, as well as mobility and, in the case of smooth muscle cells, the contractility. These changes may explain, at least partly, some of the effects other than those directly related to the lipid lowering effect. Behind such changes may be found alterations in intracellular metabolism.

© 2012 Elsevier España, S.L. and SEA. All rights reserved.

## Introducción

Las estatinas son fármacos cuyo principal efecto es la reducción del colesterol plasmático. Dicha reducción se puede situar, dependiendo del fármaco y de la dosis, entre un 10 y un 50% de la cifra basal. Su mecanismo de acción es la inhibición de la 3-hidroxi-metil-glutaril-coenzima A-reductasa (3-HMG-CoA-R), cuya acción enzimática es un paso limitante en la síntesis de colesterol intracelular. La principal consecuencia de este hecho es el aumento de la expresión y de la actividad del receptor para las LDL, con lo que se consigue un «aclaramiento» de dicha lipoproteína del plasma.

En los últimos años, diversas evidencias han sugerido que la reducción de la morbimortalidad cardiovascular producida por las estatinas podría ser consecuencia no solo de la reducción de las concentraciones plasmáticas de colesterol LDL (cLDL), sino también de otras acciones independientes.

De hecho, el beneficio clínico producido por las estatinas en los estudios 4S (Scandinavian Simvastatin Survival Study)<sup>1</sup>, WOSCOPS (West of Scotland Coronary Prevention Study)<sup>2</sup>, CARE (Cholesterol and Recurrent Events)<sup>3</sup> y HPS (Heart Protection Study)<sup>4</sup> eran independientes de los valores basales o del grado de reducción de las concentraciones plasmáticas de cLDL, y superiores a la que cabría esperar según la reducción de los valores de cLDL.

En los estudios MIRACL (Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering)<sup>5</sup> y HPS<sup>4</sup>, realizados en pacientes con valores normales o casi normales de cLDL, las estatinas producen una reducción de los episodios coronarios similar a la observada en los pacientes con cardiopatía isquémica.

En los estudios angiográficos, la reducción de los episodios coronarios producida por las estatinas se asociaba a mínimos cambios en las dimensiones de la placa, por lo que no puede atribuirse a la regresión de esta<sup>6</sup>.

Algunos efectos protectores de la estatinas en modelos animales de hipercolesterolemia (reversión de la función endotelial) aparecen antes incluso que la reducción de los valores de cLDL<sup>7</sup>, y en el estudio MIRACL la atorvastatina reducía los episodios isquémicos a las 16 semanas de

tratamiento, un intervalo demasiado corto para que pueda atribuirse a cambios en los valores de las LDL<sup>5</sup>.

Por otra parte, las estatinas disminuyen la incidencia de ictus isquémicos, a pesar de que estos no siempre se acompañan de un aumento de las concentraciones plasmáticas de colesterol<sup>6,8</sup>.

Todos estos hallazgos han llevado al convencimiento de que las estatinas tienen acciones independientes de las reducción de las concentraciones plasmáticas de cLDL, a las que denominamos acciones pleiotrópicas<sup>9,10</sup>. Las principales acciones pleiotrópicas de las estatinas incluyen la reversión de la disfunción endotelial, acciones antioxidantes, antitrombóticas, inmunomoduladoras y antiinflamatorias.

El objetivo del presente trabajo ha sido conocer los cambios en el comportamiento celular inducidos por distintas estatinas empleando cultivos de células que habitualmente se encuentran implicadas en el proceso aterogénico.

## Material y métodos

Se han empleado las técnicas de cultivo celular con soluciones y medios de cultivo ya señalados en trabajos precedentes como habituales en nuestro laboratorio<sup>11</sup>.

### Células

Algunas de las líneas celulares empleadas proceden de cultivos primarios de células humanas, y otras tienen su origen en líneas celulares previamente establecidas.

Los fibroblastos humanos proceden del cultivo primario de amígdalas hipertróficas recién extirpadas, que proporciona una buena cantidad de fibroblastos. Las amígdalas extirpadas se recogieron en solución salina equilibrada de Dulbecco, suplementada con 200 UI/ml de penicilina, 200 µg/ml de estreptomycin, 32 µg/ml de gentamicina y 40 UI/ml de nistatina. Se obtenían mediante sucesivos pases con tripsina y transferencia de las suspensiones celulares a tubos de centrifuga. Finalmente se eliminaron los residuos groseros filtrando la suspensión a través de

varias capas de gasa estéril. Se sedimentaron las células centrifugando 10 min a  $125 \times G$  a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y se suspendieron las pellas en medio R5a de Iwakata suplementado con suero bovino fetal al 10%, penicilina 100 UI/ml, estreptomicina 100  $\mu$ g/ml, gentamicina 16  $\mu$ g/ml y nistatina 20 UI/ml. La siembra se realizó utilizando frascos de mucha superficie a razón de 46.800 células viables por centímetro cuadrado en medio R5a de McCoy modificado por Iwakata suplementado con suero bovino fetal 10% y antibióticos. Cuando los cultivos estaban en pleno crecimiento logarítmico y en fase confluyente laxa se recogieron las células, desprendiéndolas con tripsina al 0,2%, y se prepararon viales que contenían diferentes volúmenes de suspensión. Los viales para congelación se prepararon con  $2,4 \times 10^6$  células con el medio de mantenimiento suplementado con 7% de dimetilsulfóxido. Los fibroblastos así obtenidos mantienen su capacidad proliferativa a lo largo de unos 15 pases consecutivos, y a partir de entonces las células adoptan propiedades y morfología de fibroblastos senescentes.

Los monocitos humanos de sangre periférica proceden de muestras de donantes sanos que se recogen en tubos estériles con EDTA-Na (1,5 mg/ml de sangre) y siliconados para evitar la coagulación e impedir la adhesión de los monocitos a las paredes del recipiente. Se centrifugan a  $125 \times G$  a temperatura ambiente durante 15 min para separar y recoger los plasmas. El sedimento que contiene las células hemáticas se ajusta al volumen inicial con solución salina equilibrada sin iones  $Ca^{++}$  ni  $Mg^{++}$ . Las células se purifican por centrifugación sobre lecho de polisucrosa y diatrizoato sódico ajustado a una densidad de 1,077, utilizando el sistema Accuspin. La centrifugación se realiza a temperatura ambiente a  $800 \times G$  durante 15 min en centrífuga IEC modelo HN. Se seleccionan por aspiración la banda de células linfomononucleares.

Las líneas celulares previamente establecidas proceden de la American Type Culture Collection (ATCC) y se han obtenido a través de la European Collection of Cell Cultures (ECACC) y de líneas establecidas en nuestro laboratorio a partir de dicho origen. Se han utilizado células humanas de endotelio vascular y células musculares lisas.

Las células humanas de endotelio vascular (HMEC-1) fueron obtenidas en 1992<sup>12</sup> a partir de endotelio vascular. Las HMEC-1 pueden crecer en ausencia de suero humano. Expresan moléculas de superficie típicamente asociadas con las células endoteliales humanas —como es el caso de las moléculas CD31 y CD36— y moléculas de adhesión como las ICAM-1. Adaptamos las células a crecer en medio R5a de Iwakata. Las células HMEC-1 son células que prosperan como cultivos semicontinuos, es decir, mantienen su capacidad proliferativa a lo largo de 95 pases sucesivos. A partir de este momento disminuye su capacidad de crecimiento y las células se mantienen en estado estacionario.

Las células musculares lisas (TG/HA-VSMC) fueron obtenidas en 1992<sup>13</sup>. En nuestro laboratorio se obtuvieron a partir de la ECACC. Asimismo, adaptamos las células a crecer en medio R5a de Iwakata. Las células TG/HA-VSMC son también células normales que prosperan como cultivos semicontinuos y mantienen su capacidad proliferativa a lo largo de 30-35 pases sucesivos. A partir de ese momento disminuye su capacidad de crecimiento y las células se mantienen en estado estacionario.

## Técnicas de videointervalometría y microscopía digital de intervalos

Estos procedimientos se utilizan para valorar las características morfodinámicas y la cinética de crecimiento de las células control y las tratadas con las distintas estatinas. Se ha empleado un microscopio invertido Nikon modelo M y un microscopio Nikon modelo Diaphot. Ambos microscopios están diseñados para poder utilizar dos salidas de recogida de imagen; en una de ellas se adaptan el portaoculares y el tubo para la cámara de fotografía, y la otra es una salida horizontal especialmente diseñada para la adaptación de una cámara de cine o vídeo. Ambos equipos llevan incorporada una cámara de incubación que permite mantener la temperatura con una precisión  $\pm 0,1^\circ C$ . La temperatura se mantiene con un dispositivo de inyección de aire caliente en la cámara, regulada por un dispositivo de control que responde a las modificaciones de temperatura detectadas por un termopar que colocamos en la zona próxima al recipiente de observación.

Utilizamos óptica de contraste de fases con condensador de larga distancia focal. Esta óptica permite la visualización en las células vivas de un mayor número de estructuras.

Para las condiciones de filmación procuramos establecer las mismas condiciones de los experimentos que paralelamente se realizaron en los microcultivos en placas, con objeto de poder correlacionar los datos obtenidos en las dos condiciones. La cadencia de registro de imagen se programa en función de la duración del fenómeno a estudiar, utilizando aceleraciones comprendidas entre 4 imágenes por segundo y una imagen cada 8 min, lo que nos permite, con la máxima aceleración, visionar en 1 min los fenómenos que se producen en 3 días.

## Estatinas

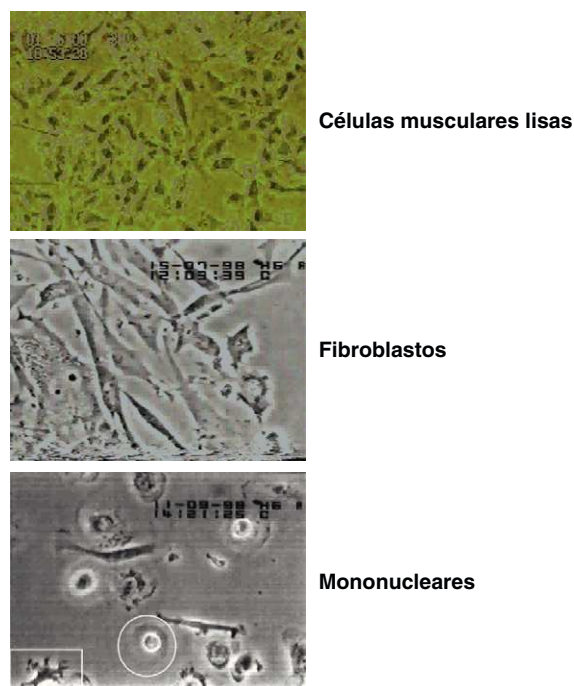
Se han ensayado la atorvastatina, la pravastatina, la simvastatina y la cerivastatina. Para la preparación de las soluciones concentradas de estatinas se han solubilizado los principios activos a partir de la presentación en comprimidos. Se muelen los comprimidos; las estatinas liposolubles se solubilizan inicialmente en dimetil sulfóxido añadiendo posteriormente agua a partes iguales; las hidrosolubles se solubilizan primero en agua con adición posterior de dimetil sulfóxido también a partes iguales. Las soluciones se preparan ajustadas a una concentración final de 2 mg/ml de la estatina, y la solución de uso se realiza por dilución en medio de cultivo, utilizando como controles los solventes de la solución madre con el mismo factor de dilución.

## Resultados

### Adherencia celular

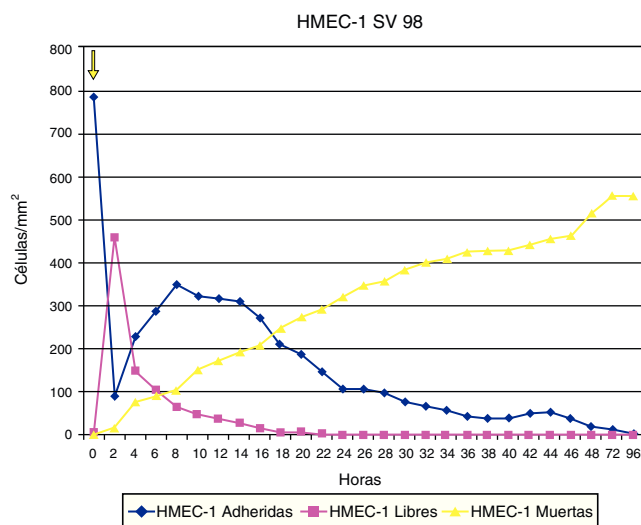
Cuando se ha estudiado la adherencia al medio de las diferentes células (un ejemplo se muestra en la [fig. 1](#)), se han obtenido curvas de adherencia individualizadas para las distintas células y para las distintas estatinas a diferentes dosis.

En las [figuras 2-4](#) se muestra una representación gráfica de las modificaciones en la adherencia celular encontradas

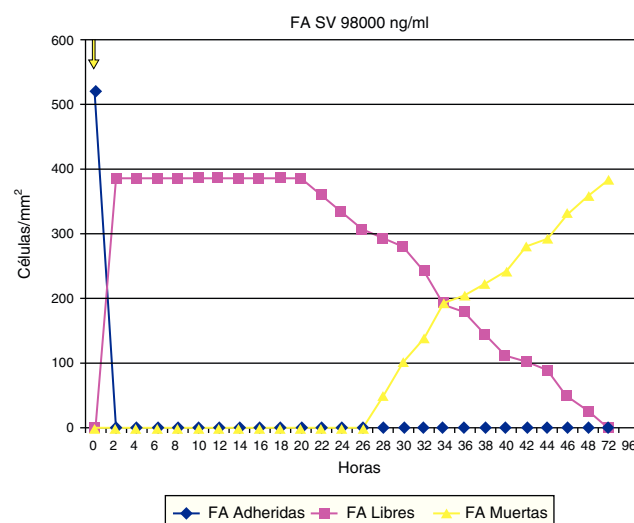


**Figura 1** Diferencias de adhesión entre diferentes células ante igual concentración de estatina (el ejemplo muestra el empleo de simvastatina 98  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

en los cultivos de células endoteliales (fig. 2), fibroblastos (fig. 3) y células mononucleares (fig. 4). Las gráficas se refieren, en todos los casos, al cultivo en presencia de simvastatina (98  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Como se puede comprobar, existe una importante variabilidad en la respuesta celular al empleo in vitro de la estatina, de tal manera que el patrón de adhesión al medio varía de unas células a otras, a igual concentración del fármaco. Sin embargo, en términos generales se produce una pérdida brusca de adhesividad de forma inmediata, que es mucho más acusada en el caso de fibroblastos y mononucleares, y más atemperada en el caso de las



**Figura 2** Adherencia de las células endoteliales (HMEC) bajo el efecto de la estatina (simvastatina 98  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).



**Figura 3** Adherencia de los fibroblastos (FA) bajo el efecto de la estatina (simvastatina).

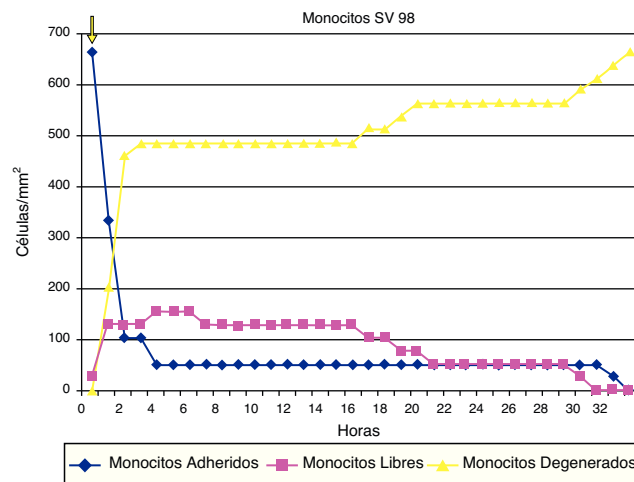
células endoteliales, en las que es solo al cabo de las 72 h del efecto cuando se alcanza el máximo resultado. Como queda reflejado, la pérdida de la adhesividad está condicionada, en una parte considerable, por la pérdida de viabilidad celular, aunque también es posible reconocer un efecto independiente sobre esta propiedad celular.

### Movilidad celular

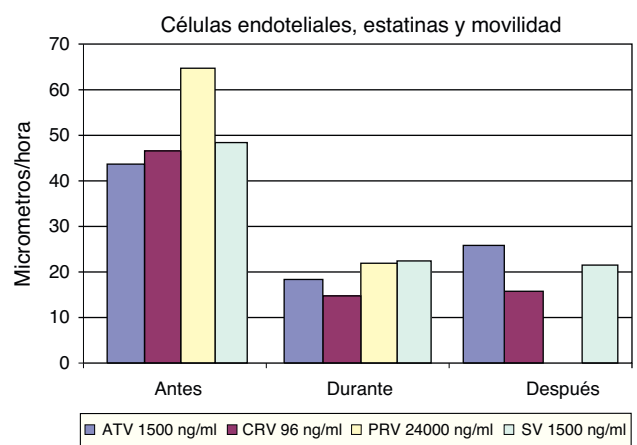
La movilidad de los diferentes tipos celulares ha sido estudiada en presencia de las estatinas ensayadas.

La figura 5 muestra los cambios en la movilidad inducidos en las células endoteliales por el influjo de distintas dosis de diferentes estatinas. Asimismo, en la figura 6 se muestra una secuencia concreta sobre cambios inducidos por la cerivastatina sobre células endoteliales humanas.

Los resultados inducidos sobre la movilidad de las células musculares lisas bajo el efecto de diferentes dosis de



**Figura 4** Adherencia de los mononucleares (monocitos humanos) bajo el efecto de la estatina (simvastatina 98  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).



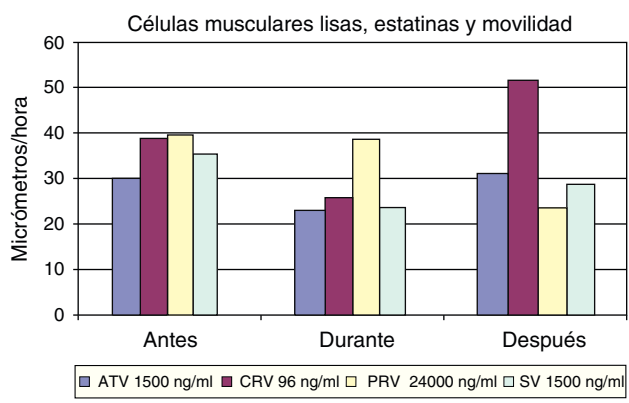
**Figura 5** Movilidad de las células endoteliales en presencia de diferentes estatinas. ATV: atorvastatina; CRV: cerivastatina; PRV: pravastatina; SV: simvastatina.

estatinas se muestran en la [figura 7](#), y asimismo una secuencia específica con cerivastatina se muestra en la [figura 8](#).

La técnica de videointervalometría permite el cálculo de la movilidad celular. Los resultados globales sobre la misma en las diferentes células, y con las distintas estatinas, se resumen en la [figura 9](#). Del análisis de los resultados se desprende que los fibroblastos son el tipo celular cuya movilidad se encuentra menos influida por la presencia de estatinas. Por el contrario, todas las estatinas ensayadas logran inducir una disminución de la movilidad en las células endoteliales y en las células musculares lisas, si bien en estas últimas la recuperación de la movilidad normal es más rápida que en las células endoteliales.

**Contractilidad de células musculares lisas**

La contractilidad fue estudiada exclusivamente en las células musculares lisas, habida cuenta de la trascendencia que este proceso puede tener en los mecanismos de producción de la lesión vascular.



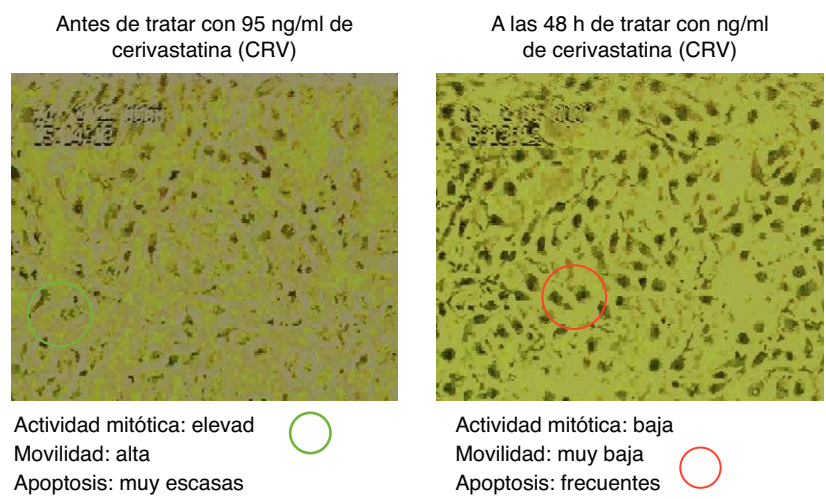
**Figura 7** Movilidad de las células musculares lisas en presencia de diferentes estatinas. ATV: atorvastatina; CRV: cerivastatina; PRV: pravastatina; SV: simvastatina.

Se pudo observar una disminución de la contractilidad bajo el efecto de estatinas (se ensayó, por su singularidad, la cerivastatina a dosis de 96 ng/ml), que se recuperó y se incrementó al suprimir el tratamiento ([figura 10](#)).

**Discusión**

Las estatinas han demostrado ser uno de los medicamentos más útiles en la prevención de la arteriosclerosis y sus complicaciones. Todas tienen un mecanismo de acción común, que es el de la inhibición de la enzima 5 hidroximetil coenzima A reductasa, en un punto de la ruta metabólica que es fase limitante de la síntesis de colesterol e isoprenoides. En la clínica, su principal efecto consiste en disminuir la colesterolemia, reduciendo los niveles de LDL, aunque tienen menos (o nulo) efecto sobre otras fracciones lipídicas, como los triglicéridos o el colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad.

La disminución de las LDL es clave para que no se produzca su paso al subendotelio y la subsiguiente modificación local de estas lipoproteínas, que se acepta como el primer acontecimiento trascendente que puede iniciar las



**Figura 6** Movilidad de las células endoteliales humanas (HMEC-1) en tratamiento con cerivastatina (95 ng/ml). Se señalan células en mitosis y células en apoptosis.





**Figura 8** Movilidad de las células musculares lisas de aorta humana (TG/HA-VSMC) en tratamiento con cerivastatina (95 ng/ml). Se señalan cambios mitóticos y apoptóticos.

modificaciones fisiopatológicas de la formación de la placa de ateroma y constituir un elemento patogénico decisivo.

Pero además de su actividad hipolipemiente, se han descrito para las estatinas una serie de efectos que han recibido la denominación de pleiotrópicos, y que parecen contribuir

a comprender mejor otros aspectos beneficiosos del tratamiento con estos compuestos. Entre estos efectos se han descrito algunos que parecen afectar directamente al comportamiento celular (proliferación, apoptosis, adherencia, movilidad...), otros que influyen en la inducción de disfunción endotelial, la oxidación de LDL, la inflamación, la coagulación o, incluso, la osteogénesis<sup>14-16</sup>.

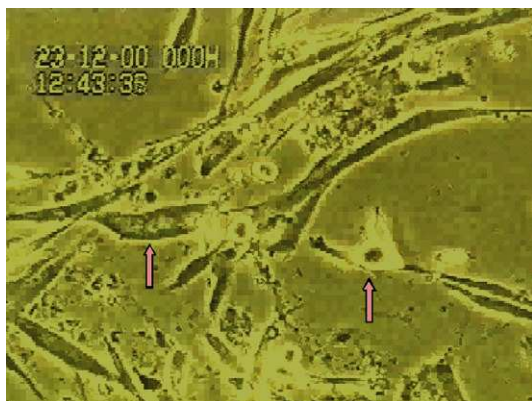
Las diferentes estatinas presentan, sin embargo, importantes diferencias de unas a otras por su procedencia, naturales o sintéticas, por su liposolubilidad, por su activación metabólica por la fracción del citocromo P-450, o por su propia actividad específica hipolipemiente. En consecuencia, también pueden ser distintos la intensidad y el tipo de los efectos pleiotrópicos.

El mecanismo implicado en estas acciones pleiotrópicas parece estar íntimamente unido al bloqueo de la 3-HMG-CoA-R. La inhibición de la síntesis del ácido mevalónico disminuye la formación de diversos isoprenoides que regulan distintas funciones celulares, como la isopenteniladenosina, el geranil geranilo pirofosfato y el farnesil pirofosfato. Estos dos últimos regulan la isoprenilación de dolicoles (participan en la síntesis de glucoproteínas), ubiquinona y hemo A (participan en la cadena transportadora de electrones) y diversas proteínas de señalización intracelulares (proteínas de pequeño tamaño), necesarias para la proliferación y diferenciación celular, la expresión genética, el ensamblaje del citoesqueleto, el transporte de lípidos y proteínas, y la fibrinólisis<sup>10,17-20</sup>. La isoprenilación es un paso fundamental en la actividad de algunas proteínas (Rho), que determina su localización subcelular y su transferencia desde su localización intracelular hacia la membrana celular. Las proteínas Rho/Ras se encuentran en dos conformaciones: una forma inactiva ligada a guanosina difosfato (GDP) y una activa ligada a guanosina trifosfato (GTP). Las estatinas inhiben la prenilación y la translocación de estas proteínas, lo que conlleva cambios en la actina del citoesqueleto, disminuye la proliferación y la migración celular, y aumenta la expresión de la óxido nítrico sintetasa endotelial (NOSe)<sup>18,19</sup>.

Una gran parte de los efectos pleiotrópicos pueden tener su fundamento en estas alteraciones bioquímico-estructurales, y ello puede condicionar la modificación de

Estatina	Endoteliales	Fibroblastos	Musculares l.
ATV antes	42 ± 10 *	28 ± 13	35 ± 9 **
ATV durante	16 ± 8 *	25 ± 12	26 ± 3 **
ATV después	16 ± 7 *	21 ± 11	34 ± 5 **
CRV antes	35 ± 14 *	26 ± 5 *	48 ± 6 *
CRV durante	10 ± 2 *	16 ± 7 *	23 ± 8 *
CRV después	8 ± 3 *	14 ± 7 *	51 ± 21 *
PRV antes	51 ± 17 *	25 ± 12	54 ± 20 *
PRV durante	19 ± 8 *	18 ± 9	29 ± 7
PRV después	-	15 ± 6	29 ± 14 *
SV antes	35 ± 12 *	26 ± 8	39 ± 13 *
SV durante	15 ± 5 *	23 ± 12	23 ± 7 *
SV después	17 ± 6 *	24 ± 13	29 ± 13

**Figura 9** Movilidad media de las diferentes células en presencia de distintas estatinas. ATV: atorvastatina; CRV: cerivastatina; PRV: pravastatina; SV: simvastatina. Movilidad en  $\mu\text{m}/\text{h}$ . \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p = 0,05$ .



**Figura 10** Efecto de la cerivastatina sobre la contractilidad de las células musculares lisas procedentes de aorta humana (las flechas indican el efecto contráctil).

la conducta y del comportamiento (características morfodinámicas) en las células que tienen un mayor protagonismo en el proceso aterogénico. En el fondo late la idea de que las estatinas pueden provocar modificaciones celulares que condicionen los cambios en la tasa de proliferación, en la muerte celular programada (apoptosis) o en su movilidad y adherencia. Y estos fenómenos pueden ser especialmente trascendentes cuando afecten al endotelio, a la fibra muscular lisa, al fibroblasto o al mononuclear, toda vez que son células directamente implicadas en el inicio y desarrollo de la aterosclerosis.

En nuestro estudio hemos comprobado que, en efecto, la adherencia celular de las distintas células, así como la movilidad y —para las células musculares lisas— la contractilidad son modificadas por el efecto de las estatinas. Es verdad que tales modificaciones dependen, en su grado e intensidad, de la estatina y de la dosis específicamente empleada, pero se puede observar fácilmente un efecto de clase, que puede ser responsable del comportamiento asociado a los conocidos como efectos pleiotrópicos.

En la práctica esto puede significar que los inhibidores de la 3-HMG-CoA-R podrían afectar de manera diferente al comportamiento celular de las distintas células implicadas en la formación de la placa de ateroma, y que estas diferencias podrían aclarar los efectos que las estatinas tienen sobre distintos aspectos que controlan la aterogénesis.

## Financiación

Trabajo financiado por la Beca Pfizer otorgada por la Fundación Española de Arteriosclerosis-Sociedad Española de Arteriosclerosis. Convocatoria 2007.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Bibliografía

- Scandinavian Survival Study Group. Randomized trial of cholesterol lowering in 4,444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet*. 1994;344:1383–9.
- Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, et al., for the West Scotland Coronary Prevention Study Group. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. *N Engl J Med*. 1995;333:1301–7.
- Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, Brown LE, Hamm P, Cole TG, et al. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. *N Engl J Med*. 1996;335:1001–9.
- Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BFH Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2002;360:7–22.
- Schwartz G, Olsson A, Ezekowitz M, Ganz P, Oliver MF, Waters D, et al. Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute coronary syndromes. The MIRACL Study: a randomized trial. *JAMA*. 2001;285:1711–8.
- Brown BG, Hillger I, Zhao XQ, Poulin D, Albers JJ. Types of change in coronary stenosis severity and their relative importance in overall progression and regression of coronary disease. Observations from the FATS Trial. *Familial Atherosclerosis Treatment Study*. *Ann N Y Acad Sci*. 1995;748:407–18.
- O'Driscoll G, Green D, Taylor R. Simvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, improves endothelial function within 1 month. *Circulation*. 1997;95:1126–31.
- Sandercock P. Statins for stroke prevention. *Lancet*. 2001;357:1548–9.
- Farmer JA. Pleiotropic effects of statins. *Curr Atheroscler Rep*. 2000;2:208–17.
- Bonetti PO, Lerman LO, Napoli C, Lerman A. Statin effects beyond lipid lowering—are they clinically relevant? *Eur Heart J*. 2003;24:225–48.
- Millán Nuñez-Cortes J, Recarte García-Andrade C, López Paredes C, Domingo F, Teigell García L, Filgueira Rubio J, et al. Efectos de la infección in vitro de células monocíticas-macrofágicas por *Chlamydia* y su relación con los valores de lípidos. *Clin Invest Arterioscl*. 2011;23:201–10.
- Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA, George VG, Summers S, Bosse DC, et al. HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermat*. 1992;99.
- Tilberg A, Gifford RR. American Type Culture Collection. General Catalog 10801. University Boulevard. Manassas S. VA 20110-2209. 2006.
- Corsini A, Bernini F, Quarato P, Donetti E, Bellosa S, Fumagalli R, et al. Non-lipid-related effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Cardiology*. 1996;87:458–68.
- Bellosa S, Ferri N, Arnaboldi L, Bernini F, Paoletti R, Corsini A. Pleiotropic effects of statins in atherosclerosis and diabetes. *Diabetes Care*. 2000;Suppl 2:B72–8.
- Dichtl W, Dulak J, Frick M, Alber HF, Schwarzbacher SP, Ares MP, et al. HMG-CoA reductase inhibitors regulate inflammatory transcription factors in human endothelial and vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:58–63.
- Bellosa S, Bernini F, Ferri N, Quarato P, Canavesi M, Arnaboldi L, et al. Direct vascular effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Atherosclerosis*. 1998;137Suppl P:S101–9.
- Liao JK. Isoprenoids as mediators of the biological effects of statins. *J Clin Invest*. 2002;110:285–8.
- Laufs U, Kilter H, Konkol C, Wassmann S, Böhm M, Nickenig G. Impact of HMG-CoA reductase inhibition on small GTPases in the heart. *Cardiovasc Res*. 2002;53:911–20.
- Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small gtp-binding proteins. *Physiol Rev*. 2001;81:153–208.