

Perfil de la expresión génica de los macrófagos humanos en cultivo en respuesta a atorvastatina

M. Artieda^a, A. Cenarro^a, D. Tejedor^b, A. Gañán^b, P. Álvarez^a, C. Junquera^c, A. Martínez^c, M. Pocovi^b y F. Civeira^a

^aLaboratorio de Investigación Molecular. Hospital Universitario Miguel Servet. Zaragoza.

^bDepartamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Universidad de Zaragoza. Zaragoza. España.

^cProgenika-Medplant Genetics S.L. Vizcaya. España.

Introducción y objetivo. El beneficio clínico de las estatinas es superior al esperado por su papel hipolipemiente, dado que producen efectos pleiotrópicos en la fisiopatología de casi la totalidad de las células involucradas en la génesis y evolución de la aterosclerosis, entre ellas los macrófagos. El objetivo de este estudio ha sido analizar la expresión génica de los macrófagos humanos en cultivo sometidos a una sobrecarga de lípidos oxidados, con y sin atorvastatina en el medio de cultivo, para poder conocer los genes de respuesta a atorvastatina que expliquen el beneficio de las estatinas en una vía independiente de la hipolipemiente.

Material y método. Las células mononucleares humanas de 10 sujetos no relacionados fueron aisladas y cultivadas en el medio Macrophage-SFM a 37 °C y un 5% de CO₂ repartidas en 4 frascos de cultivo para cada sujeto. En el día 9, todos los cultivos se suplementaron con 50 mg/l de lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas y 2 de los 4 cultivos se suplementaron también con 1 μmol/l de atorvastatina. Tras 18 horas de incubación se aisló el ARN total con Trizol-LS y se purificó con el kit RNeasy. Se prepararon 2 pools

de 15 μg de ARN total de los cultivos suplementados con LDL oxidadas (*pool* LDLox; n = 10) y de los suplementados con atorvastatina y LDL oxidadas (*pool* Atv + LDLox; n = 10). Se sintetizó ARNc marcado con biotina a partir del ARN total, y ambos *pools* se analizaron con la micromatriz GeneChip Human Genome U133A (Affymetrix). Los resultados fueron analizados con el software Microarray Suite 5.0.

Resultados. De los 22.283 genes representados en la micromatriz, 7.661 (34,4%) estuvieron presentes en el *pool* LDLox y 8.871 (39,8%) en el *pool* Atv + LDLox. Al comparar el perfil de expresión del *pool* Atv + LDLox con el del *pool* LDLox se encontró que 11 genes estaban sobreexpresados con un *Signal Log Ratio* (SLR) de 2,2-1,0 y 190 con un SLR < 1,0; asimismo, 31 genes estaban inhibidos con un SLR de -3,9 a -1,0 y 28 con un SLR > -1,0, y 9.356 genes no presentaban cambio de expresión.

Conclusiones. La atorvastatina produce cambios en la expresión de genes involucrados en la síntesis endógena de colesterol y en otras vías metabólicas independientes.

Palabras clave:

Atorvastatina. HMG-CoA reductasa. Macrófago. Micromatriz.

Este trabajo ha sido financiado en parte por la Fundación Española de Arteriosclerosis/Beca Pfizer, y los proyectos IBE 2002-BIO-03, FIS 00/0952, FIS RT/G03-181 y FIS RT/C03-01.

Correspondencia: Marta Artieda.

Laboratorio de Investigación Molecular. Hospital Universitario Miguel Servet.

Isabel la Católica, 1-3. 50009 Zaragoza. España.

Correo electrónico: martieda@salud.aragob.es

Recibido el 24 de diciembre de 2003 y aceptado el 27 de abril de 2004.

GENE EXPRESSION PROFILE IN HUMAN MACROPHAGES IN RESPONSE TO ATORVASTATIN IN VITRO

Introduction and objective. The overall clinical benefits observed with statin therapy appear to be greater than might be expected from its hypolipidemic role, due to statins exert many

pleiotropic effects on the cells involved in atherosclerotic lesions, as macrophages. The aim of this study was to analyse gene expression in human macrophages *in vitro* incubated with oxidized-LDL with and without atorvastatin in the culture medium to assess atorvastatin response genes which could explain the statin benefits in an independent hypolipidemic pathway.

Material and method. Human mononuclear cells from 10 unrelated subjects were isolated and cultured in Macrophage-SFM at 37 °C and 5% CO₂ distributed among 4 culture flasks for each subject. Oxidized-LDL (ox-LDL) 50 mg/l was added to all culture media at ninth day, and also atorvastatin 1 µmol/l to 2 of 4 culture flasks. After incubation for 18 h, total RNA was isolated using Trizol-LS and purified with RNeasy kit. We pooled 15 µg of total RNA from cultures added with ox-LDL (pool ox-LDL) (n = 10) and from cultures added with atorvastatin and ox-LDL (pool Atv+ox-LDL) (n = 10). Biotin labeled cRNA was synthesized from total RNA and both pools were analysed with the GeneChip Human Genome U133A microarray (Affymetrix). Results were analysed with the Microarray suite 5.0 software.

Results. Out of 22,283 genes present in the microarray, 7,661 genes (34.4%) and 8,871 (39.8%) were expressed in the ox-LDL and Atv+ox-LDL pools, respectively. The gene expression profile comparison between Atv+ox-LDL pool versus ox-LDL pool showed the following results: 11 upregulated genes with a Signal Log Ratio (SLR) of 2.2 to 1.0 and 190 with a SLR < 1.0, 31 downregulated genes with a SLR of -3.9 to -1.0 and 28 with a SLR > -1.0, and 9,356 genes without gene expression change.

Conclusions. Atorvastatin induces gene expression changes in those related to the biosynthetic cholesterol pathway and in other independent metabolic pathways.

Key words:

Atorvastatin. HMG-CoA reductase. Macrophage. Microarray.

Introducción

La disminución de la síntesis de colesterol por inhibidores específicos de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA) reductasa, o estatinas, reduce la progresión y favorece la regresión de la aterosclerosis carotídea y coronaria, reduce la morbilidad de origen cardiovascular y prolonga la supervivencia, tanto en la prevención primaria como secundaria de la enfermedad cardiovascular¹⁻⁵. Las

estatinas son los fármacos más comúnmente prescritos para el tratamiento de la hipercolesterolemia debido a su alta eficacia y seguridad^{6,7}. El beneficio clínico de las estatinas se ha atribuido en gran parte a su papel hipolipemiente, ya que tienen una potente acción reductora de la concentración plasmática de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (cLDL), aumentan moderadamente el colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (cHDL) y disminuyen las concentraciones plasmáticas de triglicéridos de una forma moderada y variable.

En los últimos años se ha sugerido que parte de los beneficios clínicos logrados con las estatinas pueden ser independientes de su acción hipolipemiente. En los estudios CARE³ y WOSCOPS⁴ se estudió la evolución de los sujetos que presentaron durante el seguimiento concentraciones similares de cLDL. Los individuos tratados con pravastatina tuvieron menos acontecimientos coronarios que los tratados con placebo, a pesar de tener cifras similares de cLDL durante el estudio⁸. Del mismo modo, en los metaanálisis realizados con diferentes fármacos hipolipemientes, las estatinas mostraron beneficios superiores a los logrados con otros fármacos y mayores de lo esperado^{9,10}. Asimismo, en el estudio MIRACL con atorvastatina, el beneficio clínico empezó a detectarse en un período muy corto, de pocas semanas, insuficiente para atribuir la mejoría clínica a una reducción significativa de lesiones vasculares¹¹. Todo ello ha llevado a considerar que el beneficio de las estatinas podría ir más allá de su acción sobre la concentración plasmática de cLDL; a estos posibles efectos se les ha denominado efectos pleiotrópicos¹².

Estudios tanto *in vitro* como *in vivo* han demostrado que las estatinas tienen propiedades que podrían explicar algunos efectos beneficiosos de los inhibidores de HMG-CoA reductasa, como efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores¹³, mejora de la disfunción endotelial¹⁴⁻¹⁶, atenuación de la proliferación de las células musculares lisas^{17,18}, reducción de la trombogenicidad^{19,20} y aumento de la estabilidad de las placas ateroscleróticas²¹⁻²³. Este amplio espectro de funciones de las estatinas es posible, ya que estos fármacos tienen acciones directas sobre las diferentes células presentes en la lesión aterosclerótica, entre ellas los macrófagos^{12,24,25}.

El objetivo de este estudio ha sido analizar el perfil de la modificación de la expresión génica inducida por un inhibidor de la HMG-CoA reductasa, atorvastatina, en un modelo *in vitro* de macrófagos humanos sometidos a una sobrecarga de lípidos

oxidados, para identificar a los genes de respuesta a atorvastatina que expliquen el beneficio de las estatinas en una vía independiente de la hipolipemiente. Se ha escogido este modelo celular de macrófagos por su papel crucial en el inicio y la progresión del proceso aterosclerótico. El análisis de la expresión génica se ha realizado con una herramienta de análisis a gran escala, la micromatriz de alta densidad *GeneChip Human Genome U133A*.

Material y método

Sujetos

Se obtuvieron monocitos de sangre periférica de 10 sujetos voluntarios sanos no relacionados, sin hiperlipemia ni manifestaciones clínicas de arteriosclerosis.

Los estudios que se realizaron fueron aprobados por la Comisión de Investigación del Hospital Universitario Miguel Serret de Zaragoza y todos los sujetos participantes firmaron un consentimiento informado.

Obtención y oxidación de las LDL

Las LDL ($d = 1,006-1,063 \text{ kg/l}$) fueron aisladas por ultracentrifugación secuencial en gradiente de densidad de bromuro de potasio a partir de un *pool* de plasma de donantes sanos²⁶ y dializadas en tampón fosfato salino (PBS). Su concentración proteica fue valorada por el método de Bradford²⁷ usando albúmina sérica bovina como calibrador. Las LDL fueron diluidas en PBS a una concentración de 200 mg/l para evitar la agregación de las lipoproteínas²⁸ y oxidadas mediante diálisis en PBS con 20 μM de CuSO_4 a temperatura ambiente y agitación suave durante 24 h. La reacción de oxidación se detuvo mediante la adición de 1 mmol/l de EDTA y diálisis a 4 °C. La oxidación de las LDL fue comprobada por electroforesis en gel de agarosa y por la medida de los dienos conjugados ($\lambda = 234 \text{ nm}$). Las LDL oxidadas muestran mayor migración electroforética que las LDL nativas en gel de agarosa al 0,75% en tampón barbital²⁹ y una mayor absorbancia a 234 nm, debido al aumento de carga negativa y a la formación de dienos conjugados en la reacción de oxidación³⁰. Se comprobó que las LDL oxidadas producían aumento del contenido lipídico intracelular de los macrófagos por tinción con Rojo de Nilo y citofluorometría de flujo³¹.

Obtención de monocitos humanos de sangre periférica y diferenciación a macrófagos

A cada uno de los sujetos seleccionados se le realizó una extracción de 40 ml de sangre periférica sobre heparina de litio (10 kU/l) como anticoagulante. Se aislaron las células mononucleares por separación en gradiente de densidad mediante centrifugación en Ficoll-Paque (Amersham Biosciences), se hicieron 2 lavados con medio RPMI-1640, sin L-glutamina y suplementado con antibióticos (100 kU/l de penicilina y 100 mg/l de estreptomina) y se seleccionaron los monocitos dejando que se adhirieran a frascos de cultivo durante 2 h a 37 °C y un 5% CO_2 , en medio de cultivo RPMI-1640 completo, con GlutaMAX I y 25 mmol/l de tampón Hepes, suplementado con antibióticos, un 1% de aminoácidos no esenciales, un 2% de piruvato sódico y un 1% de suero humano autólogo descomplementado. La descomplementación del plasma se realizó por incubación en baño húmedo a 56 °C durante 30 min. Pasado el período de adhesión, las células no adherentes se eliminaron mediante varios lavados con PBS (sin calcio ni magnesio,

pH = 7,4) y los monocitos aislados se diferenciaron a macrófagos en un medio libre de suero, Macrophage-SFM (Invitrogen) (suplementado con 100 kU/l de penicilina, 100 mg/l de estreptomina y 2 mmol/l de L-glutamina), incubando las células a 37 °C durante 9 días en una atmósfera húmeda con un 5% de CO_2 . Durante los primeros 9 días, los macrófagos fueron incubados en las mismas condiciones en 4 frascos de cultivo distintos.

Suplementación del medio de cultivo con atorvastatina y LDL oxidadas

En el día 9, antes de someter a las células a la sobrecarga lipídica con LDL oxidadas, se adicionó 1 μM atorvastatina durante 1 h a 2 de los 4 cultivos de macrófagos de cada individuo. Pasado este tiempo, todos los cultivos fueron incubados con una concentración 50 mg/l de LDL oxidadas durante 18 h. La atorvastatina cálcica fue proporcionada por Pfizer.

Aislamiento del ARN total

En el día 10 se retiró el medio de cultivo, se hicieron varios lavados de las células con PBS y se procedió a la extracción del ARN total siguiendo el método descrito por Chomczynski y Sacchi³² en el que se basa el reactivo comercial TRIzol-LS® Reagent (Invitrogen). Las células fueron lisadas directamente en el frasco de cultivo añadiendo 1 ml de Trizol-LS. El ARN total resultante fue purificado con el kit RNeasy (Qiagen)³³ y cuantificado por espectrofotometría ($A_{260\text{nm}}$), y su pureza fue valorada utilizando la relación $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$. Se comprobó la integridad del ARN en gel de agarosa al 1%. Una vez comprobada la pureza e integridad del ARN, se prepararon *pools* de 15 μg de ARN total para cada una de las condiciones estudiadas. El ARN fue concentrado mediante vacío, proceso tras el cual se volvió a cuantificar y comprobar la integridad del ARN en gel de agarosa.

Síntesis de ARNc

De cada *pool* de ARN total se usaron 6 μg como material de partida para la síntesis de la primera hebra de ADNc con la enzima retrotranscriptasa SuperScript™ II, Rnase H⁻ (Invitrogen), usando como cebador un oligonucleótido oligo-dT que contenía la secuencia del promotor de la ARN polimerasa del fago T7 (T7-[dT]₂₄). La segunda hebra de ADNc fue sintetizada utilizando las enzimas ADN polimerasa I de *Escherichia coli* (Invitrogen), ADN ligasa de *E. coli* (Invitrogen), Rnasa H de *E. coli* (Invitrogen) y ADN polimerasa del fago T7 (Invitrogen). El ARNc marcado con biotina fue sintetizado usando el kit ENZO BioArray™ HighYield™ Transcript Labeling Kit (Enzo Diagnostics Inc.). Después de la transcripción *in vitro*, los nucleótidos no incorporados fueron eliminados usando las columnas RNeasy (Qiagen).

Hibridación de las matrices

Se llevó a cabo una fragmentación química del ARNc marcado, optimizada para romper el ARNc en fragmentos de 35-200 pares de bases (pb) por hidrólisis inducida por metal. La fragmentación del ARNc marcado favorece la hibridación. Se fragmentaron 15 μg de cada ARNc biotinilado a 94 °C durante 35 min en una solución tampón que contenía 40 mmol/l de Tris-Acetato (pH 8,1), 100 mmol/l de acetato de potasio y 30mmol/l de acetato de magnesio. El ARNc fragmentado fue mezclado con tampón de hibridación (100 mmol/l de MES,

1 mol/l de NaCl, 20 mmol/l de EDTA y un 0,01% de Tween 20) y calentado a 99 °C durante 5 min y posteriormente a 45 °C durante 5 min, para ser cargado a continuación en la matriz de Affymetrix. La primera matriz en la que se realizó la hibridación fue el Test 3 de Affymetrix. Esta matriz permite testar la calidad del ARN previo al análisis de expresión en el Affymetrix® GeneChip® Human Genome 133A (HG-U133A). Durante la hibridación, las matrices fueron incubadas en un horno rotatorio a 45 °C durante 16 h y con una rotación constante de 60 rpm.

Revelado y adquisición de imágenes de las matrices

El lavado y la tinción de cada matriz se realizaron en la estación de fluidos de Affymetrix®. Se realizó un doble marcaje tipo *sandwich* para amplificar la señal con el fluoróforo ficoeritrina. Se usó un programa de lavado y tinción que incluía:

- 10 min × 2 ciclos de lavado con SSPE-T 6 × (0,9 mmol/l de NaCl, 60 mmol/l de NaH₂PO₄, 6 mmol/l de EDTA y un 0,01% de Tween 20) a 25 °C.

- 4 min × 15 ciclos con 0,1 mmol/l de MES, 0,1 mol/l de NaCl, un 0,01% de Tween 20 a 50 °C, tinción del ARNc biotinilado con 10 mg/l de un conjugado estreptavidina-ficoeritrina (Molecular Probes).

- 10 min × 4 ciclos de lavado con SSPE-T a 25 °C, tinción con un anticuerpo antiestreptavidina durante 10 min, tinción con 1 g/l de un conjugado de estreptavidina-ficoeritrina (Molecular Probes) durante 10 min.
- 15 min × 4 ciclos de lavado con SSPE-T a 30 °C.

Las matrices fueron escaneadas a 560 nm con un escáner con láser confocal (Agilent GeneArray Scanner), el cual permite medir la intensidad de fluorescencia emitida por el ARNc unido a las sondas de la matriz, con una resolución de 20 µm.

Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó con el software Microarray Suite 5.0. El análisis estadístico realizado por este programa se basa en algoritmos estadísticos desarrollados con técnicas estadísticas estándares. El algoritmo de detección mediante un test de discriminación clasifica a cada sonda (*probe set*) como presente (P), marginal (M) o ausente (A). Cataloga como marginales a las sondas con una escala de discriminación en el rango intermedio entre la clasificación de P y A. La señal de hibridación es el valor cuantitativo para cada *probe set* y representa el nivel relativo de expresión de un gen. Cuando se comparan las matrices, la intensidad total de la matriz se escala a 100 y, por ello, las señales comparadas son señales de hibridación escaladas a 100 (S-100). Se analizaron los datos del *pool* de macrófagos cultivados con atorvastatina y LDL oxidadas utilizando como línea base los datos del *pool* de macrófagos cultivados solamente con LDL oxidadas. Microarray Suite 5.0. se basa en 2 algoritmos para calcular la significación del cambio y para cuantificar el cambio de la expresión génica para cada *probe set* entre las matrices comparadas. Un algoritmo del cambio genera un valor de p; los valores cercanos a 0 son indicativos de un aumento del nivel de expresión del gen, mientras que valores cercanos a 1 indican una disminución del nivel de expresión. Un segundo algoritmo estima cuantitativamente el cambio en la expresión génica mediante el parámetro *Signal Log Ratio* (SLR). La relación entre el SLR y el cambio de expresión o *Fold Change* (FC) es la siguiente: FC = 2 · exp (SLR) si SLR > 0 y FC = (-1) · 2 · exp (-SLR) si SLR < 0.



Figura 1. Electroforesis en agarosa al 1% del ARN total obtenido.

Resultados

Análisis de los controles de calidad

Calidad de los pools de ARN, ARNc sintetizado y ARNc fragmentado. La integridad de los *pools* de ARN concentrados fue total, como se observa en la figura 1. La relación A_{260nm}/A_{280nm} de los *pools* de ARN fue de 2,05 para el *pool* LDLox y de 2,06 para el *pool* Atv + LDLox. En la figura 2 se observa que el ARNc sintetizado es de buena calidad, ya que hay ARNc con un alto peso molecular. Del mismo modo, el proceso de fragmentación del ARNc fue correcto (fig. 3), y se obtuvieron fragmentos dentro del rango esperado, entre 35 y 200 pb.

Matriz Test 3. Con la matriz Test 3 se comprueba la calidad del ensayo y del ARN de partida. En la matriz se encuentran sondas correspondientes a las zonas 3', intermedia y 5' de varios genes constitutivos en humanos. La relación entre las señales de hibridación para las sondas 3' respecto a las sondas 5' es indicativa de la integridad de los ARNc sintetizados que, a su vez, es el reflejo de la calidad del ARN de partida utilizado. Así, una relación 3'/5' entre las señales de hibridación cercana a 1 indica la integridad total del ARN y ARNc sintetizado. Se consideran como aceptables relaciones de hasta 3. Un alto valor de esta relación indica degradación del ARN o síntesis ineficiente del ds ADNc o del ARNc biotinilado. Tomamos como



Figura 2. Electroforesis en agarosa al 1% del ARNc sintetizado.

referencia los valores de las relaciones para los genes constitutivos β -actina y GAPDH, que fueron de 1,04 y 1,26 para el *pool* LDLox y de 0,97 y 1,10 para el *pool* Atv + LDLox. Las relaciones obtenidas fueron indicativas de que la calidad del ARN de partida fue óptima y de que el proceso de síntesis de ARNc fue correcto. Por ello, pasado este control de calidad se procedió a la hibridación de la matriz HG-U133A.

Controles de hibridación. Tanto las matrices Test 3 como la HG-U133A incluyen controles de hibridación para calcular la eficiencia de la hibridación. Estos controles son sondas para los genes *bio B*, *bio C*, *bio D*, de la ruta de síntesis de la biotina en *E. coli*, y *cre*, gen de la recombinasa del bacteriófago P1. En el tampón de hibridación se incluye una mezcla de transcritos biotinilados de ARNc de *bio B*, *bio C*, *bio D* y *cre* a diferentes concentraciones: 1,5, 5, 25 y 100 pmol/l, respectivamente. Si la hibridación ha sido correcta, *bio C*, *bio D* y *cre* deberían estar siempre presentes y dar un aumento sucesivo de la señal de intensidad, según su concentración. *bio B* es el control menos representado en la mezcla de hibridación, por lo que es el utilizado princi-



Figura 3. Electroforesis en agarosa al 1% del ARNc fragmentado.

palmente para valorar la sensibilidad del experimento. En nuestros ensayos, todos los controles de hibridación, incluido *bio B*, estuvieron presentes en ambas matrices.

Ruido de fondo. El ruido de fondo de la matriz del *pool* LDLox fue $67,87 \pm 5,98$ (media \pm desviación estándar [DE]), y el de la matriz del *pool* Atv + LDLox fue $72,93 \pm 6,41$. Estos valores se encuentran dentro del rango de 20-100 descrito por Affymetrix para las matrices escaneadas con GeneArray[®] Scanners.

Porcentaje de genes presentes

El número de sondas (*probe sets*) nombradas como presentes (P) respecto al número total de sondas representadas en la matriz se indica como el porcentaje de sondas presentes (%P). El %P depende de múltiples factores, como son el tipo celular, el estímulo biológico al que se ha sometido el cultivo celular y la cantidad del ARN de partida. En el experimento realizado, de los 22.283 genes representados en la matriz HG-U133A, 7.661 (34,4%) estuvieron presentes en el *pool* LDLox y 8.871 (39,8%) en el *pool* Atv + LDLox.

Pool Atv + LDLox frente a pool LDLox

Al comparar el perfil de expresión génica del *pool* Atv + LDLox con el del *pool* LDLox se obtuvieron los siguientes resultados:

- Genes sobreexpresados: 11 genes con un SLR de 2,2 -1,0 y 190 genes con un SLR < 1,0.
- Genes inhibidos: 31 genes con un SLR de -3,9 a -1,0 y 28 genes con un SLR > -1,0.
- Genes sin cambio de expresión: 9.356.

Entre los genes que presentaron un cambio en la expresión génica en respuesta a atorvastatina se seleccionó a los que cumplieron los criterios descritos a continuación. Se consideraron aquellos genes con S-100 (valor de la intensidad de hibridación del *probe set* tras la normalización por escalado de la intensidad global a 100) mayor que el ruido de fondo medio de las matrices comparados más 3 veces la DE; este valor fue 81. Esta condición se debía cumplir al menos en una de las matrices comparadas, de modo que se descartaron los genes que no cumplieran este criterio en ninguna de las 2 matrices, para tratar de eliminar posibles falsos positivos, genes con señal de hibridación muy cercana al ruido de fondo de la matriz. Por otra parte, sólo se consideraron los genes que, en la comparación Atv + LDLox frente a LDLox, presentaron un cambio de expresión $\geq 1,5$ veces para los genes sobreexpresados y un cambio de expresión $\leq -1,5$ veces para los genes inhibidos. Al adoptar los citados criterios se limitó el número de genes que presentaron cambio en la expresión en respuesta a atorvastatina a 54 genes, de los cuales 46 estaban sobreexpresados y 8 inhibidos (tabla 1).

Entre los genes que presentaron cambio en su expresión génica en respuesta a atorvastatina, hay algunos que se expresan solamente en presencia o ausencia del fármaco y otros que se expresan en ambas condiciones. Entre los genes que se expresaron solamente en presencia de atorvastatina se encontraron: *C14orf1* (*open reading frame 1* del cromosoma 14), *FLJ20507* (proteína hipotética FLJ20507), *VIL2* (*villin 2*), *KCNAB2* (canal de potasio), *DDX3* (ARN helicasa), *TGM2* (transglutaminasa 2), *LAK-4P* (*lymphokine-activated killer*) y *FLJ22195* (proteína hipotética FLJ22195). Los genes que no se expresaron en presencia del fármaco fueron: *SULT1B1* (sulfotransferasa) y *FLJ13840* (proteína hipotética FLJ13840). Entre los genes que aumentaron su expresión en presencia de atorvastatina destacaron los involucrados en las distintas etapas de la biosíntesis endógena de colesterol. En la primera etapa de síntesis de mevalonato a partir de acetil-CoA destacó la sobreexpresión de HMG-CoA reductasa, enzima limitante del flujo de la vía. Como se observa en la tabla 1, 2 sondas en la matriz muestran la sobreexpresión de HMG-CoA reductasa (HMGCR). En la segunda etapa, en la que el mevalonato presenta una

fosforilación y posteriormente una descarboxilación, dando lugar al isopentenil pirofosfato (el isopreno biológico), condensándose después 6 unidades de isopreno para formar el escualeno, se encontraron sobreexpresadas isopentenil difosfato delta isomerasa (IDI1) y farnesil difosfato farnesil-transferasa-1 (FDFT1). En la siguiente etapa de oxigenación y ciclación del escualeno a lanosterol se observó sobreexpresada la enzima escualeno epoxidasa (SQLE). En la última etapa, en la que se pierden 3 grupos metilo, se reorganizan los dobles enlaces en el anillo de esterano y se satura la cadena lateral para dar lugar al colesterol, se encontró sobreexpresada la enzima esterol-C5-desaturasa (SC5DL).

Entre los genes sobreexpresados destacaron también genes implicados en la síntesis de ácidos grasos, fosfolípidos y triglicéridos, concretamente genes implicados en la desaturación de ácidos grasos, la esteroil-CoA desaturasa (SCD), identificada por dos *probe sets*, y una desaturasa de ácidos grasos-1 (FADS1).

Otro gen interesante que resultó sobreexpresado fue *Insig-1* (*insulin induced gene 1*), representado en la matriz por 3 *probe sets*, como se observa en la tabla 1. *Insig-1* e *Insig-2* desempeñan un papel regulador importante en la homeostasis de lípidos en las células animales. Dada la alta homología entre *Insig-1* e *Insig-2*, del 59,4% (*GenBank*: AY112745 [*Insig-1*] y AF527632 [*Insig-2*]), se comprobó si las sondas que cuantificaban la expresión de *Insig-1* hibridaban con la secuencia de *Insig-2*. Ninguna de las sondas de los *probe sets* que determinan *Insig-1* hibridaron con la secuencia de *Insig-2* (ALIGN program)³⁴.

Se observaron sobreexpresadas varias proteínas de la familia Ras, *RAB5C* y *RAB2*, aunque entre los genes inhibidos también se encontraba *RAB2*. Sin embargo, el resultado de sobreexpresión fue más fiable, ya que estuvo determinado por una sonda de la matriz de tipo *_at*, que identifica a un transcrito determinado, a diferencia del resultado de inhibición, determinado por una sonda *_x_at*, compartida por 2 o más secuencias. En relación con la familia Ras y la reorganización del citoesqueleto, se encontró sobreexpresada una cinasa activadora de p21 (*PAK2: p21-activated kinase 2*). Otros genes también sobreexpresados y con funciones en el citoesqueleto fueron *GSN* (*gelsolin*) y *VIL2* (*villin 2*).

También se encontraron sobreexpresados los genes que codifican la proteína inhibidora de tiorredoxina (TXNIP), ARN helicasa (DDX3), factor de ajuste (SFRS2), desacetilasa de histonas (HDAC1), proteincinasa dependiente de AMPc (PRKACB),

Tabla 1. Genes que presentaron cambio en la expresión en respuesta a atorvastatina

Affymetrix ID	Gen	Señal-100 LDLox		Señal-100 Atv+LDLox		FC	SLR	Cambio	p
217188_s_at	<i>C14orf1</i>	71,5	A	175,4	P	2,3	1,2	S	0,00007
201626_at	<i>INSIG1</i>	179,3	P	257,4	P	1,9	0,9	S	0,00006
202539_s_at	<i>HMGCR</i>	194,9	P	268,0	P	1,9	0,9	S	0,00002
203603_s_at	<i>ZFHX1B</i>	43,2	P	93,9	P	1,9	0,9	S	0,00002
209146_at	<i>SC4MOL</i>	299,4	P	597,9	P	1,9	0,9	S	0,00003
200753_x_at	<i>SFRS2</i>	80,6	P	106,1	P	1,7	0,8	S	0,00019
201043_s_at	<i>ANP32A</i>	79,3	P	145,4	P	1,7	0,8	S	0,00120
201625_s_at	<i>INSIG1</i>	129,1	P	253,0	P	1,7	0,8	S	0,00003
209218_at	<i>SOLE</i>	188,0	P	363,1	P	1,7	0,8	S	0,00005
212279_at	<i>MAC30</i>	122,1	P	188,1	P	1,7	0,8	S	0,00027
214040_s_at	<i>GSN</i>	217,9	P	374,6	P	1,7	0,8	S	0,00002
219460_s_at	<i>FLJ20507</i>	145,3	M	235,7	P	1,7	0,8	S	0,00024
208621_s_at	<i>VIL2</i>	101,6	A	184,1	P	1,7	0,8	S	0,00369
211791_s_at	<i>KCNAB2</i>	85,0	A	131,0	P	1,7	0,8	S	0,00069
201008_s_at	<i>TXNIP</i>	380,4	P	669,9	P	1,6	0,7	S	0,00009
201151_s_at	<i>MBNL</i>	52,1	P	102,1	P	1,6	0,7	S	0,00275
201627_s_at	<i>INSIG1</i>	344,6	P	532,1	P	1,6	0,7	S	0,00077
204194_at	<i>BACH1</i>	43,0	P	83,7	P	1,6	0,7	S	0,00407
209154_at	<i>TIP-1</i>	181,2	P	296,1	P	1,6	0,7	S	0,00165
211162_x_at	<i>SCD</i>	292,8	P	429,5	P	1,6	0,7	S	0,00069
221268_s_at	<i>LOC81537</i>	111,1	P	160,2	P	1,6	0,7	S	0,00086
201211_s_at	<i>DDX3</i>	113,9	A	168,3	P	1,6	0,7	S	0,00304
202562_s_at	<i>C14orf1</i>	120,4	A	207,9	P	1,6	0,7	S	0,00002
211003_x_at	<i>TGM2</i>	211,4	A	344,0	P	1,6	0,7	S	0,00369
214958_s_at	<i>LAK-4P</i>	88,8	A	139,9	P	1,6	0,7	S	0,00008
200799_at	<i>HSPA1A</i>	408,3	P	612,2	P	1,5	0,6	S	0,00002
201156_s_at	<i>RAB5C</i>	304,5	P	428,6	P	1,5	0,6	S	0,00009
201170_s_at	<i>BHLHB2</i>	374,7	P	426,8	P	1,5	0,6	S	0,00019
201209_at	<i>HDAC1</i>	109,5	P	160,9	P	1,5	0,6	S	0,00249
202422_s_at	<i>FACLA</i>	69,0	P	92,8	P	1,5	0,6	S	0,00304
202437_s_at	<i>CYP1B1</i>	441,3	P	697,6	P	1,5	0,6	S	0,00002
202742_s_at	<i>PRKACB</i>	230,6	P	328,5	P	1,5	0,6	S	0,00304
202855_s_at	<i>SLC16A3</i>	155,9	P	179,8	P	1,5	0,6	S	0,00183
203067_at	<i>PDX1</i>	118,5	P	134,7	P	1,5	0,6	S	0,00108
203676_at	<i>GNS</i>	266,2	P	427,0	P	1,5	0,6	S	0,00027
208731_at	<i>RAB2</i>	130,8	P	177,8	P	1,5	0,6	S	0,00015
208878_s_at	<i>PAK2</i>	141,5	P	176,3	P	1,5	0,6	S	0,00097
208881_x_at	<i>ID11</i>	483,4	P	965,1	P	1,5	0,6	S	0,00003
208962_s_at	<i>FADS1</i>	139,4	P	180,7	P	1,5	0,6	S	0,00024
210950_s_at	<i>FDFT1</i>	519,2	P	880,6	P	1,5	0,6	S	0,00035
211423_s_at	<i>SC5DL</i>	273,1	P	423,0	P	1,5	0,6	S	0,00010
211708_s_at	<i>SCD</i>	371,3	P	591,4	P	1,5	0,6	S	0,00002
216604_s_at	<i>SLC7A8</i>	229,1	P	305,4	P	1,5	0,6	S	0,00062
218417_s_at	<i>FLJ20489</i>	253,6	P	326,9	P	1,5	0,6	S	0,00002
219599_at	<i>PRO1843</i>	181,9	P	208,5	P	1,5	0,6	S	0,00069
217924_at	<i>FLJ22195</i>	81,8	A	140,6	P	1,5	0,6	S	0,00183
211074_at	<i>18SrRNA</i>	1.027,3	P	295,2	P	-3,5	-1,8	I	0,99998
207601_at	<i>SULT1B1</i>	99,5	P	39,5	A	-3,2	-1,7	I	0,99851
202416_at	<i>DNAJC7</i>	134,3	P	84,6	P	-2,1	-1,1	I	0,99991
221419_s_at	<i>18SrRNA</i>	792,6	P	315,1	P	-2,0	-1,0	I	0,99969
208730_x_at	<i>RAB2</i>	295,5	P	154,4	P	-1,9	-0,9	I	0,99866
220283_at	<i>FLJ13840</i>	82,5	P	40,6	A	-1,9	-0,9	I	0,99665
1494_f_at	<i>CYP2A6</i>	86,3	P	57,9	P	-1,5	-0,6	I	0,99946
203147_s_at	<i>TRIM14</i>	132,4	P	74,2	P	-1,5	-0,6	I	0,99903

Señal-100: valor de la intensidad de hibridación del *probe set* tras la normalización por escalado de la intensidad global de la matriz a 100; FC: *Fold Change*; SLR: *signal log ratio*; A: ausente; P: presente; M: marginal; S: sobreexpresado; I: inhibido; p: valor de p generado por el algoritmo del cambio: valores cercanos a 0 son indicativos de un aumento del nivel de expresión del gen, mientras que valores cercanos a 1 indican una disminución del nivel de expresión.

fosfoproteína nuclear (ANP32A), factor de transcripción de cremallera de leucinas (BACH1), hidrolasa lisosomal (GNS), piruvato deshidrogenasa (PDX1), *heat shock protein* (HSPA1A), transglutaminasa (TGM2), esfingosina-1-fosfatasa (LOC81537) y ligasa de ácidos grasos (FACL4).

Dentro del grupo de genes que presentaron inhibición en presencia de atorvastatina destacó *18S rRNA* (componente de la subunidad ribosomal 40S), identificado por 2 *probe sets* (tabla 1). Además, al analizar los resultados de los genes englobados como constitutivos, entre los que están *18S rRNA*, *28S rRNA* (componente de la subunidad ribosomal 60S), β -actina y *GADPH*, entre otros, con sondas en las zonas 5', intermedia y 3', se observó que β -actina y *GADPH* se comportaron como genes constitutivos, mientras que ni *18S rRNA* ni *28S rRNA* se comportaron como tales, ya que ambos se encontraron inhibidos en respuesta a atorvastatina.

Discusión

En el presente estudio *in vitro* se analizan algunos de los mecanismos moleculares de las acciones celulares directas de las estatinas mediante el análisis del perfil de modificación génica inducido por atorvastatina en un determinado tipo celular, el macrófago, dado su importante papel en la etiopatología de la arteriosclerosis.

Hemos observado una sobreexpresión mantenida en varias enzimas de distintas etapas de la vía de síntesis endógena de colesterol (HMGCR [*Fold Change* = 1,9], IDI1 [*Fold Change* = 1,5], FDFT1 [*Fold Change* = 1,5], SQLE [*Fold Change* = 1,7], SC5DL [*Fold Change* = 1,5]), lo que era esperable dado el mecanismo de acción de la atorvastatina⁶.

Los efectos independientes de la disminución de los lípidos inducida por el tratamiento con estatinas están relacionados con la inhibición de otros intermediarios isoprenoides de la ruta de síntesis de colesterol, el farnesil pirofosfato (FPP) y el geranylgeranyl pirofosfato (GGPP). Estos intermediarios intervienen en la modificación postraduccional de ciertas proteínas, modificándolas covalentemente en un proceso que se denomina prenilación, que les permite enclavarse en las membranas donde llevan a cabo su función. Entre estas proteínas figuran las láminas nucleares, la subunidad γ de las proteínas G heterotriméricas y las proteínas G pequeñas, de gran trascendencia biológica. Entre las proteínas G pequeñas destacan las de la familia Ras (proteínas de unión a GTP): Ras, Rac, Rab, Rho, Ran, entre otras, que están implicadas en diversas funciones celulares, como la regulación de la expresión génica, la organización del citoesque-

leto, el transporte intracelular de membranas, la proliferación, la diferenciación y la apoptosis^{35,36}. En el presente trabajo hemos observado la sobreexpresión de 2 miembros de la familia Rab, Rab5C y Rab2. Estas proteínas están implicadas en el transporte intracelular de membranas. Rab5C participa en la maquinaria que regula la cinética del tráfico de membrana en la ruta endocítica temprana³⁷. Rab2 se inmunolocaliza en el pre-Golgi y actúa como intermediario en el transporte entre el retículo endoplásmico y el complejo de Golgi³⁸. Relacionadas con la familia Ras, también hemos observado la sobreexpresión de PAK2. La actividad de las proteínas de la familia PAK (*p21-activated protein kinases*) se regula por interacción con las formas activas de las proteínas Rac1 y Cdc42, que regulan la organización del citoesqueleto³⁹. La inhibición de la isoprenilación por las estatinas provoca una acumulación de las formas inactivas de las proteínas de la familia Ras en el citosol⁴⁰, y explicaría la sobreexpresión observada de PAK2 debida a la disminución de formas activas de Rac1 y Cdc42.

También en respuesta a atorvastatina, las moléculas de ARN ribosómico 18S y 28S se encontraron disminuidas. Una posible explicación a este hecho podría ser la disminución de la activación de las proteínas Ran, pertenecientes a la familia Ras y con una activación dependiente de farnesilación, las cuales participan en el transporte de ARN y proteínas.

Por otra parte, *Insig-1*, gen sobreexpresado en respuesta a atorvastatina, desempeña un papel regulador importante en la homeostasis de lípidos en las células animales, regulando la activación de los factores de transcripción SREBP (*sterol regulatory element-binding protein*). Los SREBP activan la expresión de más de 30 genes implicados en la síntesis y captación de colesterol, ácidos grasos, triglicéridos y fosfolípidos, así como el cofactor NADPH necesario para sintetizar estas moléculas⁴¹. Inmediatamente después de su síntesis en la membrana del retículo endoplásmico, los SREBP se unen a la proteína SCAP (*SREBP cleavage-activating protein*), que tiene un dominio sensible a esteroides⁴¹. La retención de SCAP y SREBP en el retículo endoplásmico, promovida por el colesterol, está mediada por otras 2 proteínas, *Insig-1* e *Insig-2*. Yang et al⁴² han demostrado recientemente que *Insig-1* interacciona específicamente con SCAP y que su sobreexpresión evita la activación de SREBP. *Insig-1* está regulada positivamente por SREBP, mientras que la expresión de *Insig-2* es aparentemente constitutiva⁴²⁻⁴⁴. La acción combinada de *Insig-1* e *Insig-2* permite una modulación fina del procesado de

SREBP en diversas condiciones de oferta y demanda de esteroides⁴³. La abundancia relativa de las 3 isoformas de SREBP difiere según se trate de células en cultivo o tejidos animales. En la mayoría de los cultivos celulares, la isoforma predominante es SREBP-1a, que parece ser la causante de mantener los valores basales de síntesis de colesterol y de ácidos grasos *in vivo*⁴⁵. SREBP-2 regula principalmente la ruta de síntesis de colesterol, la cual resultó sobreexpresada en respuesta a atorvastatina en este trabajo, mientras que la isoforma SREBP-1c activa preferentemente los genes implicados en la síntesis de ácidos grasos; en este estudio se encontró un aumento de la expresión de esteroil-CoA desaturasa (SCD), enzima clave en la formación de ácidos grasos monoinsaturados. Recientemente, Sun et al⁴⁶ han identificado la enzima SCD como clave en el eflujo de colesterol, ya que han demostrado que la sobreexpresión del gen de SCD disminuye el eflujo de colesterol hacia apo A-I mediado por ABCA1, pero aumenta el eflujo hacia HDL que es independiente de ABCA1. El aumento de la actividad de SCD conduce a un cambio en la composición de fosfolípidos y ácidos grasos de la membrana plasmática, que produce un aumento de la incorporación de ácidos grasos monoinsaturados en los fosfolípidos y aumenta, por tanto, el eflujo de colesterol hacia HDL independiente de ABCA1^{46,47}.

En conclusión, en este estudio se demuestra que la atorvastatina produce cambios en la expresión de genes involucrados en la síntesis endógena de colesterol y en otras vías metabólicas independientes, principalmente relacionadas con proteínas reguladas por intermediarios isoprenoides y con otras vías reguladas por los factores de transcripción SREBP, que podrían ayudar a explicar los efectos clínicos de las estatinas que van más allá de su papel hipolipemiante.

Bibliografía

1. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994;344:1383-9.
2. Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group. Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. *N Engl J Med* 1998;339:1349-57.
3. Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, et al. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels: Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N Engl J Med* 1996;335:1001-9.
4. Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, et al. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia: West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med* 1995;333:1301-7.
5. Mostaza JM, Lahoz C. Grandes estudios clínicos de prevención cardiovascular con inhibidores de la HMG-CoA reductasa. *Clin Invest Arterioscler* 2002;14(Supl 4):S15-27.
6. Maron DJ, Fazio S, Linton MF. Current perspectives on statins. *Circulation* 2000;101:207-13.
7. Bergoñón S. Seguridad de los inhibidores de HMG-CoA reductasa. *Clin Invest Arterioscler* 2002;14(Supl 4):S48-60.
8. West of Scotland Coronary Prevention Study group. Influence of pravastatin and plasma lipids on clinical events in the West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS). *Circulation* 1998;97:1440-5.
9. Brown BG, Zhao XQ, Sacco DE, Albers JJ. Lipid lowering and plaque regression. New insights into prevention of plaque disruption and clinical events in coronary disease. *Circulation* 1993;87:1781-91.
10. Pekkanen J, Linn S, Heiss G, Suchindran CM, Leon A, Rifkin BM, et al. Ten-year mortality from cardiovascular disease in relation to cholesterol level among men with and without preexisting cardiovascular disease. *N Engl J Med* 1990;322:1700-7.
11. Schwartz GG, Olsson AG, Ezekowitz MD, 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 controlled trial. *JAMA* 2001;285:1711-8.
12. Takemoto M, Liao JK. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1712-9.
13. Blanco-Colio LM, Tuñón J, Martín-Ventura JL, Muñoz B, Gómez A, Ortego M, et al. Efectos pleiotrópicos de los inhibidores de la HMG-CoA reductasa. I. Efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores. *Clin Invest Arterioscler* 2002;14(Supl 4):S28-37.
14. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 1998;97:1129-35.
15. Wagner AH, Kohler T, Ruckschloss U, Just I, Hecker M. Improvement of nitric oxide-dependent vasodilatation by HMG-CoA reductase inhibitors through attenuation of endothelial superoxide anion formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:61-9.
16. Hernández-Perera O, Pérez-Sala D, Navarro-Antolin J, Sánchez-Pascual R, Hernández G, Díaz C, et al. Effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1998;101:2711-9.
17. Lahera V, De las Heras N, Cediel E, Sanz-Rosa D, Cachafeiro V. Efectos pleiotrópicos de los inhibidores de la HMG-CoA reductasa. II. Efectos sobre la pared vascular. *Clin Invest Arterioscler* 2002;14(Supl 4):S38-47.
18. Corsini A, Arnaboldi L, Raiteri M, Quarato P, Faggiotto A, Paoletti R, et al. Effect of the new HMG CoA reductase inhibitor cerivastatin (BAY W6228) on migration, proliferation and cholesterol synthesis in arterial myocytes. *Pharmacological Res* 1996;33:55-61.
19. Dangas G, Badimon JJ, Smith DA, Unger AH, Levine D, Shao JH, et al. Pravastatin therapy in hyperlipidemia: effects on thrombus formation and the systemic hemostatic profile. *J Am Coll Cardiol* 1999;33:1294-304.
20. Colli S, Eligini S, Lalli M, Camera M, Paoletti R, Tremoli E. Statins inhibit tissue factor in cultured human macrophages: a novel mechanism of protection against atherothrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:265-72.
21. Ortego M, Bustos C, Hernández-Presa MA, Tuñón J, Díaz C, Hernández G, et al. Atorvastatin reduces NF- κ B activation and chemokine expression in vascular smooth muscle cells and mononuclear cells. *Atherosclerosis* 1999;147:253-61.
22. Bellosta S, Via D, Canavesi M, Pfister P, Fumagalli R, Paoletti R, et al. HMG-CoA reductase inhibitors reduce MMP-9 secretion by macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1671-8.
23. Hernández-Presa MA, Martín-Ventura JL, Ortego M, Gómez-Hernández A, Tuñón J, Hernández-Vargas P, et al. Atorvastatin reduces the expression of cyclooxygenase-2 in a rabbit model of atherosclerosis and in cultured vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2002;160:49-58.

24. Sposito AC, Chapman MJ. Statin therapy in acute coronary syndromes. Mechanistic insight into clinical benefit. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1524-34.
25. Palinski W, Napoli C. Unraveling pleiotropic effects of statins on plaque rupture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1745-50.
26. Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 1955;34:1345-53.
27. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Ann Biochem* 1976;72:248-54.
28. Hoff HF, Whitaker TE, O'Neil J. Oxidation of low density lipoprotein leads to particle aggregation and altered macrophage recognition. *J Biol Chem* 1992;267:602-9.
29. McGlashan DAK, Pilkington TRE. A method of lipoprotein electrophoresis using agarose gel. *Clin Chim Acta* 1968;22:646-7.
30. Zorn U, Haug C, Celik E, Wennauer R, Schmid-Kotsas A, Bachem MG, et al. Characterization of modified low density lipoprotein subfractions by capillary isotachopheresis. *Electrophoresis* 2001;22:1143-9.
31. Greenspan P, Mayer EP, Fowler SD. Nile Red: A selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol* 1984;100:965-73.
32. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-9.
33. Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Bio-techniques* 1993;15:532-4 y 536-7.
34. Pearson WR, Wood T, Zhang Z, Miller W. Comparison of DNA sequences with protein sequences. *Genomics* 1997;46:24-36.
35. Mackay DJ, Hall A. Rho GTPases. *J Biol Chem* 1998;273:20685-8.
36. Zohn IM, Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Der CJ. Rho family proteins and Ras transformations: the RHOad less traveled gets congested. *Oncogene* 1998;17:1415-38.
37. Bucci C, Parton RG, Mather IH, Stunnenberg H, Simons K, Hoflack B, et al. The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* 1992;70:715-28.
38. Tisdale EJ. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is required for vesicular transport in the early secretory pathway. *J Biol Chem* 2001;276:2480-6.
39. Shin EY, Shin KS, Lee CS, Woo KN, Quan SH, Soung NK, et al. Phosphorylation of p85 beta PIX, a Rac/Cdc42-specific guanine nucleotide exchange factor, via the Ras/ERK/PAK2 pathway is required for basic fibroblast growth factor-induced neurite outgrowth. *J Biol Chem* 2002;277:44417-30.
40. Blanco-Colio LM, Villa A, Ortego M, Hernández-Presa MA, Pascual A, Plaza JJ, et al. 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, induce apoptosis of vascular smooth muscle cells by down regulation of Bcl-2 expression and Rho A prenylation. *Atherosclerosis* 2002;161:17-26.
41. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBP: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 2002;109:1125-31.
42. Yang T, Espenshade PJ, Wright ME, Yabe D, Gong Y, Aebersold R, et al. Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBP in ER. *Cell* 2002;110:489-500.
43. Yabe D, Brown MS, Goldstein JL. Insig-2, a second endoplasmic reticulum protein that binds SCAP and blocks export of sterol regulatory element-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:12753-8.
44. Janowski BA. The hypocholesterolemic agent LY295427 up-regulates INSIG-1, identifying the INSIG-1 protein as a mediator of cholesterol homeostasis through SREBP. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:12675-80.
45. Shimomura I, Shimano H, Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *J Clin Invest* 1997;99:838-45.
46. Sun Y, Hao M, Luo Y, Liang CP, Silver DL, Cheng C, et al. Stearoyl-CoA desaturase inhibits ATP-binding cassette transporter A1-mediated cholesterol efflux and modulates membrane domain structure. *J Biol Chem* 2003;278:5813-20.
47. Lund-Katz S, Laboda HM, McLean LR, Phillips MC. Influence of molecular packing and phospholipid type on rates of cholesterol exchange. *Biochemistry* 1998;27:3416-23.