

El tratamiento con dosis altas de atorvastatina disminuye la inflamación en la aterosclerosis carotídea humana

J.L. Martín-Ventura^a, L.M. Blanco-Colio^a, A. Gómez-Hernández^a, B. Muñoz-García^a, M. Vega^b, J. Serrano^b, L. Ortega^c, G. Hernández^d, J. Egido^a y J. Tuñón^e

^aLaboratorio de Patología Vascul. Fundación Jiménez Díaz y Universidad Autónoma de Madrid. Madrid. España.

^bServicio de Cirugía Vascul. Hospital Clínico San Carlos. Universidad Complutense. Madrid. España.

^cServicio de Anatomía Patológica. Hospital Clínico San Carlos. Universidad Complutense. Madrid. España.

^dDepartamento Médico. Laboratorios Pfizer. Madrid. España.

^eServicio de Cardiología. Fundación Jiménez Díaz y Universidad Autónoma de Madrid. Madrid. España.

Introducción. Las estatinas mejoran la estabilidad de la placa al disminuir la actividad inflamatoria. Hemos analizado el efecto de un ciclo corto de tratamiento con altas dosis de atorvastatina sobre la inflamación de la placa de aterosclerosis humana.

Materiales y métodos. Veinte pacientes programados para endarterectomía carotídea electiva, y sin tratamiento previo con estatinas, fueron asignados aleatoriamente en el momento de la indicación quirúrgica para recibir atorvastatina 80 mg/día (n = 11) o no estatinas (n = 9) hasta el día de la cirugía (1 mes). En las placas extraídas durante la endarterectomía se analizaban el infiltrado de macrófagos, y la expresión de MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) y ciclooxigenasa-2 (COX-2) por inmunohistoquímica. La activación de NF-κB se estudió con la técnica de Southwestern.

Resultados. La atorvastatina disminuyó las concentraciones de colesterol total (118 ± 10 frente a 191 ± 10 mg/dl; p = 0,016) y de lipoproteínas de baja densidad (LDL) (63 ± 9 frente a 125 ± 9 mg/dl; p = 0,038), mientras que no hubo cambios en el grupo control. Los triglicéridos y las lipoproteínas

de alta densidad (HDL) no variaron significativamente en ningún grupo. Las placas ateroscleróticas del grupo de atorvastatina presentaron una reducción significativa del infiltrado de macrófagos (2,5 ± 1% frente a 9,3 ± 2,4%; p < 0,05), y de la expresión de MCP-1 (11 ± 1% frente a 24 ± 4%; p < 0,05) y COX-2 (16 ± 2,3% frente a 34 ± 4,4%; p < 0,05). El número de núcleos con actividad de NF-κB era menor en las placas de los pacientes que recibieron atorvastatina que en los que no recibieron tratamiento (5.706 ± 1.260 frente a 8.063 ± 1.308; p < 0,05).

Conclusiones. El tratamiento intensivo con atorvastatina disminuye la inflamación en las placas de aterosclerosis carotídea humana en sólo 1 mes.

Palabras clave:

Estatina. Aterosclerosis. Inflamación.

HIGH-DOSE ATORVASTATIN THERAPY REDUCES INFLAMMATION IN HUMAN CAROTID ATHEROSCLEROSIS

Introduction. Statins improve plaque stability by diminishing inflammatory activity. We analyzed the effect of short-term high-dose atorvastatin on plaque inflammation in human carotid atherosclerosis.

Materials and methods. Twenty patients scheduled to undergo elective carotid endarterectomy without previous statin treatment were randomized at the time of surgical indication to receive either atorvastatin 80 mg/day (n = 11) or no statins (n = 9) until surgery (1 month later). Atherosclerotic plaques were analyzed by immunohistochemistry to investigate macrophage

Este trabajo ha sido financiado por la beca Pfizer de la Sociedad Española de Arteriosclerosis y por una ayuda de laboratorios Pfizer.

Correspondencia: Dr. J. Tuñón.
Servicio de Cardiología. Fundación Jiménez Díaz.
Avda. Reyes Católicos, 2. 28040 Madrid. España.
Correo electrónico: j.tunon@wanadoo.es

Recibido el 24 de mayo de 2005 y aceptado el 6 de septiembre de 2005.

infiltrate, and expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and cyclooxygenase-2 (COX-2). In addition, nuclear factor- κ B (NF- κ B) activity was studied by Southwestern histochemistry.

Results. Atorvastatin decreased serum levels of total cholesterol (118 ± 10 versus 191 ± 10 mg/dl; $p = 0.016$) and low-density lipoprotein (63 ± 9 versus 125 ± 9 mg/dl; $p = 0.038$), while no changes were noted in the control group. Triglycerides and high-density lipoprotein showed no significant changes in either of the two groups. Carotid atherosclerotic plaques from the atorvastatin group demonstrated a significant reduction in macrophage infiltration ($2.5 \pm 1\%$ versus $9.3 \pm 2.4\%$; $p < 0.05$) and expression of MCP-1 ($11 \pm 1\%$ versus $24 \pm 4\%$; $p < 0.05$) and COX-2 ($16 \pm 2.3\%$ versus $34 \pm 4.4\%$; $p < 0.05$). The number of nuclei active for NF- κ B was lower in plaques from patients that received atorvastatin than in those from the non-treated group ($5,706 \pm 1,260$ versus $8063 \pm 1,308$; $p < 0.05$).

Conclusions. Intensive atorvastatin therapy decreases inflammatory activity in human carotid atherosclerotic plaques in as little as 1 month.

Key words:

Statin. Atherosclerosis. Inflammation.

La inflamación desempeña un papel en la formación y complicación de la placa aterosclerótica¹. En este proceso es clave la activación del factor de transcripción nuclear κ B (NF- κ B), que regula al alza la expresión de múltiples genes que codifican proteínas involucradas en la inflamación²⁻⁴. Este factor está activado en la aterosclerosis humana, especialmente en la zona de los hombros de las lesiones^{5,6} y también muestra una mayor activación en los leucocitos de pacientes con angina inestable que en los que tenían enfermedad coronaria estable⁷. Entre las proteínas reguladas por NF- κ B se encuentran el MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) y la ciclooxygenasa 2 (COX-2)²⁻⁴. La primera de ellas es probablemente la quimioquina más importante que participa en el reclutamiento de monocitos al interior de la pared vascular⁸. En cuanto a la COX-2, es una isoforma de la COX. Aunque cataliza la misma reacción que la COX-1, es decir, el paso de ácido araquidónico a prostaglandina G₂ (PGG₂), se expresa en tejidos inflamatorios junto a la PGE-sintasa. Esta enzima hará que la PGG₂ se derive hacia la síntesis de PGE₂, que tiene actividad proinflamatoria⁹.

Las estatinas han demostrado reducir la incidencia de episodios cardiovasculares y la mortalidad de modo consistente en múltiples estudios¹⁰⁻¹². Una parte de estos beneficios podría deberse a su acción antiinflamatoria¹³. Así, se ha objetivado que estos fármacos reducen las concentraciones de proteína C reactiva¹⁴, y datos de nuestro grupo muestran que disminuyen la activación de NF- κ B, así como el infiltrado de macrófagos y la expresión de COX-2 y MCP-1 en un modelo de aterosclerosis experimental de conejo^{15,16}. Recientemente, se ha visto que el tratamiento agresivo con estatinas reduce más la incidencia de episodios cardiovasculares e interfiere más significativamente con la progresión de la placa aterosclerótica que un régimen de tratamiento moderado¹⁷. En el presente estudio hemos analizado los efectos antiinflamatorios del tratamiento agresivo con atorvastatina 80 mg/día sobre la placa aterosclerótica de arterias carótidas humanas.

Materiales y métodos

Pacientes

De un total de 77 pacientes con estenosis carotídea del 70% o mayor, que iban a sufrir endarterectomía carotídea electiva en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid entre enero de 2002 y enero de 2004, se incluyó a 21 en el presente estudio. Previamente se excluyó a los que presentaban enfermedad inflamatoria o neoplasia, cirugía mayor o infarto de miocardio en los 6 meses previos, intolerancia o contraindicaciones para el uso de estatinas y a aquellos que hubieran recibido estatinas o fármacos antiinflamatorios en el año previo, exceptuando aspirina a dosis de hasta 325 mg/día. De los pacientes incluidos, 2 habían tenido un accidente isquémico reciente ipsilateral, 1 tuvo un episodio de amaurosis fugaz 6 meses antes y 2 presentaban una historia antigua de ictus isquémico contralateral y accidente isquémico transitorio. Los restantes no tenían antecedentes de síntomas neurológicos.

Cuando se determinaba la indicación de endarterectomía electiva, se proponía a los pacientes su entrada en el estudio. En caso de aceptación se obtenía el consentimiento informado y el cirujano vascular que les atendía les distribuía de manera aleatoria, usando una tabla de números aleatorios, para recibir atorvastatina 80 mg/día ($n = 11$) o para continuar sin estatinas hasta el momento de la intervención quirúrgica ($n = 10$). Se excluyó a uno de los pacientes del grupo que no recibía la estatina debido a un diagnóstico de linfoma durante el estudio, por lo que en este grupo quedaron 9 pacientes. Durante la intervención quirúrgica, las placas extraídas en el procedimiento de endarterectomía eran recogidas para su análisis. El estudio fue aprobado por el comité ético de la institución.

Inmunohistoquímica en muestras de endarterectomía carotídea

Las placas ateroscleróticas se mantuvieron en formaldehído durante 24 h y posteriormente en etanol al 70% hasta su inclusión en parafina. Se escogían para el estudio las zonas de la placa que presentaban un mayor espesor.

Las muestras incluidas en parafina se cortaban en piezas de 4 μ m de espesor a intervalos de 5 mm. Se utilizaron como anticuerpos primarios monoclonales antihumanos (macrófa-

gos, HAM-56, DAKO), anticuerpos monoclonales anti- α actina de células musculares lisas (HHF-35, SIGMA), COX-2 (Cayman) y MCP-1 (Abcam), que se administraban durante la noche. Los anticuerpos secundarios se administraban durante 1 h y se añadía ABCComplex/HRP (DAKO) durante 30 minutos. Las secciones se teñían con 3,3'-diaminobencidina (DAB, DAKO) y con hematoxilina, y se montaban en Pertex (Medite, Alemania). Para descartar que existiera tinción no específica, en cada experimento se incluía un control negativo sin el anticuerpo primario.

Técnica de Southwestern

La distribución y actividad de unión al ADN de NF- κ B in situ se detectaba usando una sonda de ADN marcada con digoxigenina con una secuencia específica de consenso para este factor de transcripción, como ha descrito previamente nuestro grupo¹⁸. A continuación, las preparaciones se incubaban con un anticuerpo antidigoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina y, finalmente, se detectaban con nitroazul de tetrazolio (NBT). Como controles negativos se usaban ensayos de competición con un exceso de sonda no marcada de 200 veces.

Cuantificación

La cuantificación de los resultados la realizó un patólogo que no conocía el tratamiento que habían recibido los pacientes. Se usó un análisis computarizado con el sistema de análisis de imagen semiautomático Cue-2 (Olympus) y el programa Micro Image™ (versión 1.0 de Windows). Las secciones arteriales teñidas con los anticuerpos se digitalizaron vía un microscopio Olympus (BH-2), a 400 aumentos, conectado a una videocámara CCD como hemos descrito⁵. Se seleccionaron aleatoriamente 5-10 áreas de cada preparación. Tras la adquisición

de la imagen se asignó a cada píxel un intervalo de valores de grises de 0 a 225. Las áreas marcadas se delimitaron y de esta forma el análisis automático se llevó a cabo estableciendo en primer lugar un nivel umbral, seguido de una mejora en la imagen (convirtiendo los píxels próximos al blanco a blanco, los próximos al negro a negro y extendiendo los restantes uniformemente sobre los intervalos de valores de la escala de grises) y, finalmente, se realizó una segmentación (transformando la imagen en otra imagen binaria). Los resultados se expresaron como porcentaje del área total que mostraba tinción positiva en la inmunohistoquímica y como núcleos positivos por mm² en la técnica de Southwestern.

Análisis estadístico

Se realizó con los programas GraphPAD InStat (GraphPAD) y SPSS 11.0. Los datos se presentan como media \pm error estándar. Los cambios en las concentraciones lipídicas en cada grupo de tratamiento se analizaban mediante análisis de la covarianza usando los valores basales como covariable. Los datos obtenidos con la técnica de Southwestern e inmunohistoquímica se analizan con la prueba de Mann-Whitney. Se consideraron significativas diferencias con $p < 0,05$ (bilateral).

Resultados

Concentraciones lipídicas

Los datos clínicos y los valores basales de lípidos no eran significativamente diferentes entre ambos grupos (tabla 1). Al final del estudio la atorvastatina redujo el colesterol total (118 ± 10 frente a 191 ± 10 mg/dl; $p = 0,016$) y LDL (63 ± 9 frente a

Tabla 1. Características basales de los pacientes

Variable	Control (n = 9)	Atorvastatina (n = 11)	p
Edad	69,1 \pm 2,48	67,5 \pm 2,83	0,79
Sexo			
Varón	6 (66%)	9 (82%)	0,62
Mujer	3 (33%)	2 (18%)	0,62
Diabetes mellitus	3 (33%)	4 (36%)	1,00
Hipertensión arterial	7 (78%)	11 (100%)	0,19
Fumador actual	1 (11%)	2 (18%)	1,00
Cardiopatía isquémica	2 (22%)	4 (36%)	0,64
Arteriopatía periférica	5 (55%)	5 (45%)	1,00
ACV previo*	2 (22%)	2 (18%)	1,00
Colesterol total (mg/dl)	210 \pm 19,0	191,3 \pm 10,3	0,22
LDL (mg/dl)	142,8 \pm 12,0	125,6 \pm 9,4	0,34
HDL (mg/dl)	40,2 \pm 2,3	42,1 \pm 3,6	0,76
Triglicéridos (mg/dl)	133,8 \pm 10,1	140,8 \pm 15,6	0,95
Fármacos			
Aspirina	3 (33%)	3 (27%)	1,00
Anticoagulantes	1 (11%)	0 (0%)	0,45
Bloqueadores beta	0 (0%)	0 (0%)	–
Tienopiridinas	3 (33%)	3 (27%)	1,00
IECA/ARA-II	5 (55%)	7 (64%)	1,00
Antagonistas del calcio	2 (22%)	3 (27%)	1,00
Diuréticos	1 (11%)	0 (0%)	0,45
Antidiabéticos orales	1 (11%)	1 (9%)	1,00
Insulina	1 (11%)	1 (9%)	1,00

ACV: accidente cerebrovascular; IECA: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; ARA-II: antagonistas de los receptores de la angiotensina II.

*Todos los ACV eran isquémicos. Uno de los dos del grupo control fue un accidente isquémico transitorio. Uno de los pacientes del grupo de atorvastatina tuvo un episodio de amaurosis fugaz 6 meses antes del estudio (no incluido en la tabla).

125 ± 9 mg/dl; p = 0,038), mientras que no hubo cambios en el grupo no tratado. Los triglicéridos y las HDL no variaron significativamente en ninguno de los grupos.

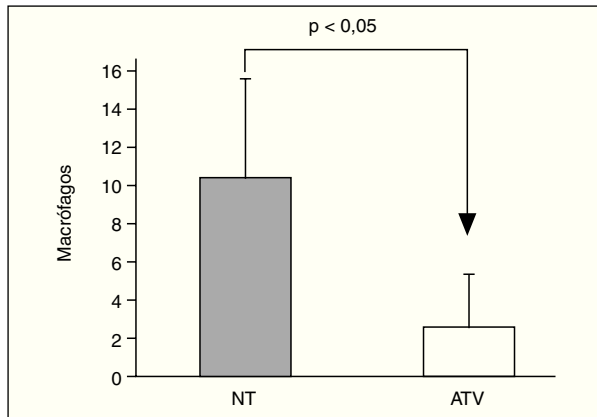


Figura 1. El infiltrado de macrófagos en la placa aterosclerótica era menor en las procedentes de pacientes que habían recibido atorvastatina (ATV) que en los que no recibieron tratamiento (NT).

Efectos de la atorvastatina en la composición de la placa de ateroma

Los especímenes de endarterectomía carotídea de los pacientes tratados con atorvastatina tenían menos infiltración de macrófagos (2,5 ± 1% frente a 9,3 ± 2,4%; p < 0,05) que los del grupo no tratado (figs. 1 y 2). Por el contrario, no había diferencias significativas entre el número de células musculares lisas vasculares ni en el número total de células entre ambos grupos.

La técnica de Southwestern demostró que el tratamiento con atorvastatina disminuía la activación de NF-κB en las placas ateroscleróticas (5.706 ± 1.260 frente a 8.063 ± 1.308; p < 0,05). En los controles negativos no había tinción nuclear.

Por inmunohistoquímica objetivamos que la expresión de MCP-1 y COX-2 estaba reducida en las lesiones de los pacientes tratados con la estatina (11 ± 1% frente a 24 ± 4% y 16 ± 2,3% frente a 34 ± 4,4%, respectivamente; p < 0,05 para ambas comparaciones) (fig. 3).

Figura 2. Inmunohistoquímica para macrófagos en especímenes de endarterectomía carotídea. La que corresponde a un paciente tratado con 80 mg/día de atorvastatina (ATV) muestra una menor tinción positiva para macrófagos (marrón) que la procedente de un paciente que no recibió la estatina (NT).

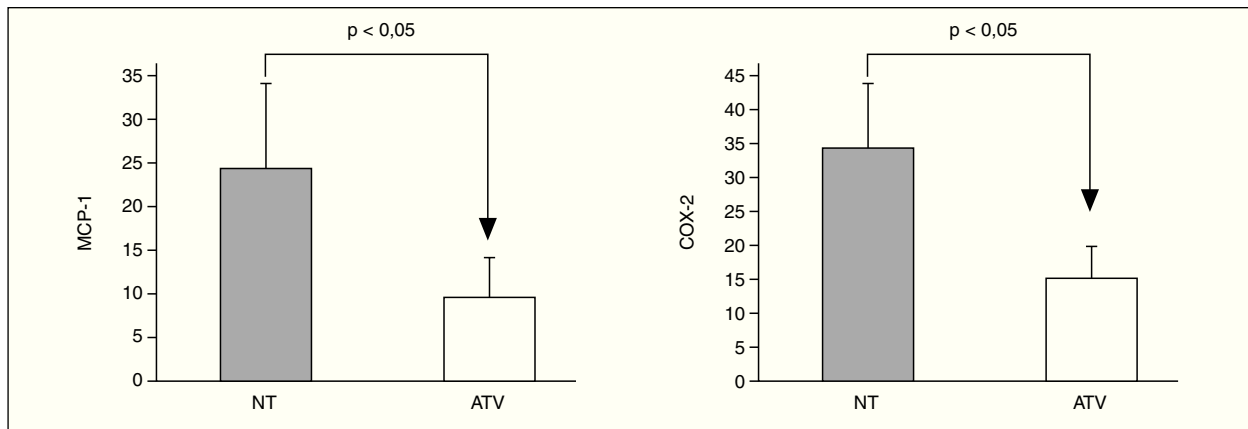
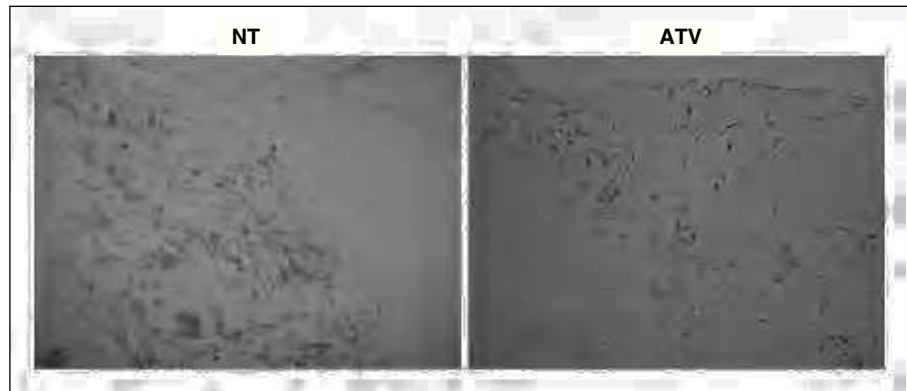


Figura 3. El área de la placa que mostraba tinción positiva para MCP-1 y COX-2 era significativamente menor en los pacientes tratados con atorvastatina (ATV) que en los que no habían recibido tratamiento (NT).

Discusión

En el presente trabajo hemos analizado el efecto de un ciclo de tratamiento corto e intensivo con atorvastatina sobre la actividad inflamatoria de la placa de aterosclerosis carotídea humana. Las placas de los pacientes que habían recibido atorvastatina mostraban un menor infiltrado de macrófagos, lo que indica una menor actividad inflamatoria. Este resultado es similar al obtenido en estudios previos, en los que pravastatina y simvastatina disminuían el contenido en macrófagos de las lesiones ateroscleróticas, aunque tras 3 o 4 meses de tratamiento, con dosis estándar. Esta reducción de la actividad inflamatoria es probablemente la causante en parte de la disminución de la incidencia de ictus mostrada en diversos estudios y confirmada en el Heart Protection Study, publicado durante la fase de reclutamiento del presente estudio¹⁹.

El tratamiento intensivo con atorvastatina no sólo redujo el infiltrado de macrófagos, sino también la actividad del factor de transcripción nuclear NF- κ B. Este hallazgo concuerda con trabajos previos en modelos animales de aterosclerosis^{15,16,20}. Sin embargo, es de interés que, en un estudio similar a éste, la administración de pravastatina 40 mg/día durante 3 meses no afectó la actividad de NF- κ B en arteria carótida humana²¹. Esto sugiere que los beneficios clínicos recientemente demostrados por el tratamiento intensivo con atorvastatina 80 mg/día frente a regímenes estándar podrían deberse, en parte, a una acción antiinflamatoria más consistente²². Así, el ensayo PROVE-IT mostró que el tratamiento intensivo con atorvastatina (80 mg/día) reducía la incidencia de episodios cardiovasculares frente a 40 mg/día de pravastatina en pacientes que habían tenido un síndrome coronario agudo¹⁷. Un dato más importante: aquellos pacientes cuyos valores de proteína C reactiva descendían por debajo de 2 mg/l tenían aún menos episodios²³, lo que apoya la tesis de que el efecto antiinflamatorio de estos fármacos contribuye a su beneficio clínico. Análogamente, el ensayo TNT demostró que una dosis de atorvastatina de 80 mg/día disminuye la incidencia de episodios cardiovasculares frente a una de 10 mg/día en pacientes con enfermedad coronaria estable²⁴. Finalmente, la atorvastatina de 80 mg/día reducía la progresión de la aterosclerosis coronaria, mientras que la pravastatina de 40 mg/día no conseguía este efecto²⁵. Esta reducción se correlacionaba significativamente no sólo con el descenso de lipoproteínas, sino también con el de proteína C reactiva²⁶.

Finalmente, también hemos demostrado que el tratamiento intensivo con atorvastatina reducía la

expresión de MCP-1 y COX-2 en las placas ateroscleróticas carotídeas. Dado que el NF- κ B regula al alza la expresión de estas proteínas proinflamatorias, este dato sugiere que la disminución de su actividad causada por la atorvastatina podría ser la causante de la disminución de la expresión de MCP-1 y COX-2. MCP-1 se sobreexpresa en la región vulnerable de las aterosclerosis humana²⁷ y se ha visto que su expresión es reducida por las estatinas en modelos animales de aterosclerosis^{15,20}. Además, las estatinas y los bloqueadores de MCP-1 han mostrado recientemente efectos similares en la estabilización de lesiones ateroscleróticas establecidas, según Kitamoto et al²⁸. Más aún, la COX-2 está sobreexpresada en las lesiones ateroscleróticas carotídeas causantes de ictus recientes²⁹. Su expresión es reducida por el tratamiento con estatinas de células musculares lisas vasculares *in vitro* y en modelos animales¹⁶. La simvastatina también disminuía su expresión en placas de aterosclerosis carotídea, pero este efecto se observó tras 4 meses de tratamiento³⁰.

Por tanto, nuestros datos muestran que la reducción de macrófagos en las lesiones ateroscleróticas observada tras el tratamiento intensivo con atorvastatina se asocia con una disminución de la actividad de NF- κ B y la consiguiente reducción de la expresión de COX-2 y MCP-1, y probablemente de otras moléculas proinflamatorias involucradas en el reclutamiento de monocitos, cuya expresión es controlada por este factor de transcripción y que no han sido exploradas en este estudio.

En conclusión, este estudio muestra que el tratamiento intensivo con atorvastatina disminuye la actividad inflamatoria en las placas de ateroma carotídeo humano en sólo 1 mes. Estos datos sugieren que el efecto antiinflamatorio de las altas dosis de estatinas en seres humanos pueden estar presentes muy pronto tras el comienzo del tratamiento.

Bibliografía

1. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115-26.
2. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappa B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med*. 1997; 336:1066-71.
3. Tuñón J, Martín-Ventura JL, Gómez-Hernández A, Blanco-Colio LM, Tarín Vicente N, Egido J. Etiopatogenia y correlaciones clínicas de la aterosclerosis. En: Egido J, Tuñón J, López Bescós L, editores. *Aterosclerosis: de la disfunción endotelial a la regeneración miocárdica*. Madrid: Editorial Línea de Comunicación; 2004. p. 19-37.
4. Egido J, Hernández-Presa MA, Tuñón J, Blanco Colio LM, Ortego M, Suzuki Y, et al. Transcription factor κ B (NF- κ B) and cardiovascular disease. *Cardiovascular Risk Factors*. 1999;9:159-68. Disponible en: <http://www.crf.medynet.com/contenido/2000/2/92-103.pdf>

5. Martín-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Muñoz-García B, Gómez-Hernández A, Arribas A, Ortega L, et al. NF-kappa B activation and Fas ligand overexpression in blood and plaques of patients with carotid atherosclerosis: potential implication in plaque instability. *Stroke*. 2004;35:458-63.
6. Brand K, Page S, Bartsch A, Brandl R, Knuechel R, Page M, et al. Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest*. 1996;97:1715-22.
7. Ritchie ME. Nuclear factor-kappa B is selectively and markedly activated in humans with unstable angina pectoris. *Circulation*. 1998;98:1707-13.
8. Inoue S, Egashira K, Ni W, Kitamoto S, Usui M, Otani K, et al. Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy limits progression and destabilization of established atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation*. 2002;106:2700-6.
9. Simon L. Role and regulation of cyclooxygenase-2 during inflammation. *Am J Med*. 1999;106:37S-42S.
10. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomised trial of cholesterol lowering in 4,444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet*. 1994;344:1383-9.
11. Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, Macfarlane PW, et al. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. *N Engl J Med*. 1995;333:1301-7.
12. Pedro-Botet J, Rubiés-Prat J. Tratamiento hipolipemiante. En: Egido J, Tuñón J, López Bescós L, editores. *Aterotrombosis: de la disfunción endotelial a la regeneración miocárdica*. Madrid: Editorial Línea de Comunicación; 2004. p. 119-32.
13. Blanco-Colio LM, Tuñón J, Martín-Ventura JL, Egido J. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of statins. *Kidney Int*. 2003;63:12-23.
14. Jialal I, Stein D, Balis D, Grundy SM, Adams-Huet B, Devaraj S. Effect of hydroxymethyl glutaryl coenzyme A reductase inhibitor therapy on high sensitive C-reactive protein levels. *Circulation*. 2001;103:1933-5.
15. Bustos C, Hernández-Presa MA, Ortego M, Tuñón J, Ortega L, Pérez F, et al. HMG-CoA reductase inhibition by atorvastatin reduces neointimal inflammation in a rabbit model of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 1998;32:2057-64.
16. 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.
17. Cannon CP, Braunwald E, McCabe CH, Rader DJ, Rouleau JL, Belder R, et al. Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 2004;350:1495-504.
18. Hernández-Presa MA, Gómez-Guerrero C, Egido J. In situ non-radioactive detection of nuclear factors in paraffin sections by Southwestern histochemistry. *Kidney Int*. 1999;55:209-14.
19. Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2002;360:7-22.
20. Hernández-Presa MA, Ortego M, Tuñón J, Martín-Ventura JL, Mas S, Blanco-Colio LM, et al. Simvastatin reduces NF-kappa B activity in peripheral mononuclear and in plaque cells of rabbit atheroma more markedly than lipid lowering diet. *Cardiovasc Res*. 2003;57:168-77.
21. Crisby M, Nordin-Fredriksson G, Shah PK, Yano J, Zhu J, Nilsson J. Pravastatin treatment increases collagen content and decreases lipid content, inflammation, metalloproteinases, and cell death in human carotid plaques: implications for plaque stabilization. *Circulation*. 2001;103:926-33.
22. Tuñón J, Blanco-Colio LM, Egido J. Intensive treatment with statins and the progression of cardiovascular diseases. The beginning of a new era? *Nephrol Dial Transpl*. 2004;19:2696-9.
23. Ridker PM, Cannon CP, Morrow D, Rifai N, Rose LM, McCabe CH, et al. Pravastatin or atorvastatin evaluation and infection therapy-thrombolysis in myocardial infarction 22 (PROVE IT-TIMI 22) investigators. C-reactive protein levels and outcomes after statin therapy. *N Engl J Med*. 2005;352:20-8.
24. LaRosa JC, Grundy SM, Waters DD, Shear C, Barter P, Fruchart JC, et al. Investigators. Intensive lipid lowering with atorvastatin in patients with stable coronary disease. *N Engl J Med*. 2005;352:1425-35.
25. Nissen SE, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Brown BG, Ganz P, Vogel RA, et al. Effect of intensive compared with moderate lipid-lowering therapy on progression of coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2004;29:1071-80.
26. Nissen SE, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Crowe T, Sasiela WJ, Tsai J, et al. Statin therapy, LDL cholesterol, C-reactive protein, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005;352:29-38.
27. Martín-Ventura JL, Ortego M, Esbrit P, Hernández-Presa MA, Ortega L, Egido J. Possible role of parathyroid hormone-related protein as a proinflammatory cytokine in atherosclerosis. *Stroke*. 2003;34:1783-9.
28. Kitamoto S, Nakano K, Hirouchi Y, Kohjimoto Y, Kitajima S, Usui M, et al. Cholesterol-lowering independent regression and stabilization of atherosclerotic lesions by pravastatin and by anti-monocyte chemoattractant protein-1 therapy in nonhuman primates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:1522-8.
29. Cipollone F, Prontera C, Pini B, Marini M, Fazio M, De Cesare D, et al. Overexpression of functionally coupled cyclooxygenase-2 and prostaglandin E synthase in symptomatic atherosclerotic plaques as a basis of prostaglandin E(2)-dependent plaque instability. *Circulation*. 2001;104:921-7.
30. Cipollone F, Fazio M, Iezzi A, Zucchelli M, Pini B, De Cesare D, et al. Suppression of the functionally coupled cyclooxygenase-2/prostaglandin E synthase as a basis of simvastatin-dependent plaque stabilization in humans. *Circulation*. 2003;107:1479-85.