

Efecto del ácido 13-*cis*-retinoico sobre el perfil de expresión génica de células HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) determinado por microarray

Juliana Salazar^a, Mercedes Camacho^b, Lluís Masana^a, Luís Vila^b y Josep Ribalta^a

^aUnitat de Recerca de Lípids i Arteriosclerosi. Institut de la Recerca en Ciències de la Salut. Universitat Rovira i Virgili. Reus. Tarragona. España.

^bLaboratori de Mediadors de la Inflamació. Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona. España.

Introducción y objetivo. El tratamiento con isotretinoína (ácido 13-*cis*-retinoico; 13-*cis* AR) se ha asociado con hipertrigliceridemia y bajas concentraciones de colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (cHDL) y, se ha hipotetizado que el desarrollo de hipertrigliceridemia secundaria a este tratamiento pondría de manifiesto una predisposición al síndrome metabólico. Debido al riesgo de arteriosclerosis asociado a este síndrome, hemos estudiado el efecto del 13-*cis* AR sobre la expresión génica en células endoteliales.

Métodos. A partir de ARN total aislado de células endoteliales humanas (HUVEC) tratadas con 13-*cis* AR (1 μ M) durante 0 (control), 6 y 24 h se realizó un análisis por microarrays (U133A array de Affymetrix) de > 22.000 sondas, y un análisis por RT-PCR a tiempo real de una serie de genes seleccionados por su implicación en la vía de señalización del ácido retinoico.

Resultados. El tratamiento de las células endoteliales con 13-*cis* AR produce cambios significativos en la expresión de genes implicados en la adhesividad celular y el metabolismo lipídico, concretamente sobre el aclaramiento de

remanentes de lipoproteínas y en el metabolismo de las lipoproteínas de alta densidad (HDL).

Conclusión. La isotretinoína en el endotelio tiene un efecto sobre factores de riesgo para la arteriosclerosis, que es especialmente relevante en la regulación de la expresión génica de los procesos de adhesión celular y del metabolismo lipídico.

Palabras clave:

Ácido 13-*cis*-retinoico. Isotretinoína. HUVEC. HDL. Adhesión celular.

EFFECT OF 13-CIS-RETINOIC ACID ON THE GENETIC EXPRESSION PROFILE OF HUVEC CELLS (HUMAN UMBILICAL VEIN ENDOTHELIAL CELLS) DETERMINED BY MICROARRAY

Introduction and objective. Treatment with isotretinoin (13-*cis*-retinoic acid; 13-*cis* RA) has been associated with hypertriglyceridemia and low high density lipoprotein-cholesterol (HDL-c) levels and it has been hypothesized that the development of hypertriglyceridemia secondary to this treatment may possibly lead to the metabolic syndrome. Due to the risk of atherosclerosis associated with this syndrome, we studied the effect of 13-*cis* RA on gene expression in endothelial cells.

Methods. Total RNA isolated from human endothelial cells (HUVEC) were treated without 13-*cis* RA (control) or were incubated with 13-*cis* RA (1 μ M) for 6 h and 24 h. Microarray analysis (Affymetrix U133A array) with > 22,000 probes was

Este trabajo ha sido financiado por la Fundación Española de Arteriosclerosis/Beca Almirall, el proyecto SAF 2002-02781 y las redes temáticas G03/181, C03/08 y C03/01.

Correspondencia: J. Ribalta.
Facultat de Medicina i Ciències de la Salut.
Sant Llorenç, 21. 43201 Reus. España.
Correo electrónico: josep.ribalta@urv.cat

Recibido el 9-11-2006 y aceptado el 26-01-2007.

used together with real-time RT-PCR of a series of genes selected because of their involvement in the retinoic acid signalling pathway.

Results. Treatment of endothelial cells with 13-*cis* RA produced significant changes in the expression of genes involved in the processes of cell adhesion and lipid metabolism, specifically in the clearance of lipoprotein remnant particles and in HDL metabolism.

Conclusion. Isotretinoin in endothelium affects risk factors for atherosclerosis, which is especially important in the regulation of gene expression of the processes of cell adhesion and lipid metabolism.

Key words:

13-*cis*-retinoic acid. Isotretinoin. HUVEC. HDL. Cell adhesion.

Introducción

La hiperlipemia es un factor de riesgo cardiovascular causado por factores ambientales, genéticos y/o farmacológicos. Los retinoides, los antivirales inhibidores de la proteasa y los bloqueadores beta, entre otros, alteran los valores lipídicos plasmáticos y provocan dislipemia. Los retinoides se utilizan como tratamiento del acné, de la psoriasis y de determinados procesos cancerígenos, y concretamente la isotretinoína (ácido 13-*cis*-retinoico; 13-*cis* AR), una de las formas activas de la vitamina A, se ha asociado a alteraciones transitorias en el metabolismo lipídico¹ y, en algunos casos, en el metabolismo glucídico². Aproximadamente el 20% de los pacientes tratados presenta incrementos significativos en los valores plasmáticos de lipoproteínas ricas en triglicéridos (lipoproteínas de muy baja densidad [VLDL]), de colesterol total y de la ratio aterogénica colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (cLDL)/ colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (cHDL). De hecho, existe un estudio que plantea como hipótesis que la isotretinoína pondría de manifiesto una predisposición genética al síndrome metabólico³, y ello está de acuerdo con estudios de nuestro grupo que sugieren una relación entre la vitamina A y alteraciones relacionadas con el síndrome metabólico, como la hiperlipemia familiar combinada⁴⁻⁶.

El incremento en los valores lipídicos puede ser el resultado tanto de un aumento en la síntesis hepática de lipoproteínas⁷, como de una disminución del catabolismo de las lipoproteínas circulantes⁸⁻¹⁰. El mecanismo molecular por el cual el 13-*cis* AR ejerce este efecto es desconocido, aunque podría ser a través de la regulación transcripcional de ge-

nes diana implicados en el metabolismo lipídico y glucídico mediada por los receptores de AR (RAR α , β y γ) y los receptores X retinoides (RXR α , β y γ)¹¹ y que es dependiente de ligando.

En pacientes tratados con isotretinoína las concentraciones plasmáticas de 13-*cis* AR en plasma pueden aumentar considerablemente. Dada la toxicidad del fármaco, es posible que, además de provocar alteraciones en el metabolismo lipídico, provoque alteraciones en procesos endoteliales como la adhesión celular, la permeabilidad y/o la inflamación asociados al inicio y a la progresión de la lesión aterosclerótica. No existen estudios ni in vivo ni in vitro en los que se haya valorado el efecto de la isotretinoína sobre el endotelio, por lo que nosotros proponemos establecer in vitro, en cultivo de células HUVEC, qué genes presentan alterados sus valores de expresión tras una exposición a 13-*cis* AR y, por lo tanto, dilucidar cuál podría ser la afectación endotelial y qué procesos podrían estar involucrados en ésta.

Material y método

Cultivo celular

Las células endoteliales se obtuvieron a partir de vena de cordones umbilicales (HUVEC) procedentes del servicio de obstetricia del Hospital de Sant Pau. El cultivo primario se obtuvo mediante digestión con colagenasa¹². Cultivos primarios de HUVEC se mantuvieron a 37 °C y 5% de CO₂ en Medio 199 que contenía 20% de suero bovino fetal (SBF), 2 mmol/l de glutamina, 1 mmol/l de piruvato sódico, 20 mmol/L de HEPES, 30 g/l de suplemento de crecimiento endotelial, 10.000 unidades/l de heparina, 100.000 U/l de penicilina y 100 mg/l de estreptomina hasta alcanzar la confluencia. Los experimentos se realizaron con células en fase I. Las células se tripsinizaron (tripsina/ácido etilendiaminotetraacético [EDTA], 0,25/0,025%) y se sembraron en placas de 6 pozos donde se mantuvieron en Medio 199 que contenía el 20% de SBF sin ECGS ni heparina durante 48 h. Transcurrido este periodo, las células se incubaron en ausencia (control) o presencia de 13-*cis* AR (Sigma Aldrich) 1 μ M (dimetilsulfóxido [DMSO]) en Medio 199 que contenía el 1% de SBF durante 6 o 24 h. Se realizaron 2 experimentos en días diferentes. La concentración de 13-*cis* AR seleccionada es la que permite observar una máxima respuesta, sin ser tóxica para el cultivo celular, para intentar así reproducir el efecto farmacológico. Y los tiempos seleccionados, de 6 y 24 h, permiten detectar genes de expresión temprana y genes de expresión tardía.

Aislamiento de ARN total

El ARN total de cada muestra se extrajo con Trizol (Invitrogen) y se purificó con RNeasy Mini kit y RNase-free DNase Set (QIAGEN) según los protocolos de los fabricantes. Una vez extraído el ARN total se determinó su calidad mediante gel de agarosa al 1%, y se preparó un *pool* de cada una de las 3 condiciones con los 2 experimentos celulares independientes.

Microarray

El análisis de expresión génica se realizó en el Human Genome U133A Array utilizando la tecnología GeneChip de Affymetrix. El software utilizado para el procesamiento de los

arrays y de los resultados fue el Microarray suite versión 5.0 (Affymetrix).

Se analizaron los datos de los *pools* de HUVEC cultivados con 13-*cis* AR a 6 y 24 h utilizando como control los datos de la *pool* control. Se consideró que una sonda presentaba expresión diferencial con respecto al control cuando estaba ≥ 2 veces sobreexpresada o reprimida.

Mediante el programa PANTHER¹³ (<http://www.pantherdb.org>) de Applied Biosystems se realizó la anotación funcional y el análisis estadístico de las categorías funcionales sobrerrepresentadas a las 6 y las 24 h con respecto a la base de datos del NCBI (*Homo sapiens*).

RT-PCR

El ADN complementario (ADNc) se sintetizó a partir de 1 μ g de ARN total utilizando *random hexamers* y la transcriptasa reversa (RT) SuperScript II (Invitrogen). Una alícuota de 5 μ l de la reacción de RT se utilizó para la reacción de amplificación de PCR con el kit Assays-on-demand (Applied Biosystems) correspondiente a cada gen. Las reacciones se llevaron a cabo en un ABI PRISM 5700 Sequence Detector (Applied Biosystems). La cuantificación de los resultados se realizó mediante el método *threshold* (C_t), para el que se utilizó gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como control interno de normalización.

Resultados

Análisis por microarray

A las 6 h de incubación de las células HUVEC con 13-*cis* AR, 95 sondas presentaron una expresión diferencial de 2 veces sobreexpresadas o reprimidas con respecto al control, de las cuales 81 correspondían a genes descritos; mientras que a las 24 h fueron 279 las sondas con una expresión diferencial, siendo 249 las correspondientes a genes descritos. Estos genes sobreexpresados y reprimidos a las 6 y las 24 h se clasificaron en procesos biológicos. Los procesos biológicos significativamente sobrerrepresentados ($p < 0,01$) se muestran en la tabla 1. El número de procesos afectados por el estímulo es mayor en el tiempo 24 h, y de éstos los que tienen una posible trascendencia en el proceso aterosclerótico son la adhesión celular, el metabolismo lipídico y la inmunidad mediada por el interferón.

De entre los genes con expresión diferencial del proceso de adhesión celular, cabe resaltar por su papel en el proceso inflamatorio la molécula intercelular de adhesión (*ICAM1*), la molécula de adhesión celular vascular (*VCAM1*) y la E-selectina (*E-SELE*), que promueven el reclutamiento leucocitario y su migración a través de la pared vascular endotelial, y la fibronectina 1 (*FN1*), que es un componente de la matriz subendotelial (tabla 2).

Los genes relacionados con el metabolismo lipídico que presentan cambios en la expresión génica en respuesta al 13-*cis* AR se muestran en la tabla 3. Se observa un aumento de la expresión de genes que intervienen en la hidrólisis y en el aclaramiento de lipoproteínas ricas en triglicéridos, como el

Tabla 1. Procesos biológicos alterados de forma significativa

Categorías (procesos biológicos)	p
6 h	
Transducción de la señal	< 0,001
Procesos del desarrollo	< 0,001
24 h	
Metabolismo lipídico	< 0,001
Procesos del desarrollo	< 0,001
Adhesión celular	< 0,001
Inmunidad mediada por el interferón	< 0,01
Transducción de la señal	< 0,01

Tabla 2. Genes implicados en la adhesión celular con expresión diferencial

Gen	Símbolo	Cambio (veces)
Sobreexpresados		
Nidogén 2 (osteonidogén)	<i>NID2</i>	2,8
Molécula de adhesión celular neuronal 2	<i>NCAM2</i>	2,6
E-selectina	<i>SELE</i>	2,6
Molécula intercelular de adhesión	<i>ICAM1</i>	2,5
Molécula de adhesión celular vascular	<i>VCAM1</i>	2,5
Receptor celular 1 del virus hepatitis A	<i>HAVCR1</i>	2,5
Fibronectina 1	<i>FN1</i>	2,1
Galectina 9	<i>LGALS9</i>	2
Homólogo al supresor de tumores 1	<i>FAT</i>	2
Reprimidos		
BH-protocaderina	<i>PCDH7</i>	-6,5
Colagenasa, tipo I, alfa 2	<i>COL1A2</i>	-2,6
Colagenasa, tipo III, alfa 1	<i>COL3A1</i>	-2
Centauroina, beta 2	<i>CENTB2</i>	-2

Los valores positivos indican sobreexpresión, mientras que los valores negativos indican represión.

receptor de lipoproteínas remanentes (*LRP2*), y de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) como es la lipasa endotelial (*LIPG*). Genes implicados en el proceso de modificación de ácidos grasos también se encuentran incrementados. Éstos son la desaturasa de ácidos grasos delta-9 (*SCD*), que es la enzima limitante en la síntesis de ácidos grasos monoinsaturados, y las desaturasas delta-5 y delta-6 (*FADS1* y 2), la proteína L-bifuncional peroxisomal (*LBP*) y la elongasa de ácidos grasos de cadena larga (*ELOVL6*), que metabolizan los ácidos grasos esenciales de la dieta a ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga; así como el receptor de la insulina (*INSR*) que interviene en la internalización de ácidos grasos. Y por otro lado aumentan su expresión 2 enzimas que intervienen en la síntesis endógena de colesterol: la farnesil difosfato farnesil-

Tabla 3. Genes del metabolismo lipídico con expresión diferencial

Gen	Símbolo	Cambio (veces)
Metabolismo de lipoproteínas		
Lipasa endotelial	<i>LIPG</i>	2,6
Receptor de lipoproteínas remanentes	<i>LRP2</i>	3,5
Metabolismo de ácidos grasos		
Delta-9 desaturasa (estearoil-CoA desaturasa)	<i>SCD</i>	2,8
Delta-5 desaturasa	<i>FADS1</i>	2
Delta-6 desaturasa	<i>FADS2</i>	2,6
Proteína L-bifuncional	<i>LBP</i>	5,7
Elongasa de ácidos grasos de cadena larga	<i>ELOVL6</i>	2,5
Receptor para insulina	<i>INSR</i>	2,6
Metabolismo del colesterol		
7-hidrocolesterol reductasa	<i>DHCR7</i>	2,6
Farnesil difosfato farnesiltransferasa-1	<i>FDFT1</i>	2,3
Otros		
Proteína transportadora de retinol 1, celular	<i>RBP1</i>	3
Prostaglandina I2 (prostaciclina) sintasa	<i>PTGIS</i>	2,8
Fosfatidilinositol-4-fosfato 5-quinasa, tipo I, beta	<i>PIP5K1B</i>	2,3
Proteína-8 vinculada con la miotubularina	<i>MTMR8</i>	2,1
Acetoacetyl-CoA sintetasa	<i>AACS</i>	2,1
Proteína-3 similar al transportador de oxisterol	<i>OSBPL3</i>	2,1
Apolipoproteína L, 3	<i>APOL3</i>	2,1
Citocromo P450, familia 1, subfamilia B, polipéptido 1	<i>CYP1B1</i>	-26
Citocromo P450, familia 1, subfamilia A, polipéptido 1	<i>CYP1A1</i>	-5,6
Diacilglicerol aciltransferasa, 1	<i>DGAT1</i>	-3
Receptor X retinoide, beta	<i>RXRβ</i>	-2,6
Diacilglicerol cinasa, alfa	<i>DGKA</i>	-2
3-alfa-hidroxiesteroide deshidrogenasa, tipo II	<i>AKR1C3</i>	-2
Proteína transportadora de ácidos grasos, 5	<i>FABP5</i>	-2

Los valores positivos indican sobreexpresión, mientras que los valores negativos indican represión.

transferasa-1 (*FDFT1*), que cataliza el primer paso de la síntesis, y la 7-hidrocolesterol reductasa (*DHCR7*), que cataliza el último paso.

Y finalmente aparece significativamente alterado el proceso biológico de inmunidad mediada por el interferón al que pertenecen el factor regulador de interferón (*IRF1*), la proteína inducida por interferón (*IFIT1*) y las oligoadenilatos sintasas (*OAS1*, *OAS2*, *OAS3* y *OASL*).

Análisis de la vía de señalización del ácido retinoico por RT-PCR

Para complementar el resultado de expresión obtenido por microarray de algunos de los genes de la vía de señalización del ácido retinoico que pueden estar implicados en el efecto observado por el tratamiento con 13-*cis* AR, se analizó mediante RT-PCR a tiempo real la expresión de *CRABP1* y 2, *PPARγ*, *RXRα* y *RXRγ*. Las proteínas transportadoras intracelulares de AR, *CRABP1* y 2 controlan la disponibilidad de AR y participan en el complejo de transcripción que se forma en el núcleo. En nuestro experimento sus expresiones se encuentran ligeramente alteradas a los 2 tiempos. Por otro lado, los factores de transcripción

que participan en la regulación génica, *PPARγ*, *RXRα* y *RXRγ*, aumentan su expresión de forma destacable. *PPARγ* aumenta de 1,2 veces a las 6 h a 3,2 veces a las 24 h, mientras que *RXRα* y *RXRγ* aumentan su expresión en 3,5 y 2,2 veces, respectivamente, a las 6 h, aunque este aumento no se mantiene a las 24 h. Contrariamente, *RXRβ* disminuye su expresión en 2,6 veces a las 24 h (resultado obtenido por microarray).

Discusión

Hemos estudiado los efectos biológicos inducidos por el 13-*cis* AR sobre el endotelio mediante análisis de expresión génica, con el objetivo de evaluar su potencial aterogénico.

Los resultados indican que en contacto con concentraciones farmacológicas de 13-*cis* AR se producen cambios en el endotelio que pueden suponer un aumento de la adhesividad celular, un aumento del aclaramiento de remanentes de lipoproteínas y una modificación del metabolismo de la HDL.

Adhesión celular

El endotelio, tras un estímulo físico o químico, expresa en su superficie moléculas de adhesión (*ICAM*,

VCAM y E-SELE) que incrementan su capacidad de reclutar e internalizar leucocitos, iniciando así un proceso inflamatorio. Estas moléculas de adhesión se localizan en placas ateroscleróticas humanas^{14,16}, y sus valores en estado soluble se consideran predictores de riesgo cardiovascular¹⁷. En nuestras condiciones experimentales el 13-cis AR aumenta en más de 2 veces los valores de ARNm de la ICAM-1, la VCAM-1, la E-SELE y la FN1, lo que sugiere un papel proinflamatorio del fármaco (isotretinoína).

Metabolismo lipídico

La isotretinoína provoca alteraciones lipídicas que son dependientes de la dosis y que generalmente aparecen a las 6 semanas del inicio del tratamiento. Los valores plasmáticos de lipoproteínas ricas en triglicéridos (VLDL) aumentan, y los valores plasmáticos de cHDL disminuyen. En la circulación, tanto las VLDL como los quilomicrones están sujetos al mismo metabolismo intravascular; las lipoproteínas son hidrolizadas mediante las lipasas del endotelio e internalizadas a través de los receptores lipoproteínas de baja densidad (LDL) y LRP2 para su uso por los diferentes tejidos. En nuestro experimento los valores de ARNm de la lipoproteína lipasa no están alterados, lo que es consecuente con resultados obtenidos en otros estudios in vivo en los que su actividad no varía^{1,18}. Sin embargo, detectamos un aumento de más de 3 veces en la expresión de LRP2, que sugiere que el endotelio reacciona al aumento de lipoproteínas inducido por el fármaco, facilitando así la retirada de remanentes de la circulación. Hay que decir que algunos estudios in vivo indican una afectación en esta vía⁸⁻¹⁰, lo que podría significar que en individuos susceptibles el mecanismo de aclaramiento sería menos eficaz y favorecería la hipertrigliceridemia secundaria al tratamiento.

Como se ha comentado, otro de los efectos secundarios de este fármaco es el descenso de los valores de cHDL. Nuestros resultados muestran que en parte podría ser debido a un aumento en los valores del gen de la lipasa endotelial, que interviene en el catabolismo de la HDL. Estudios en modelos animales muestran que la sobreexpresión de la lipasa endotelial reduce de forma significativa los valores de cHDL¹⁹, y en estudios genéticos en humanos se han identificado polimorfismos potencialmente funcionales en individuos con elevados valores de cHDL²⁰.

Por otra parte, hemos observado un aumento en la expresión de toda una serie de enzimas involucradas en el metabolismo de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (fig. 1) que podría afectar la composición de los fosfolípidos de la membrana, y

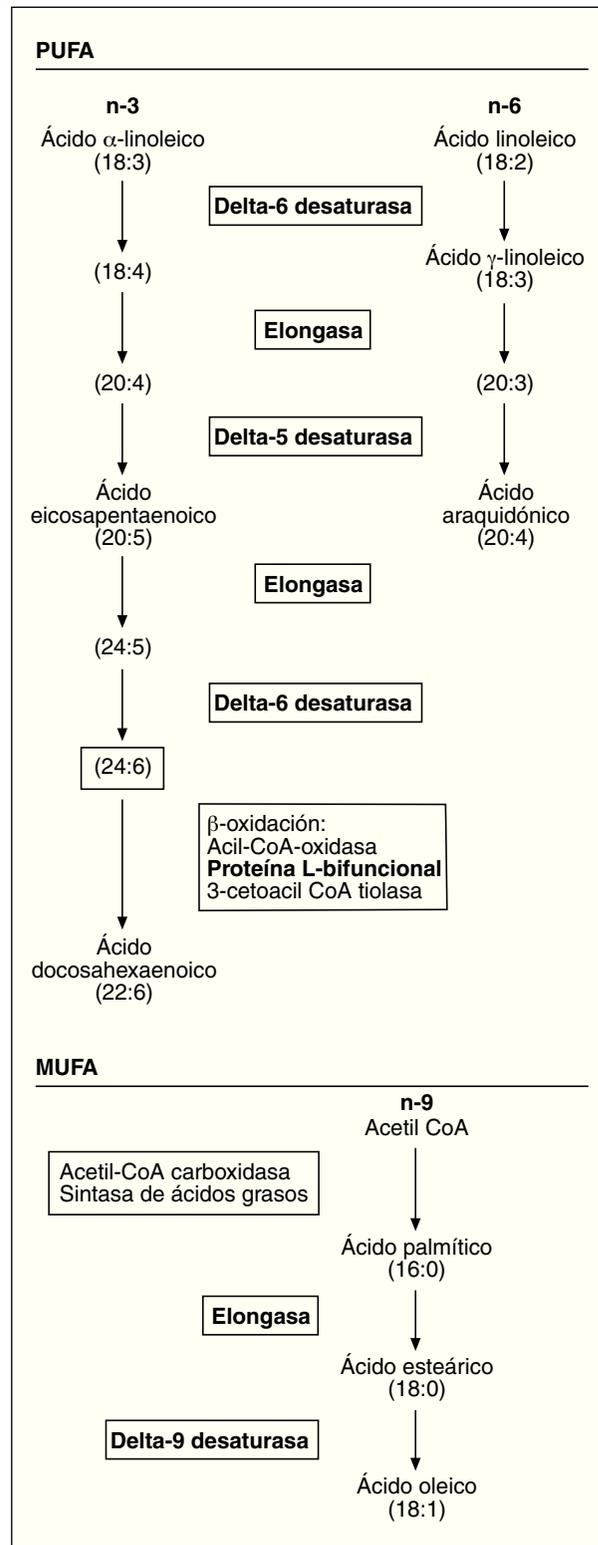


Figura 1. Esquema de la biosíntesis de los ácidos grasos insaturados. PUFA: ácidos grasos poliinsaturados; MUFA: ácidos grasos monoinsaturados. (En negrita aparecen remarcadas las enzimas que han presentado una expresión diferencial tras el estímulo.)

por lo tanto sus propiedades físicas. Concretamente, la desaturasa delta-9 cataliza la reacción final en la transformación de ácidos grasos de cadena larga a ácidos grasos monoinsaturados, mientras que las desaturasas delta-5 y delta-6, la proteína L-bifuncional y la elongasa de ácidos grasos de cadena larga son esenciales en la formación de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. Algunos estudios en modelos animales han mostrado una activación de las desaturasas delta-9²¹ y delta-5²² por la vitamina A y el AR en el hígado. La importancia de estos ácidos grasos en el proceso aterosclerótico radica en sus diferentes funciones: son ligandos para factores de transcripción que regulan la expresión de genes que codifican para transportadores, proteínas de unión y otros factores involucrados en la diferenciación celular²³; intervienen en la respuesta inflamatoria²⁴, e incrementan la fluidez de la membrana²⁵. Referente a esta última función, una sobreexpresión de delta-9 aumenta la proporción de ácidos grasos monoinsaturados frente a los saturados, provocando un cambio en la composición de la membrana plasmática que hace disminuir el flujo de colesterol hacia HDL mediado por ABCA1 y aumenta el flujo pasivo de colesterol²⁶, por lo que podríamos decir que la isotretinoína en el endotelio afectaría el transporte reverso de cHDL.

Otro proceso que también se ve afectado es el de síntesis endógena de colesterol. Las células endoteliales, a diferencia de otros tipos celulares de la vasculatura (células musculares lisas y macrófagos), no acumulan colesterol, aunque sí tienen la maquinaria para sintetizar esteroides. Dos enzimas de la síntesis del colesterol, la *FDFT1* y *DHCR7*, aumentan su expresión por el 13-*cis* AR.

Inmunidad mediada por el interferón

Por último, cabe incidir en que en respuesta al 13-*cis* AR aumenta la expresión del *IRF-1* y las diferentes oligoadenilatosintasas, lo que podría ser indicativo de una activación inmunológica del endotelio. *IRF-1* es un factor de transcripción involucrado en la regulación del crecimiento celular y en la respuesta inmune mediada por interferón γ (*IFN- γ*). En diferentes tipos celulares *IRF-1* es inducido por ácido todo-*trans* retinoico (ARNm y proteína) acompañado de un aumento de la expresión de genes diana, como *OAS2*²⁷.

Señalización molecular del 13-cis AR

El 13-*cis* AR es un efectivo agente farmacológico, aunque presenta poca afinidad tanto por las proteínas transportadoras intracelulares de ácido retinoico (*CRABP*) como por los receptores nuclea-

res RXR y RAR, a través de los cuales los retinoides median sus efectos biológicos. Uno de los mecanismos de acción propuesto implica una isomerización intracelular a ácido todo-*trans* retinoico y/o ácido 9-*cis* retinoico, y serían estas moléculas las que regularían la transcripción génica y mediarían parte del efecto farmacológico descrito^{28,29}. RXR forma heterodímeros permisivos con otros receptores nucleares (PPAR, LXR y FXR) que pueden ser activados tanto por agonistas de RXR como del receptor pareja. Nosotros, por RT-PCR a tiempo real, observamos un aumento en la expresión de *RXR α* , *RXR γ* y *PPAR γ* , y pensamos que algunos de los efectos observados en nuestro experimento son a través de la regulación transcripcional mediada por estos receptores.

En conclusión, podemos decir que en células endoteliales el tratamiento con 13-*cis* AR produce cambios en la expresión de genes involucrados en procesos inflamatorios e inmunológicos, así como en el metabolismo de la HDL. Estos procesos, junto con el aumento de los valores de lípidos en plasma, pueden estar contribuyendo a un posible proceso aterosclerótico en estos pacientes.

Bibliografía

1. Bershad S, Rubinstein A, Paterniti JR, Le NA, Poliak SC, Heller B, et al. Changes in plasma lipids and lipoproteins during isotretinoin therapy for acne. *N Engl J Med*. 1985;313:981-5.
2. Timperley AC, Withnall RD, Rainford DJ. The development of insulin-dependent diabetes mellitus in renal transplant patient receiving oral isotretinoin. *Nephrol Dial Transplant*. 1996;11:753.
3. Rodondi N, Darioli R, Ramelet AA, Hohl D, Lenain V, Perdrix J, et al. High risk for hyperlipidemia and the metabolic syndrome after an episode of hypertriglyceridemia during 13-*cis* retinoic acid therapy for acne: a pharmacogenetic study. *Ann Intern Med*. 2002;136:582-9.
4. Ribalta J, LaVille AE, Girona J, Vallve JC, Masana L. Low plasma vitamin A concentrations in familial combined hyperlipidemia. *Clin Chem*. 1997;43:2379-83.
5. Ribalta J, Girona J, Vallve JC, La Ville AE, Heras M, Masana L. Vitamin A is linked to the expression of the AI-III-AIV gene cluster in familial combined hyperlipidemia. *J Lipid Res*. 1999;40:426-31.
6. Salazar J, Ferre R, Vallve JC, Pocovi M, Cabezas MC, Masana L, et al. Two novel single nucleotide polymorphisms in the promoter of the cellular retinoic acid binding protein II gene (*CRABP-II*). *Mol Cell Probes*. 2003;17:21-3.
7. Melnik B, Bros U, Plewig G. Characterization of apoprotein metabolism and atherogenic lipoproteins during oral isotretinoin treatment. *Dermatologica*. 1987;175 Suppl 1:158-68.
8. Vu-Dac N, Gervois P, Torra IP, Fruchart JC, Kosykh V, Kooistra T, et al. Retinoids increase human apo C-III expression at the transcriptional level via the retinoid X receptor. Contribution to the hypertriglyceridemic action of retinoids. *J Clin Invest*. 1998;102:625-32.
9. Gustafson S, Vahlquist C, Sjoblom L, Eklund A, Vahlquist A. Metabolism of very low density lipoproteins in rats with isotretinoin (13-*cis* retinoic acid)-induced hyperlipidemia. *J Lipid Res*. 1990;31:183-90.
10. De Marchi MA, Maranhao RC, Brandizzi LI, Souza DR. Effects of isotretinoin on the metabolism of triglyceride-rich lipoproteins and on the lipid profile in patients with acne. *Arch Dermatol Res*. 2006;297:403-8.

11. Mangelsdorf DJ, Ong ES, Dyck JA, Evans RM. Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature*. 1990;345:224-9.
12. Camacho M, Godessart N, Anton R, Garcia M, Vila L. Interleukin-1 enhances the ability of cultured human umbilical vein endothelial cells to oxidize linoleic acid. *J Biol Chem*. 1995;270:17279-86.
13. Thomas PD, Campbell MJ, Kejariwal A, Mi H, Karlak B, Daverman R, et al. PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome Res*. 2003;13:2129-41.
14. Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJ, Pigott R, Woolf N, Katz D, et al. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol*. 1993;171:223-9.
15. O'Brien KD, Allen MD, McDonald TO, Chait A, Harlan JM, Fishbein D, et al. Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques. Implications for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis. *J Clin Invest*. 1993;92:945-51.
16. O'Brien KD, McDonald TO, Chait A, Allen MD, Alpers CE. Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content. *Circulation*. 1996;93:672-82.
17. Mulvihill NT, Foley JB, Crean P, Walsh M. Prediction of cardiovascular risk using soluble cell adhesion molecules. *Eur Heart J*. 2002;23:1569-74.
18. Fex GA, Aronsson A, Andersson A, Larsson K, Nilsson-Ehle P. In vivo effects of 13-cis retinoic acid treatment on the concentration of proteins and lipids in serum. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*. 1996;34:3-7.
19. Jaye M, Lynch KJ, Krawiec J, Marchadier D, Maugeais C, Doan K, et al. A novel endothelial-derived lipase that modulates HDL metabolism. *Nat Genet*. 1999;21:424-8.
20. DeLemos AS, Wolfe ML, Long CJ, Sivapackianathan R, Rader DJ. Identification of genetic variants in endothelial lipase in persons with elevated high-density lipoprotein cholesterol. *Circulation*. 2002;106:1321-6.
21. Miller CW, Waters KM, Ntambi JM. Regulation of hepatic stearyl-CoA desaturase gene 1 by vitamin A. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;231:206-10.
22. Zolfaghari R, Cifelli CJ, Banta MD, Ross AC. Fatty acid delta(5)-desaturase mRNA is regulated by dietary vitamin A and exogenous retinoic acid in liver of adult rats. *Arch Biochem Biophys*. 2001;391:8-15.
23. Jump DB, Clarke SD. Regulation of gene expression by dietary fat. *Annu Rev Nutr*. 1999;19:63-90.
24. Serhan CN. Inflammation. Signalling the fat controller. *Nature*. 1996;384:23-4.
25. Clandinin MT, Cheema S, Field CJ, Garg ML, Venkatraman J, Clandinin TR. Dietary fat: exogenous determination of membrane structure and cell function. *FASEB J*. 1991;5:2761-9.
26. Sun Y, Hao M, Luo Y, Liang CP, Silver DL, Cheng C, et al. Stearyl-CoA desaturase inhibits ATP-binding cassette transporter A1-mediated cholesterol efflux and modulates membrane domain structure. *J Biol Chem*. 2003;278:5813-20.
27. Luo XM, Ross AC. Retinoic acid exerts dual regulatory actions on the expression and nuclear localization of interferon regulatory factor-1. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2006;231:619-31.
28. Tsukada M, Schroder M, Roos TC, Chandraratna RA, Reichert U, Merk HF, et al. 13-cis retinoic acid exerts its specific activity on human sebocytes through selective intracellular isomerization to all-trans retinoic acid and binding to retinoid acid receptors. *J Invest Dermatol*. 2000;115:321-7.
29. Veal GJ, Errington J, Redfern CP, Pearson AD, Boddy AV. Influence of isomerisation on the growth inhibitory effects and cellular activity of 13-cis and all-trans retinoic acid in neuroblastoma cells. *Biochem Pharmacol*. 2002;63:207-15.