



Influencia de variantes de los genes *APOE*, *HMGCR*, *SLC01B1*, *CYP3A4* y *LPA* en la respuesta al tratamiento con estatinas en pacientes con dislipemia

Ruth Cano Corres

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSITAT DE BARCELONA. DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA E INMUNOLOGÍA

HOSPITAL UNIVERSITARI DE BELLVITGE. LABORATORI CLÍNIC

INFLUENCIA DE VARIANTES DE LOS GENES *APOE*, *HMGCR*, *SLCO1B1*, *CYP3A4* Y *LPA* EN LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON ESTATINAS EN PACIENTES CON DISLIPEMIA.

Memoria presentada por Ruth Cano Corres para optar al grado de doctora por
la Universitat de Barcelona.

Director: Dr. Pedro Alía Ramos* **Tutora: Dra. M^a. Teresa Mitjavila Cors****

*Jefe de sección del Área de Bioquímica y Biología Molecular del Laboratori Clínic,
Hospital Universitari de Bellvitge.

** Profesora emérita del Departamento de Fisiología e Inmunología, Universitat de
Barcelona.

Doctoranda: Ruth Cano Corres

Pedro Alía Ramos, doctor en Ciencias Biológicas, facultativo especialista en Bioquímica Clínica y jefe de sección del Área de Bioquímica y Biología Molecular del Laboratori Clínic del Hospital Universitari de Bellvitge en L'Hospitalet, Barcelona

CERTIFICA:

Que la tesis **“Influencia de variantes de los genes *APOE*, *HMGCR*, *SLCO1B1*, *CYP3A4* y *LPA* en la respuesta al tratamiento con estatinas en pacientes con dislipemia”**, de la cual es autora Ruth Cano Corres, ha sido realizada bajo mi dirección en el Laboratori Clínic del Hospital Universitari de Bellvitge, para optar al grado de doctora por la Universitat de Barcelona y que se encuentra en condiciones de ser defendida ante el tribunal correspondiente.

En L'Hospitalet de Llobregat, Junio de 2014

Dr. Pedro Alía Ramos

A mi familia

Agradecimientos

En primer lugar me gustaría agradecer a mi director, Pedro Alía, toda la ayuda prestada, los consejos, sugerencias y sobre todo su actitud siempre positiva, que ha sido esencial para poder desarrollar esta tesis. También a mis compañeras Ariadna Padró y Beatriz Candás por sus consejos a nivel profesional, ya que han sido claves para este trabajo, y por supuesto por su amistad a nivel personal.

A Pedro Alía y María José Castiñeiras les quiero agradecer la confianza depositada en mí durante mi etapa como facultativa en la sección de Biología Molecular, lo cual permitió el comienzo de mi andadura profesional y un empuje esencial para esta tesis. A Juanjo y María Teresa, por sus consejos prácticos y ayuda incondicional, hicisteis que todo fuese más fácil.

A mis compañeros residentes Elena, Gemma, Ana, Sofía y tantos otros que hicieron que mis años de residencia estuvieran plagados de buenos momentos. Especialmente a Javi, porque desde el momento en que llegamos a Barcelona ha sido siempre un gran amigo y apoyo para mí.

Gracias a todos los adjuntos del Laboratorio Clínico, por el tiempo invertido en mi formación en los diferentes ámbitos de la especialidad, y por potenciar que me involucrase en este proyecto. En especial a Dolors Dot por todos los conocimientos transmitidos, su ayuda, confianza y cariño demostrados, y a José Valero por su atención prestada como tutor. Gracias a ambos por mostrarme el camino para ser una buena profesional. A Xavier Fuentes, por introducirme en el mundo de la redacción de artículos científicos y potenciar así otro aspecto fundamental de esta profesión. A Macarena, María José y Lourdes gracias por todo lo que me enseñasteis y, sobre todo, por el cariño con que lo hicisteis, por el compañerismo y los buenos ratos que he pasado con vosotras.

Quisiera agradecer en especial al Dr. Ríos, profesor de Estadística de la UB, sus consejos y recomendaciones que me aportó para el desarrollo de los modelos estadísticos en este trabajo.

No puedo olvidarme de mis actuales compañeros de la UDIAT Centre Diagnòstic. Gracias a mis superiores por confiar en mí para este puesto, ya que ha supuesto un

paso importantísimo para mi desarrollo profesional, y a mis compañeros por el apoyo mostrado desde el primer momento.

En especial quiero agradecerle a Egoitz estar a mi lado siempre y haber sabido llevar conmigo esta, en ocasiones, dura etapa. Por último, a mis padres darles las gracias por todo lo que han hecho y hacen por mí, soy quien soy por ellos y siempre han sido un soporte incondicional estando a mi lado en todos los momentos. Gracias a los tres por haber comprendido mis malos momentos y haberme infundido ánimos, porque ha sido esencial para terminar este trabajo.

Tabla de contenidos

Agradecimientos	7
Tabla de contenidos	9
Lista de Abreviaturas	13
1. INTRODUCCIÓN	15
1.1 Lípidos y lipoproteínas	17
1.1.1 Metabolismo de las lipoproteínas plasmáticas	20
1.2 Aterosclerosis	24
1.3 Factores de riesgo cardiovascular	26
1.3.1 Factores no modificables.5.1 Dislipemias primarias	27
1.3.2 Factores modificables	28
1.3.3 Factores de riesgo cardiovascular emergentes	32
1.4 Cálculo del riesgo cardiovascular	33
1.5 Dislipemias: descripción y clasificación	34
1.5.1 Dislipemias primarias	35
1.5.1.1 Hipercolesterolemias	35
1.5.1.2 Hipertrigliceridemias	36
1.5.1.3 Dislipemias mixtas primarias	37
1.5.2 Dislipemias secundarias	37
1.6 Tratamiento de las dislipemias	38
1.6.1 Criterios para el tratamiento de las dislipemias	38
1.6.2 Las estatinas, mecanismo de acción	40
1.7 Genes propuestos a estudio por su posible relación con la efectividad del tratamiento con estatinas	41
1.7.1 APOE (rs7412 y rs429358)	41
1.7.2 HMGCR (rs3846662)	43
1.7.3 SLCO1B1 (rs4149056)	45
1.7.4 CYP3A4 (*1B) (rs2740574)	47
1.7.5 LPA (rs10455872)	48
2. OBJETIVOS	49
3. MATERIAL Y MÉTODOS	53
3.1 Sujetos a estudio y recogida de datos	55

3.2 Magnitudes estudiadas	57
3.2.1 Magnitudes relacionadas con el estudio bioquímico	57
3.2.2 Propiedades relacionadas con el estudio genético	57
3.3 Indicadores y variables a estudio	57
3.3.1 Porcentaje de cambio según la concentración final	58
3.3.2 Porcentaje de cambio según la concentración media	58
3.3.3 Consecución de objetivos terapéuticos	58
3.3.4 Variables no genéticas	59
3.4 Métodos	60
3.4.1 Obtención del suero y principios de medida de las magnitudes lipídicas	60
3.4.2 Obtención del DNA y amplificación por PCR	61
3.4.2.1 PCR-RFLP	62
3.4.2.2 PCR a tiempo real con sondas alelo-específicas	66
3.4.2.3 Interpretación de resultados de PCR a tiempo real con sondas alelo específicas obtenidos con los termocicladores iCycler y Eco	69
3.5 Tratamiento estadístico de los datos	71
3.5.1 Variables indicadoras de la respuesta al tratamiento de tipo cuantitativo: porcentaje de cambio según la concentración final y según la concentración media	71
3.5.2 Variables indicadoras de la respuesta al tratamiento de tipo cualitativo: consecución de los objetivos terapéuticos	72
3.5.3 Otros test estadísticos empleados	72
3.6 Programas informáticos	73
3.7 Direcciones de internet	73
4. RESULTADOS	75
4.1 Descripción de la población	77
4.2 Estudio con pacientes NAIF	80
4.2.1 Matriz de correlación entre las variables de control	84
4.2.2 Desarrollo de modelos estadísticos para el porcentaje de cambio del colesterol total según la concentración final	85
4.2.3 Desarrollo de modelos estadísticos para el porcentaje de cambio del colesterol total según la concentración media	88
4.2.4 Desarrollo de modelos estadísticos para el porcentaje de cambio del colesterol noHDL según la concentración final	90

4.2.5 Desarrollo de modelos estadísticos para el porcentaje de cambio de colesterol noHDL según la concentración media	93
4.2.6 Resumen de los resultados obtenidos para el porcentaje de cambio según la concentración final y según la concentración media para el colesterol total y el colesterol noHDL	94
4.2.7 Estudio sobre la consecución de objetivos terapéuticos para el colesterol total media	95
4.2.8 Estudio sobre la consecución de objetivos terapéuticos para el colesterol noHDL	100
4.2.9 Resumen de los resultados obtenidos para la consecución de objetivos terapéuticos	103
4.3 Estudio con pacientes NO NAIF	104
4.3.1 Matriz de correlación entre las variables de control	107
4.3.2 Desarrollo de modelos estadísticos para el porcentaje de cambio de según la concentración final, según la concentración media, y consecución de objetivos terapéuticos para el colesterol total y el colesterol noHDL	108
5. DISCUSIÓN	111
5.1 La enfermedad cardiovascular y su tratamiento	113
5.2 Justificación del estudio	114
5.3 Discusión de los resultados obtenidos	115
5.3.1 Estudio de la influencia de variantes de los genes <i>APOE</i> , <i>SLCO1B1</i> , <i>CYP3A4</i> , <i>HMGCR</i> y <i>LPA</i> en el porcentaje de cambio del colesterol total según la concentración final y según la concentración media en las poblaciones NAIF y NO NAIF	115
5.3.2 Estudio de la influencia de variantes de los genes <i>APOE</i> , <i>SLCO1B1</i> , <i>CYP3A4</i> , <i>HMGCR</i> y <i>LPA</i> en el porcentaje de cambio del colesterol noHDL según la concentración final y según la concentración media en las poblaciones NAIF y NO NAIF	118
5.3.3 Comparación de los resultados obtenidos para los indicadores cuantitativos con la bibliografía	119
5.3.4 Estudio de la influencia de variantes de los genes <i>APOE</i> , <i>SLCO1B1</i> , <i>CYP3A4</i> , <i>HMGCR</i> y <i>LPA</i> en la consecución de los objetivos terapéuticos del colesterol total para las poblaciones NAIF y NO NAIF	124
5.3.5 Estudio de la influencia de variantes de los genes <i>APOE</i> , <i>SLCO1B1</i> , <i>CYP3A4</i> , <i>HMGCR</i> y <i>LPA</i> en la consecución de los objetivos terapéuticos del colesterol noHDL para las poblaciones NAIF y NO NAIF	125
5.3.6 Comparación de los resultados obtenidos para el indicador cualitativo con la bibliografía	126
6. CONCLUSIONES	131
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	135

8. ÍNDICES	157
9. ANEXOS	165

Abreviaturas

- %C** porcentaje de cambio según la concentración final
- %CM** porcentaje de cambio según la concentración media
- Apo** apoproteína
- C** cistina
- CEPT** (del inglés) proteína transferidora de esteres de colesterol
- CT** colesterol total
- D** dosis media diaria de estatina
- DM** diabetes mellitus
- DMSO** dimetilsulfóxido
- DNA** (del inglés) ácido desoxirribonucleico
- dNTPs** trifosfodesoxirribonucleótidos
- E.C.** (del inglés) enzyme commission number, referencia al modo de clasificación de los enzimas
- ECV** enfermedad cardiovascular
- FR** factor de riesgo
- G** guanina
- HDL** (del inglés) lipoproteínas de alta densidad.
- HMGCR** 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa
- HMGCR (-)** RNA mensajero codificado por el gen HMGCR sin el exón 13
- HMGCR (+)** RNA mensajero codificado por el gen HMGCR nativo, con el exón 13
- IC95%** intervalo de confianza 95%
- IDL** (del inglés) lipoproteínas de densidad intermedia
- IMC** índice de masa corporal
- LCAT** lecitina-colesterol-acil-transferasa
- LDL** (del inglés) lipoproteínas de baja densidad
- LH** lipasa hepática
- Lp(a)** lipoproteína (a)

LPL lipoproteína-lipasa

mRNA (del inglés) ácido ribonucleico mensajero

noHDL colesterol (excluido el colesterol HDL)

OATP (del inglés) polipéptido transportador de aniones orgánicos

OR odds ratio

pb pares de bases

PCR (del inglés) reacción en cadena de la polimerasa

QM quilomicrón

RFLP (del inglés) fragmentos de restricción de longitud polimórfica

rs (del inglés) reference SNP. Numeración característica e individual que representa cada polimorfismo

SNP (del inglés) polimorfismo de un solo nucleótido

ΔT cambio en el hábito tabáquico

T timina

TG triglicéridos

UFRV Unidad Funcional de Riesgo Vascular

URF unidad relativa de fluorescencia

VDL (del inglés) lipoproteínas de muy baja densidad

ΔA cambio hábito enólico

ΔHe cambio en el ejercicio físico

%IMC porcentaje de cambio en el índice de masa corporal

ΔR cambio normalizado de fluorescencia

1. Introducción

1.1 Lípidos y lipoproteínas

Los lípidos ejercen diversas funciones en el organismo: constituyen su reserva energética, forman las bicapas lipídicas de todas las membranas celulares, son moléculas precursoras de diferentes hormonas y tienen también una función transportadora.

Son moléculas biológicas muy complejas cuya característica común es que son insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos, por lo que su transporte en plasma se ve dificultado. Para facilitararlo, se unen a proteínas dando lugar a unas estructuras llamadas lipoproteínas. Las lipoproteínas por tanto, están formadas por un componente lipídico y un componente proteico (1). El componente lipídico está constituido principalmente por ácidos grasos, acilglicéridos, fosfolípidos y colesterol, y el componente proteico son las denominadas apoproteínas (Apo). Las Apo, además de formar parte de la estructura de las lipoproteínas, cumplen una función esencial en el metabolismo lipídico ya que facilitan el reconocimiento celular y actúan como cofactores de diversas enzimas implicadas en el proceso (2).

Estas lipoproteínas tienen una estructura micelar con una zona exterior polar formada por proteínas y lípidos polares, como el colesterol no esterificado y los fosfolípidos, y una zona interior apolar, formada por lípidos apolares como los triglicéridos (TG) y el colesterol esterificado (imagen 1).

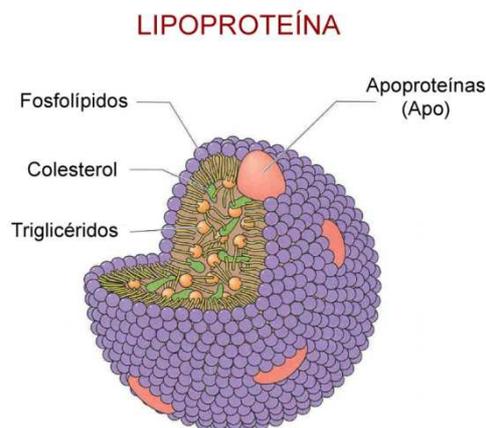


Imagen 1: Ejemplo de lipoproteína con el componente lipídico y el proteico
(<http://las-hormonas.blogspot.com.es/2013/06/colesterol-el-padre-de-algunas-hormonas.html>)

Las propiedades fisicoquímicas de las lipoproteínas vienen determinadas por su composición lipídica. Cuanto mayor sea la proporción de lípidos apolares mayor será

el tamaño de las micelas y menor será la densidad de las lipoproteínas, y al revés. Las lipoproteínas se clasifican en función de su densidad, como muestra la tabla 1.

Tabla 1: Clasificación de las lipoproteínas.

Lipoproteína y densidad (g/ml)	Composición lipídica	Síntesis	Función
QM < 0,950	Lípidos, vitaminas solubles y colesterol de la dieta	Intestino	Transporte de lípidos y colesterol de la dieta
QM remanentes >0,950	Restos de lípidos y colesterol	Residuos QM	Transporte de restos de lípidos y colesterol de la dieta al hígado
VLDL 0,96-1,006	TG endógenos, fosfolípidos y colesterol	Hígado	Transporte desde el hígado al tejido adiposo, y del tejido adiposo al órgano de consumo
IDL 1,006-1,019	=VLDL y LDL	Residuos de VLDL	Similar a VLDL y LDL
LDL 1,063-1,109	TG y 45% del colesterol	Residuos IDL	Transporte del colesterol sintetizado desde el hígado a los tejidos
LDL remanente >1,006	TG y colesterol endógenos	Residuos IDL y VLDL	Transporte y liberación de los lípidos del hígado a los tejidos
HDL naciente >1,210	Muy pobre	Hígado	Recoger lípidos y colesterol de los tejidos
HDL 1,125-1,210	Lípidos, colesterol y fosfolípidos	De las HDL nacientes	Transporte de lípidos y colesterol de los tejidos al hígado para eliminarlos

QM: quilomicrones VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad IDL: lipoproteínas de densidad intermedia LDL: lipoproteínas de baja densidad HDL: lipoproteínas de alta densidad TG: triglicéridos

A medida que va disminuyendo el contenido lipídico y aumentando el proteico, las lipoproteínas van ganando densidad. Desde las VLDL, que están compuestas por un 98% de lípidos y 2% de proteínas, hasta las HDL, que están formadas por 45% de lípidos y 55% de proteínas. En la tabla 2 se pueden ver las diferentes Apos y sus principales características.

Tabla 2: Apoproteínas que forman parte de las lipoproteínas, lugar de formación y función.

Nombre	Síntesis	Lipoproteína de la que forma parte	Función
A-I	Intestino e hígado	HDL, QM y VLDL	Estructural y cofactor de la fosfatidilcolina-esterol-acil-transferasa
A-II	Hígado e intestino	HDL y QM	-
A-IV	Intestino	HDL y QM	-
(a)	Hígado	Lipoproteína (a)	-
B-48	Intestino	QM	Estructural
B-100	Hígado	VLDL, IDL y LDL	Estructural y reconocimiento de receptores celulares
C-I	Hígado e intestino	VLDL, IDL, HDL y QM.	-
C-II	Hígado e intestino	VLDL, IDL, HDL y QM.	Cofactor de la LPL
C-III	Hígado e intestino	VLDL, IDL, HDL y QM.	Inhibe la LPL
D	Hígado, intestino, páncreas, riñón	HDL, VLDL, LDL e IDL	-
E	Hígado y otros tejidos	VLDL, QM, IDL y HDL	Confiere la especificidad para la unión a los receptores celulares.

-: casos en los no está clara la función de la Apo. QM: quilomicrones VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad IDL: lipoproteínas de densidad intermedia LDL: lipoproteínas de baja densidad HDL: lipoproteínas de alta densidad LPL: lipoproteína-lipasa

El componente proteico de las lipoproteínas es esencial debido a que ejercen como cofactores de diversas enzimas implicadas en el metabolismo de los lípidos y también en el proceso de señalización celular para su transporte.

1.1.1 Metabolismo de las lipoproteínas plasmáticas

A continuación se describe el metabolismo de las lipoproteínas plasmáticas (2), que se muestra en la imagen 2.

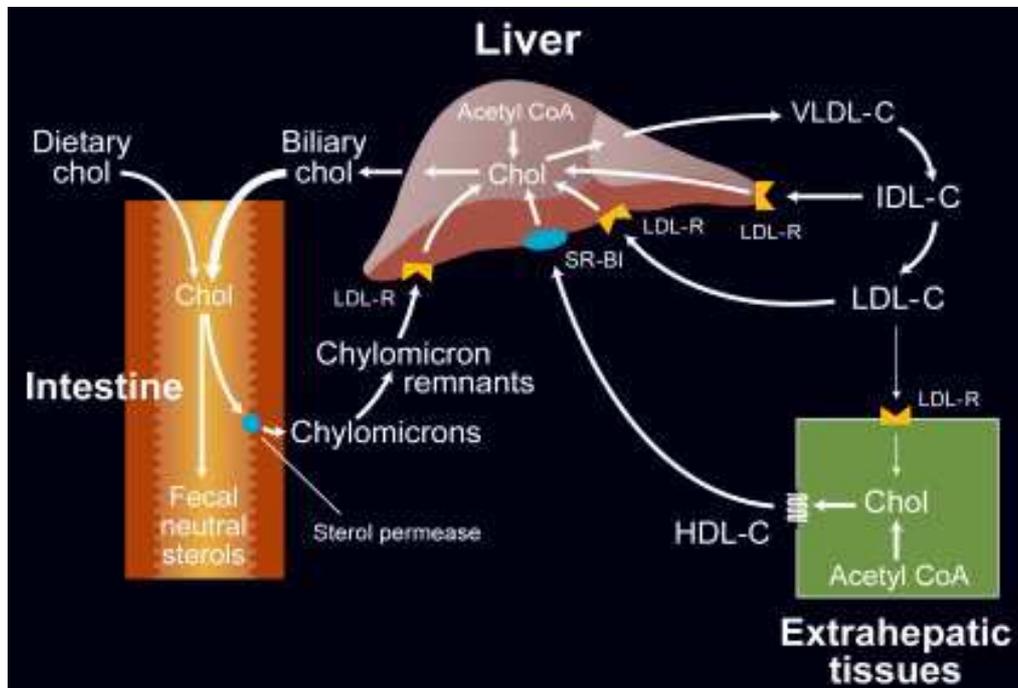


Imagen 2: Metabolismo de las lipoproteínas
(<http://www.mednet.cl/link.cgi/Medwave/Reuniones/medicina/2005/3/2526>)

Quilomicrones (QM)

Los lípidos procedentes de la dieta son emulsionados e hidrolizados por las enzimas pancreáticas, y a continuación atraviesan la membrana del enterocito. Dentro de estas células son esterificados y se unen a diversas Apo como la A-I y B-48, formándose los QM nacientes. Los lípidos que incluyen los QM son esencialmente TG y también pequeñas cantidades de colesterol, ambos procedentes de la dieta.

Los QM nacientes pasan a la linfa, y de ésta, a través del conducto torácico, a la sangre (3), donde incorporan Apos de las HDL como C-II y E. La Apo C-II es un cofactor de la enzima lipoproteína-lipasa (LPL, E.C.3.1.1.34) localizada en el endotelio. Al ser activada, la LPL hidroliza los TG de los QM, liberando los ácidos grasos, que son incorporados por los tejidos, donde serán empleados para producir energía o serán almacenados, como ocurre en los adipocitos.

Los QM, una vez han cedido los TG, ceden también el colesterol esterificado, fosfolípidos y Apo A y C de la superficie al plasma o a las HDL, dando lugar a las HDL

nacientes. Las lipoproteínas restantes son los QM residuales, muy ricos en colesterol esterificado y Apo E, que serán degradados por el hígado. Los receptores hepáticos llamados “similares al receptor de LDL” reconocen los QM residuales gracias a la Apo E, por lo que serán incorporados y degradados (4). A través de los QM se produce el transporte de lípidos de la dieta, la conocida como vía exógena del transporte de lípidos.

Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL)

Las VLDL se sintetizan en los hepatocitos a partir del colesterol y ácidos grasos que llegan al hígado, y el colesterol y TG que allí son sintetizados. Su principal componente son los TG.

En cada VLDL hay una molécula de Apo B-100. Cuando se liberan a la circulación sistémica, incorporan ésteres de colesterol a partir de las HDL gracias a la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CEPT) y también Apo C-II. La Apo C-II favorece la acción de la LPL por lo que, a partir de los TG, se liberan ácidos grasos a los tejidos. Una vez libres de los TG que se encontraban en su interior, las VLDL transfieren a las HDL los componentes en exceso de su superficie (colesterol no esterificado, fosfolípidos y Apo C) mediante la proteína transferidora de lípidos. Por su parte, reciben de las HDL colesterol esterificado mediado por la lecitina-colesterol-acil-transferasa (LCAT, E.C 2.3.1.43), convirtiéndose en las lipoproteínas de densidad intermedia (IDL).

Lipoproteínas de densidad intermedia (IDL)

Son lipoproteínas de transición entre las de muy baja y baja densidad, VLDL y LDL. Sufren un rápido catabolismo, por lo que son escasas en plasma. Las IDL captan colesterol esterificado desde las HDL por la LCAT. Pueden ser reconocidas por los receptores hepáticos mediante la Apo E de su superficie y ser degradadas en el hígado, o pueden evolucionar a LDL si pierden lípidos y ceden Apo E a las HDL.

Las IDL pierden lípidos en el hígado mediante la lipasa hepática (LH, E.C 3.1.1.3) que hidroliza los TG a ácidos grasos libres. Una vez han perdido los ácidos grasos, las IDL pueden ser degradadas en el propio hígado o transformarse en LDL y salir a la circulación.

Lipoproteínas de baja densidad (LDL)

Las LDL derivan de las IDL, y se encargan de transportar el colesterol a los tejidos, ya que éste es su principal componente. En su superficie, las LDL tienen Apo B-100, la cual es reconocida por receptores específicos en todas las células y por receptores hepáticos que reconocen tanto Apo E como Apo B-100.

Cuando una LDL se une al receptor de Apo B-100 en la superficie celular, el complejo es internalizado por endocitosis, sufre degradación lisosomal y se libera el colesterol al citoplasma. Este colesterol provoca la activación de la enzima colesterol-O-aciltransferasa (E.C.2.3.1.26), que esterifica de nuevo el colesterol. El aumento de las concentraciones citoplasmáticas de colesterol provoca la inhibición de la síntesis de receptores de LDL, y en las células capaces de sintetizar colesterol inhiben la enzima clave del proceso, la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (E.C.1.1.1.34).

Por tanto, este mecanismo de regulación, tanto de la síntesis de colesterol como de receptores, permite que las concentraciones en plasma se mantengan constantes.

El caso de la incorporación de LDL a los macrófagos es especial, independiente de receptores de Apo B, y merece la pena señalarlo debido a su implicación en el desarrollo de la aterosclerosis. Los macrófagos reconocen las LDL por medio de los receptores scavenger y éstos no se ven regulados por la concentración de colesterol intracelular. Estos receptores reconocen partículas de LDL que han sufrido alguna modificación, como la oxidación. Cuando las concentraciones de colesterol en plasma son muy elevadas, las partículas de LDL sufren modificaciones y son incorporadas por los macrófagos, que se cargan de estas partículas y degeneran a células espumosas. El metabolismo de las VLDL, IDL y LDL está involucrado en la vía de transporte endógeno de lípidos.

Lipoproteínas de alta densidad (HDL)

Las HDL tienen como función principal la de transportar el colesterol desde los tejidos periféricos al hígado para que pueda ser degradado. Son sintetizadas en el hígado o en las células intestinales. Están formadas principalmente por un núcleo de ésteres de colesterol y un revestimiento compuesto de fosfolípidos, Apo A-I y Apo A-II.

Llevan a cabo la recuperación de colesterol intracelular mediado por receptores, proceso en el cual actúa también la Apo A-I.

Las HDL nacientes tienen una estructura discoide y están compuestas principalmente por fosfolípidos, colesterol no esterificado y Apo A. Cuando el colesterol no esterificado alcanza la superficie de las HDL, se transforma en éster gracias a la LCAT, que

transfiere un ácido graso desde una molécula de lecitina a una de colesterol. Los ésteres de colesterol se van acumulando en el núcleo y la lipoproteína va alcanzando forma redondeada y un volumen cada vez mayor.

Poco a poco irán incorporando colesterol y Apo C-II y A-I de los QM y de las VLDL, así como colesterol de las membranas celulares. Las HDL pueden regresar directamente al hígado para transportar los lípidos y transferirlos a otras lipoproteínas.

La única manera de eliminar el exceso de colesterol es a través de su degradación hepática, por lo que el exceso de colesterol de los tejidos periféricos debe ser transportado hasta el hígado para su eliminación. A este proceso se le llama transporte inverso del colesterol (5). Es el mecanismo de regulación u homeostasis del colesterol, y por tanto está muy implicado en la evolución e involución del proceso de aterosclerosis.

Este mecanismo está mediado por las lipoproteínas HDL y se divide en tres pasos: eliminación de colesterol libre desde los tejidos al espacio extracelular, esterificación del colesterol y transporte de estos ésteres en el plasma, y excreción a través de las heces en forma de ácidos biliares.

La primera etapa es el paso del colesterol no esterificado de las membranas celulares a las HDL nacientes del medio extracelular. Se trata de un proceso bidireccional ya que las HDL reciben colesterol pero también lo pueden liberar mediante procesos que consumen energía. El transporte del colesterol a través de las membranas celulares se ve facilitado por la proteína ABCA1 (ATP binding cassette transporter 1), cuya función es regular el transporte de colesterol a través de la membrana en función de sus concentraciones a ambos lados.

La interacción de las HDL nacientes con ABCA1 activa una cascada de señalización intracelular que provoca el desplazamiento del colesterol citoplasmático hacia la membrana celular, desde donde será más fácil incorporarlo a las HDL.

Una vez el colesterol libre se encuentra en las HDL, es esterificado mediante la LCAT en un proceso irreversible y dependiente de energía. La acción de la LCAT se considera el mecanismo central del transporte de colesterol inverso y está sujeta a un estricto control. Una parte de los ésteres se transfiere a las VLDL por la CETP, de este modo los ésteres pueden regresar al hígado bien mediante la captación de las VLDL remanentes o bien después de convertirse las VLDL en LDL.

Las HDL también pueden dirigirse directamente al hígado para que allí se produzca la degradación de colesterol. Las HDL son reconocidas por los hepatocitos mediante unos receptores llamados SR-B1.

En último lugar, el colesterol en el hígado deberá ser convertido a ácidos biliares para poder ser eliminado en las heces, aunque se cree que también puede ser eliminado por vía intestinal (6).

1.2 Aterosclerosis

El término arteriosclerosis define, en general, el engrosamiento y aumento de rigidez de la pared vascular. La forma más común de arteriosclerosis es la aterosclerosis, enfermedad en la que se desarrollan placas de ateroma, lesiones en la capa íntima de arterias medianas y grandes, con depósito de material lipídico. La imagen 3 muestra el desarrollo de una placa de ateroma.

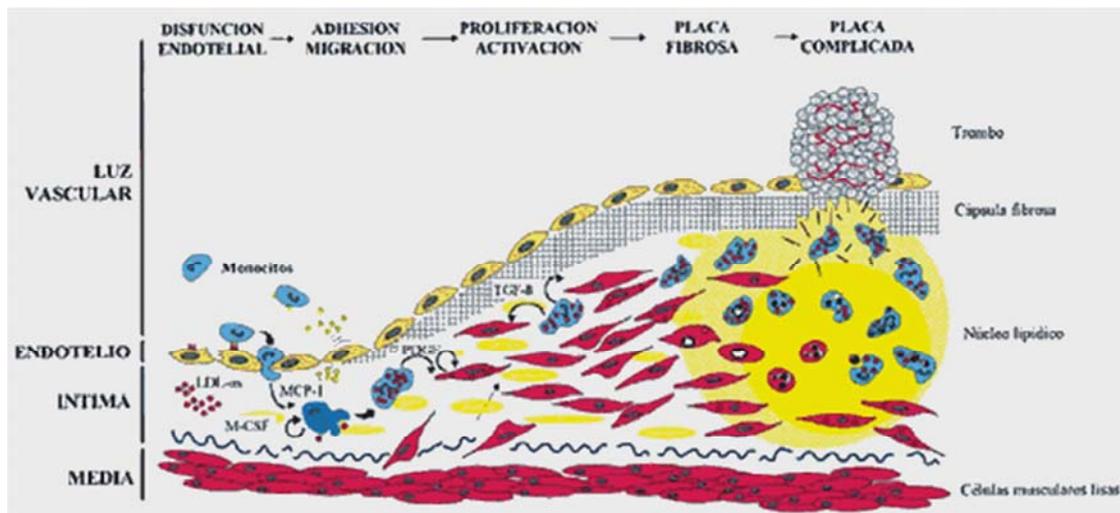


Imagen 3: Secuencia progresiva en el desarrollo de una placa de ateroma
(<http://enciclopedia.us.es/index.php/Aterosclerosis>)

El proceso de aterosclerosis comienza con una disfunción tisular de las células endoteliales, la cual puede deberse a diferentes factores: inmunológicos, químicos, como el monóxido de carbono, o incluso físicos, como la hipertensión arterial.

Las LDL, y en menor medida también otras lipoproteínas como IDL o QM remanentes, atraviesan la barrera endotelial hasta penetrar en la capa íntima de la arteria. Algunas lipoproteínas volverán a la circulación, pero otras se quedarán retenidas en la capa íntima por la interacción que se da entre los glicosaminoglicanos de esta capa y la Apo B-100 de las lipoproteínas. Las LDL atrapadas sufren un proceso de oxidación, lo que desencadena un efecto inflamatorio y citotóxico que promueve la llegada de monocitos.

Los monocitos captan las partículas de LDL oxidado mediante los receptores scavenger, convirtiéndose en células espumosas, y la acumulación de células espumosas en la íntima conduce al desarrollo de estrías grasas, que poco a poco se irán transformando en placas de ateroma. La placa de ateroma está formada por un núcleo lipídico con restos celulares, rodeado de tejido fibroso (7).

La aterosclerosis afecta generalmente a arterias de tamaño grande o medio como la aorta, femorales, coronarias, etc. Los síntomas clínicos suelen aparecer cuando la placa de ateroma tiene un tamaño suficiente para dificultar el paso de la sangre a través de la arteria, lo que puede producir isquemia o necrosis del tejido irrigado. También puede ocurrir que la placa se libere como un émbolo provocando la obstrucción sanguínea en otro territorio. La imagen 4 muestra un vaso afectado por aterosclerosis.

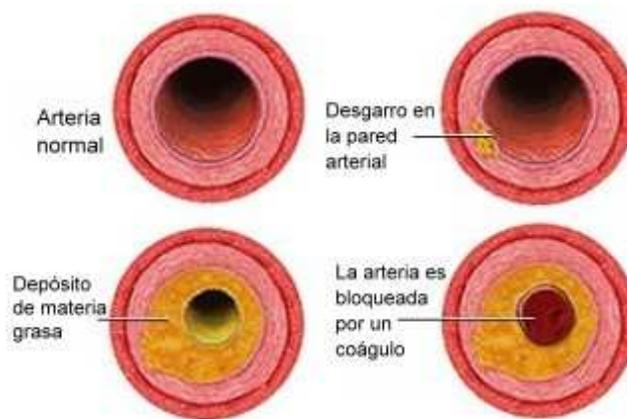


Imagen 4: Obstrucción de una arteria por placa ateromatosa
(<http://www.revespcardiol.org/es/obesidad-corazon/articulo/13191034/>)

1.3 Factores de riesgo cardiovascular

La enfermedad cardiovascular (ECV) es una de las causas más importantes de muerte en todo el mundo, especialmente en los países desarrollados. En 2004, el número de muertos al año en España por esta causa fue de 123.867, suponiendo el 33% del total de defunciones (8). Según los últimos datos publicados en 2012 por el Instituto Nacional de Estadística, el número de muertes debidas a enfermedades del sistema circulatorio son el 31% del total, llegando a suponer el 37% en el grupo de edad superior a 79 años (9). Se estima que en el año 2030 el número de muertos por ECV en el mundo alcanzará los 23,3 millones.

Un factor de riesgo cardiovascular es una característica o elemento medible que tiene una relación causal con un aumento de la frecuencia de una enfermedad y constituye un factor predictivo independiente y significativo de riesgo de contraer una ECV (10). Al tratarse de una probabilidad, la ausencia de los factores de riesgo no excluye la posibilidad de desarrollar una ECV en el futuro, y la presencia de ellos tampoco implica necesariamente su aparición, pero permiten identificar aquellos individuos con mayor riesgo de desarrollarla sobre los cuales se podrán tomar las medidas oportunas (11).

Los factores de riesgo cardiovascular se pueden clasificar en mayores y menores. Los mayores son: tabaquismo, hipertensión arterial, elevadas concentraciones en suero de colesterol total (CT) y colesterol unido a LDL (a partir de ahora LDL), bajas concentraciones en suero de colesterol unido a HDL (a partir de ahora HDL), diabetes mellitus (DM) y la edad avanzada.

Los factores menores se pueden clasificar en condicionales y predisponibles. Los condicionales se han asociado a mayor riesgo de ECV pero no hay estudios suficientes que cuantifiquen el riesgo, y los predisponibles son aquellos que empeoran los factores mayores o independientes.

Se consideran factores de riesgo predisponibles la obesidad, la obesidad abdominal, el sedentarismo, factores sociológicos, historia familiar de ECV y la raza. Y factores condicionales, la presencia de elevadas concentraciones en plasma de TG, homocisteína y lipoproteína a (Lp (a)), partículas pequeñas de LDL y la presencia de otros factores protrombóticos, como el fibrinógeno, e inflamatorios, como la proteína C reactiva (12).

Pero generalmente los factores de riesgo cardiovascular se clasifican en factores modificables y no modificables. Las estrategias de prevención de riesgo cardiovascular se centran en los factores de riesgo cardiovascular modificables.

1.3.1 Factores no modificables

La edad

El desarrollo de la placa de ateroma se lleva a cabo lentamente durante años, de manera que la placa va engrosando hasta que dificulta el paso de la sangre por el vaso, o hasta que la placa se desprende y viaja por el torrente sanguíneo para depositarse en otra zona. Hasta este momento no hay manifestaciones clínicas. Cuanto mayor sea el paciente, mayor probabilidad hay de que se haya desarrollado la placa. Un estudio con aortas de cadáveres de todas las edades mostró la relación existente entre el aumento del grosor de la capa íntima de las arterias y la edad, así como una correlación entre este grosor y el hecho de haber sufrido una ECV (13).

Sexo

El sexo masculino presenta mayor predisposición para sufrir una ECV: se ha estimado que, por término medio, los eventos cardiovasculares ocurren 10 años antes en hombres que en mujeres. Este hecho se había asociado tradicionalmente a la combinación de factores sociales y biológicos (14), pero últimamente se ha planteado la hipótesis de que concentraciones de testosterona bajas en los hombres pueden predisponer a sufrir un evento cardiovascular (15).

Antecedentes familiares

Se consideran como historia familiar de ECV prematura los infartos de miocardio y muertes súbitas del padre o familiares masculinos de primer grado que se hayan producido antes de los 55 años (16), o antes de los 65 en la madre o familiares femeninos de primer grado. Se ha observado que un paciente tiene mayor probabilidad de sufrir un evento cardiovascular si lo ha sufrido un familiar de primer grado suyo, y el riesgo también aumenta cuanto antes se haya producido el evento. En los hombres cuyo padre/madre haya sufrido una ECV, su riesgo de padecerla también aumenta 1,8 veces (17).

Un caso muy conocido son las hiperlipidemias familiares, pero éstas sólo suponen el 10% de las ECV prematuras. Se cree que hay diversos genes implicados en este proceso, pero no se conocen todos. Una de las regiones más estudiadas por su asociación con el desarrollo prematuro de ECV es el loci 9p21, que parece codificar para un RNA regulador (18).

1.3.2 Factores modificables

Concentración de colesterol unido a LDL en plasma superior o igual a 3,2 mmol/L

Según las guías internacionales, el primer objetivo sobre el que intervenir para evitar la ECV es la concentración sérica de LDL. La lipoproteína LDL es la más abundante y claramente aterogénica, implicada directamente en el desarrollo de la placa de ateroma (16).

Las poblaciones con mayor concentración plasmática de LDL desarrollan más frecuentemente eventos cardiovasculares. Este hecho se demuestra claramente en las formas de hipercolesterolemia familiar de carácter hereditario, en las que hay unas elevadas concentraciones de LDL y precoz desarrollo de aterosclerosis. Por el contrario, no se ha observado un efecto perjudicial por presentar concentraciones bajas de LDL, de hecho individuos con bajas concentraciones de LDL suelen ser más longevos.

Diversos estudios como el Framingham Heart Study (19), el Multiple Risk Factor Intervention Trial (20) y el Lipid Research Clinics (21, 22) muestran la relación que existe entre las elevadas concentraciones de LDL y el desarrollo de ECV en pacientes inicialmente libres de ella.

El control de las concentraciones de LDL inhibe el desarrollo de la placa de ateroma en edades tempranas. En los casos de aterosclerosis avanzada en los que la placa está ya formada, este control promueve su estabilización e inhibe el desarrollo de eventos isquémicos agudos.

La concentración de LDL es el principal objetivo en todas las guías para el descenso de riesgo cardiovascular, incluyendo la NCEP-ATP III (16), donde se recomienda que las concentraciones de LDL estén situadas por debajo de 3,2 mmol/L.

Concentración de triglicéridos en plasma superior o igual a 1,7 mmol/L

Diversos estudios han puesto de manifiesto una relación positiva entre la concentración plasmática de TG y el riesgo cardiovascular (23-25).

Las lipoproteínas ricas en TG como las IDL y VLDL favorecen el desarrollo de la placa de ateroma en la capa íntima de la arteria por lo que son pro-aterogénicas.

Diversos factores promueven las concentraciones elevadas de TG en plasma, como el sobrepeso, el sedentarismo, el hábito tabáquico, el consumo excesivo de alcohol e hidratos de carbono en la dieta, algunas enfermedades concomitantes y diversos tratamientos. Se sabe que también hay aspectos genéticos que influyen en su

concentración plasmática (26). Una concentración de TG superior a 1,7 mmol/L se considera como un riesgo, por implicar la presencia de lipoproteínas aterogénicas, o su asociación con otros factores que aumentan el riesgo como el tabaquismo o la hipertensión (16). Son también diana para el cambio en el estilo de vida y para fármacos destinados a disminuir su concentración.

Concentración de colesterol unido a HDL en plasma inferior o igual a 1 mmol/L

Las concentraciones plasmáticas bajas de HDL, se consideran un riesgo independiente para el desarrollo de ECV. Por el contrario, las concentraciones altas reducen el riesgo (16). Se estima que un descenso de un 1% en las concentraciones plasmáticas de HDL conlleva un aumento del riesgo de 2-3% (27). No se conoce muy bien el mecanismo por el que disminuye el riesgo, pero se cree que se debe a que es la lipoproteína encargada del transporte inverso del colesterol, por lo que podría retirar el exceso de colesterol de las células espumosas de la lesión ateromatosa (28). Por otra parte, también se cree que ejerce un papel antioxidante y antiinflamatorio, lo que inhibiría la aterogénesis (29-31).

Diversos estudios con genes relacionados con la deficiencia de HDL muestran el aumento en el riesgo cardiovascular, pero no así otros trabajos, por lo que el papel genético no está aún claro (32-34).

De todas maneras, las bajas concentraciones de HDL generalmente correlacionan con concentraciones elevadas de TG y LDL, las cuales están claramente considerados factores independientes de riesgo cardiovascular.

Concentración de colesterol no unido a HDL en plasma superior o igual a 3,4 mmol/L

A la suma del colesterol unido a VLDL y LDL se le denomina colesterol no unido a HDL (noHDL) y constituye el conjunto de las lipoproteínas aterogénicas. Se calcula restando al colesterol total (CT) el HDL.

Se emplea sobre todo en las situaciones en las que las concentraciones de TG son muy altas, lo que imposibilita el cálculo del LDL.

Hay pocos estudios que hayan analizado la capacidad predictiva del colesterol noHDL vs el LDL en pacientes con hipertrigliceridemia, pero algunos autores postulan que debido a la interrelación del noHDL con el HDL y el CT, no es un factor independiente en la predicción del desarrollo de ECV (16). Otros trabajos en cambio, sí muestran la relevancia de esta magnitud en el desarrollo de la ECV (35), y algunos incluso postulan que es más correcto el uso del noHDL para la estimación del riesgo en la

práctica clínica que el LDL (36, 37). Además, es conocido que el noHDL está muy correlacionado con las concentraciones de Apo B, que es la Apo más asociada a la aterogénesis (38, 39). Por eso, ya que en muchos laboratorios no es posible la determinación de Apo B, se propone la determinación del noHDL en su lugar.

Por otra parte en situaciones en que los TG están elevados, aumentan las partículas de VLDL (40), por lo que la estimación del riesgo mediante el noHDL sería más adecuada que mediante el LDL.

Se ha propuesto que el noHDL sea la segunda diana terapéutica para disminuir el riesgo cardiovascular, porque es conocido que el efecto de las estatinas implica tanto al LDL como al VLDL. No se han hecho muchos estudios que midan la disminución del noHDL en vez de la del LDL para valorar la disminución del riesgo cardiovascular, pero se cree que en los casos de hipertrigliceridemia la medida de noHDL sería más veraz.

Hipertensión arterial

Se considera que existe hipertensión cuando la presión sanguínea en arteria supera los 140 mmHg de presión sistólica o 90 mmHg de presión diastólica, o cuando se está en tratamiento con fármacos antihipertensivos. Numerosos estudios han demostrado la relación existente entre la presión sanguínea alta y el desarrollo de ECV (41).

Esta asociación se da tanto para hombres como para mujeres, y para todas las edades.

Tabaquismo

Existe una fuerte asociación entre el consumo de tabaco y el aumento del riesgo de ECV. Se ha demostrado que el cese de su consumo conlleva también una importante disminución del riesgo, y esto ocurre tanto en hombres como en mujeres (42, 43). Además, se ha observado que el descenso del riesgo ya es evidente a los pocos meses de haber dejado de fumar (44).

Diabetes Mellitus

Este término engloba una serie de trastornos metabólicos que cursan con concentraciones elevadas de glucosa en plasma. Pueden deberse a la falta de secreción de insulina, a la falta de su acción o a la combinación de ambos. Se considera que un paciente es diabético cuando presenta una concentración de glucosa

plasmática en ayunas superior a 7 mmol/L o una hemoglobina glicosilada superior a 6,5% (45).

Se ha observado que el riesgo de sufrir enfermedad coronaria aumenta en los pacientes diabéticos, especialmente en mujeres (46). Esto ocurre tanto en los que padecen tipo I (47) como tipo II (48). Muchos pacientes con diabetes tipo II presentan microalbuminuria, un signo de lesión vascular en el glomérulo. No sólo se ha asociado la microalbuminuria al futuro fallo renal, sino que también diversos estudios epidemiológicos la asocian al desarrollo de aterosclerosis, enfermedad coronaria y otras enfermedades vasculares (49). Un buen control de la concentración de glucosa en suero en estos pacientes ayuda a reducir el riesgo de sufrir una ECV.

Obesidad

El índice de masa corporal (IMC) se calcula dividiendo el peso entre la altura al cuadrado. Un paciente es obeso cuando presenta un IMC superior a 30 kg/m², y tiene sobrepeso cuando éste se encuentra entre 25-29,9 kg/m².

La obesidad es un factor independiente de riesgo cardiovascular, pero también es un factor de riesgo de mortalidad por otras causas, ya que las personas con obesidad presentan riesgo de desarrollar otros factores que contribuyen al desarrollo de ECV, como la dislipemia, la hipertensión o la diabetes tipo II. El estudio Framingham (19) demostró que el exceso de peso es un fuerte predictor de ECV, y posteriormente en otros estudios se ha comprobado esta asociación (50, 51).

Sedentarismo

La inactividad física está relacionada con el riesgo de desarrollar una ECV. Por el contrario, se ha demostrado que la práctica de ejercicio reduce el riesgo debido a que disminuye las concentraciones de LDL y TG en plasma, aumenta el HDL, disminuye la presión sanguínea e incluso favorece la sensibilización a la insulina. Muchos estudios observacionales muestran los efectos beneficiosos de la práctica de ejercicio físico (52, 53).

Probablemente el mecanismo por el que el ejercicio físico disminuye el riesgo cardiovascular es multifactorial, ya que no se han identificado mecanismos concretos. Se cree que podría estar relacionado con las modificaciones hemodinámicas que se producen durante el ejercicio, y con que el aumento de la vasodilatación provoca la expresión de genes antiaterogénicos (54).

La práctica de ejercicio físico es uno de los más importantes factores modificables, y uno de los hábitos de vida en los que antes se incide para hacer disminuir el riesgo cardiovascular (55).

Dieta

Otro de los factores de riesgo en que más se incide es en la dieta. Diversos estudios han puesto de manifiesto que una dieta rica en ácidos grasos saturados y colesterol favorece el desarrollo de ECV porque favorecen los perfiles lipídicos aterogénicos (56). En cambio dietas ricas en ácidos grasos omega 3, frutas y verduras son beneficiosas (57), tanto en pacientes con antecedentes de enfermedad vascular o sin ellos.

1.3.3 Factores de riesgo cardiovascular emergentes

Los factores de riesgo anteriormente presentados explican el 50% del riesgo en la población, por lo que deben existir otros factores de riesgo todavía no identificados. A estos factores se les llama factores de riesgo cardiovascular emergentes y se pueden dividir en tres categorías: factores lipídicos, factores no lipídicos y enfermedad aterosclerótica subclínica (16).

Se aplican los mismos criterios a los factores emergentes que a los mayores para averiguar su significación clínica;

- Poder predictivo significativo e independiente de otros factores de riesgo mayores.
- Alta prevalencia en la población, para justificar su medida o estudio.
- Su estudio o medida en el laboratorio debe estar estandarizada, ser de bajo coste y accesible a todos los clínicos, tener valores de referencia establecidos y ser estable.
- Por último también es recomendable, aunque no necesario, que su variación suponga una disminución del riesgo en ensayos clínicos.

Se consideran factores de riesgo emergentes lipídicos las lipoproteínas remanentes, la Lp(a), las partículas pequeñas de LDL, las subespecies de HDL, las Apo B y A-I y el cociente entre el CT y el HDL.

Se consideran factores de riesgo cardiovascular emergentes no lipídicos, la concentración de homocisteína en plasma, diversas moléculas implicadas en el proceso de trombogénesis como el fibrinógeno o algunos factores de la coagulación, marcadores de la inflamación como la proteína C reactiva y estados fisiológicos como la intolerancia en ayunas a la glucosa.

En un futuro, puede que estas magnitudes formen parte del perfil lipídico para el estudio del riesgo cardiovascular, y ya hoy en día algunas se pueden solicitar en los laboratorios.

Las personas con aterosclerosis subclínica avanzada presentan mayor riesgo de desarrollar un evento coronario grave que las que presentan aterosclerosis menos severa. Por eso la aterosclerosis avanzada se debe considerar como un factor de riesgo cardiovascular emergente. Se puede evaluar el grado de aterosclerosis de diversas maneras, como mediante el índice de presión arterial tobillo-brazo, pruebas de isquemia miocárdica o pruebas para evaluar la estabilidad de las placas de ateroma

1.4 Cálculo del riesgo cardiovascular

Las guías de prevención de riesgo cardiovascular recomiendan usar “scores” o puntuaciones de riesgo, que permitan identificar los individuos con elevado riesgo de sufrir un evento vascular, los cuales se pueden beneficiar del tratamiento. Existen diferentes maneras de calcular el riesgo que tiene el individuo de sufrir un evento cardiovascular en los próximos 10 años (58). El modo de cálculo más habitualmente empleado es el de Framingham, el Framingham Risk Score o FRS (59). En Estados Unidos la mayoría de guías que recomiendan el tratamiento con estatinas lo hacen basándose en este cálculo (60, 61) que utiliza puntuaciones de una serie de variables como son: edad (35-74 años), sexo, CT, HDL, presión arterial sistólica, tabaquismo (sí/no), diabetes (sí/no) e hipertrofia ventricular izquierda (sí/no), con las que se calcula el riesgo a los 10 años de sufrir una angina estable, un infarto de miocardio o muerte coronaria (62).

El FRS se estimó con una población blanca de edad media de 49 años, con edades comprendidas entre los 30 y los 79 años, por lo que en función de la población a la que se quiera aplicar serán necesarias ciertas modificaciones.

Existen otras escalas de cálculo del riesgo vascular derivadas de la de Framingham, como son las de Anderson et al. (63), Wilson et al. (59) o Grundy et al. (64), de las que se ha verificado que se pueden emplear en diversas áreas como España. Indican igualmente el riesgo de padecer un evento vascular en los próximos diez años. En el caso de población europea, se tomaron datos de 12 cohortes a partir de los cuales se ha desarrollado una escala que estima el riesgo cardiovascular y cerebrovascular: es el proyecto SCORE (Systematic Coronary Risk Evaluation) que tiene diversas versiones en función de los países con baja o alta incidencia de eventos cardiovasculares (65).

Al estar basadas en población americana, estas escalas tienden a sobrestimar el riesgo en los países con baja incidencia de cardiovascular, como España. Para solucionar el problema, se ha intentado calibrar la escala de Wilson con los datos del registro de Gerona de enfermedades del corazón, más conocido como REGICOR (66). Para los Hospitales del Institut Catalá de la Salut, dentro de los cuales se encuentra el centro en el que se ha llevado a cabo este estudio, se recomienda para el cálculo del riesgo vascular la escala REGICOR. Según esta escala, existen cuatro tablas para estimar el riesgo de sufrir una enfermedad coronaria en diez años para hombres y mujeres diabéticos y no diabéticos, en función de la edad, la presión arterial sistólica, la concentración de CT y el tabaquismo.

1.5 Dislipemias: descripción y clasificación

Se considera dislipemia cualquier alteración del metabolismo lipídico. Existen diferentes maneras de clasificar las dislipemias: en función de la lipoproteína afectada, de la causa de la dislipemia, o según el fenotipo.

El primero en realizar una clasificación sistemática de las dislipemias fue Fredrickson (67), que las clasificó basándose en la movilidad electroforética de las lipoproteínas presentes en el plasma de los pacientes. Posteriormente, esta clasificación fue modificada por expertos de la OMS (68).

La tabla 3 muestra la clasificación de Fredrickson-OMS para las dislipemias en función de las lipoproteínas alteradas.

Tabla 3: Clasificación de las dislipemias de Fredrickson-OMS

Fenotipo	Lipoproteína aumentada	Lípidos aumentados	Aspecto suero
I	QM	TG	Lechoso, tras reposo capa cremosa y resto transparente
Ila	LDL	Colesterol	Transparente
Ilb	LDL y VLDL	Colesterol y TG	Transparente o ligeramente opalescente
III	IDL	Colesterol y TG	Opalescente, puede aparecer capa cremosa tras reposo
IV	VLDL	TG	Opalescente, no aparece capa cremosa tras reposo
V	QM y VLDL	TG, a veces colesterol	Opaco, tras reposo capa cremosa y resto transparente

QM: quilomicrones VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad IDL: lipoproteínas de densidad intermedia LDL: lipoproteínas de baja densidad HDL: lipoproteínas de alta densidad. TG: triglicéridos

Según la causa, las dislipemias se pueden clasificar en primarias o secundarias. En las primarias la causa no se conoce o es genética (69), y en las secundarias la causa es una enfermedad o algún factor externo capaz de alterar el metabolismo lipídico (70).

La clasificación que más se usa actualmente es la que utiliza el fenotipo en sangre periférica, basándose en el componente lipídico que esté aumentado; el CT, los TG o ambos. Esta es la clasificación empleada en este trabajo, que se centra principalmente en las hipercolesterolemias, y además se describen brevemente las hipertrigliceridemias.

1.5.1 Dislipemias primarias

1.5.1.1 Hipercolesterolemias

Las hipercolesterolemias primarias son alteraciones del metabolismo lipídico que cursan con aumento de las concentraciones plasmáticas de CT, y que responden a una causa genética o desconocida. Existen diferentes tipos de hipercolesterolemia primaria como: la hipercolesterolemia familiar, el defecto familiar de Apo B-100, la hipercolesterolemia poligénica y la hiperlipemia familiar combinada.

- La hipercolesterolemia familiar es una enfermedad genética, de herencia autosómica dominante debido a mutaciones en el gen del receptor de LDL. Existen diferentes mutaciones que pueden causar esta enfermedad, pero en España se considera que tres de ellas son las responsables del 40% de los casos de hipercolesterolemia familiar que se producen. Se cree que es la enfermedad monogénica de mayor prevalencia en humanos: se estima que una de cada 500 personas es heterocigota para una de estas mutaciones y una de cada millón homocigota. Debido a la mutación en el receptor LDL, se produce una disminución del aclaramiento hepático del LDL, por lo que aumenta la concentración plasmática de CT y su depósito en los tejidos, aumentando el riesgo de sufrir una ECV (71). Los individuos con hipercolesterolemia familiar presentan concentraciones plasmáticas de CT muy elevadas desde la infancia, manifestaciones cutáneas como las xantelasmas o el arco corneal, y tendinosas como los xantomos (72).

- El defecto familiar de Apo B-100 se describió en 1989 y es una enfermedad autosómica dominante debida a una mutación en el gen de la Apo B-100. Esta

mutación afecta a una zona de reconocimiento del receptor de las LDL. Por lo tanto, estas Apo B-100 defectuosas permanecerán en sangre porque no se podrán unir a su receptor (73, 74). Las manifestaciones clínicas y bioquímicas son idénticas a las de la hipercolesterolemia familiar, por lo que el diagnóstico definitivo es genético.

- La hipercolesterolemia poligénica es la más frecuente de las hipercolesterolemias primarias, representando el 85% de ellas. Afecta al 4% de la población general. En este caso, la hipercolesterolemia es el resultado de la interacción entre factores genéticos, ambientales y sociales. Se manifiesta en la edad adulta presentando elevadas concentraciones de CT en plasma, pero no tan altas como en el caso de la hipercolesterolemia familiar monogénica. Es rara la presencia de xantomas tendinosos o el arco corneal (75). La presencia de esta enfermedad produce un aumento del riesgo de sufrir una ECV, sobre todo a partir de los 50 años, pero no tanto como en el caso de la hipercolesterolemia familiar.

- La hiperlipemia familiar combinada se caracteriza porque en las familias afectadas se presentan sujetos con los tres diferentes fenotipos; hipercolesterolemia aislada por aumento exclusivo de LDL, hipertrigliceridemia aislada por aumento exclusivo de VLDL y fenotipos combinados que dan lugar a dislipemia mixta. Fue descrita en 1972 por Rose et al. (76). La alteración que principalmente se produce es el aumento de la síntesis hepática de Apo B y VLDL, con un aclaramiento defectuoso de los TG plasmáticos. No presentan xantomas, pero pueden presentar xantolemas. Se asocia a un aumento del riesgo de ECV y comúnmente se encuentra asociada a otras alteraciones metabólicas como la hiperuricemia, hipertensión, obesidad o diabetes. No existe una prueba diagnóstica definitiva, se cree que puede haber genes implicados en su desarrollo (77) pero actualmente para el diagnóstico es necesario la evaluación de las magnitudes bioquímicas y el estudio de los familiares.

1.5.1.2 Hipertrigliceridemias

El otro tipo de dislipemia primaria es la hipertrigliceridemia, que se define cuando la concentración plasmática de TG es superior a 2,3 mmol/L. Si las concentraciones elevadas de TG se acompañan de concentraciones también elevadas de LDL o de IDL, se tratará de hipertrigliceridemias mixtas.

Las hipertrigliceridemias pueden clasificarse en primarias o secundarias (78). La mayoría de las hipertrigliceridemias sin aumento de LDL se deben a causa secundarias como consumo excesivo de alcohol, de carbohidratos en la dieta, a la

resistencia insulínica o al consumo de diversos fármacos. Las hipertrigliceridemias primarias se clasifican en función de la lipoproteína aumentada. Si las lipoproteínas aumentadas son los QM se denomina síndrome de hiperquilomicronemia y puede deberse a un déficit de LPL o al déficit de Apo C-II. Si se debe al aumento de VLDL se denomina hipertrigliceridemia familiar o esporádica y si se debe al aumento de las IDL se denomina disbetalipoproteinemia (79). Las hipertrigliceridemias pueden deberse al aumento de los TG transportados por los QM, al aumento de los TG transportados por las VLDL, o a ambos.

1.5.1.3 Dislipemias mixtas primarias

En ocasiones ocurre que la hipercolesterolemia familiar combinada se presenta con concentraciones plasmáticas elevadas de CT y TG, pero esta situación no se considera como dislipemia mixta pura. En cambio, sí se considera dislipemia mixta pura la hiperlipoproteinemia tipo III. Es un trastorno del metabolismo lipídico de causa genética, en el que se presentan concentraciones realmente elevadas de CT y TG.

Fue descrita por primera vez en 1952 por Gofman (80), y después fue mejor caracterizada por Fredrickson (67), que la denominó hiperlipoproteinemia tipo III.

En esta dislipemia las concentraciones de CT y TG se ven aumentadas debido al aumento de las lipoproteínas remanentes IDLs. Estas IDLs proceden de los QM de origen intestinal y del catabolismo de las VLDL.

En esta enfermedad existe una alteración genética que afecta a la Apo E, la cual es imprescindible para la unión de las lipoproteínas ricas en TG a sus receptores hepáticos una vez se han transformado por la LPL endotelial.

La Apo E es polimórfica en la población. Las variantes más estudiadas son las denominadas E3, E2 y E4. Comúnmente se ha asociado a los individuos homocigotos para E2 a la hiperlipoproteinemia tipo III (81). Es característica de esta forma de dislipemia la presencia de depósitos lipídicos en los surcos de las manos, los xantomas de las estrías palmares. La hiperlipoproteinemia tipo III predispone a sufrir eventos isquémicos principalmente cardiacos y periféricos.

1.5.2 Dislipemias secundarias

Existen diferentes causas de alteración del perfil lipídico. A continuación se describen algunas de ellas.

El consumo de alcohol es una de las causas más comunes de hipertrigliceridemia. En general, el consumo de alcohol produce un ligero y transitorio aumento de los TG

después de la ingesta. Su efecto se ve potenciado si se ingiere acompañado de comidas ricas en grasas. Los pacientes con hiperlipemias genéticas son especialmente sensibles al consumo de alcohol.

Otros factores que causan hiperlipemia secundaria son la obesidad y la DM, así como el hipotiroidismo. Es muy común que pacientes con hipotiroidismo primario presenten un aumento de LDL y muchos presentan además hipertrigliceridemia.

Ya que el hipotiroidismo es un enfermedad muy prevalente, es aconsejable medir la concentración de TSH en plasma en los pacientes en los que se halle hipercolesterolemia *de novo*, o cuando en un paciente hipercolesterolémico tratado con estatinas se observe una pobre respuesta terapéutica o manifestaciones de miopatía.

También se han detectado casos de hiperlipemia inducida por el consumo de un fármaco, como las hormonas sexuales femeninas, los antihipertensivos o los fármacos antirretrovirales.

1.6 Tratamiento de las dislipemias

1.6.1 Criterios para el tratamiento de las dislipemias

Como ya se ha visto en el apartado anterior, el riesgo cardiovascular es diferente de un individuo a otro y esto condiciona las medidas de tratamiento.

En primer lugar se deben descartar las causas de dislipemia secundarias como son la DM, el hipotiroidismo, la nefropatía, las hepatopatías, las diarreas aberrantes y el consumo de alcohol o fármacos. Después se evaluará el riesgo asociado a la dislipemia valorando el perfil lipídico del paciente y la existencia de otros factores de riesgo cardiovascular. En función de éstos, se tomarán las decisiones terapéuticas.

Para decidir el tratamiento que se debe aplicar en cada caso existen diferentes documentos y recomendaciones de sociedades científicas para la prevención cardiovascular. La más empleada es la guía NCEP-ATP III (16). Debido al carácter multifactorial de la ECV, los criterios de intervención dietética y farmacológica vendrán determinados por la valoración del riesgo global.

La tabla 4 muestra los criterios de la NCEP-ATP III para el tratamiento de la hipercolesterolemia en función de las concentraciones de LDL y los demás factores de riesgo, tanto para prevención primaria como para prevención secundaria.

Tabla 4: Criterios para el tratamiento de la hipercolesterolemia según la NCEP-ATP III.

Categoría del riesgo	Objetivo de LDL (mmol/L)	Concentración de LDL (mmol/L) para indicar cambios en el estilo de vida	Concentración de LDL (mmol/L) para indicación farmacológica
Enfermedad coronaria o equivalentes (RC >20%)	<2,6	≥2,6	≥3,4
2 ó más FR	<3,4	≥3,4	RC 10-20% ≥3,4 RC <10% ≥4,1
0 ó 1 FR	<4,1	≥4,1	≥4,9

RC: riesgo coronario FR: factor de riesgo. LDL: colesterol LDL

Es importante diferenciar entre prevención primaria y prevención secundaria.

La prevención primaria trata de evitar la ECV en individuos en los que no se ha producido ningún evento, con el principal objetivo de reducir los factores de riesgo. En cambio la prevención secundaria es la que se lleva a cabo en pacientes que ya tienen establecida la ECV, y que tienen riesgo de sufrir un evento recurrente (16).

En los últimos años a raíz de los datos obtenidos en estudios como el Heart Protection Study y el PROVE-It, que demuestran una relación lineal entre las concentraciones de LDL y el riesgo cardiovascular, se considera que el objetivo de LDL podría disminuirse hasta 1,8 mmol/L (16). Este valor se establecería para pacientes con un riesgo vascular debido a la presencia de varios factores de riesgo, en especial la DM, la existencia de varios factores de riesgo mal controlados, especialmente el tabaquismo, y la presencia de varios factores de riesgo del síndrome metabólico.

Existen factores que modulan los criterios para la intervención farmacológica, sobre todo cuando las concentraciones de LDL se encuentran en el límite para el tratamiento. Por ejemplo, la presencia de sedentarismo, obesidad o el aumento de los valores de las magnitudes bioquímicas consideradas factores de riesgo emergente, aconsejan la instauración del tratamiento.

Existen también algunos casos especiales. Por ejemplo, los pacientes con dislipemias por causas genéticas son portadores de defectos genéticos que favorecen la aparición temprana de aterosclerosis, por lo que se tendrá que ser más estricto, aun cuando no existan otros factores de riesgo. En el caso de los diabéticos, se considera la DM como si fuera una situación de prevención secundaria.

1.6.2 Las estatinas, mecanismo de acción

El uso de las estatinas se ha incrementado enormemente debido a su eficacia para el tratamiento de la hipercolesterolemia. Se estima que en todo el mundo unos 100 millones de personas toman estatinas para reducir el riesgo cardiovascular (82).

Diversos estudios han demostrado la relación lineal que existe entre la disminución de la concentración de LDL y la del riesgo de sufrir un evento cardiovascular (83). Además, las estatinas tienen efectos beneficiosos sobre todo el perfil lipídico y sobre los marcadores de inflamación, inmunidad y estrés oxidativo. También reducen la incidencia de infartos y la respuesta inflamatoria a la sepsis (84).

Las estatinas producen efectos diferentes en los pacientes, debido a causas genéticas y también a que hay diferencias en la adhesión al tratamiento a causa de los efectos secundarios que puede provocar, principalmente mialgias y miopatías (85).

Son fármacos hipocolesterolemiantes potentes ya que inhiben de forma reversible y competitiva la conversión enzimática del sustrato 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA en mevalonato, que es el precursor limitante de la producción intracelular de colesterol. Debido a esta inhibición, se produce una depleción de la concentración intracelular de colesterol que desencadena un aumento de la expresión de los receptores de LDL, y en consecuencia, un aumento del aclaramiento plasmático del LDL y de las partículas remanentes de las lipoproteínas ricas en TG. La eficacia de estos fármacos se explica por el hecho de que la mayoría del colesterol plasmático procede de la síntesis en el organismo y no de la dieta. Existen diferentes estatinas en el mercado, algunas de las cuales se consideran naturales, como la simvastatina, pravastatina o lovastatina, y otras sintéticas, como la atorvastatina y la fluvastatina. No todas las estatinas tienen el mismo efecto, y esto se debe a diversos motivos, como sus diferentes biodisponibilidades, mecanismos de metabolización, grado de eliminación renal etc... Todas las estatinas son metabolizadas por el citocromo P450, excepto la pravastatina. Algunas son metabolizadas vía CYP3A4 y otras vía CYP2C8. Esto conlleva que se puedan producir interacciones con otros fármacos, incluso alimentos, que modifiquen las concentraciones plasmáticas de estatinas y su acción. La eficacia en la reducción de las concentraciones de LDL y TG, así como los ligeros aumentos de HDL dependen, entre otros, de estos factores (86).

Está demostrado que las estatinas son eficaces reduciendo el riesgo cardiovascular ya que provocan una disminución del colesterol (83), y se ha relacionado la concentración del fármaco con los cambios de las magnitudes lipídicas, obteniendo mayores disminuciones al aumentar la dosis (87). Pero también es conocido que su efecto no

es homogéneo para todos los pacientes tratados, ni siquiera entre los tratados con la misma estatina a la misma dosis, pudiendo variar la respuesta al tratamiento entre un 10 y un 50% (88). Por otra parte, diversos estudios también han asociado el desarrollo de efectos adversos, más o menos graves, al tratamiento con estatinas (87). Por estos dos motivos se cree que debe haber un cierto componente genético que explique la diferente eficacia y tolerancia a las estatinas, pudiendo estar implicadas variantes genéticas tanto que codifiquen para proteínas esenciales en las vías de acción de las estatinas, como otras proteínas del metabolismo lipídico general.

Por ello, en este trabajo se han seleccionado una serie de variantes que podrían estar implicadas en la eficacia variable del fármaco.

1.7 Genes propuestos a estudio por su posible relación con la efectividad del tratamiento con estatinas

A continuación se exponen algunas características de los genes y las variantes que han sido seleccionadas para este estudio. Algunos de estos genes están implicados en la respuesta a las estatinas porque codifican proteínas que intervienen en su farmacocinética, como *SLCO1B1* que codifica para un transportador que facilita la entrada del fármaco a los hepatocitos, o *CYP3A4*, relacionado con su metabolización. En cambio, otros genes están implicados en su farmacodinámica, como *HMGCR*, que es el gen que codifica para la enzima sobre la cual ejercen su acción las estatinas.

También fueron evaluados algunos genes que codifican proteínas con funciones esenciales en el metabolismo de las LDL, como *APOE*, y genes relacionados con los denominados factores de riesgo cardiovascular emergentes como *LPA*.

1.7.1 *APOE* (rs7412 y rs429358)

La Apo E es una glicoproteína compuesta de 299 aminoácidos con un peso molecular de 34 KDa. Ejerce muy diferentes funciones, ya que está implicada en el metabolismo lipídico, el sistema inmune, el sistema nervioso central... Es producida por diversos tipos celulares como las células de la glía y endocrinas, pero la mayor fuente de Apo E es el hígado. Ejerce una función esencial en el metabolismo de las lipoproteínas, estando implicada en diversas etapas. Apo E se asocia con las VLDL y QM remanentes, siendo un ligando de gran afinidad para los receptores de LDL y LDL-like en el hígado. De esta manera, las partículas con Apo E se dirigen al hígado donde las

lipoproteínas serán degradadas. También inhibe la lipólisis de VLDL, produce la secreción elevada de TG de las VLDL, modula la actividad de otras proteínas como la CETP, está implicada en el desarrollo de las partículas HDL nacientes, etc.... (89).

El gen *APOE* está formado por cuatro exones y tres intrones. En el exón 4 se encuentran las variantes rs7412 y rs429358, que se han estudiado ampliamente. Estas variantes dan lugar a tres isoformas de la Apo E denominadas Apo E2, Apo E3 y Apo E4, que son codificadas por tres alelos codominantes: E2, E3 y E4 (imagen 5).

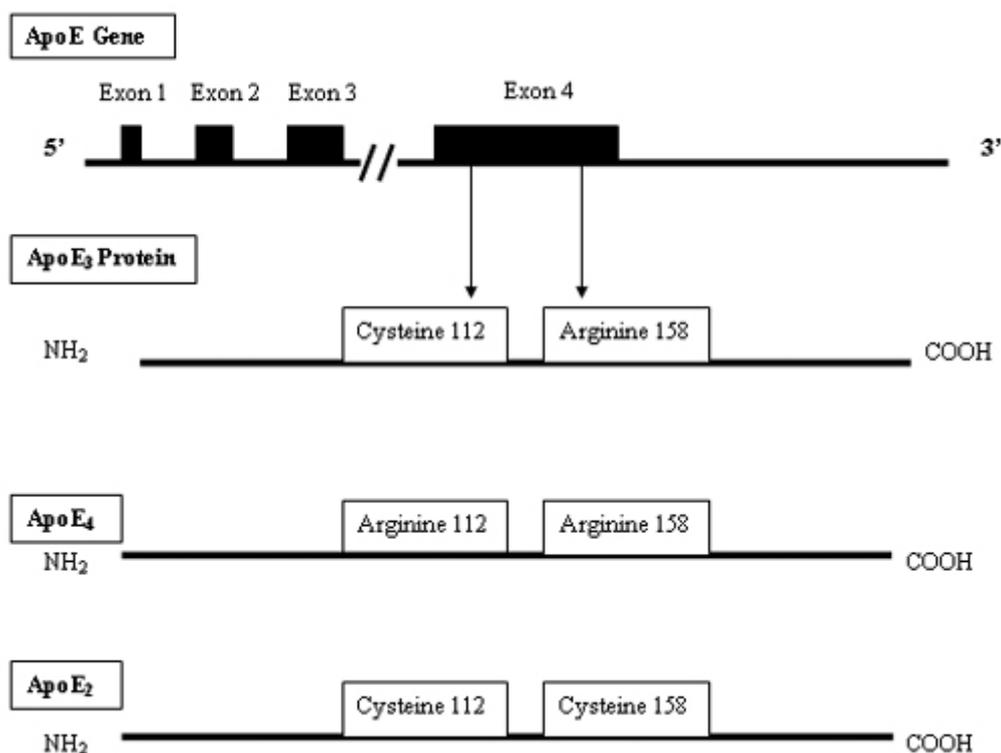


Imagen 5: Variantes del gen *APOE*

(www.trabajosdistinguidos.com/factores/expertosfactores43.php?PHPSESSID=om9eq0mk2m3dmrem74v45op0r1)

Los cambios correspondientes consisten en la sustitución de una única base. Para E4 se produce el cambio (c.388T>C), y para E2 el cambio (c.526C>T), lo que origina un cambio en los codones 112:TGC (Cys) > CGC (Arg), y 158:CGC (Arg) > TGC (Cys), respectivamente. La isoforma E2 tiene cisteína en posiciones 112 y 158 de la proteína, la isoforma E3 tiene cisteína en posición 112 y arginina en posición 158, y la isoforma E4 arginina en ambas posiciones (90).

Se ha estudiado muy ampliamente la relación de estas tres variantes con las concentraciones de colesterol plasmáticas, siendo conocida la asociación entre la variante Apo E4 y un aumento de riesgo cardiovascular, así como mayor riesgo de sufrir Alzheimer. Apo E se une a los receptores LDL hepáticos produciendo una

disminución del colesterol plasmático, al cual se unen adecuadamente tanto la forma E3 como la E4. Se ha observado que el cambio de aminoácido que da lugar a E4, hace que Apo E se una más a las VLDL que en el caso de E3, por lo que se dificulta el proceso de lipólisis de éstas. Por tanto, se produce un menor aclaramiento del plasma de las VLDL y disminuyen los componentes procedentes de la superficie de las VLDL degradadas, necesarios para la formación de los HDL nacientes. En conclusión, el perfil lipídico es mucho más pro-aterogénico (91). La variante E2 se ha asociado, cuando se encuentra en homocigosis, a la disbetalipoproteinemia, pero muchos estudios han relacionado también la presencia de esta variante con concentraciones de LDL más bajas, así como con un menor riesgo de sufrir ECV (92, 93). La relación de las variantes E2 y E4 con las concentraciones lipídicas en plasma es conocida desde hace tiempo, pero en este estudio lo que se trata de valorar es su posible implicación en la respuesta a las estatinas. Dado que es una situación que afecta a millones de personas en todo el mundo, se han realizado diversos estudios de asociación genómica respecto a este tratamiento, revelando la distinta influencia de estos polimorfismos en la disminución de las concentraciones de colesterol tras la administración de estatinas. Se cree que los individuos con el alelo E2 presentan mayores reducciones de colesterol que los E3, y estos a su vez que los E4 (94, 95). En este trabajo se ha estudiado la influencia de cada variante de manera independiente.

1.7.2 HMGCR (rs3846662)

El colesterol se puede incorporar a partir de la dieta pero también es sintetizado *de novo* de manera endógena a partir de Acetil-CoA. El órgano donde se produce principalmente la síntesis de colesterol es el hígado. La síntesis del colesterol se lleva a cabo en el citoplasma de las células y se puede dividir en diversas etapas; formación de mevalonato a partir de Acetil-CoA, transformación del mevalonato en escualeno, y transformación del escualeno en colesterol (imagen 6).

La enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMGCR) cataliza el paso limitante en la síntesis del colesterol, y sobre ella ejercen su acción las estatinas.

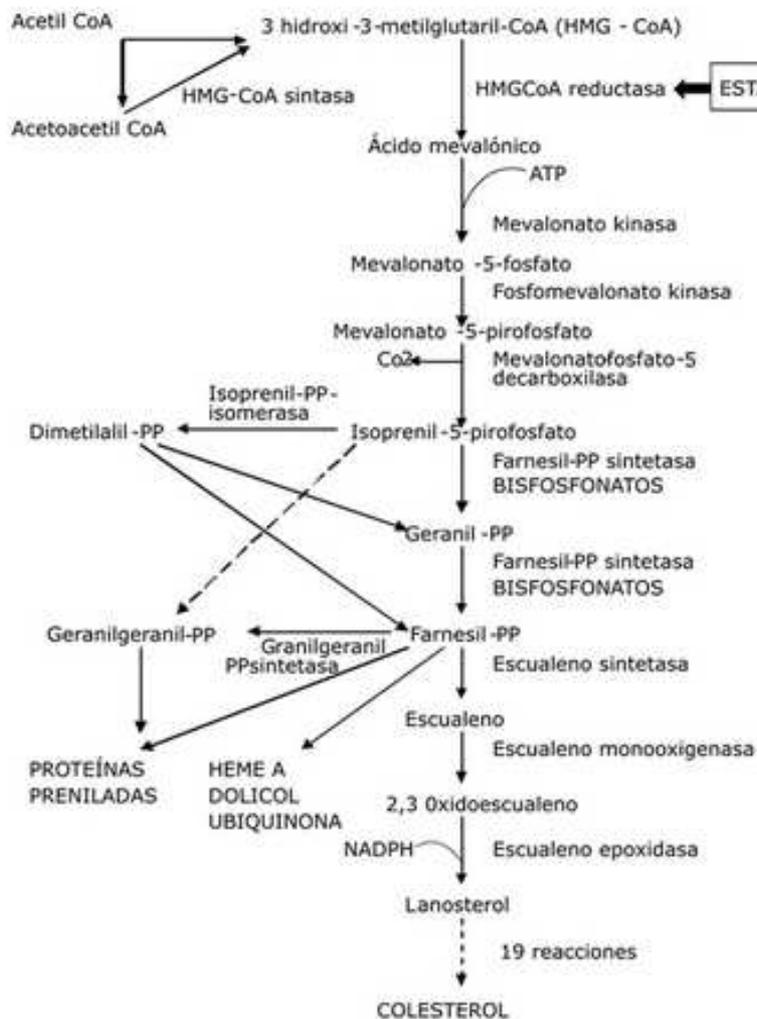


Imagen 6: Síntesis endógena de colesterol
http://bvs.sld.cu/revistas/mgi/vol25_2_09/mgi09209.htm

El gen que codifica para la HMGCR se encuentra en el brazo largo de cromosoma 5, concretamente en posición 5q13.3-q14, tiene un tamaño de 25.776 pares de bases (pb) y está formado por 44 exones (90 ncbi).

Ya que se trata del gen que codifica para la enzima que cataliza el paso clave de la síntesis del colesterol, fue uno de los primeros en estudiarse en relación a la eficacia de las estatinas. Se han estudiado tres variantes de una región intrónica cuya presencia afecta al splicing del exón 13, y componen el denominado haplotipo H7. Las 3 variantes intrónicas son rs17244841, rs3846662 y rs17238540, y se han relacionado

con la disminución de las concentraciones de LDL en respuesta al tratamiento con estatinas.

El splicing alternativo genera un mRNA sin exón 13, HMGCR13 (-), y aunque no rompe el marco de lectura, afecta a la síntesis de un dominio catalítico de la enzima (96). En este trabajo (96), se postuló que la presencia de HMGCR13 (-), podría resultar en una menor actividad enzimática pero posteriormente se concluyó que la pérdida de este exón conlleva la inactividad del centro catalítico (97), por lo que la enzima no puede catalizar la conversión de HMG-CoA en mevalonato. Algunos autores han propuesto que es posible que esto afecte a la respuesta al tratamiento con estatinas ya que la modificación del dominio catalítico podría implicar una pérdida de sensibilidad para la unión de éstas (97). Se cree que el rs3846662 ejerce como regulador de la expresión de HMGCR (-), y la presencia de su alelo mayoritario (A) se ha asociado a la de mayores concentraciones de HMGCR (-) respecto al HMGCR (+) (97).

No se conoce muy bien cuál es el mecanismo por el que podría haber menor sensibilidad a las estatinas, pero se cree que podría estar relacionado con la estructura de la enzima, ya que ésta no es activa como monómero sino como tetrámero (98). En un tetrámero puede haber monómeros HMGCR (-) y monómeros HMGCR (+), haciendo variable el grado de funcionalidad de la enzima respecto a un tetrámero con todos los monómeros HMGCR (+). Diversos estudios de asociación genómica ya han relacionado otras variantes del gen *HMGCR* con la respuesta a las estatinas (99), por lo que en este trabajo se decidió estudiar la influencia del haplotipo H7. Ya que son tres las variantes formantes del haplotipo H7 y están muy ligadas entre sí (87), para este trabajo se decidió estudiar la variante rs3846662.

1.7.3 *SLCO1B1* (rs4149056)

Las estatinas deben entrar en los hepatocitos para que puedan ser metabolizadas (imagen 7) y ejercer su acción. El gen *SLCO1B1* se encuentra localizado en el cromosoma 12 y codifica para el polipéptido transportador de aniones orgánicos (OATP) 1B1, el cual se encuentra principalmente en los hepatocitos en la cara expuesta al torrente sanguíneo. Este polipéptido es esencial para la captación de diversos aniones inorgánicos, como las estatinas. Recientes estudios han demostrado su importancia en la farmacocinética de fármacos aniónicos, ya que la inhibición de estos transportadores provoca que el fármaco esté presente en sangre más tiempo. Además, se han estudiado dos variantes, c.521T>C y c.388 A>G, del gen *SLOC1B1* por su implicación en los efectos farmacológicos y tóxicos de diversos fármacos (100).

En este trabajo se estudiará el efecto del polimorfismo rs4149056, consistente en un cambio c.521T>C, ya que se ha relacionado con una menor actividad del transportador, por lo que las concentraciones plasmáticas del fármaco serán más elevadas (101, 102). Diversos estudios de asociación genómica han relacionado esta variante con los efectos adversos de las estatinas, como son la miopatía o destrucción muscular, probablemente por la mayor exposición a estos fármacos al ser incorporados peor a los hepatocitos (103).

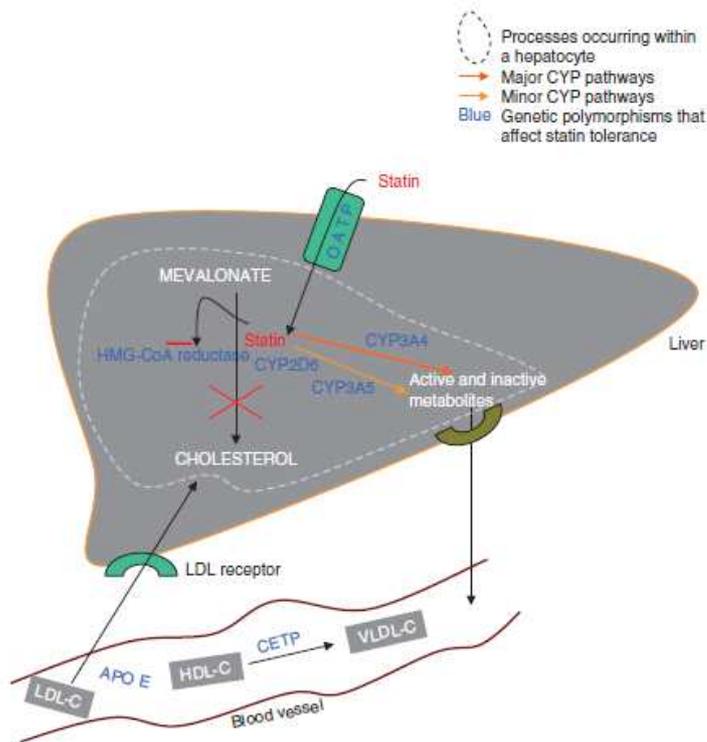


Imagen 7: Mecanismo de entrada de las estatinas a los hepatocitos (88)

Puesto que el polimorfismo rs4149056 se ha asociado con una menor capacidad transportadora, creemos que la menor penetración del fármaco para ejercer su acción podría dar lugar a una peor eficacia de los fármacos. Respecto al cambio de las concentraciones de HDL y TG hay pocos estudios, pero hasta ahora no se ha encontrado asociación entre esta variante y la variación de sus concentraciones tras el tratamiento con estatinas (104). Respecto al LDL, algún estudio muestra lo contrario: la dificultad de alcanzar el objetivo de LDL en ausencia de la variante (100).

1.7.4 CYP3A4 (*1B) (rs2740574)

El citocromo P450 forma parte de una superfamilia de hemoproteínas que llevan a cabo diversas reacciones como oxidaciones, hidroxilaciones, desalquilaciones, desulfuraciones, desaminaciones y deshalogenaciones. Está presente tanto en organismos procariotas como eucariotas, en muy diversas especies, y dentro de un mismo organismo en diferentes tejidos. Existen muchas variaciones del citocromo P450, por lo que estas enzimas están clasificadas en familias y subfamilias (105). Su actividad se relaciona con el metabolismo de diversos xenobióticos como drogas, pesticidas, anestésicos y otros fármacos como las estatinas.

Para eliminar los xenobióticos, en el organismo se produce una biotransformación para incrementar la hidrofilia de estas moléculas. Estas reacciones se pueden clasificar en reacciones de fase I y II. En la fase I, la molécula adquiere grupos polares, lo que se traduce en un aumento de la hidrosolubilidad, y en la fase II se conjugan con moléculas endógenas que facilitan su transporte en el organismo para ser eliminadas. Además, el citocromo también puede activar diversos profármacos, como ocurre en el caso de algunas estatinas (105).

Las estatinas pueden ser administradas en forma de precursores como lactonas, como ocurre con la simvastatina, o en forma ácida, que es la forma activa, como por ejemplo la atorvastatina.

Se ha visto que la principal responsable de la metabolización inicial de las estatinas, tanto en forma ácida como en forma de lactona, es la isoenzima CYP3A4 del complejo enzimático del citocromo P450, el cual es el responsable de la metabolización de entre el 45-60% de los fármacos. El CYP3A4 se expresa principalmente a nivel hepático y está implicado en el metabolismo de la lovastatina, simvastatina y atorvastatina. El metabolismo inicial conlleva un descenso de la biodisponibilidad de las estatinas. La actividad del CYP3A4 puede variar hasta diez veces entre individuos, por lo que se cree que también podría modificar la eficacia y la tolerancia al tratamiento con estas estatinas (87). El polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) que se va a estudiar en este trabajo es el rs2740574. Se trata de una variante cuya modificación afecta a la zona del promotor, y se cree que su efecto es que la unión de un represor al promotor se ve dificultada, por lo que la actividad transcripcional es mayor, y se produce una mayor cantidad de enzima activa. Como consecuencia se da una metabolización excesivamente rápida del fármaco, y por tanto podría haber un menor efecto hipolipemiente (106). Algunos autores han asociado esta variante a un mayor aumento de HDL tras el tratamiento con estatinas, (107) pero en cambio otros autores la han asociado a menores descensos de LDL tras el mismo (108).

1.7.5 LPA (rs10455872)

La lipoproteína (a) se ha considerado una variante de las lipoproteínas de baja densidad, con la diferencia de que además de incorporar la Apo B-100 tiene una Apo de muy variado peso molecular denominada (a) que se une por un puente disulfuro a Apo B-100. La Apo (a) posee una secuencia de repeticiones de un fragmento proteico denominado kringle y es una proteína con actividad aterogénica y antifibrinolítica. De hecho, se han asociado elevadas concentraciones de Lp(a) con un mayor riesgo cardiovascular. El gen *LPA* que codifica para la glicoproteína Lp(a) se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 6 (91). La variante que se estudiará en este trabajo es la rs10455872, que produce un cambio de A>G en una región intrónica. El Global Lipid Outcome (109) demostró la asociación entre la variante y las concentraciones de LDL, y diversos estudios han asociado la presencia de la variante a una menor disminución de las concentraciones de LDL en respuesta al tratamiento con estatinas (110-113). Otros estudios también han asociado la variante a un mayor riesgo de desarrollo de ECV en pacientes tratados con estatinas (114). En este trabajo se pretende estudiar si la influencia de la variante sobre los niveles de LDL se ven también reflejadas en los niveles de noHDL y de CT.

Como ya se ha mencionado, debido a que los genes propuestos están implicados en alguna de las vías de metabolización o acción de las estatinas, o están relacionados con el metabolismo de las lipoproteínas, se cree que sus variantes podrían determinar una mejor o peor respuesta al tratamiento con estos fármacos. Este trabajo tratará de verificar su influencia sobre la eficacia terapéutica de las estatinas sobre dos magnitudes lipídicas, el CT y el noHDL, de manera independiente y conjunta a una serie de variables de control, tratando además de cuantificar dicha influencia.

2. Objetivos

Teniendo en cuenta los datos expuestos anteriormente, en el presente trabajo se plantean los siguientes objetivos.

Objetivos principales

1. Estudiar la influencia de variantes de los genes *APOE* (c.526C>T, *APOE2*, y c.388T>C, *APOE4*), *SLCO1B1* (c.521T>C), *CYP3A4* (c.-392G>A), *HMGCR* (c.1564-106A>G) y *LPA* (c.3947+467T>C), sobre la respuesta al tratamiento con estatinas, tanto de manera individual como conjunta con otras variables no genéticas que se utilizarán como variables de control. La respuesta se valorará como la disminución relativa de la concentración de CT y de noHDL.
2. Estudiar la influencia de variantes de los genes *APOE* (c.526C>T, *APOE2*, y c.388T>C, *APOE4*), *SLCO1B1* (c.521T>C), *CYP3A4* (c.-392G>A), *HMGCR* (c.1564-106A>G) y *LPA* (c.3947+467T>C) sobre la consecución de los objetivos terapéuticos de CT y noHDL, en pacientes tratados con estatinas. Esta influencia se estudiará tanto de manera individual como conjunta con variables no genéticas que se utilizarán como variables de control.

Objetivos secundarios

3. Valorar si la influencia combinada de dichas variantes podría tener un efecto aditivo en la explicación de la respuesta al tratamiento.
4. Comparar la influencia de las variantes en dos poblaciones: una NAIF (de pacientes no tratados previamente con estatinas al comenzar el estudio) y otra NO NAIF (de pacientes que ya estaban siendo tratados al comenzar el estudio).

3. Material y Métodos

Este trabajo se ha planteado como un estudio de carácter observacional unicéntrico y retrospectivo.

3.1 Sujetos a estudio y recogida de datos

Todos los pacientes incluidos en este estudio fueron atendidos y tratados entre 1994 y 2012 en la Unidad Funcional de Riesgo Vascular (UFRV) del Hospital Universitari de Bellvitge.

Se seleccionaron aquellos pacientes que presentaban concentraciones de CT en plasma superiores al valor discriminante de 5,2 mmol/L, el recomendado por la guía NCEP-ATP III (16), en la primera visita a la UFRV y que fuesen visitados por segunda vez antes de 1 año. Se seleccionaron estos pacientes ya que en esta tesis se pretendía estudiar la influencia de las variantes genéticas en el efecto hipolipemiente de las estatinas, y era razonable suponer que este efecto sería más fácilmente observable en pacientes con concentraciones basales de CT altas. No se incluyeron pacientes con un perfil lipídico normal, aunque tomasen estatinas por haber sufrido un evento cardiovascular. Se verificó que ninguno de los pacientes presentase concentraciones de CT iniciales superiores a 13 mmol/L, para descartar aquellos pacientes que pudiesen sufrir una hipercolesterolemia familiar.

No se incluyeron en el estudio pacientes en tratamiento con acenocumarol, digoxina, ciclosporina, antifúngicos, antibióticos macrólidos, niacina, tacrolimus, inhibidores de proteasas, verapamil o antiácidos, debido a la interferencia que pueden producir estos fármacos en la acción de las estatinas (115-117).

Tampoco se incluyeron aquellos pacientes que además de estatinas tomasen otros fármacos hipolipemiantes como los fibratos, indicados principalmente para hacer disminuir las concentraciones de TG en suero, con el fin de evitar la confusión que podría provocar el efecto combinado de ambos tratamientos.

Una vez seleccionados los participantes en el estudio, se dividieron en dos grupos según la situación de tratamiento en la visita inicial a la UFRV; aquellos que no habían sido tratados previamente (población NAIF) y aquellos que ya estaban siendo tratados en ese momento, pero se les modifica el tratamiento (población NO NAIF). Se decidió hacer esta distinción ya que se consideró que los NO NAIF podrían ser pacientes con más dificultad para controlar sus niveles de lípidos ya que venían derivados desde un centro de atención primaria (donde ya se había iniciado el tratamiento sin obtener el resultado esperado) a una unidad especializada. Además, el tiempo que llevaban estos pacientes con un tratamiento previo podía ser muy diverso.

Tras la aplicación de los criterios de selección y exclusión el número total de participantes en este estudio fue de 157: 100 pertenecientes al subgrupo NAIF y 57 al NO NAIF.

Las diferentes estatinas recetadas a los pacientes fueron: simvastatina, atorvastatina, pravastatina, rosuvastatina y fluvastatina a diferentes dosis. Todos los datos se transformaron a su equivalente en dosis de simvastatina mediante el uso de la siguiente tabla de equivalencias.

Tabla 5: Equivalencia entre las diferentes dosis de estatinas

Reducción LDL (%)	Atorvastatina (mg)	Fluvastatina (mg)	Lovastatina (mg)	Pravastatina (mg)	Rosuvastatina (mg)	Simvastatina (mg)
10-20	-	20	10	10	-	5
21-30	-	40	20	20	-	10
33-40	10	80	40	40	5	20
41-45	20	-	80	80	5-10	40
46-50	40	-	-	-	10-20	80
51-55	80	-	-	-	20	-
56-60	-	-	-	-	40	-

LDL: colesterol LDL

En cada visita del paciente a la UFRV se recogieron los siguientes datos mediante una encuesta que realizó el médico al paciente:

- IMC (kg/m²)
- Tabaquismo (1= fuma / 2=no fuma / 3=ex fumador)
- Práctica de ejercicio físico (horas/semana)
- Consumo de alcohol (g/día)
- DM (si/no)
- Hipertensión arterial (si/no)
- Evento isquémico previo (si/no)
- Fecha de la visita
- Tratamiento previo y tratamiento impuesto

3.2 Magnitudes estudiadas.

3.2.1 Magnitudes relacionadas con el estudio bioquímico

Las magnitudes bioquímicas estudiadas fueron:

- Srm—Colesterol; c.subst. (CT)
- Srm—Colesterol (excluido el HDL); c.subst. (noHDL)

En este trabajo se ha estudiado la concentración de noHDL en vez de la de LDL, que es la magnitud que tradicionalmente se ha incluido en otros trabajos. La concentración de LDL se calcula mediante la fórmula de Friedewald, pero cuando las concentraciones de TG son altas no se puede aplicar esta fórmula (118). Para disponer de datos de todos los pacientes se ha estudiado el noHDL en vez del LDL.

3.2.2 Propiedades relacionadas con el estudio genético

Se estudiaron los siguientes SNPs:

- *APOE (APOE2) (rs7412) NM_000041.2:c.526C>T*
- *APOE (APOE4) (rs429358) NM_000041.2:c.388T>C*
- *SLCO1B1 (rs4149056) NM_006446.4:c.521T>C*
- *CYP3A4 (rs2740574) NM_017460.5:c.-392G>A*
- *HMGCR (rs3846662) NM_001130996.1:c.1564-106A>G*
- *LPA (rs10455872) NM_005577.2:c.3947+467T>C*

3.3 Indicadores y variables a estudio

Para poder valorar cuantitativamente la evolución del tratamiento de los pacientes, se seleccionaron los siguientes indicadores: porcentaje de cambio según la concentración final (%C) y porcentaje de cambio según la concentración media (%CM).

Además, se incluyó un indicador de tipo cualitativo, la consecución de los objetivos terapéuticos de CT y noHDL.

3.3.1 Porcentaje de cambio según la concentración final

Indica el cambio porcentual entre el valor de las magnitudes bioquímicas en la primera visita (Ci) y en la última (Cf). Se calcula con la siguiente fórmula:

$$\%C = \frac{Cf - Ci}{Ci} \times 100$$

Se calculó el indicador porcentaje de cambio según la concentración final (%C) tanto para CT como para noHDL.

3.3.2 Porcentaje de cambio según la concentración media

Puesto que a lo largo del periodo del tratamiento podrían darse oscilaciones al alza y a la baja de las magnitudes estudiadas, se ha considerado que la media de los valores obtenidos durante este periodo representa mejor su comportamiento, que además es variable entre los pacientes. Para tener en cuenta este aspecto se utilizó como indicador el porcentaje de cambio de las magnitudes respecto a la concentración media (%CM) durante el tratamiento. Se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\%CM = \frac{Cm - Ci}{Ci} \times 100$$

La concentración media durante el periodo del tratamiento (Cm) se calculó a partir de los datos de las magnitudes bioquímicas en cada una de las visitas de los pacientes a la UFRV. El indicador %CM se calculó tanto para CT como para noHDL.

3.3.3 Consecución de objetivos terapéuticos

Un indicador cualitativo dicotómico (objetivo alcanzado o no alcanzado) considerado para valorar la respuesta de los pacientes al tratamiento con estatinas fue la consecución de los objetivos terapéuticos de CT y noHDL. Se consideró que se había alcanzado el objetivo terapéutico de CT si en la última visita del paciente a la UFRV la concentración de CT era igual o inferior a 5,2 mmol/L, y de noHDL si éste era igual o inferior a 4,2 mmol/L.

3.3.4 Variables no genéticas

A partir de los datos recogidos en las encuestas que se realizaron a los pacientes en cada visita a la UFRV, se calcularon las siguientes variables, que fueron incluidas en los modelos estadísticos para estudiar su posible implicación en la eficacia de la respuesta a las estatinas.

Porcentaje de cambio del Índice de masa corporal (%IMC)

Representa el cambio en el IMC del paciente entre la primera (IMCi) y la última visita (IMCf).

$$\%IMC = \frac{IMCi - IMCf}{IMCi} \times 100$$

Cambio en el hábito tabáquico (ΔT)

El cambio en el hábito tabáquico se codificó como muestra la tabla 6.

Tabla 6: Codificación del cambio en el hábito tabáquico

Primera visita	Última visita	Cambio hábito tabáquico (ΔT)
0 (no fumaba)	0 (no fuma)	0
1 (fumaba)	1 (fuma)	0
0 (ex fumador o no fuma)	1 (fuma)	-1
1 (fumaba)	0 (ex fumador)	1

Cambio ejercicio físico (ΔHe) (horas/semana)

Representa el cambio en el número de horas de ejercicio físico que practica el paciente semanalmente entre la primera (Hei) y la última visita (Hef).

$$\Delta He = Hef - Hei$$

Cambio hábito enólico (ΔA) (gr alcohol/día)

Es el cambio en los gramos de alcohol diarios que ingiere el paciente entre las dos visitas.

$$\Delta A = A_f - A_i$$

Siendo A_i los gramos de alcohol diarios que consume el paciente en la visita inicial y A_f los gramos de alcohol diarios que consume el paciente en la visita final.

Dosis media diaria de estatina (mg)

Es la dosis que ha recibido el paciente por término medio cada día de su tratamiento. En el caso de cambios en las pautas de tratamiento, dosis o estatina, se calculó la dosis en cada periodo de tratamiento, se sumaron las dosis de los diferentes periodos y se dividió el resultado entre el número de días total del estudio. En todos los casos las dosis se convirtieron a su equivalente en dosis de simvastatina utilizando la tabla 5.

3.4 Métodos

3.4.1 Obtención del suero y principios de medida de las magnitudes lipídicas

El suero de los pacientes se obtuvo mediante punción venosa, recogiendo la sangre en un tubo sin ningún aditivo y con gel separador. Se esperó a la retracción del coágulo, se centrifugó a 2000 G durante 12 minutos a una temperatura entre (18-22)°C, y se obtuvo el suero. La extracción se realizó siempre a primera hora de la mañana tras ocho horas de ayuno y la determinación de las magnitudes bioquímicas se realizó el mismo día de la extracción.

Las medidas en suero de las magnitudes bioquímicas relacionadas con el colesterol se llevaron a cabo en el analizador Modular System (Roche Diagnostics) hasta septiembre de 2009. Posteriormente este analizador fue sustituido por el Cobas c711 (Roche Diagnostics), por lo que antes de comenzar a utilizarse para la medida de las diferentes magnitudes bioquímicas se verificó la intercambiabilidad entre ambos. Los principios de medida empleados son los mismos en ambos analizadores.

- Srm—Colesterol; c.subst. (CT)

Espectrometría de absorción molecular a 505 y 700 nm. Reacción de la colesterol esterasa/colesterol oxidasa/peroxidasa.

- Srm—Colesterol HDL; c.subst. (HDL)

Espectrometría de absorción molecular a 600 y 700 nm. Reacción de la colesterol esterasa/colesterol oxidasa/peroxidasa en presencia polietilenglicol, lo que provoca que la actividad catalítica de las enzimas sea diferente para las diferentes fracciones lipoprotéicas (LDL < VLDL, QM < HDL). Además, la presencia de sulfato de α -dextrina e iones magnesio disminuye la reactividad del colesterol de los QM y de las VLDL.

- Srm—Colesterol (excluido el HDL); c.subst. (noHDL)

Es una magnitud que se calcula a partir de la fórmula;

Srm—Colesterol (excluido HDL); c.subst. = (Srm—Colesterol; c.subst.) - (Srm—Colesterol HDL; c.subst.)

3.4.2 Obtención del DNA y amplificación por PCR

Se extrajo el DNA a partir de una muestra de sangre obtenida en un tubo con EDTA-K3 como anticoagulante mediante punción venosa. Las muestras se conservan entre (2-8)°C hasta el momento de realizar la extracción del DNA, como máximo una semana tras la obtención de la muestra.

La extracción de DNA se llevó a cabo mediante el sistema High Pure™ PCR Template Preparation Kit; Roche 1796828. El protocolo de extracción de DNA es el siguiente:

1. Se lisan las células de 200 μ L de sangre mediante la incubación con 200 μ L de una mezcla de guanidina-HCl 6 M, urea 10 mM, Tris HCl 10 mM, 20% Tritón X-100 (v/v) a pH=4,4 y 40 μ L de proteinasa K que permite la inactivación de la DNAsa endógena. Se agita en un vórtex y se incuba a 70°C en el baño durante 10 minutos.
2. El equipo proporciona unos tubos que tienen una capa de fibra de vidrio, en la que se fijan los ácidos nucleicos mediante la adición de 100 μ L de isopropanol. Se traspasa el contenido del tubo al correspondiente tubo con filtro, colocado

- sobre un tubo colector y se centrifugan los tubos durante 1 minuto a 9000 rpm. Se pasa el tubo con filtro a un nuevo tubo colector y se desecha el usado.
3. Se realiza un lavado con 500 μ L de guanidina-HCl 5 M, Tris HCl 20 mM a pH=6,6 en etanol para eliminar los contaminantes inhibidores de la PCR. Se repite la centrifugación y desecho.
 4. Se realizan dos lavados con 400 μ L NaCl 20 mM, Tris HCl 2 mM, a pH= 7,5 en etanol para liberar a los ácidos nucleicos de sales, proteínas y otras impurezas celulares. Se repite la centrifugación y desecho.
 5. El DNA se eluye de la fibra de vidrio con 200 μ l una solución de Tris HCl 10 mM, a pH de 8,5.

Para verificar que la extracción se había realizado correctamente, se corrieron los productos de DNA en un gel de agarosa estándar al 1% que se tiñó con bromuro de etidio y se iluminó con luz UV para visualizar las bandas de DNA.

Una vez extraído, el DNA se guardó congelado a -80°C hasta el estudio de las variantes genéticas.

3.4.2.1 PCR-RFLP

El estudio de los polimorfismos mediante amplificación por PCR clásica seguida de digestión con enzimas de restricción (RFLP) y estudio del tamaño de los fragmentos obtenidos, se realizó para el estudio de SNPs de los genes *CYP3A4* (rs2740574) y *APOE* (rs7412 y rs429358)

CYP3A4 (rs2740574)

En primer lugar se llevó a cabo la reacción de amplificación por PCR empleando los siguientes cebadores:

Cebador A: 5'-GGA CAG CCA TAG AGA CAA CTG CA -3'

Cebador B: 5'-CTT TCC TGC CCT GCA CAG -3'

Estos cebadores permiten amplificar un fragmento de DNA de 334 pb e introducen una diana para la enzima de restricción Pst I.

La mezcla de reacción empleada para un volumen final de 25 μ L fue:

- Supermix (2x) 12,5 μ L

- Dimetilsulfóxido (DMSO) 2 µL
- Cebador A (100 µmol/L) 0,25 µL
- Cebador B (100 µmol/L) 0,25 µL
- Agua estéril 5 µL
- Muestra de DNA 5 µL

La Supermix (*iQ™ Supermix, Bio-Rad*) es un tampón que contiene la polimerasa (iTaQ DNA polymerase), dNTPs, MgCl₂ 6 mM y estabilizadores, que son los componentes esenciales, además de los cebadores, para que se produzca la amplificación.

Se empleó el termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad) y el siguiente programa de PCR.

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1x	94°C	5 min
	94°C	20 s
35x	55°C	30 s
	72°C	30 s
1x	72°C	5 min
1x	12°C	∞

El producto de 344 pb se sometió a electroforesis en un gel de agarosa estándar al 1,5% y se tiñó con bromuro de etidio, para verificar que se hubiese obtenido producto tras la amplificación. Una vez verificado que se había obtenido producto de la PCR, se llevó a cabo su digestión con la enzima de restricción Pst I durante toda la noche a 37°C.

Para realizar la digestión se preparó la siguiente mezcla:

- Tampón H (10X) 1,2 µL
- Enzima Pst I 0,5 µL
- Producto de DNA 10 µL

Los fragmentos obtenidos tras la digestión corresponden a los tamaños:

- Homocigoto normal (AA): 223+78+33 pb
- Homocigoto mutado (GG): 200+78+33+23 pb
- Heterocigoto (GA): 223+200+78+33+23 pb

Los fragmentos obtenidos fueron sometidos a una electroforesis en gel de agarosa estándar a una concentración del 2%, y posteriormente el gel fue teñido con bromuro de etidio para poder visualizarlo con luz UV.

En el gel, los fragmentos pequeños de 33 y 23 pb no se observan, debido a su pequeño tamaño, pero su detección no es necesaria para la identificación de los genotipos de las muestras.

APOE (rs7412 y rs429358)

Para el caso del gen *APOE* se estudiaron dos variantes: APOE2 (rs7412) y APOE4 (rs429358). Hasta 2010, el genotipado de los pacientes se realizó mediante PCR clásica seguida de digestión con enzima de restricción, y a partir de 2011 mediante PCR a tiempo real con sondas alelo-específicas. Antes del cambio de método se verificó la intercambiabilidad entre ambos.

En el caso de PCR-RFLP los cebadores empleados para llevar a cabo la PCR clásica fueron:

Cebador APOEA: 5' ACAGAATTCGCCCGGCCTGGTACAC 3'

Cebador APOEB: 5' TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGA 3'

Se amplificó un fragmento de 244 pb, que se digirió posteriormente con la enzima de restricción Cfo I.

La mezcla de reacción empleada, con un volumen final de 25 μ L fue:

- Tampón (10x) 2,5 μ L
- DMSO 2,5 μ L
- Cebador APOEA (20 μ mol/L) 0,25 μ L
- Cebador APOEB (20 μ mol/L) 0,25 μ L
- dNTPs (1 mmol/L) 2,5 μ L
- Polimerasa Expand (Roche) 0,15 μ L
- Agua estéril 8,85 μ L
- Muestra de DNA 8 μ L

Se empleó el termociclador iCycler de Biorad y el siguiente programa de PCR.

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1x	95 °C	2 min
1x	96 °C	5 min
	94 °C	45 s
30x	60 °C	60 s
	72 °C	60 s
1x	72°C	5 min
1x	12°C	∞

El producto de 244 pb se sometió a electroforesis en un gel de agarosa estándar al 1,5% y se tiñó con bromuro de etidio, para verificar que se hubiese obtenido producto tras la amplificación. En la imagen 8 la flecha señala el producto amplificado.

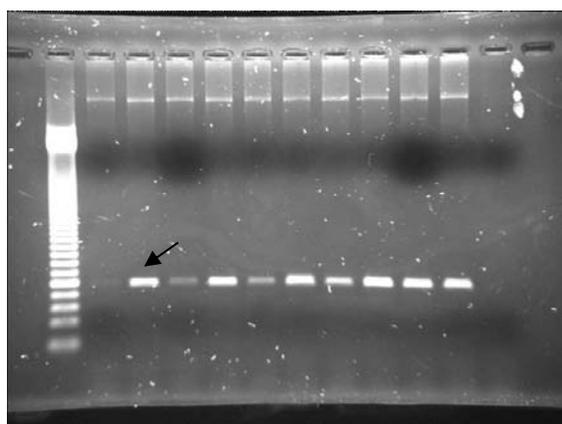


Imagen 8: Producto amplificado mediante PCR

Una vez comprobado que la amplificación se había producido correctamente, se realizó la digestión con la enzima de restricción Cfo I durante toda la noche a 37°C, para lo que se empleó la siguiente mezcla:

- Tampón L (10X) 2,3 µL
- Enzima Cfo I 0,5 µL
- Producto de DNA 20 µL

Los fragmentos obtenidos fueron sometidos a una electroforesis en gel de agarosa de alta resolución a una concentración del 2,5%, y posteriormente el gel fue teñido con bromuro de etidio para poder visualizarlo con luz UV. La tabla 7 muestra los tamaños obtenidos tras la digestión en función de los genotipos.

Tabla 7: Fragmentos obtenidos en la digestión en función de los genotipos

Genotipos	Fragmento de las bandas visualizadas (pb)			
E2/E2	91	81	-	-
E2/E3	91	81		48
E2/E4	91	81	72	48
E3/E3	91	-	-	48
E3/E4	91	-	72	48
E4/E4	-	-	72	48

pb: pares de bases

La imagen 9 muestra los diferentes fragmentos observados en función de los genotipos.

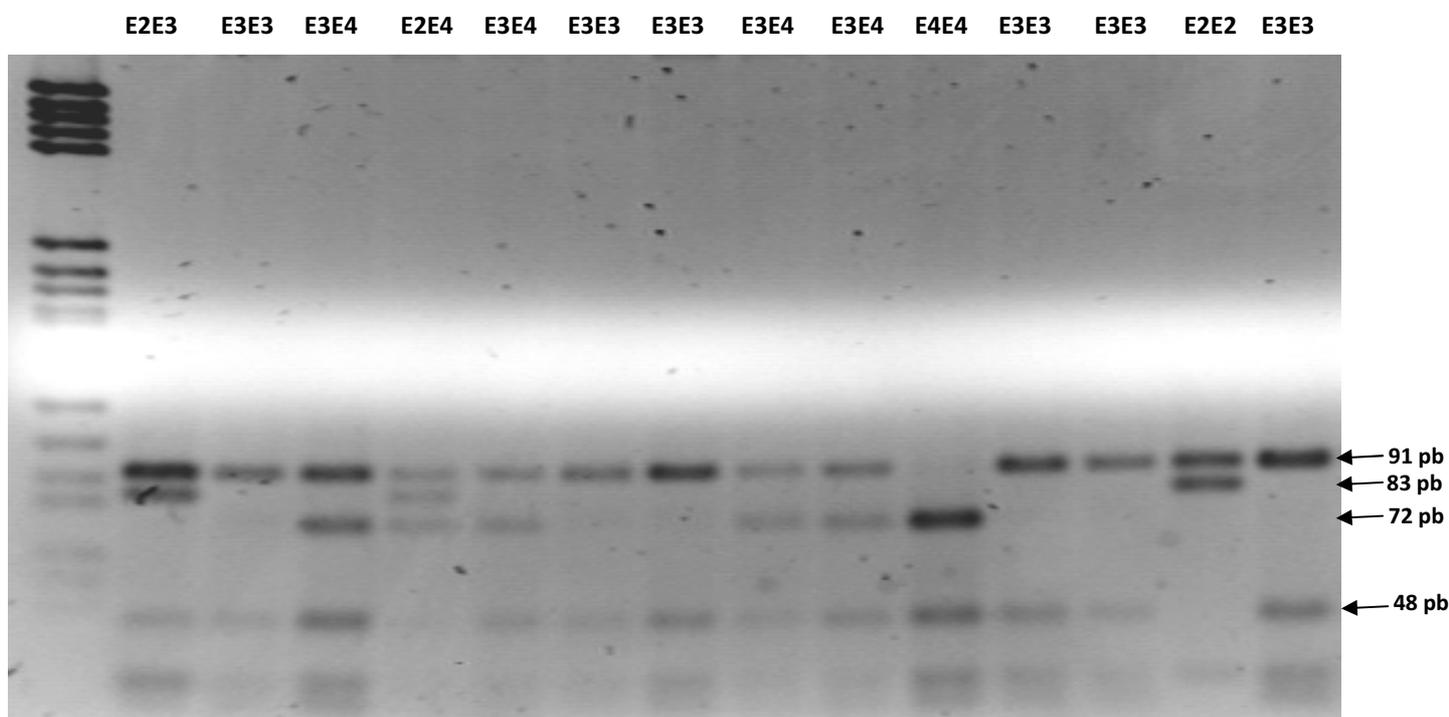


Imagen 9: Genotipos posibles de los dos SNPs de APOE.

3.4.2.2 PCR a tiempo real con sondas alelo-específicas

Se denomina PCR a tiempo real al tipo de amplificación de DNA que permite seguir el proceso mientras ocurre, lo cual se consigue incorporando a la reacción fluorocromos que al ser excitados emiten luz a diferentes longitudes de onda. En este estudio se empleó esta tecnología para detectar SNPs con sondas alelo-específicas marcadas.

Se emplearon sondas Taqman® (Applied Biosystem). Estas sondas son secuencias complementarias diseñadas una para reconocer el alelo normal y otra el alelo mutado, que se añaden a la mezcla de reacción de la PCR e hibridan perfectamente con el fragmento de DNA correspondiente.

Cada sonda contiene el flourocromo en posición 5' y un atenuador o quencher en el extremo 3'. El atenuador es una molécula que impide la emisión de luz por el flourocromo, de manera que mientras la sonda está en la mezcla de reacción o unida al DNA no se emite fluorescencia. Al llevarse a cabo la PCR, la polimerasa se une al DNA monocatenario y comienza la copia de la cadena por lo que degrada y libera la sonda, produciéndose la emisión de la fluorescencia que es detectada. La fluorescencia detectada es proporcional a la cantidad de DNA amplificado.

Para el estudio de cada SNP se emplean dos sondas, cada una de ellas marcada con un flourocromo que emite luz a diferente longitud de onda, por lo que se puede identificar el genotipo. En el caso de las sondas empleadas en este estudio, los flourocromo son FAM® y VIC®.

El estudio de las variantes del gen *APOE* se llevó a cabo con el termociclador iCycler con módulo iQ™5 (Multicolor Real-time PCR Detection System, Biorad) y el de las variantes de los genes *SLCOB1*, *HMGCR* y *LPA* con el termociclador Eco™ Real-Time PCR System (Illumina)

Para el estudio de las variantes de los genes *SLCO1B1*, *HMGCR* y *LPA*, se empleó la siguiente mezcla de reacción de la PCR a tiempo real con sondas alelo-específicas en un volumen final de 10 µL:

- Supermix (2x) 5 µL
- TaqMan Validated SNP Genotyping Assay (20x) 0,5 µL
- Muestra de DNA 4,5 µL

En el caso del estudio del gen *APOE* mediante PCR a tiempo real la mezcla de reacción empleada para un volumen final de 20 µL fue:

- Supermix (2x) 10 µL
- Dimetilsulfóxido (DMSO) 2 µL
- TaqMan Validated SNP Genotyping Assay (20x) 1 µL
- Agua estéril 2 µL
- Muestra de DNA 5 µL

La Supermix (*iQ™ Supermix, Bio-Rad*) es un tampón que contiene la polimerasa (*iTaq DNA polymerase*), dNTPs, MgCl₂ 6 mM y estabilizadores. El reactivo *TaqMan Validated SNP Genotyping Assay Mix* (*Applied Biosystems*) contiene los cebadores y las sondas específicas para cada SNP, marcadas con los flourocromo FAM® y VIC® y los quenchers. No se conocen las secuencias de las sondas y cebadores, ya que la casa comercial no las proporciona.

A continuación, se expone para el estudio de cada polimorfismo el perfil térmico empleado para la PCR y la base reconocida por cada una de las sondas marcadas con flourocromos.

SCLO1B1

Programa:

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1x	95°C	10 min
40x	92°C	15 s
	60°C	1 min
1x	40°C	1 min

Marcaje de las sondas:

Flourocromo	Base reconocida
VIC®	C
FAM®	T

HMGCR, LPA y APOE

Programa:

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1x	95 °C	10 min
50x	92°C	15 s
	60°C	1 min
1x	40°C	1 min

Marcaje de las sondas:

Variante	Flourocromo	Base reconocida
HMGCR (c.1564 106A>G)	VIC® FAM®	A G
LPA (c.3947+467T>C)	VIC® FAM®	A G
APOE2 (c.526C>T)	VIC® FAM®	C T
APOE4 (c.388T>C)	VIC® FAM®	C T

3.4.2.3 Interpretación de resultados de PCR a tiempo real con sondas alelo específicas obtenidos con los termocicladores iCycler y Eco.

En el termociclador iCycler la interpretación de los resultados se realiza con el programa informático iQ5 2.0 (Standard Edition Optical System Software V2.0, Bio-Rad), y en el termociclador Eco, el programa Eco™ Software (v4.0, Illumina).

En ambos casos, al final de cada ciclo de PCR se mide la señal de fluorescencia emitida. Se puede medir la emisión de fluorescencia mediante las URFs (unidades relativas de fluorescencia) o mediante ΔR , cambio normalizado de fluorescencia. Las URF se obtienen dividiendo la fluorescencia final entre la basal o fluorescencia inespecífica, y el ΔR es la diferencia desde la línea base a la máxima fluorescencia alcanzada. El gráfico de resultados de iCycler muestra las URFs de cada sonda, en cambio el Eco muestra las ΔR (imágenes 10 y 11, respectivamente). Para cada muestra se miden las URF o ΔR de FAM y VIC, de manera que en función de la fluorescencia emitida por cada sonda se pueden clasificar los genotipos. Si ambos flourocromos emiten fluorescencia de similar intensidad se trata de un paciente heterocigoto, y si mayoritariamente sólo emite uno de ellos, homocigoto. En las imágenes se puede ver que si se divide la gráfica en 4 partes, en el cuadrante inferior derecho se encuentran los homocigotos normales, en el cuadrante superior derecho se encuentran los casos en que ambas sondas emiten fluorescencia a similar intensidad, tratándose de heterocigotos. En el cuadrante superior izquierdo se sitúan los homocigotos mutados y en el cuadrante inferior izquierdo se encuentra una muestra sin amplificación (muestra sin DNA). Ésta última no debe emitir fluorescencia ya que de ser así podría tratarse de una señal inespecífica o de contaminación de la reacción.

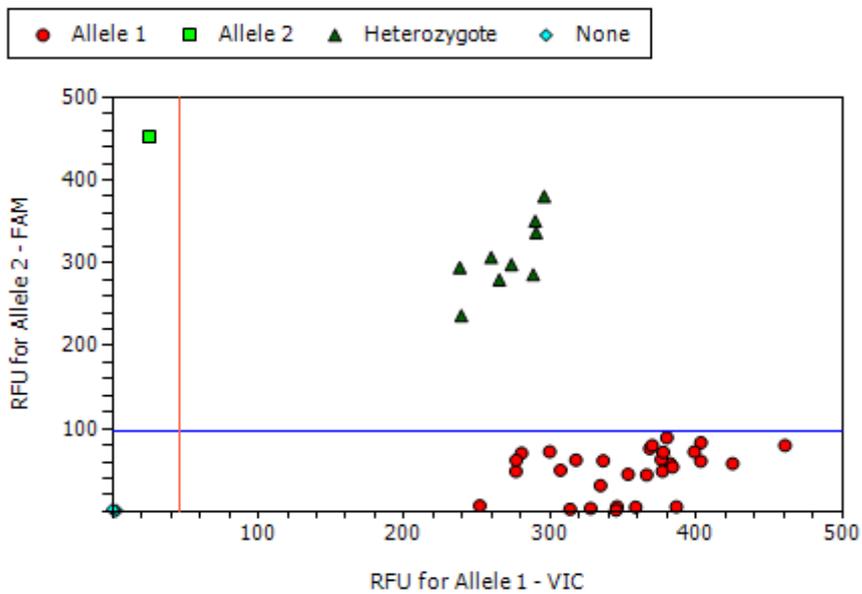


Imagen 10: Resultados de iCycler. Se representa las URF de FAM frente a las URF de VIC. Los círculos rojos son los homocigotos normales, el cuadrado verde el homocigoto mutado y los triángulos verdes los heterocigotos. El círculo azul corresponde a una muestra de agua, que no se amplifica porque no hay DNA.

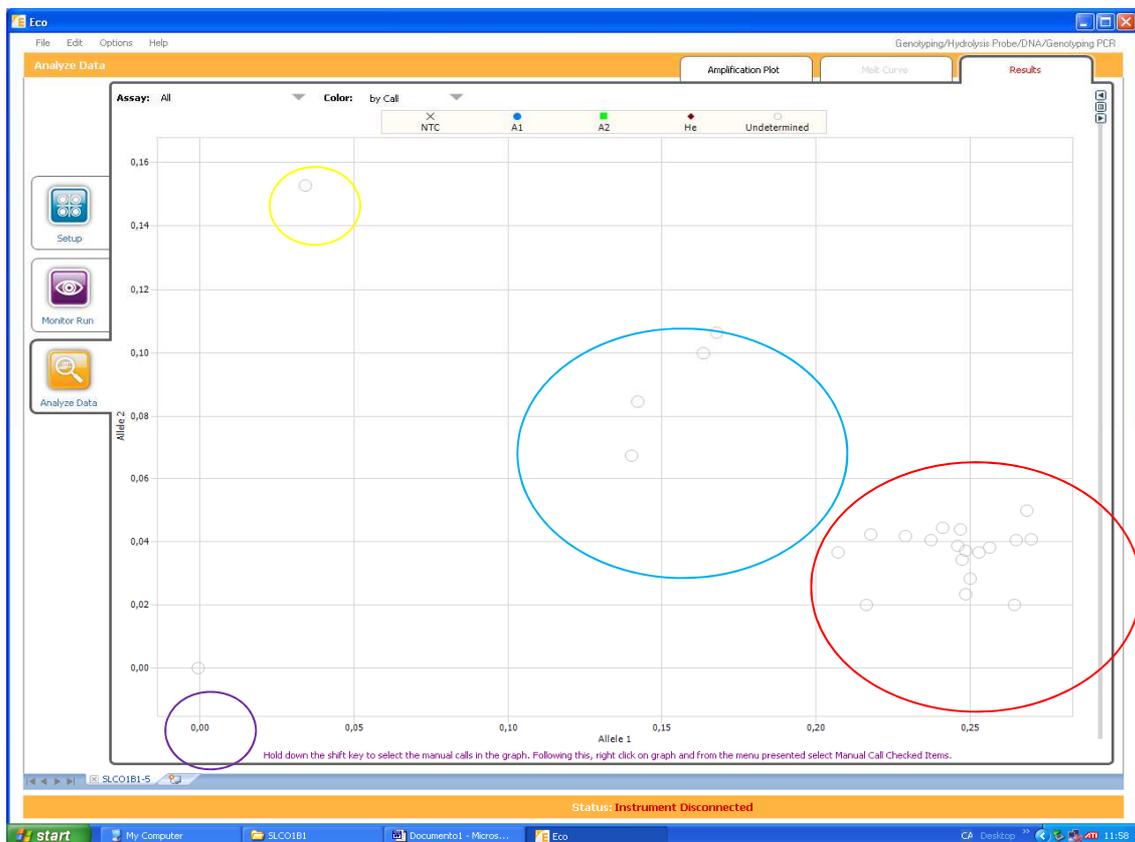


Imagen 11: Resultados de Eco. Se representa las ΔR de FAM frente a las de VIC, de modo que las muestras rodeadas por un círculo rojo son los homocigotos normales, por el amarillo es un homocigoto mutado y por el azul los heterocigotos. El círculo morado corresponde a una muestra de agua, que no se amplifica porque no hay DNA.

3.5 Tratamiento estadístico de los datos

3.5.1 Variables indicadoras de la respuesta al tratamiento de tipo cuantitativo: porcentaje de cambio según la concentración final y según la concentración media

En este trabajo se estudiaron dos variables dependientes Y como variables indicadoras de la respuesta al tratamiento de los pacientes con estatinas: porcentaje de cambio según la concentración final (%C) y porcentaje de cambio según la concentración media (%CM).

Para valorar la influencia de las variantes genéticas sobre cada indicador, se desarrolló el siguiente procedimiento estadístico en etapas:

- 1- En primer lugar, para estudiar la influencia individual de las variables de control cuantitativas (edad, dosis, Δ IMC, Δ He y Δ A) sobre el indicador (%C o %CM), se realizaron estudios de regresión lineal simple. En el caso de las variables de control cualitativas (sexo, Δ T, DM y HTA) se compararon los resultados de los grupos mediante test de comparaciones de medias.
- 2- A continuación se construyó un modelo de regresión múltiple de tipo stepwise con todas las variables de control que habían resultado significativas ($p < 0,05$) en las regresiones o comparaciones de medias, para valorar así su influencia conjunta sobre el indicador. A este modelo se le denominó modelo basal, y se calculó el porcentaje de explicación del indicador que correspondía a este modelo (R^2).
- 3- Para cada variante genética se clasificaron los pacientes como portadores o no portadores de la variante, y se compararon los resultados de los indicadores %C y %CM entre los dos grupos.
- 4- En los casos en que hubiera diferencias entre portadores y no portadores, se seleccionó la variante para incluirla en el modelo basal.
- 5- Se construyeron los modelos finales mediante regresiones múltiples tipo stepwise, incluyendo de manera independiente cada una las variables genéticas seleccionadas junto a las variables de control. Se calculó la explicación del indicador debido al modelo final (R^2).
- 6- La diferencia entre la R^2 del modelo final y la del modelo basal, será la explicación que aporta la presencia de la variante genética.

3.5.2 Variables indicadoras de la respuesta al tratamiento de tipo cualitativo: consecución de los objetivos terapéuticos.

Se realizó el siguiente estudio estadístico por pasos muy similar al realizado para los indicadores cuantitativos, pero teniendo en cuenta que el indicador (consecución de objetivo terapéutico) ahora era una variable de tipo nominal dicotómica.

- 1- Para las variables de control cuantitativas, se realizaron estudios de regresión logística simple y para las variables cualitativas se realizaron comparaciones de proporciones entre grupos mediante chi cuadrado. Además se tuvieron en cuenta como variables de control los valores iniciales de las magnitudes bioquímicas (CTi y noHDLi). En esta parte del estudio se definió el nivel de significación para la selección de las variables como $p \leq 0,100$.
- 2- Se construyó un modelo de regresión logística múltiple incluyendo las variables por pasos hacia delante de una en una, con todas las variables de control seleccionadas, para ver su influencia conjunta sobre el indicador. A este modelo se le denominó modelo basal y se calculó el porcentaje de explicación que se le atribuyó (R^2).
- 3- Se estudiaron las diferencias para la consecución de los objetivos terapéuticos entre los portadores y no portadores de las variantes mediante chi cuadrado, y aquellas para las que se encontraron diferencias se seleccionaron. El nivel de significación definido fue también de $p \leq 0,100$.
- 4- Se construyeron los modelos definitivos incluyendo las variables de control y las variantes genéticas seleccionadas, mediante regresión logística múltiple incluyendo las variables una a una. Se calculó el porcentaje de explicación del modelo final (R^2).
- 5- La diferencia entre la R^2 del modelo final y la del modelo basal, será la explicación que aporta la presencia de la variante genética

Igual que para los indicadores cuantitativos, se estudió en primer lugar la población NAIF y después se comprobaron los resultados en la población NO NAIF.

3.5.3 Otros test estadísticos empleados

Para los estudios de correlación se han empleado los test de Pearson y Spearman, en función de que las variables se distribuyesen o no normalmente. Para las comparaciones entre dos grupos o más se empleó el test de T de Student y ANOVA,

para las variables que se ajustasen a una distribución gaussiana, y el de U de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis para las que no.

3.6 Programas informáticos

Para obtener los resultados de las magnitudes bioquímicas de los pacientes se empleó el programa de laboratorio Omega 3000 (Roche Diagnostics) y para el estudio estadístico se empleó el programa informático SPSS, versión 17.0 para Windows (SPSS; Chicago, US).

Para la interpretación de los resultados de PCR a tiempo real se trabajó con los programa iQ5 2.0 (Standard Edition Optical System Software V2.0, Bio-Rad) y el Eco™ Software (v4.0, Illumina).

3.7 Direcciones de internet

Toda la información relativa a los polimorfismos en estudio proviene de la base de datos de la National Center for Biotechnology Information (NCBI)- National Institutes of Health (NIH) de Estados Unidos: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

4. Resultados

4.1 Descripción de la población

El estudio de los tres indicadores se llevó a cabo en primer lugar en la población NAIF (n=100) y posteriormente se contrastaron los resultados con la población NO NAIF (n=57). Las tablas 8 y 9 muestran los datos de todos los pacientes en las visitas iniciales, separando las poblaciones en NAIF y NO NAIF, así como la *p* obtenida de la comparación entre ambos grupos. En negrita se muestran los casos en los que se encontraron diferencias significativas. Como ya se ha mencionado, los datos se obtuvieron mediante la encuesta realizada y el sistema informático del laboratorio.

Tabla 8: Datos en la visita inicial de las variables cuantitativas en ambas poblaciones.

Variable (unidad de medida)	NAIF Mediana (rango)	NO NAIF Mediana (rango)	<i>p</i>
Edad (años)	45, 8 (43,6;48,0)*	52,0 (48,2;55,8)*	0,008
IMC (kg/m ²)	27,9 (19,8;37,0)	28,0 (18,2;41,2)	0,857
Práctica de ejercicio (horas/semana)	2 (0;14)	2 (0;30)	0,516
Consumo de alcohol (g/día)	0 (0;130)	0 (0;50)	0,521
Srm—Colesterol; c.sust (mmol/L)	6,9 (5,3;11,8)	6,7 (5,3;10,9)	0,124
Srm—Colesterol no HDL; c.sust (mmol/L)	5,6 (3,4;10,2)	5,2 (3,6;9,4)	0,068

IMC: índice de masa corporal *media e intervalo de confianza del 95% rango: valor mínimo y valor máximo *p*: probabilidad obtenida en cada uno de los test de comparación de medias o medianas

Tabla 9: Datos en la visita inicial de las variables cualitativas en ambas poblaciones.

Variable (%)	NAIF	NO NAIF	<i>p</i>
Sexo (%F / %M)	33 / 67	32 / 68	1,000
Hábito tabáquico (%fumadores / %no fumadores / % ex fumadores)	34/ 22 / 25	21/ 37 / 37	0,017
DM (%si / %no)	13 / 81	19 / 75	0,332
HTA (%si / %no)	19 / 75	32 / 63	0,049
ISQM (%si / %no)	16 / 68	21 / 63	0,457

F: femenino M: masculino DM: antecedentes de diabetes mellitus HTA: antecedentes de hipertensión arterial ISQM: antecedentes de evento isquémico *p*: probabilidad obtenida en cada uno de los test de comparación de proporciones

La variable edad (tabla 8), para las dos poblaciones, se distribuyó normalmente por lo que en la tabla se muestra la media y el intervalo de confianza del 95%. Por el contrario, el resto de variables no siguió una distribución normal, por lo que se muestra la mediana y el rango. Para las variables cualitativas (tabla 9), los resultados se expresan como el porcentaje de pacientes en cada grupo de clasificación. Debido a la falta de datos para alguno de los participantes en el estudio, en alguno de los casos los porcentajes no suman en total el 100%.

Se estudió la existencia de diferencias entre las dos subpoblaciones para todas las variables y se encontraron diferencias en el caso de la edad, el hábito tabáquico y la presencia de HTA. Además, en el caso del noHDL se rozó la significación estadística.

A la vista de estos datos se puede concluir que la población NO NAIF está constituida por pacientes algo más mayores, lo cual es compatible con que lleven un tiempo más o menos prolongado en tratamiento, y que presentan menor hábito tabáquico (probablemente por presión facultativa). Sin embargo, los datos del perfil lipídico no son más favorables pese al tiempo de tratamiento previo, lo cual indica su falta de efectividad. Además, es un grupo de pacientes con mayor proporción de hipertensos.

Equilibrio de Hardy-Weinberg

En este estudio se analizaron los siguientes SNPs de los genes:

- *APOE (APOE2) (rs7412) NM_000041.2:c.526C>T*
- *APOE (APOE4) (rs429358) NM_000041.2:c.388T>C*
- *SLCO1B1 (rs4149056) NM_006446.4:c.521T>C*
- *CYP3A4 (rs2740574) NM_017460.5:c.-392G>A*
- *HMGCR (rs3846662) NM_001130996.1:c.1564-106A>G*
- *LPA (rs10455872) NM_005577.2:c.3947+467T>C*

En la tabla 10 se muestran las frecuencias genotípicas obtenidas y la p correspondiente a la prueba del cumplimiento del equilibrio de Hardy-Weinberg para las dos poblaciones. Se considera que la población está en equilibrio si $p > 0,05$.

Tabla 10: Frecuencias genotípicas de las variantes estudiadas en las poblaciones NAIF y NO NAIF.

Variantes	NAIF				NO NAIF			
	HN	HT	HM	p	HN	HT	HM	p
APOE2 c.526C>T	95	4	1	0,007	53	4	0	0,963
APOE4 c.388T>C	76	24	0	0,394	44	10	3	0,119
SLCO1B1 c.521T>C	68	29	3	0,999	40	17	0	0,416
CYP3A4 c.-392G>A	95	4	1	0,007	52	5	0	0,947
CYP3A4 (s/a) c.-392G>A	67	1	1	<0,01	37	4	0	0,943
HMGCR c.1564-106A>G	27	53	20	0,808	19	30	7	0,654
LPA c.3947+467T>C	77	20	3	0,511	43	14	0	0,572

HN: homocigotos normales HT: heterocigotos HM: homocigotos mutados p: p del equilibrio de Hardy-Weinberg (s/a): subgrupo de pacientes tratados con simvastatina o atorvastatina

En el caso de CYP3A4 c.-392G>A, en la tabla 10 se presenta la distribución y la p para toda la población, pero también para el subgrupo formado por los pacientes tratados con simvastatina o atorvastatina (s/a). Esto se debe a que, de todas las estatinas incluidas en este trabajo, únicamente estas dos son metabolizadas por CYP3A4, y la influencia de la variante de este gen sólo se estudiará en este subgrupo. Todas las distribuciones de frecuencias se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg excepto en el caso de CYP3A4 c.-392G>A y APOE2 c.526C>T en el grupo de los NAIF. Este hecho parece deberse a un sesgo debido al azar ya que no hay ningún criterio en la selección de los pacientes que lo justifique.

Para este estudio se decidió agrupar a los participantes como portadores o no portadores de la variante para cada uno de los seis casos. Como se puede observar, el número de homocigotos mutados para las variantes APOE2 c.526C>T, APOE4 c.388T>C, SLCO1B1 c.521T>C, CYP3A4 c.-392G>A y LPA c.3947+467T>C es muy bajo o incluso nulo, tanto para la población NAIF como para la NO NAIF. Por lo tanto, en estos 5 casos el criterio de agrupación en portadores y no portadores de la variante fue un criterio matemático. En el caso de la variante HMGCR c.1564-106A>G, en el que había mayor número de pacientes con cada uno de los tres genotipos, se estudió el cambio de los indicadores para el CT en cada uno de los tres grupos, homocigotos no portadores (HN), heterocigotos (HT) y homocigotos portadores (HM), para las dos poblaciones. Se agruparon también en portadores y no portadores, esta vez por criterio fisiológico (datos en Anexo 1). Se agruparon los pacientes heterocigotos con los homocigotos mutados, formando el grupo de portadores de la variante. Una vez creados los grupos, se realizó un estudio para eliminar posibles valores aberrantes

empleando el test estadístico de Grubbs. Se estudiaron los datos relativos al %C y %CM de CT y noHDL, pero no se encontró ningún valor aberrante.

4.2 Estudio con pacientes NAIF

Como una aproximación estadística inicial, antes de realizar los modelos de regresión, se estudiaron las diferencias entre los portadores y no portadores de las seis variantes genéticas para las siguientes variables no genéticas: edad, dosis media diaria de estatina (D), cambio en el índice de masa corporal (%IMC), cambio de horas de ejercicio practicadas por semana (Δ He) y cambio en el consumo de gramos de alcohol diarios (Δ A). No se estudió el cambio en el hábito tabáquico, ya que el número de pacientes en los que se produjo el cambio fue muy bajo, lo que no permitía la comparación entre grupos.

Respecto a la comparación de la edad, el %IMC y el Δ A entre portadores y no portadores de las seis variantes, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los casos. Respecto a la D, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre portadores y no portadores de APOE4 c.388T>C ($p=0,01$) y rozó la significación estadística para LPA c.3947+467T>C ($p=0,09$). Se encontraron también diferencias entre los portadores y no portadores de la variante HMGCR c.1564-106A>G para el Δ He ($p=0,03$) (datos no mostrados).

Las tablas 11 y 12 muestran el estudio de comparación de los indicadores cuantitativos (%C y %CM para CT y noHDL) entre portadores y no portadores de las seis variantes. En las tablas se exponen las medias e intervalos de confianza del 95% para aquellas variables que se distribuyeron normalmente, y las medianas y rangos para las que no. También se muestran las p de los test estadísticos aplicados en cada caso para las comparaciones entre grupos, y en negrita figuran aquellas que resultaron estadísticamente significativas.

Para los portadores de la variante del gen *CYP3A4*, ya que sólo son dos pacientes, en la tabla se muestran los dos datos. En el caso del %CM de noHDL únicamente se muestra el dato de uno de ellos, porque para el otro no se dispuso de los valores de HDL, por lo que no se pudo calcular el noHDL.

Tabla 11: Comparación del %C y %CM de CT y noHDL entre portadores y no portadores de las variantes de los genes *APOE* y *SLCO1B1*.

	APOE2 c.526C>T			APOE4 c.388T>C			SLCO1B1 c.521T>C		
	NP (n=95)	P (n=5)	<i>p</i>	NP (n=77)	P (n=23)	<i>p</i>	NP (n=68)	P (n=32)	<i>p</i>
%C CT	-23,8 (-63,6; 19,3)	-24,5 (-40,5;-17,6)	0,524	-23,8 (-27,5;-20,2)*	-21,1 (-27,8;-14,3)*	0,585	-23,2 (-27,1;-19,4)*	-23,1 (-28,6;-17,6)*	0,914
%CM CT	-13,6 (-31,8;33,4)	-12,3 (-27,0;4,1)	0,905	-13,3 (-19,6;3-7,0)*	-13,4 (-20,0;-6,9)*	0,874	-13,9 (-17,8;-10,0)*	-11,8 (-20,6;-3,0)*	0,321
%C noHDL	-28,6 (-70,5;27,3)	-28,6 (-37,3;23,4)	0,554	-28,7 (-33,5;-24,0)*	-27,3 (-35,7;-18,8)*	0,955	-28,0 (-32,9;-23,1)*	-29,2 (-36,6;-21,8)*	0,845
%CM noHDL	-18,6 (-46,9;29,8)	-23,7 (-33,1;4,9)	0,595	-16,4 (-23,0;-8,9)*	-16,9 (-26,8;-6,9)*	0,803	-18,0 (-23,5;-12,5)*	-16,5 (-27,4;-5,7)*	0,638

*media e IC95%. NP: No portadores P: portadores. *p*: probabilidad obtenida en los test estadísticos %C: porcentaje de cambio según la concentración final %CM: porcentaje de cambio según la concentración media CT: colesterol total noHDL: colesterol noHDL

Tabla 12: Comparación del %C y %CM de CT y noHDL entre portadores y no portadores de las variantes de los genes *CYP3A4*, *HMGCR* y *LPA*.

	CYP3A4 c.-392G>A (s/a)			HMGCR c.1564-106A>G			LPA c.3947+467T>C		
	NP (n=67)	P (n=2)	<i>P</i>	NP (n=67)	P (n=2)	<i>P</i>	NP (n=67)	P (n=2)	<i>P</i>
%C CT	-23,6 (-27,6;-19,7)*	-44,8 y -20,7	0,512	-28,3 (-33,5;-23,1)*	-21,6 (-25,5;-17,7)*	0,098	-23,1 (-27,0;-19,2)*	-20,9 (-26,9;-15,0)*	0,752
%CM CT	-13,6 (-31,8;33,4)	-22,4 y -9,5	0,767	-17,3 (-22,7;-11,8)*	-11,7 (-16,4;-7,0)*	0,011	-12,7 (-17,3;-8,2)*	-14,8 (-21,3;-8,3)*	0,386
%C noHDL	-29,3 (-34,4;-24,2)*	-53,4 y -29,0	0,397	-34,9 (-41,7;-28,1)*	-26,4 (-31,5;-21,3)*	0,097	-27,3 (-32,4;-22,3)*	-29,9 (-37,9;-22,0)*	0,380
%CM noHDL	-17,3 (-38,2;29,8)	-26,7	-	-22,0 (-29,8;-14,2)*	-15,9 (-22,2;-9,7)*	0,039	-17,4 (-23,4;-11,4)*	-18,0 (-27,9;-8,1)*	0,869

*media e IC95%. NP: No portadores P: portadores. *p*: probabilidad obtenida en los test estadísticos (s/a): subpoblación tratada con simvastatina o atorvastatina. %C: porcentaje de cambio según la concentración final %CM: porcentaje de cambio según la concentración media CT: colesterol total noHDL: colesterol noHDL

Se puede observar que en todos los casos el tratamiento es efectivo ya que el porcentaje de cambio medio es siempre negativo, lo que implica un descenso de las concentraciones de lípidos. Hay que mencionar que sí existen algunos casos (datos no mostrados) en los que no disminuyeron las concentraciones de CT y noHDL, sino que estas magnitudes aumentaron, concretamente esto ocurrió en 5 pacientes.

Para los indicadores %C de CT y de noHDL las diferencias entre los portadores y no portadores de la variante HMGCR c.1564-106A>G resultaron cercanas a la significación estadística ($p=0,098$ y $p=0,097$). En ambos casos se observa que los portadores de la variante presentan menores reducciones de %C. Para el %CM de CT y de noHDL las diferencias entre portadores y no portadores de esta variante sí alcanzaron la significación estadística ($p=0,011$ y $p=0,039$).

4.2.1 Matriz de correlación entre las variables de control

Antes de incluir simultáneamente una serie de variables de control en un modelo de regresión múltiple, es conveniente asegurarse de que no existe una fuerte correlación entre ellas, por este motivo, se realizó un estudio de correlación entre todas las variables no genéticas. La tabla 13 muestra las p del test de Spearman para cada correlación entre variables. En el caso de que la p resultase significativa, el valor de ρ obtenido se muestra entre paréntesis, y ambos valores en negrita.

Tabla 13: Correlaciones entre variables de control.

Edad	Edad									
Sexo	0,019 (0,242)	Sexo								
D	0,109	0,789	D							
%IMC	0,125	0,416	0,389	%IMC						
ΔT	0,722	1,000	0,426	0,147	ΔT					
ΔHe	0,188	0,652	0,795	0,231	0,856	ΔHe				
ΔA	0,393	0,249	0,943	0,038 (0,380)	0,203	0,818	ΔA			
DM	0,217	0,707	0,647	0,441	0,031 (0,251)	0,992	0,981	DM		
HTA	0,001 (0,351)	0,692	0,877	0,805	1,000	0,191	0,991	0,120	HTA	
ISQM	0,197	0,379	0,007 (0,294)	0,717	0,034 (0,268)	0,622	0,486	<0,001 (0,570)	0,623	ISQM

D: dosis media diaria de estatina %IMC: porcentaje de cambio en el índice de masa corporal ΔT : cambio en el hábito tabáquico ΔHe : cambio en el ejercicio físico ΔA : cambio hábito enólico DM: antecedentes de diabetes mellitus HTA: antecedentes de hipertensión arterial ISQM: evento isquémico previo

La única correlación de grado medio fue la existente entre DM-ISQM, cuya ρ fue de 0,570. La variable ISQM (presencia de evento isquémico previo al estudio) se correlacionó con tres variables y presentó además la correlación más fuerte con la variable DM. Por esta razón se decidió no introducirla en los posteriores modelos del estudio.

4.2.2 Desarrollo de modelos estadísticos para el porcentaje de cambio del colesterol total según la concentración final

Construcción del modelo explicativo basal

Se estudió la influencia de cada variable de control cuantitativa sobre %C para CT, mediante regresiones lineales simples. La tabla 14 muestra la p , el coeficiente B con su intervalo de confianza del 95% y la R^2 obtenidas en cada caso. La R^2 se interpreta como la variación de Y que es explicada por la variable X, y el coeficiente de regresión B representa la variación de Y cuando se produce un cambio de una unidad de X. Por ejemplo el cambio de CT según la concentración final que se produce por cada año que aumente la variable edad. En la misma tabla, para el caso de las variables cualitativas sexo, DM y HTA, se muestra la p del test de comparación de medias de %C de CT entre grupos. En negrita se muestran aquellas variables X con una p estadísticamente significativa en la regresión univariante o en la t de Student.

Tabla 14: Estudio de influencia de las variables de control sobre el porcentaje de cambio de CT según la concentración final. Regresiones lineales para las variables cuantitativas y comparación de medias para las cualitativas.

Variables X (unidades)	B (IC 95%)	R^2	p
Edad (años)	0,105 (-0,201;0,411)	0,005	0,497
D (mg)	-0,243 (-0,338;-0,148)	0,209	<0,001
%IMC (kg/m ²)	0,030 (-0,175;0,235)	0,003	0,766
ΔHe (horas/semana)	-1,477 (-2,653;-0,302)	0,094	0,015
ΔA (gr/día)	-0,248 (-0,770;0,274)	0,015	0,346
Sexo (M/F)			0,526
DM (SI/NO)			0,770
HTA (SI/NO)			0,519

B (IC 95%): coeficiente B con el intervalo de confianza del 95%. R^2 : coeficiente de determinación. p : probabilidad asociada a los test estadísticos D: dosis media diaria de estatina %IMC: porcentaje de cambio en el índice de masa corporal ΔHe: cambio en el ejercicio físico ΔA: cambio hábito enólico M: masculino F: femenino DM: diabetes mellitus HTA: hipertensión arterial

En primer lugar hay que remarcar que en este estudio todos los modelos realizados son explicativos, y no predictivos.

La influencia de la dosis sobre %C de CT resultó estadísticamente significativa y explicaba un 20,9% de la variación de %C de CT. Por otra parte, el Δ He explica un 9,4% del cambio de %C de CT. Para ninguna de las comparaciones de variables cualitativas se alcanzó el nivel de significación estadística, por lo que no fueron seleccionadas para incluirlas en el modelo basal.

A continuación se incluyeron todas las variables de control seleccionadas por presentar una $p < 0,05$, en un modelo de regresión múltiple de tipo stepwise, al que se le denomina modelo basal. La tabla 15 muestra los resultados obtenidos en este modelo, el valor de p y el coeficiente de regresión B con su intervalo de confianza del 95%.

Tabla 15: Modelo basal formado con las variables seleccionadas

Variables x (unidades)	B (IC 95%)	p
Constante	-14,306 (-19,552;-9,059)	<0,001
D (mg)	-0,238 (-0,353; -0,122)	<0,001
ΔHe (horas/semana)	-1,416 (-2,453;-0,380)	0,008

B (IC 95%): coeficiente B con el intervalo de confianza del 95% p : probabilidad asociada a los test estadísticos D: dosis media diaria de estatina Δ He: cambio en el ejercicio físico

La R^2 ajustada por el número de variables del modelo basal fue de 0,271. Por tanto, este modelo explicaba el 27,1% de la variación del CT según la concentración final.

El coeficiente B de la variable D de -0,238 indica que por cada mg que aumenta la dosis disminuyen las concentraciones de CT según el punto final un 0,238%. Por ejemplo, para una dosis de estatina equivalente a 40 mg de simvastatina, la reducción del CT sería de un 9,52%. Por otra parte, el coeficiente B de Δ He de -1,416 indica que por cada hora que aumenta el ejercicio practicado semanalmente la disminución de %C de CT es de un 1,416%. A partir de estos datos se podría realizar una aproximación teórica: el aumento de la práctica de ejercicio en 6,7 horas por semana equivaldría al efecto que tiene una dosis de 40 mg de estatina, sin tener en cuenta que el efecto del fármaco es mucho más rápido

Estudio de la posible influencia de las variantes genéticas sobre el modelo explicativo basal e inclusión en el modelo final

La única variante que se seleccionó para incluir en el modelo basal (tablas 11 y 12) fue la del gen *HMGCR*, porque presentó una p de comparación entre ambos grupos cercana a la significación ($p=0,098$). Se incluyó en el modelo explicativo basal con las variables de control, mediante un modelo también de tipo stepwise para dar lugar al modelo final. Los datos obtenidos se muestran en la tabla 16.

Tabla 16: Modelo final formado por las variables de control y la variante genética seleccionada

Variables (unidades)	B (IC 95%)	p
Constante	-23,766 (-31,490;-16,041)	<0,001
D (mg)	-0,232 (-0,339;-0,124)	<0,001
ΔHe (horas/semana)	-1,656 (-2,635;-0,677)	0,001
HMGCR c.1564-106A>G	12,511 (4,606; 20,416)	0,002

B (IC 95%): coeficiente B con el intervalo de confianza del 95% p : probabilidad asociada a los test estadísticos D: dosis media diaria de estatina Δ He: cambio en el ejercicio físico

La R^2 de este modelo fue de 0,366, lo cual implica que la inclusión de la variante HMGCR c.1564-106A>G en el modelo basal permitió aumentar un **9,5%** su capacidad de explicación del porcentaje de cambio de CT respecto a la concentración final. Además la variante alcanzó el nivel de significación estadística en el modelo de regresión múltiple. Estos datos confirman lo observado en la tabla 12: que la presencia de la variante de HMGCR c.1564-106A>G tiene una notable implicación en porcentaje de cambio del CT y que su presencia no resulta beneficiosa.

En este modelo final, la D presentó un coeficiente B de -0,232. Esto quiere decir que para una dosis equivalente a 40 mg de simvastatina, el porcentaje de reducción del CT atribuido a la dosis representa un 9,3%. En cambio, el hecho de que se encuentre presente la variante HMGCR c.1564-106A>G supone un 12% menos de descenso, lo cual teóricamente podría contrarrestar el efecto de esta dosis. Esto muestra que aunque el porcentaje de explicación atribuible a la variante genética pueda parecer modesto, su importancia es considerable en relación a otros factores.

4.2.3 Desarrollo de modelos estadísticos para el porcentaje de cambio del colesterol total según la concentración media.

A continuación se realizó el mismo estudio secuencial para el indicador %CM, cambio según la concentración media estimada diaria.

Construcción del modelo explicativo basal

Igual que en el caso anterior, en primer lugar se estudiaron las influencias de las variables de control sobre el indicador %CM mediante regresiones lineales simples o comparaciones entre grupos (tabla 17).

Tabla 17: Estudio de influencia de las variables de control sobre el porcentaje de cambio de CT según la concentración media. Regresiones lineales para las variables cuantitativas y comparación de medias para las cualitativas.

VARIABLES X (UNIDADES)	B (IC 95%)	R ²	p
Edad (años)	-0,105 (-0,292;0,082)	0,003	0,267
D (mg)	-0,121 (-0,182;-0,060)	0,128	<0,001
%IMC (kg/m ²)	-0,029 (-0,143;0,085)	0,008	0,612
ΔHe (horas/semana)	-0,300 (-1,068;0,468)	0,010	0,610
ΔA (gr/día)	-0,003 (-0,302;0,296)	<0,001	0,982
Sexo (M/F)			0,163
DM (SI/NO)			0,496
HTA (SI/NO)			0,902

B (IC 95%): coeficiente B con el intervalo de confianza del 95%. p: probabilidad obtenida en los test estadísticos R²: coeficiente de determinación. D: dosis media diaria de estatina %IMC: porcentaje de cambio en el índice de masa corporal ΔHe: cambio en el ejercicio físico ΔA: cambio hábito enólico M: masculino F: femenino DM: diabetes mellitus HTA: hipertensión arterial

La D presentó, al igual que en el caso de %C de CT, cierta influencia sobre el %CM de CT suponiendo una explicación de un 12,8%. En este caso, por cada mg que aumenta la dosis, la concentración media de CT disminuye un 0,121%.

Ya que únicamente fue seleccionada una variable, no se construyó el modelo explicativo basal, sino que se decidió construir directamente el modelo final junto a la

variante genética que resultase seleccionada. El hecho de emplear un modelo de tipo stepwise en el que se incluyen las variables que sean significativas de una en una, permite valorar la aportación de la variante a la explicación debida a la dosis.

Estudio de la posible influencia de las variantes genéticas sobre el modelo explicativo basal e inclusión en el modelo final

Los datos de comparación entre grupos de portadores y no portadores se muestran en las tablas 11 y 12. La única variante que podría resultar influyente en el %CM de CT fue HMGCR 1564-106A>G con una p de 0,011, por lo que se creó el modelo final con dicha variante.

Tabla 18: Modelo final formado por las variables de control y la variante genética seleccionada

Variabes (unidades)	B (IC 95%)	p
Constante	-12,569 (-16,451;-8,686)	<0,001
D (mg)	-0,123 (-0,182; -0,065)	<0,001
HMGCR c.1564-106A>G	5,703 (1,821; 9,586)	0,004

B (IC 95%): coeficiente B con el intervalo de confianza del 95% p : probabilidad obtenida en los test estadísticos D: dosis media diaria de estatina

La explicación de este modelo final fue de un 19%, y en el primer paso del desarrollo del modelo stepwise la inclusión únicamente de la variable D suponía una explicación de un 12,8%. Por lo tanto, la adición de la variante de HMGCR c.1564-106A>G aportaba un **6,2%** adicional. Igual que en el caso del %C, la presencia de la variante es perjudicial, ya que implicará un menor descenso de las concentraciones de CT.

A través de los datos de la tabla 18 se puede comprobar que, igual que ocurría para el indicador %C, la presencia de esta variante, aunque parezca de influencia moderada, podría teóricamente contrarrestar el efecto de una dosis de estatina equivalente a 40 mg diarios de simvastatina. El coeficiente B de la dosis en el modelo final fue de -0,123, por lo tanto una dosis de 40 mg diarios supondría un descenso de la concentración de CT de un 4,92%, y la sola presencia de la variante supone un “no descenso” del CT de 5,703 %.

4.2.4 Desarrollo de modelos estadísticos para el porcentaje de cambio del colesterol noHDL según la concentración final.

Construcción del modelo explicativo basal

Para noHDL se siguió el mismo esquema de trabajo que para el CT, estudiando en primer lugar las influencias individuales de las variables de control sobre el indicador, y posteriormente se construyó el modelo basal.

Tabla 19: Estudio de influencia de las variables de control sobre el porcentaje de cambio de noHDL según la concentración final. Regresiones lineales para las variables cuantitativas y comparación de medias para las cualitativas.

Variables X (unidades)	B (IC 95%)	R²	p
Edad (años)	-0,072 (-0,485;0,340)	0,001	0,728
D (mg)	-0,273 (-0,398;-0,149)	0,175	<0,001
%IMC (kg/m²)	-0,020 (-0,324;0,283)	0,001	0,893
ΔHe (horas/semana)	-1,467 (-3,018;0,084)	0,059	0,063
ΔA (gr/día)	-0,127 (-0,815;0,560)	0,002	0,712
Sexo (M/F)			0,497
DM (SI/NO)			0,871
HTA (SI/NO)			0,794

B (IC 95%): coeficiente B con el intervalo de confianza del 95%. R²: coeficiente de determinación. p: probabilidad obtenida en los test estadísticos D: dosis media diaria de estatina %IMC: porcentaje de cambio en el índice de masa corporal ΔHe: cambio en el ejercicio físico ΔA: cambio hábito enólico M: masculino F: femenino DM: diabetes mellitus HTA: hipertensión arterial

Las variables que resultaron influyentes en las regresiones univariantes fueron la D y el ΔHe, las mismas que para el caso de %C de CT. La dosis explica un 17,5% del %C del noHDL, comparable al 20,2% que explicaba en el caso de CT, y por cada mg que aumenta la dosis las concentraciones de noHDL según la concentración final disminuyen un 0,273%. Estos datos corroboran los obtenidos para el CT: la influencia de la dosis en el descenso de los lípidos, y que aproximadamente se produce un 0,3% de descenso de estas magnitudes por cada mg que aumenta la dosis.

El Δ He explican un 5,9% del %C del noHDL. El coeficiente B de -1,467 indica que por cada hora que aumenta el ejercicio practicado semanalmente el %C del noHDL disminuye un 1,467%, datos también muy similares a los obtenidos para CT.

La tabla 20 muestra los datos del modelo explicativo basal construido con las variables D y Δ He.

Tabla 20: Modelo basal formado con las variables seleccionadas

Variables x (unidades)	B (IC 95%)	p
Constante	-17,191 (-24,309;-10,072)	<0,001
D (mg)	-0,286 (-0,439; -0,133)	<0,001
ΔHe (horas/semana)	-1,404 (-2,804;-0,003)	0,050

B (IC 95%): coeficiente B con el intervalo de confianza del 95% p: probabilidad obtenida en los test estadísticos D: dosis media diaria de estatina Δ He: cambio en el ejercicio físico

Ambas variables continuaron siendo significativas en el modelo múltiple, el cual explicaba el 22,2% del porcentaje de cambio del colesterol noHDL respecto a la concentración final (R^2 ajustada por número de variables = 0,222).

Estudio de la posible influencia de las variantes genéticas sobre el modelo explicativo basal e inclusión en el modelo final

Como se puede observar en las tablas del estudio inicial (tablas 11 y 12), la única variante que resultó influyente sobre el %C noHDL, con una p asociada al test de t de Student cercana al valor de significación, fue la del gen *HMGCR* ($p=0,097$). A continuación se añadió al modelo explicativo basal la variante genética *HMGCR* c.1564-106A>G, para valorar su aportación al mismo.

Tabla 21: Modelo final formado por las variables de control y la variante genética seleccionada

Variables (unidades)	B (IC 95%)	p
Constante	-28,518 (-39,083;-17,954)	<0,001
D (mg)	-0,283 (-0,428; -0,138)	<0,001
Δ He (horas/semana)	-1,666 (4,249;26,009)	0,016
HMGCR c.1564-106A>G	15,129 (4,249; 26,009)	0,007

B (IC 95%): coeficiente B con el intervalo de confianza del 95% p: probabilidad obtenida en los test estadísticos D: dosis media diaria de estatina Δ He: cambio en el ejercicio físico

Este modelo presentó una R^2 de 0,304, por lo que la presencia de la variante genética HGMCR c.1564-106A>G aportó un **8,2%** adicional. Además la variante alcanzó el nivel de significación dentro del modelo.

4.2.5 Desarrollo de modelos estadísticos para el porcentaje de cambio de colesterol noHDL según la concentración media.

Construcción del modelo explicativo basal

La tabla 22 muestra los datos del estudio de la influencia de cada una de las variables de control sobre el indicador mediante regresiones simples o comparación de medias.

Tabla 22: Estudio de influencia de las variables de control sobre el porcentaje de cambio de noHDL según la concentración media. Regresiones lineales para las variables cuantitativas y comparación de medias para las cualitativas

Variabes X (unidades)	B (IC 95%)	R²	p
Edad (años)	-0,122 (-0,374;0,130)	0,011	0,338
D (mg)	-0,139 (-0,221;-0,058)	0,111	0,001
%IMC (kg/m²)	-0,100 (-0,256;0,057)	0,048	0,205
ΔHe (horas/semana)	-0,544 (-1,580;0,492)	0,019	0,297
ΔA (gr/día)	-0,134 (-0,537;0,269)	0,008	0,510
Sexo (M/F)			0,116
DM (SI/NO)			0,343
HTA (SI/NO)			0,870

B (IC 95%): coeficiente B con el intervalo de confianza del 95%. R²: coeficiente de determinación. p: probabilidad obtenida en los test estadísticos D: dosis media diaria de estatina %IMC: porcentaje de cambio en el índice de masa corporal ΔHe: cambio en el ejercicio físico ΔA: cambio hábito enólico M: masculino F: femenino DM: diabetes mellitus HTA: hipertensión arterial

En todos los casos, %C y %CM para CT y noHDL, la variable dosis fue influyente en las regresiones lineales simples, y además el cambio en la práctica de ejercicio físico también lo fue para las dos magnitudes para %C. Se puede concluir que las variables que formaron los modelos basales para %C y %CM son reproducibles para ambas magnitudes lipídicas.

Igual que para el caso de %CM CT, no se construyó modelo basal inicial ya que únicamente la variable D resultó seleccionada.

Estudio de la posible influencia de las variantes genéticas sobre el modelo explicativo basal e inclusión en el modelo final

Igual que en los casos anteriores, la variante más influyente sobre el indicador resultó ser HMGCR c.1564-106A>G ($p=0,039$). Se estudió la adición de esta variante al modelo final junto a la D.

Tabla 23: Modelo final formado por las variables de control y la variante genética seleccionada

Variables (unidades)	B (IC 95%)	p
Constante	-16,857 (-22,136;-11,578)	<0,001
D (mg)	-0,145 (-0,225; -0,066)	<0,001
HMGCR c.1564-106A>G	6,573 (1,197; 11,950)	0,017

B (IC 95%): coeficiente B con el intervalo de confianza del 95% p: probabilidad obtenida en los test estadísticos D: dosis media diaria de estatina Δ He: cambio en el ejercicio físico

El modelo junto con la dosis y la variante explicaba un 14,6% del indicador, y el modelo en el primer paso en que únicamente se incluía la D, un 10,1%. Por lo tanto, en este caso la aportación de la variante representó un 3,5% adicional y el valor de p alcanzó la significación estadística ($p=0,017$).

4.2.6 Resumen de los resultados obtenidos para el porcentaje de cambio según la concentración final y según la concentración media para el colesterol total y el colesterol noHDL.

La siguiente tabla resume los datos obtenidos con los modelos estadísticos desarrollados para %C y %CM de CT y noHDL.

Para cada caso, se muestra la R^2 del modelo explicativo basal, la R^2 del modelo creado con las variables del modelo basal y la variante genética HMGCR c.1564-106A>G, y el porcentaje de explicación que aporta la variante genética al modelo basal.

Tabla 24: Resumen del porcentaje de explicación del modelo basal, el modelo final y la aportación de la variante genética sobre cada uno de los indicadores.

Respuesta (Y)	R ² modelo basal (%)	R ² modelo basal + HMGCR c.1564- 106A>G (%)	Aportación de la variable genética (%)
%C CT	27,1	36,6	9,5
%CM CT	12,8	19,0	6,2
%C noHDL	22,2	30,4	8,2
%CM noHDL	14,6	10,1	3,5

%C: porcentaje de cambio según la concentración final %CM: porcentaje de cambio según la concentración media CT: colesterol total noHDL: colesterol noHDL

En todos los casos, los portadores de la variante presentaron menores reducciones de CT y noHDL que los no portadores, por lo que parece que la presencia de la variante resulta perjudicial para el descenso de las magnitudes lipídicas (ver datos de la tabla 12). Además, a partir de los datos de la tabla 12 también se puede concluir que las reducciones del noHDL son mayores que las del CT, tanto si se evalúa el indicador %C como el indicador %CM.

4.2.7 Estudio sobre la consecución de objetivos terapéuticos para el colesterol total.

Además de la valoración de la eficacia del tratamiento mediante los indicadores %C y %CM, también se ha estudiado la influencia de las variantes genéticas sobre la consecución de los objetivos terapéuticos de CT y noHDL. Este indicador da una visión más sencilla de interpretar, y podría ser más práctica para el clínico.

Se consideró que se habían alcanzado los objetivos terapéuticos si en la última visita a la UFRV la concentración sérica de CT era igual o inferior a 5,2 mmol/L, y para noHDL si su concentración sérica en la última visita era igual o inferior a 4,2 mmol/L.

En primer lugar, para hacer una primera aproximación, para cada variante genética se estudió cuántos no portadores y portadores (heterocigotos y homocigotos) alcanzaron los objetivos terapéuticos, tanto para CT como para noHDL. La tabla 25 muestra los pacientes en cada grupo.

Tabla 25: Número de portadores y no portadores de cada variante que alcanzaron o no el objetivo terapéutico para el CT y el noHDL.

		CT		noHDL	
		SI	NO	SI	NO
APOE2	NP	41	53	49	40
c.526C>T	P	4	1	4	1
APOE4	NP	33	43	41	32
c.388T>C	P	12	11	12	9
SLCO1B1	NP	33	35	37	28
c.521T>C	P	13	19	17	13
CYP3A4	NP	31	36	35	28
c.-392G>A	P	1	1	1	1
HMGCR	NP	16	11	17	11
c.1564-106A>G	P	30	43	37	30
LPA	NP	34	43	40	33
c.3947+467T>C	P	12	11	14	6

NP: no portadores de la variante P: portadores de la variantes SI: número de pacientes que alcanzaron el objetivo terapéutico NO: número de pacientes que no alcanzaron el objetivo terapéutico

En el caso del CT, a la vista de los resultados de esta tabla inicial parece que los portadores de la variante APOE2 c.526C>T alcanzaron en mayor proporción los objetivos de CT que los no portadores. En cambio, para la variante HMGCR c.1564-106A>G parece que los no portadores alcanzaron en mayor proporción los objetivos, y para el resto de las variantes genéticas no parece que existan diferencias. Por lo tanto, como primera aproximación, se intuye que la presencia de la variante APOE2 c.526C>T podría suponer un beneficio para el grado de consecución del objetivo de CT, y lo contrario ocurre para HMGCR c.1564-106A>G.

Para estudiar la influencia de las variantes genéticas sobre el grado de consecución de los objetivos terapéuticos se desarrollaron modelos estadísticos secuenciales similares a los realizados para %C y %CM. En este caso, la variable Y es cualitativa dicotómica (consecución del objetivo vs no consecución del objetivo), por lo que se emplearon modelos de regresión logística.

Construcción del modelo explicativo basal

Se estudió la influencia de las variables edad, dosis media diaria de estatina (D), concentración inicial de CT (CTi), cambio del índice de masa corporal (%IMC), cambio

en el número de horas de práctica de ejercicio semanales (ΔH_e) y cambio en el número de gramos de alcohol que se consumen al día (ΔA) sobre el grado de consecución del objetivo terapéutico de CT mediante modelos de regresión logística simple. En el caso de las variables cualitativas (sexo, DM y HTA) se compararon las distribuciones entre los grupos de portadores y no portadores mediante test de chi cuadrado.

Todas aquellas variables cuya p fuese inferior o igual a 0,100 fueron seleccionadas para construir un modelo de regresión logística múltiple, llamado modelo explicativo basal.

La tabla 26 muestra los valores p , R^2 de Cox-Snell y la odds ratio (OR) con su intervalo de confianza del 95% para cada una de las regresiones logísticas simples, y la p del test de comparación de proporciones para las variables cualitativas.

La OR corresponde al riesgo de obtener el efecto estudiado para un determinado valor de X respecto al valor disminuido en una unidad ($X-1$). En nuestro caso, pese a la connotación negativa de la palabra, el “riesgo” representa la probabilidad de alcanzar el objetivo terapéutico. Por ejemplo, la probabilidad de alcanzar el objetivo terapéutico de CT para una determinada edad (40 años) respecto a la probabilidad de alcanzarlo teniendo un año menos (39 años). Para las variables cualitativas representa la probabilidad de alcanzar el objetivo para los individuos que presentan una condición, por ejemplo antecedentes de DM, respecto a los que no la presentan.

Una OR superior a 1 indica que la probabilidad de que ocurra el efecto es mayor según aumenta el valor de la variable X , por ejemplo la edad, y, al contrario, una OR inferior a 1 indica que la probabilidad de que ocurra el efecto disminuye. Por último, una OR de 1 se interpreta como que la posibilidad de que ocurra el evento es la misma cuando varía la variable X .

Tabla 26: Estudio de influencia de las variables de control sobre la consecución de objetivos terapéuticos de CT. Regresiones logísticas para las variables cuantitativas y comparación de proporciones para las cualitativas.

VARIABLES X (variables)	OR (IC 95%)	R ²	p
Edad (años)	1,013 (0,975;1,052)	0,05	0,515
CTi (mmol/L)	0,582 (0,399;0,848)	0,091	0,005
D (mg)	1,009 (0,995;1,023)	0,016	0,217
%IMC (kg/m ²)	0,886 (0,704;1,114)	0,152	0,299
ΔHe (horas/semana)	0,932 (0,801;1,084)	0,014	0,361
ΔA (gr/día)	1,039 (0,964;1,121)	0,019	0,315
Sexo (M/F)	0,555 (0,236;1,305)		0,175
DM (SI/NO)	2,314 (0,712;7,525)		0,155
HTA (SI/NO)	1,029 (0,375;2,891)		0,956

OR: odds ratio IC95%: intervalo de confianza del 95% R²: coeficiente de determinación. p: probabilidad obtenida en los test estadísticos CTi: concentración inicial de colesterol total D: dosis media diaria de estatina %IMC: porcentaje de cambio en el índice de masa corporal ΔHe: cambio en el ejercicio físico ΔA: cambio hábito enólico M: masculino F: femenino DM: diabetes mellitus HTA: hipertensión arterial

Ante estos resultados, parece que la probabilidad de alcanzar el objetivo es menor según aumenta la CTi, ya que presentó una OR inferior a 1. De las variables cualitativas, la única que pareció influir sobre la consecución del objetivo terapéutico fue la DM, ya que presentó un valor cercano al predefinido de 0,100. Para la presencia de DM, la OR de 2,314, indicaría que la probabilidad de alcanzar el objetivo era mayor para los pacientes diabéticos. Aunque este efecto pueda resultar inicialmente desconcertante, se puede pensar que se debe a que estos pacientes, ya que conocen su mayor riesgo cardiovascular, también tengan tendencia a cuidarse más, por lo que alcancen más frecuentemente el objetivo. De todas maneras este dato debe interpretarse con cautela ya que en el intervalo de confianza está incluido el 1.

Se incluyeron ambas variables, CTi y DM, en el modelo de regresión logística múltiple en el que las variables eran incluidas de una en una en caso de que alcanzasen el nivel de significación estadístico definido de 0,100.

Únicamente la variable CTi, con una OR de 0,603 e IC95% de 0,413 a 0,881, se incluyó en el modelo ya que presentó una p=0,009. La variable DM quedó excluida porque presentó una p de 0,318.

La R^2 de Cox-Snell del modelo fue de 0,084, por lo que la influencia de este modelo sobre el grado de consecución del objetivo terapéutico para CT puede valorarse en un 8,4%. Se verifica que a mayor concentración de CTi es menos probable que se alcancen los objetivos terapéuticos (OR inferior a 1).

Estudio de la posible influencia de las variantes genéticas sobre el modelo explicativo basal

A continuación se estudió la influencia de cada una de las variables genéticas sobre el alcance del objetivo de CT, y para ello se comparó el número de pacientes que consiguieron el objetivo en los grupos de portadores y no portadores de cada variante mediante un test de chi cuadrado. La tabla 27 muestra los resultados de cada una de ellas.

Tabla 27: Comparación de pacientes que alcanzaron los objetivos terapéuticos de CT entre los portadores y no portadores de cada una de las variantes genéticas.

Variantes genéticas	OR (IC 95%)	p
APOE2 c.526C>T	5,171 (0,557;48,034)	0,111
APOE4 c.388T>C	1,421 (0,558;3,623)	0,460
SLCO1B1 c.521T>C	0,726 (0,310;1,699)	0,459
CYP3A4 c.-392G>A	1,161 (0,070;19,349)	0,917
HMGCR c.1564-106A>G	0,480 (0,195;1,178)	0,106
LPA c.3947+467T>C	1,380 (0,542;3,510)	0,498

OR: odds ratio IC95%: intervalo de confianza del 95% p: probabilidad obtenida en los test estadísticos

La presencia de las variantes APOE2 c.526C>T y HMGCR c.1564-106A>G se acercaron al nivel de significación estadística fijado para este estudio. A partir de estos datos y de las proporciones expuestas en la tabla 25 se deduce que la probabilidad de alcanzar el objetivo si está presente la variante HMGCR c.1564-106A>G es menor que si no está. En cambio, la presencia de la variante APOE2 c.526C>T parece favorecer que se alcancen los objetivos terapéuticos.

Inclusión de las variantes genéticas influyentes en el modelo explicativo final.

A continuación se estudió la aportación de las dos variantes seleccionadas al modelo basal.

-La inclusión de la variante APOE2 c.526C>T no resultó significativa y no se incluyó en el modelo ya que presentó una p asociada de 0,226 en el modelo final. Presentó una OR de 4,848, por lo que en principio, si hubiese resultado significativa, la influencia de la variante sobre la consecución de los objetivos terapéuticos sería beneficiosa.

-Por el contrario la variante HMGCR c.1564-106A>G, sí que entró en el modelo. Los datos del modelo final se muestran en la tabla 28.

Tabla 28: Modelo final con la variable de control seleccionada y la variante genética.

VARIABLES (UNIDADES)	OR (IC 95%)	p
CTi (mmol/L)	0,539 (0,356;0,815)	0,003
HMGCR c.1564-106A>G	0,321 (0,113;0,916)	0,034

OR: odds ratio IC95%: intervalo de confianza del 95% p : probabilidad obtenida en los test estadísticos

La R^2 fue 0,013, por lo que una vez incluida en el modelo basal, la variante HMGCR 1564-106A>G aportó un **4,6%** al modelo basal. Además resultó ser estadísticamente significativa ($p < 0,05$) dentro del modelo. Presentó una OR de 0,321, lo que quiere decir que la probabilidad de alcanzar el objetivo es menor si está presente la variante que si no lo está.

4.2.8 Estudio sobre la consecución de objetivos terapéuticos para el colesterol noHDL.

Construcción del modelo explicativo basal

Se estudió la influencia de las mismas variables de control que para CT, excepto la concentración inicial de CT que se sustituyó por la concentración inicial de noHDL (noHDLi), sobre la consecución del objetivo terapéutico. Se tomó igualmente como nivel de significación $p \leq 0,100$.

Los resultados del estudio de la influencia de cada variable no genética sobre el indicador mediante regresiones logísticas o comparaciones que se exponen en la tabla 29.

Tabla 29: Estudio de influencia de las variables de control sobre la consecución de objetivos terapéuticos de noHDL. Regresiones logísticas para las variables cuantitativas y comparación de proporciones para las cualitativas.

VARIABLES X (UNIDADES)	OR (IC 95%)	R ²	p
Edad (años)	1,024 (0,984;1,066)	0,016	0,239
noHDLi (mmol/L)	0,735 (0,513;1,053)	0,032	0,094
D (mg)	1,009 (0,994;1,024)	0,015	0,255
%IMC (kg/m ²)	0,942 (0,821;1,080)	0,142	0,391
ΔHe (horas/semana)	0,924 (0,791;1,079)	0,017	0,319
ΔA (gr/día)	1,039 (0,965;1,118)	0,019	0,312
Sexo (M/F)	0,796 (0,338;1,875)		0,602
DM (SI/NO)	1,628 (0,452;5,858)		0,453
HTA (SI/NO)	0,714 (0,253;2,013)		0,523

OR: odds ratio IC95%: intervalo de confianza del 95% R²: coeficiente de determinación. p: probabilidad obtenida en los test estadísticos D: dosis media diaria de estatina %IMC: porcentaje de cambio en el índice de masa corporal ΔHe: cambio en el ejercicio físico ΔA: cambio hábito enólico M: masculino F: femenino DM: diabetes mellitus HTA: hipertensión arterial

Únicamente se seleccionó la variable noHDLi para construir el modelo basal, por lo que se decidió no construirlo, sino realizar directamente el modelo final una vez seleccionada la o las variantes genéticas influyentes.

Estudio de la posible influencia de las variantes genéticas sobre el modelo explicativo basal

A continuación se estudió la influencia de cada una de las variantes genéticas sobre el alcance del objetivo de noHDL, mediante comparaciones de chi cuadrado entre grupos.

Tabla 30: Comparación de pacientes que alcanzaron los objetivos terapéuticos de noHDL entre los portadores y no portadores de cada una de las variantes genéticas.

Variantes genéticas	OR (IC 95%)	<i>p</i>
APOE2 c.526C>T	3,265 (0,351;30,390)	0,274
APOE4 c.388T>C	1,041 (0,391;2,773)	0,936
SLCO1B1 c.521T>C	0,990 (0,413;2,370)	0,981
CYP3A4 c.-392G>A	0,800 (0,048;13,368)	0,876
HMGCR c.1564-106A>G	0,563 (0,222;1,427)	0,223
LPA c.3947+467T>C	1,444 (0,540;3,860)	0,463

OR: odds ratio IC95%: intervalo de confianza del 95% *p*: probabilidad obtenida en los test estadísticos

Ninguna de las variantes alcanzó el nivel de significación predefinido, pero se estudió la influencia de APOE2 c.526C>T y HMGCR c.1564-106A>G, por analogía con CT. Se decidió realizar la prueba de construir el modelo basal con las variantes APOE2 c.526C>T y HMGCR c.1564-106A>G, pero tanto el noHDLi como las variantes presentaron valores de *p* en el modelo de alrededor de 0,200, incluso de 0,300 para APOE2 c.526C>T (datos no mostrados).

4.2.9 Resumen de los resultados obtenidos para la consecución de objetivos terapéuticos.

La tabla 31 resume los datos obtenidos en el estudio de la consecución de objetivos. Muestra la R^2 de Cox y Snell del modelo explicativo basal, la variante genética incluida en el modelo, la R^2 de Cox y Snell del modelo creado con la variable del modelo basal y la variante genética, el porcentaje de explicación que aporta la variante al modelo final y la OR de la variante en dicho modelo.

Tabla 31: Resumen del porcentaje de explicación del modelo basal, el modelo final y la aportación de la variante genética sobre la consecución de los objetivos terapéuticos.

Alcance de objetivos (Y)	R^2 modelo basal (%)	R^2 modelo basal + HMGCR c.1564-106A>G (%)	Aportación de la variable genética (%)	OR (IC95%)
CT	8,4	13,0	4,6	0,321 (0,113;0,916)

CT: colesterol total OR: odds ratio IC95%: intervalo de confianza del 95%

4.3 Estudio con pacientes NO NAIF

Para contrastar los resultados obtenidos en el grupo de pacientes NAIF, se repitió el estudio con otra población, la de los pacientes NO NAIF.

Se trata de una población de pacientes caracterizados por que en el momento de su primera visita a la UFRV ya estaban siendo tratados con algún fármaco hipolipemiente y en ese momento se les modificó el tratamiento. Se emplearon los mismos criterios de selección que para la población NAIF y el grupo final estuvo formado por 57 participantes. Las características basales de esta población se muestran en la sección 4.1 Descripción de la población.

Igual que para los NAIF, en primer lugar se estudiaron las diferencias entre los portadores y no portadores de las seis variantes genéticas para las variables edad, D, %IMC, Δ He, Δ A, y %C y %CM para el CT y el noHDL.

Del total de pacientes, no hubo ninguno que modificase su hábito tabáquico durante el periodo del estudio, por lo cual no se incluyó esta variable en los modelos.

Respecto a la comparación de la edad, D, Δ He y Δ A entre portadores y no portadores de las seis variantes, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los seis casos. Respecto al %IMC sí se encontraron diferencias para la variante LPA c.3947+467T>C ($p=0,04$) (datos no mostrados).

Las tablas 32 y 33 muestran las comparaciones para %C y %CM de CT y noHDL entre portadores y no portadores de las seis variantes. Exponen las medias e intervalo de confianza del 95% para aquellas variables que se distribuyeron normalmente y la mediana y rango para aquellas que no, así como las p de los test estadísticos aplicados en cada caso para las comparaciones entre grupos. En negrita figuran las p de aquellos test de comparaciones entre grupos que resultaron estadísticamente significativas.

Tabla 32: Comparación del %C y %CM de CT y noHDL entre portadores y no portadores de las variantes de los genes *APOE* y *SLCO1B1*.

	APOE2 c.526C>T			APOE4 c.388T>C			SLCO1B1 c.521T>C		
	NP (n=52)	P (n=4)	p	NP (n=52)	P (n=4)	p	NP (n=52)	P (n=4)	p
%C CT	-17,2 (-51,3;-18,5)	-2,6 (-20,1;5,8)	0,288	-14,7 (-19,9;-9,5)*	-19,1 (-31,1;-7,2)*	0,456	-19,1 (-24,7;-13,5)*	-7,8 (-15,1;0,5)*	0,029
%CM CT	-7,8 (-31,5;9,2)	-1,31 (-10,3;2,9)	0,262	-7,7 (-10,5;-4,9)*	-10,2 (-17,3;-3,2)*	0,528	-10,0 (-13,1;-6,8)*	-4,3 (-8,7;0,1)*	0,049
%C noHDL	-20,1 (-59,2;24,0)	-1,7 (-35,7;2,6)	0,460	-17,6 (-23,8;-11,5)*	-24,6 (-40,7;-8,6)*	0,340	-22,2 (-29,7;-14,6)*	-13,1 (-22,1;-4,1)*	0,163
%CM noHDL	-8,2 (-37,1;12,0)	-0,9 (-17,8;1,3)	0,388	-10,2 (-13,9;-6,5)*	-13,3 (-22,9;-3,7)*	0,564	-11,5 (-15,8;-7,3)*	-9,6 (-16,0;-3,1)*	0,620

*media e IC95%. NP: No portadores P: portadores. p: probabilidad obtenida en los test estadísticos %C: porcentaje de cambio según la concentración final %CM: porcentaje de cambio según la concentración media CT: colesterol total noHDL: colesterol noHDL

Tabla 33: Comparación del %C y %CM de CT y noHDL entre portadores y no portadores de las variantes de los genes *CYP3A4*, *HMGCR* y *LPA*.

	CYP3A4 c.-392G>A (s/a)			HMGCR c.1564-106A>G			LPA c.3947+467T>C		
	NP (n=37)	P (n=4)	p	NP (n=37)	P (n=4)	p	NP (n=37)	P (n=4)	p
%C CT	-17,2 (-51,3;18,5)	-26,3 (-36,9;-9,7)	0,346	-7,8 (-15,1;-0,6)*	-19,6 (-25,5;-13,8)*	0,021	-16,6 (-22,1;-11,1)*	-13,4 (-23,0;-3,9)*	0,643
%CM CT	-8,1 (-11,3;-4,8)*	-12,4 (-19,2;-5,6)*	0,314	-3,9 (-7,5;-0,3)*	-10,5 (-13,7;-7,1)*	0,013	-8,3 (-11,2;-5,4)*	-8,5 (-14,4;-2,6)*	0,969
%C noHDL	-18,6 (-59,2;24,3)	-33,9 (-42,9;-10,4)	0,315	-11,5 (-20,8;-2,2)*	-23,7 (-31,0;-16,3)*	0,051	-20,5 (-27,4;-13,6)*	-16,8 (-27,7;-5,8)*	0,587
%CM noHDL	-11,2 (-15,8;-6,6)*	-15,1 (-22,4;-7,8)*	0,413	-5,7 (-10,3;-1,1)*	-13,9 (-18,5;-9,2)*	0,018	-11,2 (-15,2;-7,1)*	-10,6 (-17,6;-3,5)*	0,884

*media e IC95%. NP: No portadores P: portadores. p: probabilidad obtenida en los test estadísticos (s/a): subpoblación tratada con simvastatina o atorvastatina. %C: porcentaje de cambio según la concentración final %CM: porcentaje de cambio según la concentración media CT: colesterol total noHDL: colesterol noHDL

Para los indicadores %C y %CM de CT y de noHDL las diferencias entre los portadores y no portadores de la variante HMGCR c.1564-106A>G alcanzaron la significación estadística ($p=0,021$, $p=0,013$, $p=0,051$ y $p=0,018$, respectivamente). Además para %C y %CM de CT se encontraron diferencias significativas entre los portadores y no portadores de la variante SLCO1B1 521T>C ($p=0,029$ y $p=0,049$).

4.3.1 Matriz de correlación entre las variables de control.

Se realizó el mismo estudio de correlación entre todas las variables no genéticas (variables X), que el realizado para la población NAIF. Las variables edad y %IMC siguieron una distribución normal ($p>0,05$), pero el resto de variables no. Por lo tanto, en todos los casos la matriz de correlación se construyó estudiando las correlaciones entre las variables mediante el test no paramétrico de Spearman, excepto la correlación edad-%IMC que se estudió mediante el test de Pearson.

La siguiente tabla muestra las p del test de Spearman o Pearson para cada correlación entre variables. En el caso de que la p fuese significativa, $p<0,05$, se muestra entre paréntesis el valor de rho obtenido. En esos casos los datos se muestran en negrita.

Tabla 34: Correlaciones entre variables de control.

Edad	Edad								
Sexo	0,173	Sexo							
D	0,286	0,686	D						
%IMC	0,503	0,833	0,927	%IMC					
ΔHe	0,678	0,695	0,388	0,581	ΔHe				
ΔA	0,562	0,388	0,457	0,775	0,242	ΔA			
DM	0,339	0,276	0,884	0,363	0,907	0,718	DM		
HTA	0,514	0,639	0,551	0,867	0,708	0,349	0,222	HTA	
ISQM	0,721	0,562	0,882	0,416	0,161	0,575	0,047 (0,292)	0,905	

D: dosis media diaria de estatina %IMC: porcentaje de cambio en el índice de masa corporal ΔT: cambio en el hábito tabáquico ΔHe: cambio en el ejercicio físico ΔA: cambio hábito enólico DM: antecedentes de diabetes mellitus HTA: antecedentes de hipertensión arterial ISQM: evento isquémico previo

La única correlación estadísticamente significativa fue la que existente entre DM-ISQM, cuya *rho* fue de 0,292. Por analogía con el estudio de los pacientes NAIF, se decidió eliminarla y no incluirla en los modelos.

4.3.2 Desarrollo de modelos estadísticos para el porcentaje de cambio de según la concentración final, según la concentración media, y consecución de objetivos terapéuticos para el colesterol total y el colesterol noHDL.

Debido al bajo número de pacientes en este estudio (n=57), se tomó como valor de nivel de significación $p < 0,100$. Únicamente en el caso de %CM de CT una de las variables de control, DM, fue seleccionada para formar el modelo basal. En el resto de los casos ninguna de las variables de control resultó seleccionada para incluirse en los modelos basales, de modo que se valoró directamente la aportación de las variantes genéticas influyentes sobre el indicador.

La tabla 35 muestra un resumen de los modelos obtenidos para la población NO NAIF para %C, %CM de CT y noHDL. En los casos en que más de una variante genética resultó influyente sobre el indicador, se valoró la aportación conjunta de ambas.

Tabla 35: Resumen del porcentaje de explicación del modelo basal, el modelo final y la aportación de la variante genética sobre cada uno de los indicadores.

Respuesta (Y)	Variables en el modelo basal	R ² modelo basal (%)	Variante genética	Aportación de la variable genética (%)
%C CT	-	-	SLCO1B1 c.521T>C	7,1
			HMGCR c.1564-106A>G	8,0
			SLCO1B1 c.521T>C HMGCR c.1564-106A>G	14,4
%CM CT	DM	4,2	SLCO1B1 c.521T>C	5,9*
			HMGCR c.1564-106A>G	8,6*
			SLCO1B1 c.521T>C HMGCR c.1564-106A>G	12,9*
%C noHDL	-	-	HMGCR c.1564-106A>G	8,2
%CM noHDL	-	-	HMGCR c.1564-106A>G	8,6

*en el modelo stepwise con la variable de control y la genética, únicamente queda dentro la variante genética. DM presentó en el modelo una $p > 0,100$. %C: porcentaje de cambio según la concentración final %CM: porcentaje de cambio según la concentración media CT: colesterol total noHDL: colesterol noHDL -: casos en los que no se pudo construir el modelo basal.

Como se puede comprobar sólo en el caso del %CM de CT hubo una variable seleccionada para la construcción del modelo basal, la DM ($p=0,079$). Para %C de CT, %C de noHDL y %CM de noHDL las p asociadas a comparación de los indicadores en función de DM fueron de 0,135, 0,132 y 0,154 respectivamente.

En este caso, las variables de control no resultaron influyentes sobre los indicadores, probablemente debido al bajo número de pacientes en la población y a las propias características de ésta. A pesar de ello, la variante HMGCR c.1564-106A>G, igual que ocurría para los NAIF, resultó influyente en todos los casos.

Pero, según se observa en la tabla del estudio inicial de los NO NAIF (tabla 33), en este caso ocurre lo contrario de lo que ocurría con los NAIF: ahora son los portadores de la variante los que presentan mayores disminuciones relativas de CT y noHDL. Por tanto, parece que en este subtipo de población, la presencia de la variante es beneficiosa para la disminución de ambas magnitudes lipídicas. Igual que para los NAIF, el descenso porcentual de noHDL es de mayor grado que el CT.

También cabe destacar que aunque en todos los casos se observa un descenso de las concentraciones de CT y noHDL, su magnitud es significativamente menor a la que se observaba en los NAIF.

En este caso, además de la variante HMGCR c.1564-106A>G, también resultó seleccionada la variante SLCO1B1 c.521T>C para el %C y %CM de CT. En ambos casos los portadores de la variante presentaron menores descensos del CT que los no portadores.

Por último, para %C y %CM de CT, se valoró de manera conjunta la influencia de las dos variantes y a la vista de los resultados parece que los efectos de ambas podrían ser aditivos.

En la tabla 36 se muestran los resultados relativos a la consecución de los objetivos terapéuticos de CT y noHDL. Se muestra la R^2 de Cox-Snell del modelo basal, la R^2 del modelo final con la variante seleccionada, la aportación de la variante al mismo y su OR en el modelo final. El nivel de significación fue $p \leq 0,100$.

Tabla 36: Resumen del porcentaje de explicación del modelo basal, el modelo final y la aportación de la variante genética sobre la consecución de objetivos terapéuticos.

Respuesta (Y)	Variables en el modelo basal	R² modelo basal (%)	R² modelo basal +SLCO1B1 c.521T>C (%)	Aportación de la variable genética (%)	OR (IC95%)
Objetivo CT	CTi	7,3	20,5	13,2	0,088 (0,010;0,707)
Objetivo noHDL	noHDLi	7,3	18,5	11,2	0,145 (0,026;0,820)

OR: odds ratio IC95%: intervalo de confianza del 95%.CT: colesterol total CTi: concentración inicial CT noHDL: colesterol noHDL noHDLi: colesterol noHDL inicial

En ambos casos, al incluir la variante en el modelo ésta alcanzó la significación estadística ($p=0,023$ y $0,029$, respectivamente) y además presentaron OR por debajo de 1, lo cual indica que la presencia de esta variante dificulta la consecución de los objetivos terapéuticos en esta población.

La variante HMGCR c.1564-106A>G, que para los NAIF resultaba influyente para la consecución del objetivo terapéutico de CT, en este caso no resultó significativa. En el estudio de comparación de proporciones de pacientes que alcanzaron frente a los que no alcanzaron el objetivo en función de la presencia o no de esta variante, se obtuvieron unas p de chi cuadrado de 0,541 para el CT y 0,551 para el noHDL.

En el caso de la variante APOE2 c.526C>T, que para el CT de los NAIF mostró cierta influencia, la p de chi cuadrado fue de 0,577.

5. Discusión

5.1 La enfermedad cardiovascular y su tratamiento

Actualmente, según la Organización Mundial de la Salud, la enfermedad cardiovascular es la principal causa de mortalidad en el mundo (119). Existen diversos factores que pueden influir en el desarrollo de la ECV, los denominados factores de riesgo cardiovascular. Algunos de ellos son modificables, como los que constituyen el perfil lipídico del paciente: la concentración sérica de CT, colesterol LDL, colesterol HDL, colesterol noHDL y los TG.

Las guías de prevención del riesgo cardiovascular establecen que el colesterol LDL es la principal diana sobre la que incidir para disminuir este riesgo (16). Pero actualmente, la mayoría de laboratorios clínicos no miden directamente la concentración de colesterol LDL, sino que la calculan a través de la fórmula matemática de Friedewald. Esta fórmula incluye la concentración de TG, y cuando éstos están por encima de 4,5 mmol/L no se puede aplicar (118). En estos casos se recomienda medir la concentración del colesterol noHDL, ya que incluye todas las fracciones lipídicas pro-aterogénicas (2).

En este trabajo, para evitar la limitación del colesterol LDL se decidió emplear como magnitudes bioquímicas indicadoras el CT y el noHDL para todos los pacientes, independientemente de sus concentraciones de TG.

Como ya se ha mencionado, la ECV es multifactorial y está afectada por factores intrínsecos al individuo como la edad y el sexo, factores ambientales y también factores genéticos. Es conocido que existe cierto grado de heredabilidad en estas enfermedades, y en diversos estudios se han encontrado diferentes *loci* genéticos implicados en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, como el infarto agudo y las enfermedades coronarias (120, 121). Cabe destacar que los *loci* conocidos hasta el momento sólo explican un pequeño porcentaje de la heredabilidad, y que todavía quedan muchos genes y mecanismos de acción por descubrir. También se han realizado estudios sobre los genes implicados en el metabolismo de los lípidos y las lipoproteínas. Hay algunas dislipemias de las que se ha identificado el gen responsable, como ocurre en el caso de la hipercolesterolemia familiar (122), y en cambio, se cree que otras dislipemias pueden ser el resultado de una combinación de variantes de diversos genes (78,123).

Uno de los tratamientos más extendidos de las dislipemias o de la prevención de las ECV es el uso de estatinas para conseguir la disminución de las concentraciones de

lípidos. Sin embargo, se ha observado que la respuesta al tratamiento con estatinas no es homogénea entre los pacientes que las toman. Se cree que puede haber variantes de genes implicadas en la diferente respuesta al tratamiento, por lo que también se han realizado estudios de asociación genómica (GWAS) en este campo (97, 124, 125).

En este trabajo se ha pretendido estudiar la influencia de algunas variantes de diversos genes potencialmente implicados en la respuesta al tratamiento con estatinas (*CYP3A4*, *SLCO1B1*, *HMGCR*, *LPA* y *APOE*) en pacientes con dislipemia, tratados únicamente con estos fármacos.

5.2 Justificación del estudio

Es conocido que los efectos que producen las estatinas en los individuos son muy heterogéneos. Por este motivo se han realizado diversos estudios sobre el origen de estas diferencias, especialmente las causas genéticas (126), así como los efectos que tienen estas diferencias a nivel clínico (127).

Este trabajo propone una manera de cuantificar la influencia de cada una de las variantes genéticas seleccionadas a partir de modelos explicativos, que resulten fáciles de interpretar. Además, se incluyen otras variables cuya influencia en los perfiles lipídicos es muy conocida, como la edad, la diabetes, la práctica de ejercicio físico, etc... Se trata de una manera novedosa de evaluar el efecto de las variantes, ya que se valora su influencia tanto de manera independiente como conjunta con las variables de control.

Por otra parte, además de valorar el efecto de las estatinas en función de las concentraciones de CT, que es lo que habitualmente se suele hacer, se ha estudiado el noHDL. Se trata de una magnitud bioquímica menos estudiada pero de gran relevancia, ya que incluye todas las fracciones pro-aterogénicas. En los estudios publicados se valora generalmente el colesterol LDL, calculado mediante la fórmula de Friedewald, lo cual tiene el inconveniente de que no se puede calcular cuando hay TG altos, algo que ocurre habitualmente. La valoración en función del noHDL, por lo tanto, lo hace de mayor utilidad para la práctica clínica diaria.

Por último, se ha querido incluir el punto de vista clínico tomando como indicador la consecución de los objetivos terapéuticos.

5.3 Discusión de los resultados obtenidos

En primer lugar se discutirán los resultados relacionados con el CT, para cada uno de los dos indicadores cuantitativos y después se seguirá el mismo esquema para el noHDL. Por último, se tratará la consecución de los objetivos terapéuticos para ambas magnitudes.

5.3.1 Estudio de la influencia de variantes de los genes *APOE*, *SLCO1B1*, *CYP3A4*, *HMGCR* y *LPA* en el porcentaje de cambio del colesterol total según la concentración final y según la concentración media en las poblaciones NAIF y NO NAIF.

En primer lugar, cabe destacar, como se puede observar en las tablas 11 y 12, que en general todos los pacientes consiguen una reducción del CT (porcentajes de cambio de signo negativo) tras el tratamiento con estatinas, por lo que se puede concluir que el tratamiento es efectivo. Sólo hubo 5 casos en los que no se produjo un descenso del CT, sino que sus valores aumentaron.

En la población NAIF, las variables de control que acabaron siendo seleccionadas para construir los modelos basales fueron la D para ambos indicadores y Δ He para %C. Los porcentajes de explicación de los modelos basales fueron de un 27,1% para el %C y de un 12,8% para el %CM, los cuales se pueden considerar bastante altos para incluir sólo una o dos variables. En ambos casos la variante genética que resultó influyente fue c.1564-106A>G del gen *HMGCR*, y su adición al modelo basal sumó un porcentaje de explicación de un 9,5% y un 6,2% respectivamente. En ambos casos, la presencia de la variante supuso una menor disminución de las concentraciones de CT (-28,3% vs -21,6% para %C y -17,3% vs -11,7% para %CM).

Como ya se ha mencionado en el apartado de los resultados, aunque la aportación de la explicación debida a la variante pueda parecer moderada, adquiere mayor relevancia si se compara con el resto de las variables. De hecho, muchas de las variables cuya influencia está ampliamente probada como el consumo de alcohol o el IMC, no la demostraron en esta población, al contrario de lo que ocurrió con esta variante genética.

El estudio de los pacientes NO NAIF trató de verificar los resultados obtenidos en los NAIF. Es importante advertir que, de entrada, la disminución de los lípidos es más

acusada en los pacientes NAIF que en los NO NAIF, como ya se esperaba por las características de esta población (ver tablas 11, 12, 32 y 33). En la población NO NAIF, para el caso de %C ninguna variable resultó seleccionada para la construcción del modelo basal, y para el %CM, únicamente la variable DM. Este hecho podría deberse al menor número de pacientes en el subgrupo y a la mayor dispersión de los datos. En este caso, además de la variante c.1564-106A>G del gen *HMGCR*, hubo otra que resultó influyente sobre los indicadores: c.521T>C del gen *SLCO1B1*. La aportación de la variante de *HMGCR* a los indicadores %C y %CM fue similar a la que se observó en el caso de la población NAIF (8,0% vs 9,5% para %C y 8,6% vs 6,2% para %CM), aunque hay que tener en cuenta que para %C no se pudo elaborar un modelo basal.

Es importante destacar que el efecto de la presencia de la variante del gen *HMGCR* es opuesto en ambas poblaciones: perjudicial en el caso de los NAIF y beneficiosa en los NO NAIF. Para profundizar en estos resultados, se cuantificaron por separado los %C y %CM de CT en los homocigotos sin la variante, heterocigotos y homocigotos con la variante, en los dos grupos de pacientes (datos mostrados en el Anexo 1). En la población NAIF, los homocigotos para la variante y los heterocigotos presentaron una disminución similar de CT valorada según %C, que fue inferior a la que presentaron los homocigotos sin la variante. Por tanto, desde un punto de vista funcional, es correcto clasificar a los individuos como portadores o no portadores. Para los pacientes NO NAIF, los %C de CT de los homocigotos con la variante y heterocigotos también son muy similares (además de ser muy similares a los %C de CT que presenta este grupo en los pacientes NAIF). Se puede comprobar que el efecto de la presencia de la variante c.1564-106A>G, tanto en los pacientes NAIF como en los NO NAIF, supone un descenso de la concentración de CT según el punto final de aproximadamente un 21%. En cambio, en los homocigotos no portadores de los NO NAIF, la reducción del %C de CT es mucho menor a la obtenida para los NAIF (-7,83% vs -29,01%). Por tanto, el aparente perjuicio (o beneficio) de la presencia de la variante según la población estudiada reside en realidad en el diferente comportamiento de los no portadores de las dos poblaciones. Sobre los posibles motivos de este comportamiento se discutirá más adelante, cuando se comparen nuestros resultados con la bibliografía en el apartado 5.3.3. Hay que destacar que los homocigotos no portadores NO NAIF, a pesar de ser un grupo relativamente numeroso (n=19), presentan una gran dispersión de los datos (la desviación estándar es aproximadamente el doble de la media).

En cuanto a la variante c.521T>C del gen *SLCO1B1*, se observó que tenía un efecto sobre el descenso del CT en el caso de los pacientes NO NAIF, pero no en los NAIF. La presencia de la variante explicaba un 7,1% del %C y un 5,9% del %CM. A partir de los datos de la tabla 32, se deduce que la presencia de la variante tiene un efecto negativo para la reducción del CT, ya que en los portadores la disminución de CT fue menor (-7,8% vs -19,1%). En cambio, en los pacientes NAIF no se observaron estas diferencias (-23,2% vs -23,1%). Es posible que estos datos puedan deberse en parte a las características de la población NO NAIF y al efecto que tiene la variante c.521T>C de *SLCO1B1* sobre los eventos adversos. Diversos estudios de asociación genómica han relacionado la presencia de esta variante con los efectos adversos, los cuales tienen como consecuencia que muchos pacientes dejen el tratamiento con estatinas, o que no haya un grado adecuado de adhesión al mismo (102, 103). Estos efectos pueden ser más o menos graves, desde dolor muscular sin aumento de la enzima creatina-quinasa, que se eleva cuando hay destrucción de fibras musculares, hasta la rhabdomiolisis, que se define como una necrosis masiva de las fibras musculares, en la que se produce una excreción de mioglobina por la orina. Esta situación puede llevar a una lesión renal, que es una de sus más importantes complicaciones.

Probablemente, el hecho de que los pacientes NO NAIF lleven más años en tratamiento podría implicar que son más resistentes al mismo, ya que vienen derivados de un centro de atención primaria debido al mal control del perfil de colesterol. Una de las causas para ello podría ser la menor adhesión al tratamiento que se da cuando se producen efectos adversos. Según datos publicados por el Ministerio de Sanidad, la tasa de rhabdomiolisis mortal oscila entre en 0,04 y 0,19 por cada millón de prescripciones para las diversas estatinas, pero la incidencia de mialgias sin elevación de la creatina-quinasa es mucho mayor: según algunos estudios de alrededor de un 15% (128).

Los pacientes NAIF son tratados *de novo* y se cree que podría darse esta situación menos frecuentemente, y haber una mejor adhesión al tratamiento.

Por último se estudió en la población NO NAIF la influencia conjunta de las dos variantes sobre el modelo basal, obteniéndose una explicación adicional de un 14,4% y 12,9% para el %C y %CM, respectivamente, por lo que parece que el efecto de la presencia de ambas variantes es aditivo.

5.3.2 Estudio de la influencia de variantes de los genes *APOE*, *SLCO1B1*, *CYP3A4*, *HMGCR* y *LPA* en el porcentaje de cambio del colesterol noHDL según

la concentración final y según la concentración media en las poblaciones NAIF y NO NAIF.

Los modelos basales de los pacientes NAIF para CT y noHDL fueron reproducibles para ambos indicadores, ya que las variables seleccionadas para el modelo basal fueron las mismas para las dos magnitudes lipídicas; D y Δ He para %C y D para %CM. Las R^2 asociadas a dichos modelos fueron ligeramente menores en el caso del noHDL respecto al CT e, igualmente, en ambos casos la variante genética seleccionada para incluirse en los modelos finales fue c.1564-106A>G de *HMGCR*.

Igual que la capacidad de explicación sobre los indicadores en los modelos basales era menor para el noHDL que para el CT, la explicación añadida por la variante genética al modelo también fue algo menor en este caso. Para el %C, la variante aportó un 8,2% adicional, y para %CM un 3,5%. Hay que remarcar también que, revisando los datos de la tabla 12 (comparaciones entre portadores y no portadores de la variante), las reducciones en las concentraciones son más importantes en el caso del noHDL que en el del CT. Este hecho es de gran importancia, ya que es la magnitud que representa todas las fracciones pro-aterogénicas del colesterol.

En la población NO NAIF, no se seleccionó ninguna de las variables para construir un modelo basal, por lo que se valoró la influencia de las variantes de manera independiente. La única variante que resultó influyente fue c.1564-106A>G de *HMGCR*. En este caso, el efecto de la variante sobre la disminución de los lípidos también parece contradictorio en ambas poblaciones, por lo que se realizó el mismo estudio que para el CT, clasificando a los pacientes como homocigotos sin la variante, heterocigotos y homocigotos con la variante, y calculando la media y desviación estándar del %C y %CM de noHDL para cada grupo y subpoblación. Se observa lo mismo que en el caso anterior: que los portadores presentan porcentajes de cambio de noHDL según la concentración final y media similares entre sí, y que esto ocurre en las dos poblaciones. En estos casos, las desviaciones estándar, aunque son mayores que las observadas para CT, son menores que las medias. Para la población NAIF, el %C y %CM noHDL de los homocigotos no portadores es mucho mayor y presenta una desviación relativamente baja, pero en cambio en los NO NAIF presenta un %C y %CM de noHDL mucho menor que los portadores de la variante con una desviación estándar de aproximadamente el doble (datos en el Anexo 1).

5.3.3 Comparación de los resultados obtenidos para los indicadores cuantitativos con la bibliografía.

Como ya se ha indicado previamente, la mayoría de las guías para el control del riesgo cardiovascular inciden principalmente en la importancia de la disminución de las concentraciones de CT y LDL, como dianas para la reducción de este riesgo. En este trabajo se ha querido valorar la influencia de diversas variantes genéticas, teniendo en cuenta variables de control cuya influencia es conocida, en la reducción del CT y del noHDL, en vez de LDL.

De las seis variantes genéticas seleccionadas para ser estudiadas, APOE2 c.526C>T, APOE4 c.388T>C, SLCO1B1 c.521T>C, CYP3A4 c.-392G>A, HMGCR c.1564-106A>G y LPA c.3947+467T>C, sólo dos de ellas mostraron influencia sobre el porcentaje de cambio de CT según la concentración final (%C) y según la concentración media (%CM): la del gen *HMGCR* para las dos poblaciones, y la del gen *SLCO1B1* para la población NO NAIF. Para el caso del noHDL, la única variante que resultó influyente fue la c.1564-106A>G de *HMGCR*, para las dos poblaciones.

HMGCR c.1564-106A>G

El gen *HMGCR* codifica para la enzima limitante de la síntesis endógena de colesterol, la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa, sobre la cual ejercen su efecto las estatinas. Por este motivo, es uno de los genes más estudiados en relación al efecto del tratamiento con estos fármacos.

El polimorfismo intrónico estudiado en este trabajo se puede considerar un polimorfismo funcional, ya que se ha relacionado con la regulación del splicing alternativo que se produce en el exón 13, por la cual éste se pierde en el mRNA dando lugar al denominado HMGCR (-) (95). Como consecuencia, la proteína restante carece de 53 aminoácidos que forman parte de su dominio catalítico, lo que conduce a la práctica desaparición de su actividad. Además, se cree que este cambio podría afectar a la sensibilidad para la unión de las estatinas. Chung et al. (129) estudiaron la influencia de este polimorfismo sobre las concentraciones de los lípidos y el efecto del tratamiento con estatinas. Observaron que únicamente en el caso del LDL, los pacientes portadores de la variante minoritaria G presentaban concentraciones de LDL más altas en el punto inicial y en todos los puntos del estudio. En otro trabajo, Medina et al. (130), encontraron que la presencia del HMGCR (-) produce una menor

sensibilidad a la acción de las estatinas, lo que conlleva menores reducciones en el CT, el LDL, la Apo B y los TG en los pacientes tratados con estatinas. Este estudio fue llevado a cabo en líneas celulares de linfocitos de pacientes en las que se controlaron los niveles de los diferentes mRNA, en función de la presencia o no de la variante. Es importante destacar que los dos tipos de mRNA se encuentran presentes en todos los tejidos. En el trabajo de Burkhardt et al. (97) se estudiaron las diferentes proporciones de HMGCR (+) y HMGCR (-) en diferentes tipos celulares, y se vio que en todos ellos existen ambos, pero es en los linfocitos donde hay mayor proporción de HMGCR (-). Se desconoce cuál es el motivo por el que el transcrito sin el exón 13 es el predominante en este tipo celular.

Por otra parte, también se han llevado a cabo estudios acerca de diversos haplotipos, formados por variantes, que se han asociado a la respuesta a las estatinas (131,132), como los denominados H2 y H7. Como ya se señaló en la Introducción, la variante de *HMGCR* de nuestro estudio, la rs3846662, forma parte del haplotipo H7 junto a las otras dos variantes intrónicas rs17244841 y rs17238540 (131). Una reciente revisión realizada por Gelissen et al. (133), hace un repaso de aquellos genes cuyas variantes han sido relacionadas con los diferentes efectos del tratamiento con estatinas. En él, diversas variantes de este trabajo, como la *HMGCR* c.1564-106A>G, aparecen relacionadas con dicho efecto, mostrando que todavía quedan muchos aspectos que aclarar sobre la influencia del splicing alternativo sobre la eficacia de las estatinas.

En un estudio más reciente de Medina et al. (134) se revelan otras claves acerca de la implicación y regulación de esta variante. Se sabe que los no portadores de la variante (los individuos AA) presentan mayores proporciones de HMGCR (-) a nivel celular, lo cual hace que se sinteticen menores cantidades de colesterol endógeno y por tanto se capte más colesterol plasmático procedente de la dieta. Por tanto, los pacientes AA deberían presentar concentraciones basales de CT y noHDL menores que los GG. Por otra parte en su estudio en líneas celulares, Medina et al. (134) también ponen de manifiesto que la producción de HMGCR (-) se ve modulada, además de por la variante, por las concentraciones de lípidos circulantes. Si las concentraciones de lípidos disminuyen se produce menor proporción de HMGCR (-) y mayor de HMGCR (+), y al revés si los lípidos aumentan. Pero este hecho sólo ocurre en las líneas celulares de genotipo AA y no en las GG, en los que las proporciones se mantienen constantes a pesar de las variaciones de los lípidos circulantes (134).

En nuestro estudio, en cambio, no se observa esta situación inicial respecto a CT y noHDL. En el Anexo 2 se muestran las comparaciones entre los AA y GG de la

población NAIF, y puede verse que no existen diferencias entre ambas poblaciones, y que, en todo caso, lo que se observa es una tendencia a presentar mayores concentraciones basales de CT y noHDL en los AA. No se ha encontrado ningún motivo en la selección de los pacientes que pueda justificar este hecho.

Asumiendo la bondad de estos datos del estudio de Mediana et al. (134), y aplicándolos a los resultados de nuestro estudio, se puede proponer la siguiente hipótesis. En el grupo de los pacientes NAIF, los individuos no portadores (AA) presentarían una disminución más pronunciada de las concentraciones de CT y noHDL que los portadores, porque aunque inicialmente tengan mayor proporción de HMGCR (-) inactivo e insensible a las estatinas, el efecto del fármaco sobre los HMGCR (+) activos producirá de todas formas un descenso de las concentraciones de lípidos. Este descenso conlleva que se produzca más transcritos HMGCR (+) y menos HMGCR (-), por lo que habrá cada vez más centros activos y la estatina ejercerá más efecto. Por lo tanto, se producirá un descenso más pronunciado al inicio del tratamiento, que luego se irá estabilizando cuando se alcance el equilibrio entre las proporciones de los dos transcritos y las concentraciones de lípidos circulantes. En cambio, para los GG la estatina será igual de efectiva durante todo el tratamiento, porque las proporciones de HMGCR (+) y HMGCR (-) se mantendrán igual durante todo el tiempo que dure el mismo. La disminución del colesterol en los individuos no portadores (AA) podría ser de tipo sigmoideo, mientras que en los individuos portadores se produciría una disminución de tipo lineal.

Lo que podría ocurrir con la población NO NAIF es que al evaluarla en una etapa más avanzada del tratamiento, los GG continuarán con el descenso progresivo de CT y noHDL. En cambio en los AA, el descenso más importante (el inicial) ya se habrá producido, y se encontrarán en la etapa en la que los descensos serán ya más moderados. Esta hipótesis concuerda con los datos obtenidos, ya que se ha visto que los descensos de las magnitudes lipídicas son muy similares en los portadores de G en ambas poblaciones (-21% y -17%), y en cambio los descensos para los no portadores, AA, son muy diferentes, siendo de mayor grado en los NAIF que en los NO NAIF (-29% y -8%). Además, la elevada dispersión observada en los no portadores en el grupo de los NO NAIF se podría deber al hecho de que como no se sabe cuánto tiempo llevan los NO NAIF en tratamiento, algunos podrían encontrarse todavía en la zona de la curva del descenso más brusco, y otros ya en la fase de estabilidad. Lo que ocurre con los pacientes heterocigotos AG, es más difícil de interpretar y no hay estudios respecto a ellos, pero a la vista de nuestros resultados la variante parece comportarse como dominante.

En nuestro estudio se muestra por primera vez “in vivo” en pacientes, que el efecto de esta variante puede parecer diferente en función del momento en que se estudie la población, algo muy importante que habría que tener en cuenta a la hora de valorar a los pacientes en el ámbito clínico. Además se verifica que este efecto es debido únicamente al comportamiento de los no portadores y que se observa en las dos magnitudes lipídicas, valoradas de manera conjunta a las variables de control.

También cabe destacar que, a pesar de tratarse de la diana secundaria en las guías de prevención de riesgo cardiovascular como la NCEP-ATP III (16), no se ha encontrado ningún estudio que relacione este polimorfismo con el noHDL, por lo cual los hallazgos de este trabajo pueden considerarse bastante novedosos. De hecho, hay muy pocos estudios que evalúen la influencia de variantes genéticas sobre el noHDL. En uno de ellos, Karvanen et al. (135) encontraron asociación entre tres variantes de los genes *PRSC1*, *CELSR2* y *SMAD3*, con valores más altos de colesterol noHDL, pero este tipo de estudios son muy escasos.

SLCO1B1 c.521T>C

El gen *SLCO1B1* codifica para una proteína transportadora, OATP1B1, situada en la membrana de los hepatocitos. Esta proteína es esencial para permitir la entrada y la acción intracelular, o el metabolismo, de diversos fármacos como los antiinflamatorios o las estatinas (136). Es muy conocido el efecto que tienen las variantes de *SLCO1B1* en el desarrollo de efectos secundarios de las estatinas, como han mostrado diversos estudios (137, 138). El efecto de la variante c.521T>C de *SLCO1B1* se ha asociado a una menor actividad de la proteína transportadora OATP1B1, por lo que el fármaco permanece más tiempo en circulación sin entrar a las células, siendo las concentraciones plasmáticas más elevadas (100, 101). El estudio SEARCH (139) de asociación genómica encontró una asociación significativa entre la presencia del alelo C y el riesgo de desarrollar miopatía. El posterior estudio de Stewart et al. (140), no pudo evidenciar el beneficio de genotipar a los pacientes para determinar la dosis más indicada de estatina para cada paciente. En el estudio STRENGTH se comprobó que había una peor adhesión al tratamiento en pacientes con esta variante, y además, se observó un efecto de dosis alélica, especialmente para el caso de la simvastatina (141). También en un estudio realizado con pacientes del Rotterdam Study (142) se demostró que en los pacientes con el alelo C se daba un mayor número de casos en que era necesaria la reducción de la dosis y el cambio de tratamiento, lo cual es indicativo de una mayor proporción de efectos secundarios.

En nuestro trabajo se ha encontrado una relación entre la presencia de la variante y el descenso de la concentración de CT, tanto según la concentración final como la media, pero únicamente para la población NO NAIF. Como se puede calcular a partir de los datos de la tabla 32 del estudio de la población NO NAIF, los pacientes portadores del alelo C presentan menores reducciones del CT, un 11,3% menos para el %C y un 5,7% menos para %CM. Para el caso de noHDL, las diferencias entre ambos grupos no alcanzaron diferencias estadísticamente significativas, pero en la misma tabla también se puede ver que los porcentajes de reducción son menores para los portadores de C.

En un estudio realizado en población china no se encontraron diferencias respecto a la disminución del LDL entre portadores y no portadores de esta variante (143) y otro estudio realizado por Hubacek et al. (144), mostró diferencias en las disminuciones de CT en función de la presencia o no de la variante, pero el efecto era diferente en función del sexo. Respecto a la reducción de las concentraciones de HDL y TG hay pocos estudios, pero hasta ahora no se ha encontrado asociación entre esta variante y la variación de sus concentraciones tras el tratamiento con estatinas (106).

Como ya se ha comentado a lo largo del trabajo, es llamativo observar que la variante haya resultado influyente solamente para el grupo de los NO NAIF, y además con un porcentaje de explicación de los indicadores bastante importante. El hecho de que un efecto de esa magnitud no se observe en la población NAIF hace pensar que la presencia de este efecto debe estar relacionada con las características de la población en la que se observa. La población NO NAIF es una población ya expuesta a diversos cambios de tratamiento antes de llegar a la UFRV, una unidad especializada. Podría darse el caso (aunque no se dispone de los datos) de que en la población NO NAIF hubiese una mayor cantidad de pacientes que sufriesen efectos adversos, por lo que tenderían a seguir peor el tratamiento, y en consecuencia el efecto del fármaco resultaría menos eficaz.

5.3.4 Estudio de la influencia de variantes de los genes *APOE*, *SLCO1B1*, *CYP3A4*, *HMGCR* y *LPA* en la consecución de los objetivos terapéuticos del colesterol total para las poblaciones NAIF y NO NAIF.

Para este indicador, el esquema de trabajo fue el mismo, pero las regresiones empleadas fueron regresiones logísticas ya que el indicador es de tipo cualitativo dicotómico. Por este motivo, el efecto de la falta de datos para algunos de los pacientes influye más, por lo que se podrían obtener peores resultados que con las regresiones lineales.

Para la población NAIF se realizó un estudio inicial, similar al realizado para los indicadores cuantitativos, en que se pueden ver las distribuciones de los pacientes que alcanzaron o no los objetivos terapéuticos de CT y noHDL en función de las seis variantes genéticas (tabla 25). A partir de los datos de esta tabla, ya se podía hacer una primera aproximación, puesto que se intuía que la presencia de la variante *APOE2* c.526C>T podría suponer un beneficio para el grado de consecución del objetivo de CT, y lo contrario para *HMGCR* c.1564-106A>G. Para el resto de variantes no parecía haber diferencias. En la selección de las variables de control únicamente resultó influyente el CTi (CT inicial), que explicaba un 8,4% del indicador. Presentó una OR inferior a 1, lo que quiere decir que la posibilidad de alcanzar el objetivo de CT disminuye según aumenta el CTi. Es lógico pensar que aquellos pacientes que presentan concentraciones de CTi más altas tendrán mayor dificultad para alcanzar el objetivo. Es llamativo que, en este caso, la variable dosis no alcanzó el nivel de significación (presentó una *p* asociada de 0,217, datos no mostrados), ya que en los casos de los indicadores cuantitativos resultó siempre influyente. Tal y como se intuía a partir de los datos de la tabla inicial, se seleccionaron las variantes *APOE2* c.526C>T y *HMGCR* c.1564-106A>G, por presentar una *p* asociada cercana al valor predefinido de 0,100, pero una vez introducidas en el modelo basal, únicamente la variante *HMGCR* c.1564-106A>G continuó mostrando cierta influencia. Su aportación al modelo basal fue de un 4,6%, que aunque puede parecer de grado moderado, supone más del 50% de la explicación que aporta la concentración inicial de CT. La OR de la variante *HMGCR* c.1564-106A>G en el modelo final fue inferior a 1 (concretamente de 0,321), por lo que su presencia resultaría perjudicial para la consecución del objetivo de CT. Estos datos están totalmente de acuerdo con los obtenidos para los indicadores %C y %CM para CT.

En el caso de la población NO NAIF, también la variable CTi fue la única que resultó influyente y su explicación de la consecución del objetivo de CT fue de un 7,3%, bastante similar al de la población NAIF. En este caso resultó seleccionada la variante *SLCO1B1* c.521T>C, pero ninguna de las dos seleccionadas en el estudio con los NAIF, *APOE2* c.526C>T y *HMGCR* c.1564-106A>G. La aportación de la variante del gen *SLCO1B1* a la explicación fue de un 13,2 %, con una OR de 0,088. Hay que tener en cuenta que en esta población la presencia de la variante es claramente perjudicial, además de explicar un porcentaje que supone casi el doble de la explicación que aporta CTi.

5.3.5 Estudio de la influencia de variantes de los genes *APOE*, *SLCO1B1*, *CYP3A4*, *HMGCR* y *LPA* en la consecución de los objetivos terapéuticos del colesterol noHDL para las poblaciones NAIF y NO NAIF.

Los datos de la tabla 25 muestran también cuántos de los pacientes NAIF portadores y no portadores de cada una de las seis variantes estudiadas alcanzaron el objetivo terapéutico de noHDL en la última visita a la UFRV. A primera vista parece que las variantes que resultaron significativas para el caso de CT, podrían ser también influyentes para el noHDL.

Para la población NAIF la única variable influyente fue noHDLi (noHDL inicial), pero la explicación que aportaba al modelo fue únicamente de un 3,2%. Igual que para el caso de CT, es lógico pensar que aquellos pacientes que presenten concentraciones iniciales más elevadas tendrán menos posibilidades de alcanzar el objetivo, a pesar de que reduzcan sustancialmente el noHDL, que aquellos con concentraciones iniciales más bajas. Tal y como ocurría para los indicadores cuantitativos, las explicaciones de las variables sobre los indicadores representaban un menor porcentaje para el noHDL que para el CT. Ninguna de las variantes alcanzó el valor de probabilidad definido, por lo que no se pudo verificar la influencia de la variante *HMGCR* c.1564-106A>G, sobre la consecución del objetivo de noHDL.

Se realizó el mismo estudio en la población NO NAIF, y en este caso la variable seleccionada para el modelo basal también fue el noHDLi, suponiendo una explicación del indicador de un 7,3%. Igual que para el caso de CT, la variante que resultó seleccionada fue *SLCO1B1* c.521T>C. Además, su aportación al modelo fue de un 11,2%, significativamente más alta que la explicación del propio modelo basal, presentando una OR de 0,145. Parece que la presencia de la variante es perjudicial

para el alcance del objetivo, de tal manera que aunque los pacientes partieran de concentraciones de noHDL relativamente bajas, si son portadores del alelo C, su efecto negativo podría contrarrestar esta ventaja.

5.3.6 Comparación de los resultados obtenidos para el indicador cualitativo con la bibliografía.

APOE2 c.526C>T

Esta variante fue seleccionada en el estudio inicial porque se acercó al nivel de significación definido en el estudio para CT ($p=0,111$) pero no para el noHDL ($p=0,274$). Además, para el CT presentó una OR superior a 1, de 5,171, lo que indicaba que la presencia de la variante podría suponer un beneficio para la consecución del objetivo, aunque en el modelo final no llegase a alcanzar el nivel de significación requerido.

Como ya se mencionó en el apartado Introducción, la variante APOE2 c.526C>T se ha asociado, cuando se encuentra en homocigosis, a la disbetalipoproteinemia, pero también muchos estudios la han relacionado con la presencia de concentraciones de LDL más bajas, así como con un menor riesgo de sufrir enfermedad cardiovascular (89, 90). Por ejemplo, en el estudio de Mazzotti et al. (145), realizado en casi 600 pacientes brasileños, se encontró que los pacientes con la variante APOE2 c.526C>T presentaban concentraciones de CT y LDL más bajas. Lo mismo ocurre para el LDL en la población lituana (146), por lo que parece que esta situación está bien demostrada. Respecto a la efectividad del tratamiento con estatinas, se cree que los individuos con el alelo T presentan mayores reducciones de colesterol que los no portadores (90). El trabajo de Mega et al. (147) es uno de los que muestran que la variante está asociada a reducciones mayores de los lípidos, concretamente en este caso, de LDL. Además, en el mismo trabajo se estudia también la consecución de un objetivo de LDL (LDL menor o igual a 70mg/dL después de 30 días de tratamiento), el cual se vio influenciado por la presencia de la variante. En nuestro caso, no se llegó a comprobar la influencia de esta variante en el grado de consecución de los objetivos, tal vez debido a la escasez de datos. Por este motivo sería interesante ampliar este estudio con un mayor número de participantes.

HMGCR c.1564-106A>G

Igual que ocurría para los indicadores %C y %CM para CT y noHDL, la variante c.1564-106A>G de *HMGCR* resultó influyente en el grado de consecución de objetivos terapéuticos, pero únicamente para CT. En este caso, parece que su capacidad de explicación es menor que para los indicadores cuantitativos, pero si nos fijamos en el porcentaje de explicación que añade respecto a la del modelo basal, la explicación aportada por la variante supone un 50% de ésta. En cambio, para los indicadores cuantitativos la explicación añadida representaba aproximadamente un tercio de la explicación del modelo basal.

Como ya se ha explicado previamente, hay muchos estudios que muestran la influencia de la variante en el descenso de las concentraciones de lípidos en pacientes tratados con estatinas, pero esto no ocurre con estudios que planteen el alcance de un objetivo de concentración. Por ejemplo, la revisión de Medina et al. (148) afirma que la presencia de los alelos minoritarios de las variantes que forman el haplotipo H7 se asocia a mayores reducciones de CT, LDL, Apo B y TG en los pacientes tratados con estatinas. Ya se ha explicado que la relación entre esta variante y la eficacia de las estatinas, está definida por las proporciones de HMGCR (-) y HMGCR (+), así como por las variaciones de los lípidos circulantes. Debido a la respuesta de los individuos no portadores, AA, a la disminución de los lípidos, se produce menos HMGCR (-) y más HMGCR (+), por lo que hay más centros activos sobre los que puede actuar la estatinas y se producen en consecuencia disminuciones cada vez mayores del CT y noHDL. Por tanto, para los individuos no portadores, AA, debería ser más fácil alcanzar el objetivo, o por lo menos alcanzarlo en un plazo de tiempo más corto.

Cabe destacar que el mecanismo de regulación del splicing alternativo del exón 13 no está totalmente descrito, como muestra el hecho de que vayan apareciendo artículos acerca de nuevas moléculas implicadas en el proceso. Este es el caso del artículo de Yu et al. (149), que investiga la relación de la proteína HNRNPA1 con el splicing alternativo del exón 13.

Para los pacientes NO NAIF, la variante que resultó influyente fue *SLCO1B1* c.521T>C tanto para CT como para noHDL. Los datos concuerdan con los obtenidos para los indicadores cuantitativos, pero en este caso la variante *HMGCR* c.1564-106A>G no presentó ninguna influencia.

SLCO1B1 c.521T>C

En este caso el porcentaje de explicación debido a la variante es incluso de mayor grado que la explicación aportada por el modelo basal. Además presentan OR muy bajas, indicando el claro efecto perjudicial de esta variante. Por estos dos motivos, su presencia debe considerarse de importancia.

Al igual que ocurría en los casos anteriores, se piensa que el hecho de no alcanzar los objetivos terapéuticos podría deberse, entre otros motivos, a la presencia de efectos adversos en los pacientes portadores del alelo C, ya que es un efecto muy claro que se observa sólo en la población NO NAIF.

En la bibliografía hay pocos artículos que estudien esta variante desde el punto de vista de alcanzar determinadas concentraciones lipídicas como objetivo. En uno de ellos, el Go-DARTS Study (150), se genotiparon 4196 pacientes diabéticos para ésta, y otra variante del gen *SLCO1B1*. Los individuos con genotipo CC presentaron mayor grado de intolerancia a las estatinas y además, presentaron también menores reducciones de LDL. Esta asociación no se observaba al eliminar los pacientes con intolerancias. Además, a los pacientes CC les resultó tres veces más difícil alcanzar el objetivo de LDL marcado de 2 mmol/L. Estos datos concuerdan con los obtenidos en este trabajo.

La mayoría de estudios se centran en el grado de reducción de las magnitudes lipídicas, en vez de en la consecución de un valor concreto. Por ejemplo, en su trabajo en diversos hospitales japoneses con pacientes tratados con pravastatina, Zhang et al. (104) encontraron que los pacientes con genotipo TC presentaron menores reducciones de colesterol total que los TT. En cambio en otro estudio realizado también con pacientes tratados con pravastatina no se encontraron diferencias entre portadores y no portadores de la variante, en las reducciones de CT, LDL, HDL ni TG (151).

Otros estudios plantean la existencia de diferencias en función del sexo: en el trabajo de Hubeck et al. (145) se compararon los descensos de CT y LDL entre los sexos y se encontró que los hombres CC presentaron el menor porcentaje de reducción de CT, y en cambio las mujeres CC el mayor porcentaje de reducción. En nuestro trabajo la variable sexo fue tratada como variable de control, para evitar este efecto.

Como se puede comprobar, así como en la bibliografía hay muchos artículos que dejan clara la influencia de la variante en el desarrollo de efectos secundarios, no ocurre lo mismo con la valoración del efecto que tiene sobre la eficacia de las estatinas. Existen discrepancias, ya que para algunos la presencia de la variante es perjudicial para la reducción de los lípidos (152), pero en cambio otros estudios no lo corroboran (153). Creemos que esto podría ser debido, por lo menos en parte, al tipo de población estudiada, igual que en el presente trabajo.

6. Conclusiones

Conclusiones

Estudio de la influencia de variantes de los genes *APOE*, *SLCO1B1*, *CYP3A4*, *HMGCR* y *LPA* en el porcentaje de cambio del CT y noHDL según la concentración final y según la concentración media en las poblaciones NAIF y NO NAIF.

- La variante c.1564-106A>G de *HMGCR* influyó sobre la eficacia de las estatinas en la disminución de CT y noHDL, valorada según los dos indicadores cuantitativos evaluados, en las dos poblaciones estudiadas.
- En el caso del CT, los porcentajes de explicación que aportó la variante c.1564-106A>G a los modelos basales del cambio según la concentración final y según la concentración media fueron de 9,5% y 6,2% (en la población NAIF), y 8,0% y 8,6% (en la NO NAIF),
- En el caso de noHDL, los porcentajes adicionales de explicación en los mismos casos fueron de 8,2%, 3,5%, 8,2% y 8,6%, respectivamente.
- El efecto de la presencia del alelo minoritario G es contrario en ambas poblaciones. En los NAIF, se asocia a menor respuesta en cuanto a disminución del CT y noHDL, mientras que en los NO NAIF se asocia a mayores disminuciones.
- En la población NO NAIF, la variante c.521T>C de *SLCO1B1* mostró un porcentaje de explicación de un 7,1% y un 5,9 % para el cambio de CT según la concentración final y según la concentración media, respectivamente. La presencia del alelo minoritario se asoció a menor eficacia del tratamiento.
- Para el noHDL, la variante c.521T>C de *SLCO1B1* no resultó influyente en la población NO NAIF.
- La presencia conjunta de las dos variantes en la población NO NAIF (*HMGCR* c.1564-106A>G y *SLCO1B1* c.521T>C), pareció tener un efecto aditivo.

Estudio de la influencia de variantes de los genes *APOE*, *SLCO1B1*, *CYP3A4*, *HMGCR* y *LPA* en la consecución de los objetivos terapéuticos de CT y noHDL para las poblaciones NAIF y NO NAIF.

- La presencia de la variante c.1564-106A>G de *HMGCR* resultó perjudicial para la consecución del objetivo terapéutico de CT en la población NAIF.
- En cuanto al objetivo terapéutico de noHDL, ninguna de las variantes genéticas estudiadas en la población NAIF resultó tener influencia sobre él.
- En la población NO NAIF, para las dos magnitudes lipídicas, la única variante influyente resultó ser c.521T>C de *SLCO1B1*. La presencia de esta variante resultó perjudicial para conseguir los objetivos en esta población.

7. Referencias bibliográficas

1. Lehninger AL. Principios de Bioquímica. Capítulo 9. 2ª edición. Barcelona: Ediciones Omega SA 1995.
2. Fuentes A, Castiñeiras MJ, Queraltó JM. Bioquímica Clínica y Biología Molecular. Volumen II. 2º Edición. Barcelona: Editorial Reverté. 1997;48:679-702.
3. Iqbal J, Anwar K, Hussain MM. Multiple, independently regulated pathways of cholesterol transport across the intestinal epithelial cells. *J Biol Chem.* 2003;278(34):31610-31620.
4. De Faria E, Fong LG, Komaromy M, Cooper AD. Relative roles of the LDL receptor, the LDL receptor-like protein, and hepatic lipase in chylomicron remnant removal by the liver. *J Lipid Res.* 1996;37(1):197-209.
5. Turner S, Voogt J, Davidson M, Glass A, Killion S, Decaris J, Mohammed H, Minehira K, Boban D, Murphy E, Luchoomun J, Awada M, Neese R, Hellerstein M. Measurement of Reverse Cholesterol Transport Pathways in Humans: In Vivo Rates of Free Cholesterol Efflux, Esterification, and Excretion. *J Am Heart Assoc.* 2012;1(4):e001826.
6. Van der Velde AE, Brufau G, Groen AK. Transintestinal cholesterol efflux. *Curr Opin Lipidol.* 2010;21(3):167-171.
7. Takahashi K, Takeya M, Sakashita N. Multifunctional roles of macrophages in the development and progression of atherosclerosis in humans and experimental animals. *Med Electron Microsc.* 2002;35(4):179-203.
8. <http://www.msc.es/campannas/campanas07/cardiovascular2.htm>
9. <http://www.ine.es/prensa/np703.pdf>
10. O'Donnell CJ, Elosua R. Factores de riesgo cardiovascular. Perspectivas derivadas del Framingham Heart Study. *Rev Esp Cardiol.* 2008;61(3):299-310.

11. Perk J, De Backer G, Gohlke H, Graham I, Reiner Z, Verschuren WM, Albus C, Benlian P, Boysen G, Cifkova R, Deaton C, Ebrahim S, Fisher M, Germano G, Hobbs R, Hoes A, Karadeniz S, Mezzani A, Prescott E, Ryden L, Scherer M, Syväanne M, Scholte Op Reimer WJ, Vrints C, Wood D, Zamorano JL, Zannad F; Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice; European Association for Cardiovascular Prevention and Rehabilitation. European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012): The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). *Atherosclerosis*. 2012;223(1):1-68.
12. Helfand M, Buckley DI, Freeman M, Fu R, Rogers K, Fleming C, Humphrey LL. Emerging risk factors for coronary heart disease: a summary of systematic reviews conducted for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*. 2009;151(7):496-507.
13. Ferraz ML, Nascimento DM, Rorato JP, Espindula AP, Oliveira LF, Ramalho LS, Soares MH, Cavellani CL, Oliveira FA, Pereira SA, Corrêa RR, Teixeira Vde P. Correlation of lifetime progress of atherosclerosis and morphologic markers of severity in humans: new tools for a more sensitive evaluation. *Clinics*. 2012;67(9):1071–1075.
14. Rogers RG, Everett BG, Onge JM, Krueger PM. Social, behavioral, and biological factors and sex differences in mortality. *Demography*. 2010; 47(3):555-578.
15. Wu FC, Von Eckardstein A. Androgens and coronary artery disease. *Endocr Rev*. 2003;24(2):183-217.
16. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) Final Report. *Circulation*. 2002;106:31-43.
17. Banerjee A. A review of family history of cardiovascular disease: risk factor and research tool. *Int J Clin Pract*. 2012;66(6):536-543.

18. Wierzbicki SA. New directions in cardiovascular risk assessment: the role of secondary risk stratification markers. *Int J Clin Pract.* 2012;66(7):622-630.
19. Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular disease: the Framingham Study. *JAMA* 1979; 241:2035-2038.
20. Stamler J, Wentworth D, Neaton JD. Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356,222 primary screens of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *JAMA.* 1986;256(29):2823-2828.
21. Lipid Research Clinics Program. The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial results. I: Reduction in the incidence of coronary heart disease. *JAMA.* 1984;251(3):351-364.
22. Lipid Research Clinics Program. The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial results. II: The relationship of reduction in incidence of coronary heart disease to cholesterol lowering. *JAMA.* 1984;251(3):365-374.
23. Da Luz GM, Villela Baroncini LA, Champoski AF, Carla A, Biazon B, Isolane A, Musial DC, Précoma DB. Household cardiovascular screening in adolescents from high-risk families. *Atherosclerosis.* 2013;226(1):286-290.
24. Sarwar N, Danesh J, Eiriksdottir G, Sigurdsson G, Wareham N, Bingham S, Boekholdt SM, Khaw KT, Gudnason V. Triglycerides and the risk of coronary heart disease: 10,158 incident cases among 262,525 participants in 29 Western prospective studies. *Circulation.* 2007;115(4):450-458.
25. Sone H, Tanaka S, Tanaka S, Imuro S, Oida K, Yamasaki Y, Oikawa S, Ishibashi S, Katayama S, Ohashi Y, Akanuma Y, Yamada N; Japan Diabetes Complications Study Group. Serum level of triglycerides is a potent risk factor comparable to LDL cholesterol for coronary heart disease in Japanese patients with type 2 diabetes: subanalysis of the Japan Diabetes Complications Study (JDACS). *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(11):3448-3456.

26. Dussailant C, Serrano V, Maiz A, Eyheramendy S, Cataldo LR, Chavez M, Smalley SV, Fuentes M, Rigotti A, Rubio L, Lagos CF, Martinez JA, Santos JL. APOA5 Q97X mutation identified through homozygosity mapping causes severe hypertriglyceridemia in a Chilean consanguineous family. *BMC Med Genet.* 2012;13:106.
27. Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD, Castelli WP, Knoke JD, Jacobs DR Jr, Bangdiwala S, Tyroler HA. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease: four prospective American studies. *Circulation.* 1989;79(1):8-15.
28. Tall AR. An overview of reverse cholesterol transport. *Eur Heart J.* 1998;19(suppl A):A31-A35.
29. Van Lenten BJ, Hama SY, De Beer FC, Stafforini DM, McIntyre TM, Prescott SM, La Du BN, Fogelman AM, Navab M. Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response: loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. *J Clin Invest.* 1995; 96(6):2758-2767.
30. Navab M, Hama SY, Anantharamaiah GM, Hassan K, Hough GP, Watson AD, Reddy ST, Sevanian A, Fonarow GC, Fogelman AM. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3. *J Lipid Res.* 2000;41(9):1495-1508.
31. Navab M, Hama SY, Cooke CJ, Anantharamaiah GM, Chaddha M, Jin L, Subbanagounder G, Faull KF, Reddy ST, Miller NE, Fogelman AM. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1. *J Lipid Res.* 2000;41(9):1481-1494.
32. Miller M, Aiello D, Pritchard H, Friel G, Zeller K. Apolipoprotein A-I Zavallo (Leu159→Pro): HDL cholesterol deficiency in a kindred associated with premature coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18(8):1242-1247.
33. Takata K, Saku K, Ohta T, Takata M, Bai H, Jimi S, Liu R, Sato H, Kajiyama G, Arakawa K. A new case of Apo A-I deficiency showing codon 8 nonsense

- mutation of the Apo A-I gene without evidence of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15(11):1866-1874.
34. Miccoli R, Bertolotto A, Navalesi R, Odoguardi L, Boni A, Wessling J, Funke H, Wiebusch H, von Eckardstein A, Assmann G. Compound heterozygosity for a structural apolipoprotein A-I variant, apo A-I (L141R) Pisa, and an apolipoprotein A-I null allele in patients with absence of HDL cholesterol, corneal opacifications, and coronary heart disease. *Circulation.* 1996;94(7):1622-1628.
 35. McPherson R. Remnant cholesterol: "Non-(HDL-C + LDL-C)" as a coronary artery disease risk factor. *J Am Coll Cardiol.* 2013;29;61(4):437-439.
 36. Frost PH, Havel RJ. Rationale for use of non-high density lipoprotein cholesterol rather than low-density lipoprotein cholesterol as a tool for lipoprotein cholesterol screening and assessment of risk and therapy. *Am J Cardiol.* 1998;81(4A):26B-31B.
 37. Cui Y, Blumenthal RS, Flaws JA, Whiteman MK, Langenberg P, Bachorik PS, Bush TL. Non-high-density lipoprotein cholesterol level as a predictor of cardiovascular disease mortality. *Arch Intern Med.* 2001;161(11):1413-1419.
 38. Vega GL, Grundy SM. Does measurement of apolipoprotein B have a place in cholesterol management? *Arteriosclerosis.* 1990;10(5):668-671.
 39. Abate N, Vega GL, Grundy SM. Variability in cholesterol content and physical properties of lipoproteins containing apolipoprotein B-100. *Atherosclerosis.* 1993;104(1-2):159-171.
 40. Lipid Research Clinics Program Epidemiology Committee. Plasma lipid distributions in selected North American populations: the Lipid Research Clinics Program Prevalence Study. *Circulation.* 1979;60(2):427-439.
 41. Franklin SS, Khan AS, Wong ND, Larson MG, Levy Dis. Pulse Pressure Useful in Predicting Risk for Coronary Heart Disease? The Framingham Heart Study. *Circulation.* 1999;100(4):354-360.

42. Huxley R, Woodward M. Cigarette smoking as a risk factor for coronary heart disease in women compared with men: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Lancet*. 2011;378(9799):1297-1305.
43. Bertola ML, Allison MA, Manson JE, Freiberg MS, Kuller LH, Solomon AJ, Limacher MC, Johnson KC, Curb JD, Wassertheil-Smoller S, Eaton CB. Risk Factors for Sudden Cardiac Death in Post-Menopausal Women. *J Am Coll Cardiol*. 2012;60(25):2674-2682.
44. U.S. Department of Health and Human Services. The health benefits of smoking cessation. A Report of the Surgeon General. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health. DHHS pub. No. (CDC) 90-8416, Washington, D.C.: U.S. Department of Health and Human Services, 1990.
45. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2012;35 Suppl 1:S64-S71.
46. Abbott RD, Donahue RP, Kannel WB, Wilson PW. The impact of diabetes on survival following myocardial infarction in men vs women: the Framingham Study. *JAMA*. 1988;260(23):3456-3460.
47. Fox CS. Weighty Matters: Balancing Weight Gain with Cardiovascular Risk among Patients with Type 1 Diabetes on Intensive Insulin Therapy. *Circulation*. 2012;127(2):157-159.
48. Kuwahara M, Ishigami J, Shikuma S, Akita W, Mori Y, Asai T, Tsukamoto Y, Adachi S, Noda Y, Rai T, Uchida S, Sasaki S. Type II Diabetes Mellitus Is a Risk Factor for Heart Failure in Pre-Dialysis Patients. *Ther Apher Dial*. 2012;16(6):541-547.
49. Meisinger C, Heier M, Landgraf R, Happich M, Wichmann HE, Piehlmeier W. Albuminuria, cardiovascular risk factors and disease management in subjects with type 2 diabetes: a cross sectional study. *BMC Health Serv Res*. 2008;8:226.

50. Khosravi A, AkhavanTabib A, Golshadi I, Dana Siadat Z, Bahonar A, Zarfeshani S, Alikhasi H, Rezaee S, Noori F, HashemiJazi M, Khosravi Z. The relationship between weigh and CVD risk factors in a sample population from central Iran (Bades on IHHP). *ARYA Atheroscler*. 2012;8(2):82-89.
51. Dudina A, Cooney MT, Bacquer DD, Backer GD, Ducimetière P, Jousilahti P, Keil U, Menotti A, Njølstad I, Oganov R, Sans S, Thomsen T, Tverdal A, Wedel H, Whincup P, Wilhelmsen L, Conroy R, Fitzgerald A, Graham I. Relationships between body mass index, cardiovascular mortality, and risk factors: a report from the SCORE investigators. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2011;18(5):731-742.
52. Shiraev T, Barclay G. Evidence based exercise - Clinical benefits of high intensity interval training. *Aust Fam Physician*. 2012;41(12):960-962.
53. Balducci S, Zanuso S, Fernando F, Fallucca S, Fallucca F, Pugliese G. Physical activity/exercise training in type 2 diabetes. The role of the Italian Diabetes and Exercise Study. *Diabetes Metab Res Rev*. 2009; Suppl 1:S29-S33.
54. Newcomer SC, Thijssen DH, Green DJ. Effects of exercise on endothelium and endothelium/smooth muscle cross talk: role of exercise-induced hemodynamics. *J Appl Physiol*. 2011;111(1):311-320.
55. Ho SS, Dhaliwal SS, Hills AP, Pal S. The effect of 12 weeks of aerobic, resistance or combination exercise training on cardiovascular risk factors in the overweight and obese in a randomized trial. *BMC Public Health*. 2012;12:704.
56. Lambrinoudaki I, Ceasu I, Depypere H, Erel T, Rees M, Schenck-Gustafsson K, Simoncini T, Tremollieres F, van der Schouw YT, Pérez-López FR. EMAS position statement: Diet and health in midlife and beyond. *Maturitas*. 2013;74(1):99-104.
57. Wennberg M, Tornevi A, Johansson I, Hörnell A, Norberg M, Bergdahl IA. Diet and lifestyle factors associated with fish consumption in men and women: a study of whether gender differences can result in gender-specific confounding. *Nutr J*. 2012;11:101.

58. Bosomworth NJ. Practical use the Framingham risk score in primary prevention: Canadian perspective. *Can Fam Physician*. 2011;57(4):417-423.
59. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation*. 1998;97(18):1837-1847.
60. NCEP (2001) Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*. 2001;285(19):2486–2497.
61. US Preventive Services Task Force. Aspirin for the prevention of cardiovascular disease: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med*. 2009;150(6):396–404.
62. Kannel WB, McGee D, Gordon T. A general cardiovascular risk profile: The Framingham Study. *Am J Cardiol*. 1976;38:46-51.
63. Anderson KM, Wilson PWF, Odell PM, Kannel WB. An update coronary risk profile. A stament for health professionals. *Circulation*. 1991;83(1):356-362.
64. Grundy S, Pasternak R, Greenland P, Smith S Jr, Fuster V. Assessment of cardiovascular risk by use of multiple-risk-factor assessment equations: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology. *Circulation*. 1999;100:1481-1492.
65. Conroy RM, Pyörälä K, Fitzgerald AP, Sans S, Menotti A, de Backer G. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE Project. *Eur Heart*. 2003;24(11):987-1003.
66. García-Ortiz L, Gómez-Marcos MA, González-Elena LJ, Rodríguez-Sánchez E, García García Á, Parra-Sánchez J, González García AM, Herrero Rodríguez C, Melón Barrientos L. Framingham-Grundy, REGICOR y SCORE en la estimación del riesgo cardiovascular del paciente hipertenso. Concordancias y discrepancias (CICLO-RISK). *Hipertensión (Madr.)* 2006;23(4):111-117.

67. Fredrickson, DS; Lees, RS. "A system for phenotyping hyperlipoproteinemia" *Circulation*. 1965;31:321–327.
68. Fredrickson DS. An international classification of hyperlipidemias and hyperlipoproteinemias. *Ann Intern Med*. 1971;75(3):471-472.
69. Zeller T, Blankenberg S, Diemert P. Genomewide association studies in cardiovascular disease. An update 2011. *Clin Chem*. 2012;58(1):92-103.
70. Chait A. Secondary hyperlipidemia. *J Clin Pathol Suppl (Assoc Clin Pathol)*. 1973;5:68-71.
71. Farnier M, Bruckert E. Severe familial hypercholesterolemia: current and future management. *Arch Cardiovasc Dis* 2012;105(12):656-665.
72. Klemp P, Halland AM, Majoos FL, Steyn K. Musculoskeletal manifestations in hyperlipidemia: a controlled study. *Ann Rheum Dis*. 1993;52(1):44-48.
73. Soria LF, Ludwig EH, Clarke HRG. Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100. *Proc Nat Acad Sci*. 1989;86(2):587-591.
74. Pullinger CR, Hennesy LK, Chatterton JE. Familial ligand defective apolipoprotein B: identification of a new mutation that decreases LDL receptor binding affinity. *J Clin Invest*. 1995;95(3):1125-1134.
75. Harrison TR. Principios de Medicina Interna (13ª edición).1994. Capítulo 344. Madrid: Ediciones Iberoamericana-Mc Graw-Hill.
76. Rose HG, Kranz P, Weinstock M, Juliano J, Haft JI. Inheritance of combined hyperlipoproteinemia: evidence for a new lipoprotein phenotype. *Am J Med*. 1973;54:148-160.
77. Naukkarinen J, Ehnholm C, Peltonen L. Genetics of familial combined hyperlipidemia. *Curr Opin Lipido*. 2006;17(3):285-290.

78. Yuan G, Al-Shali KZ, Hegele RA. Hypertriglyceridemia: its etiology, effects and treatment. *CMAJ*. 2007;176(8):1113-1120.
79. Brahm A, Hegele RA. Nutrients. Hypertriglyceridemia. *Nutrients*. 2013;22;5(3):981-1001.
80. Gofman JW. Diet and Lipotropic Agents in Atherosclerosis. *Bull N Y Acad Med*. 1952;28(5):279–329.
81. Georgiadou D, Chroni A, Vezeridis A, Zannis VI, Stratikos E. Bipphysical analysis of apolipoprotein E3 variants linked with development of type III hyperproteinemia. *PLoSOne*. 2011;6(11):e27037.
82. Simons J. The \$10 billion pill. *Fortune*. 2003;147:58-62.
83. Baigent C, Keech A, Kearney PM, Blackwell L, Buck G, Pollicino C, Kirby A, Sourjina T, Peto R, Collins R, Simes R; Cholesterol Treatment Trialists (CTT) Collaborators. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet*. 2005;366(9493):1267–1278.
84. Robinson JG. Models for describing relations among the various statin drugs, low-density lipoprotein cholesterol lowering, pleiotropic effects and cardiovascular risk. *Am J Cardiol*. 2008;101(7):1009-1015.
85. Whayne TF Jr. Problems and Possible Solutions for Therapy with Statins. *Int J Angiol*. 2013;22(2):75-82.
86. Chong PH, Seeger JD, Franklin C. Clinically relevant differences between the statins: implications for therapeutic selection. *Am J Med*. 2001;111(5):390-400.
87. Maggo SD, Kennedy MA, Clark DW. Clinical implications of pharmacogenetic variation on the effects of statins. *Drug Saf*. 2011;34(1):1-19.

88. Sirtori CR, Mombelli G, Triolo M, Laaksonen R. Clinical response to statins: Mechanism(s) of variable activity and adverse effects. *Ann Med*. 2012;44(5):419-432.
89. Getz GR, Reardon CA. Apoprotein E as a lipid transport and signaling protein in the blood, liver, and artery wall. *J Lipid Res*. 2009; 50(Suppl):S158-S161.
90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>(SNP and GENE database)
91. Li H, Dhanasekaran P, Alexander ET, Rader DJ, Phillips MC, Lund-Katz S. Molecular mechanisms responsible for the differential effects of apoE3 and apoE4 on plasma lipoprotein cholesterol levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(4):687-693.
92. Khan TA, Shah T, Prieto D, Zhang W, Price J, Fowkes GR, Cooper J, Talmud PJ, Humphries SE, Sundstrom J, Hubacek JA, Ebrahim S, Lawlor DA, Ben-Shlomo Y, Abdollahi MR, Slioter AJ, Szolnoki Z, Sandhu M, Wareham N, Frikke-Schmidt R, Tybjærg-Hansen A, Fillenbaum G, Heijmans BT, Katsuya T, Gromadzka G, Singleton A, Ferrucci L, Hardy J, Worrall B, Rich SS, Matarin M, Whittaker J, Gaunt TR, Whincup P, Morris R, Deanfield J, Donald A, Davey Smith G, Kivimaki M, Kumari M, Smeeth L, Khaw KT, Nalls M, Meschia J, Sun K, Hui R, Day I, Hingorani AD, Casas JP. Apolipoprotein E genotype, cardiovascular biomarkers and risk of stroke: systematic review and meta-analysis of 14,015 stroke cases and pooled analysis of primary biomarker data from up to 60,883 individuals. *Int J Epidemiol*. 2013;42(2):475-492.
93. Bennet AM, Di Angelantonio E, Ye Z, Wensley F, Dahlin A, Ahlbom A, Keavney B, Collins R, Wiman B, de Faire U, Danesh J. Association of apolipoprotein E genotypes with lipid levels and coronary risk. *JAMA*. 2007;298(11):1300-1311.
94. Thompson JF, Hyde CL, Wood LS, Paciga SA, Hinds DA, Cox DR, Hovingh GK, Kastelein JJ. Comprehensive whole-genome and candidate gene analysis for response to statin therapy in the Treating to New Targets (TNT) cohort. *Circ Cardiovasc Genet*. 2009;2(2):173-181.

95. Baptista R, Rebelo M, Decq-Mota J, Dias P, Monteiro P, Providência LA, Silva JM. Apolipoprotein E epsilon-4 polymorphism is associated with younger age at referral to a lipidology clinic and a poorer response to lipid-lowering therapy. *Lipids Health Dis.* 2011;10:48.
96. Medina MW. The Relationship Between HMGCR Genetic Variation, Alternative Splicing, and Statin Efficacy. *Discov Med.* 2010;9(49):495-499.
97. Burkhardt R, Kenny EE, Lowe JK, Birkeland A, Josowitz R, Noel M, Salit J, Maller JB, Pe'er I, Daly MJ, Altshuler D, Stoffel M, Friedman JM, Breslow JL. Common SNPs in HMGCR in micronesians and whites associated with LDL-cholesterol levels affect alternative splicing of exon13. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(11):2078-2084.
98. Istvan ES, Palnitkar M, Buchanan SK, Deisenhofer J. Crystal structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase: insights into regulation of activity and catalysis. *EMBO.* 2000;19(5):819-830.
99. Trompet S, de Craen AJ, Postmus I, Ford I, Sattar N, Caslake M, Stott DJ, Buckley BM, Sacks F, Devlin JJ, Slagboom PE, Westendorp RG, Jukema JW;PROSPER Study Group. Replication of LDL GWAs hits in PROSPER/PHASE as validation for future pharmacogenetic analyses. *BMC Med Genet.* 2011;12:131.
100. Yoshida K, Takano J, Ishizu Y, Lezhava A, Ieiri I, Maeda K, Hayashizaki Y, Sugiyama Y Direct and rapid genotyping of SLCO1B1 388A>G and 521T>C in human blood specimens using the SmartAmp-2 method. *AAPS J.* 2013;15(2):618-622.
101. Maeda K, Sugiyama Y. Impact of genetic polymorphisms of transporters on the pharmacokinetic, pharmacodynamic and toxicological properties of anionic drugs. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2008;23(4):223–235.
102. Niemi M, Pasanen MK, Neuvonen PJ. Organic anion transporting polypeptide 1B1: a genetically polymorphic transporter of major importance for hepatic drug uptake. *Pharmacol Rev.* 2011;63(1):157–181.

103. Wilke RA, Ramsey LB, Johnson SG, Maxwell WD, McLeod HL, Voora D, Krauss RM, Roden DM, Feng Q, Cooper-Dehoff RM, Gong L, Klein TE, Wadelius M, Niemi M; Clinical Pharmacogenomics Implementation Consortium (CPIC). The clinical pharmacogenomics implementation consortium: CPIC guideline for SLCO1B1 and simvastatin-induced myopathy. *Clin Pharmacol Ther.* 2012;92(1):112-117.
104. Zhang W, Chen BL, Ozdemir V, He YJ, Zhou G, Peng DD, Deng S, Xie QY, Xie W, Xu LY, Wang LC, Fan L, Wang A, Zhou HH. SLCO1B1 521T-->C functional genetic polymorphism and lipid-lowering efficacy of multiple-dose pravastatin in Chinese coronary heart disease patients. *Br J Clin Pharmacol.* 2007;64(3):346-352.
105. Guengerich PF. Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolisms and toxicity. *APPS Journal* 2006;8(1) Article 1.
106. Becker ML, Visser LE, van Schaik RH, Hofman A, Uitterlinden AG, Stricker BH. Influence of genetic variation in CYP3A4 and ABCB1 on dose decrease or switching during simvastatin and atorvastatin therapy. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 2010;19(1):75-78.
107. Rosales A, Alvear M, Cuevas A, Saavedra N, Zambrano T, Salazar LA. Identification of pharmacogenetic predictors of lipid-lowering response to atorvastatin in Chilean subjects with hipercolesterolemia. *Clin Chim Acta* 2009;413(3-4):594-501.
108. Kajinami K, Brousseau ME, Ordovas JM, et al. CYP3A4 genotypes and plasma lipoprotein levels before and after treatment with atorvastatin in primary hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* 2004;93(1):104-107.
109. Teslovich TM, Musunuru K, Smith AV, Edmondson AC, Stylianou IM, Koseki M, et al. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature* 2010;466(7307):707-713.

110. Chasman DI, Giulianini F, MacFadyen J, Barratt BJ, Nyberg F, Ridker PM. Genetic determinants of statin low-density lipoprotein cholesterol reduction: the Justification for the Use of Statins in Prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin (JUPITER) trial. *Circ Cardiovasc Genet*. 2012; 5(2):257-264.
111. Colhoun HM, Betteridge DJ, Durrington PN, Hitman GA, Neil HA, Livingstone SJ, Thomason MJ, Mackness MI, Charlton-Menys V, Fuller JH; CARDS investigators. Primary prevention of cardiovascular disease with atorvastatin in type 2 diabetes in the Collaborative Atorvastatin Diabetes Study (CARDS): multi centre randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2004; 364(9435):685-696.
112. Sever PS, Dahlöf B, Poulter NR, Wedel H, Beevers G, Caulfield M, Collins R, Kjeldsen SE, Kristinsson A, McInnes GT, Mehlsen J, Nieminen M, O'Brien E, Ostergren J; ASCOT Investigators. Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower than average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): a multicenter randomized controlled trial. *Drugs*. 2004;64Suppl 2:43-60.
113. Sheperd J, Blauw GJ, Murphy MBBollen EL, Buckley BM, Cobbe SM, Ford I, Gaw A, Hyland M, Jukema JW, Kamper AM, Macfarlane PW, Meinders AE, Norrie J, Packard CJ, Perry IJ, Stott DJ, Sweeney BJ, Twomey C, Westendorp RG; PROSPER study group. PROspective Study of Pravastatin in the Elderly at Risk. Pravastatin in elderly at risk of vascular disease (PROSPER): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2002; 23;360(9346):1623-1630.
114. Donnelly LA, van Zuydam NR, Zhou K, Tavendale R, Carr F, Maitland-van der Zee AH, Leusink M, de Boer A, Doevendans PA, Asselbergs FW, Morris AD, Pearson ER, Klungel OH, Doney AS, Palmer CN. Robust association of the LPA locus with low-density lipoprotein cholesterol lowering response to statin treatment in a meta-analysis of 30,467 individuals from both randomized control trials and observational studies and association with coronary artery disease outcome during statin treatment. *Pharmacogenet Genomics*. 2013;23(10):518-525.

115. Van Schie RM, Verhoef TI, Boejarat SB, Schalekamp T, Wessels JA, le Cessie S, Rosendaal FR, van der Meer FJ, de Boer A, Maitland-van der Zee AH. Evaluation of the effect of statin use on the acenocoumarol and phenprocoumon maintenance dose. *Drug Metabol Drug Interact.* 2012;27(4):229-234.
116. Franco D, Henao Y, Monsalve M, Gutiérrez F, Hincapie J, Amariles P. Hypolipidemic agents drug interactions: approach to establish and assess its clinical significance. Structured review. *Farm Hosp.* 2013;37(6):539-557.
117. Chauvin B, Drouot S, Barrail-Tran A, Taburet AM. Drug-drug interactions between HMG-CoA reductase inhibitors (statins) and antiviral protease inhibitors. *Clin Pharmacokinet.* 2013;52(10):815-831.
118. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972;18(6):499-502.
119. <http://www.who.int>
120. Dichgans M, Malik R, König IR, Rosand J, Clarke R, Gretarsdottir S, Thorleifsson G, Mitchell BD, Assimes TL, Levi C, Odonnell CJ, Fornage M, Thorsteinsdottir U, Psaty BM, Hengstenberg C, Seshadri S, Erdmann J, Bis JC, Peters A, Boncoraglio GB, März W, Meschia JF, Kathiresan S, Ikram MA, McPherson R, Stefansson K, Sudlow C, Reilly MP, Thompson JR, Sharma P, Hopewell JC, Chambers JC, Watkins H, Rothwell PM, Roberts R, Markus HS, Samani NJ, Farrall M, Schunkert H; the METASTROKE Consortium; the CARDIoGRAM consortium; the C4D consortium; the International Stroke Genetics Consortium; Collaborators/second tier of authors. Shared Genetic Susceptibility to Ischemic Stroke and Coronary Artery Disease: A Genome-Wide Analysis of Common Variants. *Stroke.* 2014;45(1):24-36.
121. Prins BP, Lagou V, Asselbergs FW, Snieder H, Fu J. Genetics of coronary artery disease: genome-wide association studies and beyond. *Atherosclerosis.* 2012;225(1):1-10.

122. Foody JM. Familial Hypercholesterolemia: An Under-recognized but Significant Concern in Cardiology Practice. *Clin Cardiol.* 2014;37(2):119-125.
123. Pajukanta P, Terwilliger JD, Perola M, Hiekkalinna T, Nuotio I, Ellonen P, Parkkonen M, Hartiala J, Ylitalo K, Pihlajamäki J, Porkka K, Laakso M, Viikari J, Ehnholm C, Taskinen MR, Peltonen L. Genomewide scan for familial combined hyperlipidemia genes in Finnish families, suggesting multiple susceptibility loci influencing triglyceride, cholesterol, and apolipoprotein B levels. *Am J Hum Genet.* 1999;64(5):1453-1463.
124. Barber MJ, Mangravite LM, Hyde CL, Chasman DI, Smith JD, McCarty CA, Li X, Wilke RA, Rieder MJ, Williams PT, Ridker PM, Chatterjee A, Rotter JI, Nickerson DA, Stephens M, Krauss RM. Genome-wide association of lipid-lowering response to statins in combined study populations. *PLoS One.* 2010;5(3):e9763. doi: 10.1371/journal.pone.0009763.
125. Deshmukh HA, Colhoun HM, Johnson T, McKeigue PM, Betteridge DJ, Durrington PN, Fuller JH, Livingstone S, Charlton-Menys V, Neil A, Poulter N, Sever P, Shields DC, Stanton AV, Chatterjee A, Hyde C, Calle RA, Demicco DA, Trompet S, Postmus I, Ford I, Jukema JW, Caulfield M, Hitman GA. Genomewide association study of genetic determinants of LDLc response to atorvastatin therapy: importance of Lp(a). *J Lipid Res* 2012;53(5):1000-1011.
126. Patel J, Abd T, Blumenthal RS, Nasir K, Superko HR. Genetics and Personalized Medicine—a Role in Statin Therapy?. *Curr Atheroscler Rep.* 2014;16(1):384.
127. Yip VL, Pirmohamed M. Expanding role of pharmacogenomics in the management of cardiovascular disorders. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2013;13(3):151-162.
128. https://www.msssi.gob.es/biblioPublic/.../docs/vol35_2_Estatinas.pdf
129. Chung JY, Cho SK, Oh ES, Lee DH, Lim LA, Jang SB, Lee YJ, Park K, Park MS. Effect of HMGCR variant alleles on low-density lipoprotein

- cholesterol-lowering response to atorvastatin in healthy Korean subjects. *J Clin Pharmacol.* 2012;52(3):339-346.
130. Medina MW, Gao F, Ruan W, Rotter JI, Krauss RM. Alternative splicing of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase is associated with plasma low-density lipoprotein cholesterol response to simvastatin. *Circulation.* 2008;118(4):355-362.
131. Krauss RM, Mangravite LM, Smith JD, Medina MW, Wang D, Guo X, et al. Variation in the 3-hydroxyl-3-methylglutaryl coenzyme a reductase genes associated with racial differences in low-density lipoprotein cholesterol response to simvastatin treatment. *Circulation* 2008;117(12):1537–1544.
132. Mangravite LM, Medina MW, Cui J, Pressman S, Smith JD, Rieder MJ, et al. Combined influence of LDLR and HMGCR sequence variation on lipid-lowering response to simvastatin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30(7):1485–1492.
133. Gelissen IC, McLachlan AJ. The pharmacogenomics of statins. *Pharmacol Res.*2013. [Epub ahead of print].
134. Medina MW, Gao F, Naidoo D, Rudel LL, Temel RE, McDaniel AL, Marshall SM, Krauss RM. Coordinately regulated alternative splicing of genes involved in cholesterol biosynthesis and uptake. *PLoS One.* 2011; 29;6(4):e19420.
135. Karvanen J, Silander K, Kee F, Tiret L, Salomaa V, Kuulasmaa K, Wiklund PG, Virtamo J, Saarela O, Perret C, Perola M, Peltonen L, Cambien F, Erdmann J, Samani NJ, Schunkert H, Evans A; MORGAM Project Genet Epidemiol. The impact of newly identified loci on coronary heart disease, stroke and total mortality in the MORGAM prospective cohorts. *Genet Epidemiol.* 2009;33(3):237-246.
136. Kindla J, Müller F, Mieth M, Fromm MF, König J. Influence of non-steroidal anti-inflammatory drugs on organic anion transporting polypeptide (OATP) 1B1- and OATP1B3-mediated drug transport. *Drug Metab Dispos.* 2011;39(6):1047-1053.

137. Brunham LR, Lansberg PJ, Zhang L, Miao F, Carter C, Hovingh GK, Visscher H, Jukema JW, Stalenhoef AF, Ross CJ, Carleton BC, Kastelein JJ, Hayden MR. Differential effect of the rs4149056 variant in SLCO1B1 on myopathy associated with simvastatin and atorvastatin. *Pharmacogenomics J*. 2012;12(3):233-237.
138. Needham M, Mastaglia FL. Statin myotoxicity: A review of genetic susceptibility factors. *Neuromuscul Disord*. 2014;24(1):4-15.
139. Link E, Parish J, Armitage L, et al. SLCO1B1 variants and statin-induced myopathy: a genomewide study. *N Engl J Med*. 2008;359(8):1-11.
140. Stewart A. SLCO1B1 Polymorphisms and Statin-Induced Myopathy. *PLoS Curr*. 2013 Dec 4;5.
141. Voora D, Shah SH, Spasojevic I, et al. The SLCO1B1*5 genetic variant is associated with statin-induced side effects. *J Am Coll Cardiol* 2009;54(17):1609-1616.
142. De Keyser CE, Peters BJ, Becker ML, Visser LE, Uitterlinden AG, Klungel OH, Verstuyft C, Hofman A, Maitland-van der Zee AH, Stricker BH. The SLCO1B1 c.521T>C polymorphism is associated with dose decrease or switching during statin therapy in the Rotterdam Study. *Pharmacogenet Genomics*. 2014;24(1):43-51.
143. Lee HK, Hu M, Lui S, Ho CS, Wong CK, Tomlinson B. Effects of polymorphisms in ABCG2, SLCO1B1, SLC10A1 and CYP2C9/19 on plasma concentrations of rosuvastatin and lipid response in Chinese patients. *Pharmacogenomics*. 2013 Aug;14(11):1283-94. doi: 10.2217/pgs.13.115.
144. Hubacek JA, Dlouha D, Adámková V, Lanska V, Ceska R, Vrablik M. Possible gene-gender interaction between the SLCO1B1 polymorphism and statin treatment efficacy. *Neuro Endocrinol Lett*. 2012;33Suppl 2:22-25.
145. Mazzotti DR, Singulane CC, Ota VK, Rodrigues TP, Furuya TK, De Souza FJ, Cordeiro BG, De Oliveira Amaral CM, Chen ES, Jacomini A, De

- Arruda Cardoso Smith M, Borsatto-Galera B. Association of APOE, GCPII and MMP9 polymorphisms with common diseases and lipid levels in an older adult/elderly cohort. *Gene* 2014;535(2):370-375.
146. Smalinskiene A, Petkeviciene J, Luksiene D, Jureniene K, Klumbiene J, Lesauskaite V. Association between APOE, SCARB1, PPAR α polymorphisms and serum lipids in a population of Lithuanian adults. *Lipids Health Dis.* 2013;12:120.
147. Mega JL, Morrow DA, Brown A, Cannon CP, Sabatine MS. Identification of genetic variants associated with response to statin therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(9):1310-1315.
148. Medina MW, Krauss RM. The role of HMGCR alternative splicing in statin efficacy. *Trends Cardiovasc Med.* 2009;19(5):173-177.
149. Yu CY, Theusch E, Lo K, Mangravite LM, Naidoo D, Kutilova M, Medina MW. HNRNPA1 regulates HMGCR alternative splicing and modulates cellular cholesterol metabolism. *Hum Mol Genet.* 2014;23(2):319-332.
150. Donnelly LA, Doney AS, Tavendale R, Lang CC, Pearson ER, Colhoun HM, McCarthy MI, Hattersley AT, Morris AD, Palmer CN. Common nonsynonymous substitutions in SLCO1B1 predispose to statin intolerance in routinely treated individuals with type 2 diabetes: a go-DARTS study. *Clin Pharmacol Ther.* 2011;89(2):210-216.
151. Martin NG, Li KW, Murray H, Putt W, Packard CJ, Humphries SE. The effects of a single nucleotide polymorphism in SLCO1B1 on the pharmacodynamics of pravastatin. *Br J Clin Pharmacol.* 2012;73(2):303-306.
152. Akao H, Polisecki E, Kajinami K, Trompet S, Robertson M, Ford I, Jukema JW, de Craen AJ, Westendorp RG, Shepherd J, Packard C, Buckley BM, Schaefer EJ. Genetic variation at the SLCO1B1 gene locus and low density lipoprotein cholesterol lowering response to pravastatin in the elderly. *Atherosclerosis.* 2012;220(2):413-417.

153. Fu Q, Li YP, Gao Y, Yang SH, Lu PQ, Jia M, Zhang LR. Lack of association between SLCO1B1 polymorphism and the lipid-lowering effects of atorvastatin and simvastatin in Chinese individuals. *Eur J Clin Pharmacol.* 2013;69(6):1269-1274.

Índice

Índice

Acenocumarol 55.

Acetil CoA 43.

Ácidos biliares 23.

Ácidos grasos 17, 20, 21, 32.

Agarosa 62, 63, 64, 65.

Alcohol 28, 36, 37, 38, 56, 60.

Alelos codominantes 42.

Alzheimer 42.

Aminoácido 41, 43, 119.

Antiácidos 55.

Antibióticos 55.

Antifúngicos 55.

Antiinflamatorio 29, 122.

Antioxidante 29.

APOE 41, 42, 57, 64, 67, 78, 79, 80, 81, 96, 99, 100, 102, 105, 124, 125, 126.

Apolipoproteína A-I 22.

Apolipoproteína A-II 22.

Apolipoproteína B-100 21, 22, 24, 30, 32, 35, 36, 48.

Apolipoproteína C-II 20, 21, 23, 37.

Apolipoproteína E 21, 22, 37, 41.

Arco corneal 35, 36.

Arginina 42.

Atenuador 67.

Aterosclerosis 22, 24, 28, 31, 33.

Atorvastatina 40, 47, 56, 79.

Biodisponibilidad 40,47.

Bromuro de etidio 62, 63, 64, 65

Categoría de riesgo 39.

Cebadores 62, 63, 64, 68.

Células espumosas 22, 25, 29.

Ciclosporina 55.

Cisteína 42.

Citocromo P450 40, 47.

Codones 42.

Cofactor 17, 19, 20.

Colesterol esterificado 20, 21.

Colesterol no esterificado 17, 21, 22, 23.

CYP3A4 40, 47, 57, 62, 78, 79, 82, 96, 106.

Defecto familiar apo B-100 35.

Densidad 18, 19, 20, 21, 22.

Diabetes Mellitus 26, 30, 31, 33, 36, 38, 39, 56, 71, 77, 97, 98, 108, 109, 114, 116.

Dieta 28, 32, 36, 40, 43, 120.

Digestión 62, 63, 64, 65, 66.

Digoxina 55.

Disbetalipoproteinemia 37, 48, 126.

Dislipemia mixta 37.

Dislipemias primarias 35.

Dislipemias secundarias 37.

DNA 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68.

Dominio catalítico 45, 119.

Edad 26, 27, 28, 30, 33, 34, 36, 71, 77, 80, 97, 104.

Efectos secundarios 40, 122, 129.

Émbolo 25.

Endocitosis 22.

Enfermedad aterosclerótica subclínica 32.

Enfermedad cardiovascular prematura 27.

Enterocito 20.

Enzimas pancreáticas 20.

Escualeno 43.

Estatinas 30, 33, 38, 40, 41, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 55, 56, 58, 59, 71, 79, 13, 114, 115, 117, 119, 120, 121, 122, 123, 126, 127, 128, 129, 133.

Estrías grasas 25

Evento isquémico 56, 84.

Exón 42, 44, 45, 119, 120, 127.

Factores de riesgo cardiovascular 26, 32, 38, 41, 113.

Farmacocinética 41, 45.

Farmacodinámica 41.

Fenotipo 34, 35, 36.

Fibratos 55.

Fibrinógeno 26, 32.

Fluorocromos 66, 68, 69.

Fluvastatina 40, 56.

Fosfolípidos 17, 18, 20, 21, 22.

Friedewald 57, 113, 114.

Glicosaminoglicanos 24.

Haplotipo 44, 45, 120, 127.

HDL nacientes 18, 20, 22, 23, 42, 43.

Hemoglobina glicosilada 31.

Hepatopatía 38.

Heterocigoto 63, 69, 79, 95, 116, 118, 121.

Hidratos de carbono 28.

Hipercolesterolemia familiar 35.

Hipercolesterolemia poligénica 36.

Hiperlipemia familiar combinada 36.

Hiperquilomicronemia 37.

Hipertensión arterial 24, 26, 29, 30, 31, 36, 56, 71, 77, 78, 85, 97.

Hipertrigliceridemia 36.

Hipertrofia ventricular izquierda 33.

Hipolipemiantes 47, 55, 104.

Hipotiroidismo 38.

HMGCR 43, 68, 78, 82, 95, 96, 103, 106, 108, 116, 119, 127.

Homocigoto 37, 63, 69, 79, 95, 116, 118.

Homocisteína 26, 32.

Índice de Masa Corporal 31, 56, 59, 77, 80, 115.

Infarto de miocardio 33.

Inhibidores de la proteasa 55.

Insulina 30, 31.

Intercambiabilidad 60, 64.

Kringle 48.

Lecitina-colesterol-acil-transferasa 21, 22, 23.

Lipasa hepática 21.

Lipoproteína-lipasa 19, 20, 21, 37.

Lipoproteínas 17, 18, 19, 20, 21, 2, 23, 24, 28, 29, 34, 37, 40, 41, 42, 48, 113.

Lipoproteínas aterogénicas 29.

Longitud de onda 67.

Lovastatina 40, 47, 56.

LPA 41, 47, 57, 67, 68, 78, 82, 106,

Macrófagos 22.

Mevalonato 40, 43, 45.

Mialgia 40, 117.

Micela 17, 18.

Microalbuminuria 31.

Miopatía 38, 40, 46, 122.

Monogénica 35, 36.

Monómero 45.

Mortalidad 31, 113.

mRNA 45, 119, 120.

Mutaciones 35.

Necrosis 25, 117.

Nefropatía 38.

Niacina 55.

Obesidad 26, 31, 36, 38, 39.

Objetivo terapéutico 38, 72, 124, 125.

PCR tiempo real 66.

PCR-RFLP 62.

Placa de ateroma 25.

Polimerasa 63, 64, 67, 68.

Polipéptido transportador de aniones orgánicos 1B1 45, 122.

Pravastatina 40, 56, 128.

Presión diastólica 30.

Presión sistólica 30.

Prevalencia 32, 35.

Prevención primaria 38, 39.

Prevención secundaria 38, 39.

Principio de medida 60.

Promotor 47.

Proteína trasferidora de ésteres de colesterol 21,

Proteína C reactiva 26, 32.

Puntuaciones de riesgo 33.

Quilomicrones nacientes 20.

Quilomicrones remanentes 18, 21, 24, 41.

Raza 26.

Reacciones de fase I 47.

Reacciones de fase II 47.

Región intrónica 44, 48, 119, 120.

Resistencia insulínica 37.

Sedentarismo 26, 28, 31, 39.

Sexo 27, 33, 71, 77, 85, 97, 113, 123, 128.

Simvastatina 40, 47, 56, 60, 79, 86, 87, 89, 122.

Síndrome metabólico 39.

SLCO1B1 45, 67, 78, 81, 96, 105, 108, 110, 117, 122, 128.

Sonda 64, 66, 67, 68, 69.

Splicing 44, 45, 119, 120, 127.

Suero 26, 31, 34, 55, 60.

Tabaquismo 26, 29, 30, 33, 34, 39, 56.

Tacrolimus 55.

Termociclador 63, 65, 67, 69.

Tetramero 45.

Transporte endógeno 22.

Transporte inverso 23, 29.

Unidad Funcional de Riesgo Vascular 55, 56, 58, 59, 95, 104, 123, 125.

Valor discriminante 55.

Verapamil 55.

VLDL remanentes 23.

Xantomas 35, 36, 37.

Xenobióticos 47.

Apéndices

Anexo 1

Las siguientes tablas muestran la media y la desviación estándar entre paréntesis de cada indicador del cambio de CT y noHDL para los homocigotos sin la variante, heterocigotos y homocigotos con la variante 1564-106A>G de *HMGR*.

CT

Tabla 36: Media y desviación estándar entre paréntesis de cada indicador respecto al colesterol total para cada genotipo en la población NAIF y NO NAIF

		HN (n=27)	HT (n=53)	HM (n=20)
NAIF	%C	-29,01 (13,38)	-21,52 (16,85)	-21,80 (14,30)
	%CM	-17,30 (7,2)	-11,76 (8,75)	-11,09 (13,67)
		HN (n=19)	HT (n=30)	HM (n=7)
NO NAIF	%C	-7,83 (15,70)	-20,31 (18,45)	-16,75 (16,29)
	%CM	-3,98 (7,84)	-10,38 (10,94)	-10,77 (6,11)

HN: homocigotos normales HT: heterocigotos HM: homocigotos mutados %C: porcentaje de cambio según la concentración final %CM: porcentaje de cambio según la concentración media

noHDL

Tabla 37: Media y desviación estándar entre paréntesis de cada indicador respecto al colesterol noHDL para cada genotipo en la población NAIF y NO NAIF

		HN (n=27)	HT (n=53)	HM (n=20)
NAIF	%C	-34,90 (18,14)	-26,4 (19,72)	-26,49 (21,61)
	%CM	-22,00 (9,93)	-16,15 (12,15)	-15,29 (16,31)
		HN (n=19)	HT (n=30)	HM (n=7)
NO NAIF	%C	-11,49 (20,07)	-24,19 (21,03)	-21,47 (21,54)
	%CM	-5,7 (10,04)	-12,85 (13,59)	-14,00 (7,25)

HN: homocigotos normales HT: heterocigotos HM: homocigotos mutados %C: porcentaje de cambio según la concentración final %CM: porcentaje de cambio según la concentración media

Anexo 2

Comparación de los datos basales de las magnitudes bioquímicas para los diferentes genotipos de la variante 1564-106A>G del gen *HMGCR*, para la población NAIF.

CT

Tabla 38: Diferencias entre los resultados de colesterol total inicial entre los tres diferentes genotipos de la variante *HMGCR* c.1564-106A>G

	Media (s)	p
AA (n=27)	7,55 (1,24)	0,304
AG(n=53)	7,08 (1,23)	
GG(n=19)	7,33 (1,46)	

s=desviación estándar p=probabilidad obtenida en los test de comparaciones

Tabla 39: Diferencias entre los resultados de colesterol total inicial entre portadores y no portadores de la variante *HMGCR* c.1564-106A>G

	Media (s)	p
AA(n=27)	7,55 (1,24)	0,174
AG+GG(n=72)	7,15 (1,29)	

s=desviación estándar p=probabilidad obtenida en los test de comparaciones

noHDL

Tabla 40: Diferencias entre los resultados de colesterol total inicial entre los tres diferentes genotipos de la variante *HMGCR* c.1564-106A>G

	Media (s)	p
AA(n=26)	6,17 (0,96)	0,160
AG(n=51)	5,74 (1,21)	
GG(n=18)	5,95 (1,54)	

s=desviación estándar p=probabilidad obtenida en los test de comparaciones

Tabla 41: Diferencias entre los resultados de colesterol noHDL inicial entre portadores y no portadores de la variante *HMGCR* c.1564-106A>G

	Media (s)	p
AA(n=26)	6,17 (0,96)	0,090
AG+GG(n=69)	5,79 (1,30)	

s=desviación estándar p=probabilidad obtenida en los test de comparaciones.

