

Facultad de Medicina
Departamento de Medicina



Tesis Doctoral

“MEDICINA DE PRECISIÓN: NcRNAs COMO HERRAMIENTA DIAGNÓSTICA PARA PACIENTES CON INTOLERANCIA A ESTATINAS DE ALTO Y MUY ALTO RIESGO CARDIOVASCULAR”

Juan Sebastián Rodríguez Roca

Cádiz, 2024

UNIVERSIDAD DE CÁDIZ
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA



Tesis que, para aspirar al grado de Doctor, presenta el licenciado Don Juan Sebastián Rodríguez Roca. Dirigido por el profesor Dr. Don Alipio Mangas Rojas, Catedrático del Departamento de Medicina de la Universidad de Cádiz y la Dra. Dña. Rocío Toro Cebada, Profesora Titular del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cádiz.

Cádiz, 2024

A mi familia: mi hermana Nuria, mi padre Juan, y en especial mi madre Sebastiana, que en su entrega, amor y dedicación me ha motivado para llegar hasta aquí

AGRADECIMIENTOS

Quiero darle mi más sincero agradecimiento a todas las personas gracias a las que este trabajo ha visto la luz.

Gracias a todo el equipo de INIBICA que ha participado.

Gracias a mis compañeros del Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario Puerta del Mar de Cádiz. A la Unidad de Lípidos del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla, y la Unidad de Lípidos del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba.

Gracias a Rocío Toro, por su ayuda y haber marcado el camino en este campo de la investigación.

Y gracias, por supuesto, a mi director Alipio Mangas Rojas, por su confianza, amabilidad y apoyo incondicional que siempre he recibido.

Este trabajo ha sido posible gracias a la ayuda de la Iniciativa Territorial Integrada del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) (ITI PI0048-2017 e ITI PI0017-2019), una beca de investigación de la Sociedad Española de Cardiología para la Investigación Básica en Cardiología (PI0012-2019), Plan Propio de INIBICA (PI-INBICA 2019-13), Fundación Progreso y Salud PEER (2020-019)

Investigador y co-investigador principal: Dra Rocío Toro y Dr Alipio Mangas.

ÍNDICE

RESUMEN	2
1.ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA DE ESTUDIO	5
1.1 Epidemiología de la dislipemia y mortalidad cardiovascular	5
1.2 Colesterol y aterogénesis	7
1.3 Objetivos y tratamiento de la dislipemia	12
1.4 Efectos secundarias de las estatinas	18
1.5 Miopatía relacionada con estatinas	20
1.5.1 Factores de riesgo SMAE	22
1.5.2 Definiciones.....	24
1.5.3 Prevalencia de intolerancia a estatinas y magnitud del problema	27
1.6 LDL FACTOR ETIOLÓGICO de la ECVA. Cuanto más bajo y antes mejor.....	31
1.7 ncRNA y su papel emergente como herramienta diagnóstica.....	36
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO	40
3. OBJETIVOS	41
4. MATERIAL Y MÉTODOS	44
4.1 Población de estudio y diseño.....	44
4.2 Análisis estadístico	49
5. RESULTADOS	52
5.1 Parámetros clínicos entre pacientes IE y NIE	52
5.2 Perfil de miRNA plasmático en pacientes con IE.....	54
5.3 Estudio de validación de miRNAs y su correlación con parámetros clínicos	55
5.4 MiRNA circulante como marcador biológico del IE.....	56
5.5 Combinación de miRNAs, años de dislipidemia y c-no-HDLc para categorizar a los pacientes con IE.....	58
5.6 Enciclopedia de Kyoto de genes y análisis de enriquecimiento de ontologías génicas y rutas de genomas.....	61
6. DISCUSIÓN.....	63
7. CONCLUSIONES	76
8. ABREVIATURAS.....	79
9. BIBLIOGRAFÍA.....	83

RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares ateroscleróticas (ECVAS) son la principal causa de morbilidad y mortalidad en las poblaciones occidentales y su asociación a la dislipemia es incuestionable. Las estatinas son el tratamiento de primera elección para su control, y se consideran la piedra angular en el tratamiento de las ECVAS. Los síntomas musculares asociados a las estatinas (SMAE), son mayoritariamente un “autodiagnóstico” clínico, y el principal motivo de abandono a este tratamiento. Por ello consideramos, una necesidad prioritaria, identificar biomarcadores con precisión discriminativa para un auténtico diagnóstico de intolerancia a las estatinas (IE) en estos pacientes. Los microRNA (miRNA) se han erigido en los últimos años como unas moléculas que se ofrecen válidas en el papel de biomarcadores, implicados en la regulación de múltiples acontecimientos celulares de enfermedades cardiovasculares. En el presente estudio, evaluamos los miRNAs plasmáticos como potenciales biomarcadores para discriminar la población con IE asociada a efectos adversos musculares, con respecto a aquellos pacientes no intolerantes (NIE).

Es un estudio multicéntrico, prospectivo, y de casos y controles. Se examinaron un total de 179 miRNAs circulantes expresados diferencialmente en dos cohortes de pacientes de riesgo cardiovascular (RCV) alto y muy alto: (i) NIE ($n = 10$); (ii) IE ($n = 10$). En el screening diez miRNAs fueron identificados como sobreexpresados y validados en el plasma de IE ($n = 39$) y NIE ($n = 45$). Cinco miRNA (let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a-3p y miR-376c-3p) fueron sobreexpresados en el plasma de pacientes con IE. Proponemos una huella predictiva de tres miRNA (let-7f-5p, miR-376a-3p y miR-376c-

3p) y variables clínico-biológicas a destacar colesterol no HDL (c-no-HDL) y años de exposición a la dislipidemia, para discriminar a los pacientes con IE. Este modelo alcanza sensibilidad, especificidad y área bajo la curva (AUC) del 83,67%, 88,57 y 89,10 respectivamente. En la práctica clínica, este conjunto de miRNA combinado con variables clínico-biológicas puede discriminar entre sujetos con IE vs. NIE. Este modelo multiparamétrico puede erigirse como un potencial biomarcador diagnóstico con valor clínico en estos pacientes intolerantes y gracias a ello optimizar el tratamiento de las dislipemias.

**ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL
DEL TEMA DE ESTUDIO**

1.ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA DE ESTUDIO

1.1 Epidemiología de la dislipemia y mortalidad cardiovascular.

Las enfermedades cardiovasculares (ECV), de las que las enfermedades cardiovasculares ateromatosas (ECVAS) son el representante más relevante, afectan a la mayoría de los adultos mayores de 60 años y son la principal causa de muerte a nivel mundial. En Estados Unidos la mortalidad anual corrobora estos datos (1), y en Europa, según los últimos datos disponibles, las ECV causaron más de 3,8 millones de muertes al año, lo que representa aproximadamente 1,76 millones de muertes en hombres y más de 2 millones de muertes en mujeres. Esto correspondió al 39% de todas las muertes en hombres y al 46% de todas las muertes en mujeres (2). De forma similar en nuestro país es la principal causa de mortalidad, con unos 120.000 decesos anuales (3), aunque existe una tendencia a la ralentización y estabilización en las tasas de mortalidad entre los 2014 a 2018 (4). De las ECV, la cardiopatía isquémica encabeza la clasificación de muertes por ECV en los hombres y la enfermedad cerebrovascular en las mujeres (3).

En términos generales, en la mayoría de la población existe al menos un factor de riesgo cardiovascular (FRCV), siendo habitual la coexistencia de más de uno en una misma persona. Se calcula que los principales cinco factores de riesgo modificables (hipercolesterolemia, diabetes mellitus, hipertensión arterial, obesidad y tabaquismo), son responsables de más del 50% de la mortalidad cardiovascular, y en pacientes con al menos uno se producen mayoritariamente los episodios de cardiopatía isquémica (5-7).

El umbral de la tasa de colesterol que define una dislipidemia, es controvertido, y las sociedades científicas han publicado directrices que intentan delimitar los niveles de riesgo vascular asociado a la misma, y según ésta, cuando establecer el tratamiento dietético, la práctica de ejercicio físico programado y/o farmacológico de las dislipidemias (8).

La prevalencia de la dislipidemia aumenta en los pacientes con cardiopatía isquémica prematura, llegando a ser entre el 75 y 85%, en comparación con aproximadamente el 40 al 48%, en la población de la misma edad sin haber presentado ningún evento vascular (9, 10).

En el estudio INTERHEART, la dislipidemia definida por el cociente entre la apolipoproteína B (apo B) y la apolipoproteína A1 (apo A1), de los pacientes incluidos, que refleja la relación entre todas las lipoproteínas aterogénicas y las ateroprotectoras, representaba la mitad del riesgo cardiovascular poblacional, de presentar un infarto agudo de miocardio (IAM) (11). En el mismo sentido, se ha demostrado que los pacientes con perfiles genéticos ateroprotector, que dan lugar a una exposición de por vida, de niveles más bajos de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (cLDL), tienen un menor riesgo de IAM, revascularización coronaria o muerte por ECVAS (12).

La importancia patogénica del colesterol sérico procede en gran medida de ensayos clínicos aleatorizados (ECA), de intervención farmacológica, que han puesto de manifiesto como la reducción del colesterol total y cLDL –su mayoría con estatinas-, reduce el RCV y la mortalidad total, cuando se administran tanto en prevención primaria como secundaria (teoría lipídica) (13,14,15).

1.2 Colesterol y aterogénesis.

Los lípidos, hidrófobos, no pueden circular libremente en un medio acuoso como es el torrente sanguíneo. Para ello, precisan ser vehiculizados por unas partículas denominadas lipoproteínas, clasificadas según su gradiente de densidad, que los transportan a los tejidos para diferentes funciones tales como síntesis de energía, la esteroidogénesis, y la elaboración de ácidos biliares y de hormonas sexuales. Las lipoproteínas, contienen en su núcleo, colesterol esterificado y triglicéridos (TG), y en su capa externa o superficie, fosfolípidos, colesterol libre, y proteínas a las que se denominan apolipoproteínas. Estas últimas poseen intrínsecamente múltiples funciones, como servir de receptores celulares para un correcto metabolismo lipídico, e intervenir en los sistemas implicados en el mismo. Según su gradiente de densidad, las seis más importantes son los quilomicrones, las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), las lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), las lipoproteínas de baja densidad (LDL), las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y la Lipoproteína (a) [Lp(a)]

En la misma línea con las recomendaciones conjuntas en la Guía de la Sociedad Europea de Cardiología y de la Sociedad Europea de Arteriosclerosis (ESC/EAS) publicadas en 2016, la Guía de Práctica Clínica (GPC), publicada por estas mismas sociedades científicas en el año 2019, proporciona información adicional, proveniente de ensayos clínicos aleatorizados, observacionales, y genéticos de aleatorización mendeliana, los cuales demuestran de forma irrefutable la relación etiológica del cLDL en el desarrollo de la ECVAS. Adicionalmente, también ponen de manifiesto la importancia en la aterogénesis, de las lipoproteínas que contienen Apo B, como son, además de las LDL, las lipoproteínas ricas en triglicéridos (LRTG) (16). Así destacan que la capacidad aterogénica de las LRTG,

depende principalmente de dos factores, por una parte, de su tamaño, y por otra, su composición apoproteica, especialmente en apo C-III (17). Todas las lipoproteínas formadas por apo B, incluidas las LRTG, cuando el diámetro de su tamaño es menor de 70 nm atraviesan el endotelio, así cuando éste ha perdido su integridad, aunque de forma inicial solamente se traduzca en una disfunción endotelial, son retenidas en su superficie, una vez han interactuado con moléculas extracelulares como son los proteoglicanos (18). La apo B capturada en la pared arterial, inicia un proceso que de forma concatenada conduce a la deposición lipídica y, al inicio de la formación de la placa de ateroma (19). Además, la exposición continuada de las apo B en el endotelio, facilita el reclutamiento de otras partículas, con el consiguiente incremento del depósito de lípidos en la placa aterosclerótica. Ello, tiene implicaciones patogénicas relevantes, ya que se puede deducir, que el volumen de la placa aterosclerótica total está condicionada además de por la concentración de cLDL, por la presencia de apo B en el torrente circulatorio, y como hemos comentado el aumento de las mismas, está condicionado por la retención de dichas partículas (20). La progresión de esta carga aterosclerótica facilita la aparición de aterotrombosis que conduce a procesos isquémicos en diferentes territorios arteriales, principalmente enfermedad coronaria (EC), accidente cerebrovascular agudo (ACVA), y enfermedad vascular periférica (EVP).

Esto trae consigo la implementación de recomendaciones cardiosaludables de estilo de vida desde edades tempranas con objeto de reducir la concentración de apo B y posponer las complicaciones de la aterosclerosis. Además, justifica la necesidad de establecer un tratamiento farmacológico que permita disminuir las concentraciones de cLDL y de apo B, tanto en la prevención primaria o secundaria de nuevos accidentes vasculares (20).

Estudios poblacionales en ensayos clínicos y de aleatorización mendeliana, coinciden en demostrar una concordancia entre las concentraciones plasmáticas de cLDL y el riesgo de padecer ECVAS (20-25), ello sugiere la necesidad de la disminución de las concentraciones de cLDL y apo B, ya que la disminución de estas partículas se acompaña de una reducción de eventos cardiovasculares proporcional a su decremento (26,27).

La HDL es considerada como una lipoproteína ateroprotectora, sin embargo, en los estudios de aleatorización mendeliana el grado de concordancia entre sus concentraciones y la presencia de eventos cardiovasculares no es significativo, como tampoco se ha podido demostrar en estudios de intervención farmacológica destinados a elevar su concentración. Como consecuencia, las guías de práctica clínica no consideran a esta lipoproteína como un objetivo terapéutico (28-34).

A diferencia con las dudas anteriormente expuestas respecto la posible función antiaterogénica de las HDL y su relevancia en la práctica clínica, la Guía publicada en 2019, sí destaca la importancia de las LRTG que contienen apo B (35,36). Las LRTG vehiculizan de forma inicial triglicéridos y colesterol, posteriormente sufren una hidrólisis de los TG, por los sistemas enzimáticos Lipoprotein lipasa (LPL), y lipasa hepática, que se traduce en un predominio de colesterol como lípido transportado. Los estudios de aleatorización mendeliana y observacionales han demostrado como el aumento o la disminución de la concentración de estas partículas con su carga de colesterol transportado, colesterol remanente, tienen una concordancia significativa con un incremento o decremento de eventos cardiovasculares, como también ha sido referido que la elevación de este colesterol remanente, se asocia a fenómenos inflamatorios y que su concentración después de la ingesta (postprandial), se acompaña de un aumento de la mortalidad (37-50) .

Es muy importante destacar, a este respecto, un estudio de aleatorización mendeliana que pone de manifiesto que mutaciones genéticas que se traducen en una reducción de TG y de LDL, tienen el mismo resultado sobre la reducción de eventos cardiovasculares, monitorizando la apo B, lo que demuestra que las lipoproteínas que tienen esta apoproteína en su composición tienen el mismo efecto sobre el RCV (51).

Por ello, en la Guía de 2019, enfatiza la determinación de la apo, para estimar la carga total aterogénica de un paciente, y orientar las decisiones terapéuticas para amortiguar su RCV. Hay que recordar que todas las lipoproteínas que contienen apo B, son portadoras de una sola molécula de esta apoproteína, es decir hay una molécula de apo B por cada lipoproteína, y, además, a diferencia de otras apoproteínas, ésta no se transfiere a otra lipoproteína durante el metabolismo lipídico. Esta estabilidad metabólica, permite que su cuantificación traduzca el número total de partículas aterogénicas presentes en plasma.

Hay que señalar, que las concentraciones de cLDL, colesterol-no-HDL (c-no-HDL) y apo B muestran una correlación significativa, y como la determinación de esta última no está disponible en todos los laboratorios, el c-no-HDL, proporciona una información similar acerca del RCV, siendo recomendado su cálculo en las GPC, al poder ser obtenido de forma muy sencilla, restando al colesterol total el cHDL (52,53). Esta determinación sería especialmente indicada en situaciones como hipertrigliceridemia, diabetes mellitus tipo 2 (DM2), obesidad o niveles de cLDL bajos, ya que la determinación de cLDL puede subestimar el RCV real en estos pacientes, y por ello su determinación o en su defecto el c-no-HDL, sería indispensable en el perfil lipídico de estos pacientes.

Otra lipoproteína aterogénica es la Lp(a), estructuralmente se trata de una LDL en la cual, su apoproteína B se une a través de un puente disulfuro a la proteína a. Su estructura mantiene un alto grado de similitud a la del plasminógeno, y debido a su tamaño, de modo similar a la LRTG (< 70 nm), atraviesan el endotelio, depositándose en la íntima arterial. Su efecto se puede considerar aterotrombótico, pues la aterogenicidad que le confiere la apo B, se une el efecto trombogénico debido a su analogía con el plasminógeno. Su concentración sérica está determinada genéticamente, y en la actualidad se considera que concentraciones por encima de 50 mg/dl, se asocian a un aumento del RCV, y cifras entre 30 y 50 mg/dl, se mantiene como una zona gris, en estudio (54-56). Este efecto se ve fuertemente reforzado, en el papel causal que demuestran los estudios de aleatorización mendeliana, respecto a la concordancia de mutaciones de ganancia o de pérdida de sus concentraciones y el aumento o disminución de ECV. De hecho en algunos estudios, sus resultados muestran como concentraciones de Lp(a), por encima de 180 mg/dl, tienen un RCV similar a pacientes con una hipercolesterolemia familiar (HF) heterocigota, enfermedad de transmisión monogénica con la prevalencia más elevada de todas las enfermedades de transmisión genética hereditaria. Estos estudios adicionalmente muestran, que se precisan reducciones muy importantes de las concentraciones de Lp(a), para conseguir una reducción significativa del RCV (57,58).

1.3 Objetivos y tratamiento de la dislipemia.

Según las GPC previas y la última publicada en 2019 por la ESC/EAS, sobre el tratamiento de las dislipemias, a la hora de establecer objetivos deseables en la población, tienen un papel determinante todos los estudios de intervención con diversos fármacos hipolipemiantes, que demuestran como la reducción de ECV se asocia a una disminución de las concentraciones de cLDL, sin haberse establecido hasta la fecha, ningún valor por debajo del cual se considere perjudicial (59-61).

Los valores recomendados en las Guías de Práctica Clínica, estratificados con un RCV muy elevado, se establece un cLDL en menos de 55 mg/dl (<1,4 mmol/l), y una reducción de al menos un 50% de su valor basal. En pacientes con un RCV elevado, el objetivo es de < 70 mg/dl (<1,8 mmol/l), debiéndose también conseguir una reducción de su valor basal por debajo del 50%, y en las personas con RCV moderado una concentración de cLDL por debajo de 100 mg/dl (62,63).

La Guía no implanta objetivos para el cHDL o los TG. Para estos últimos, incide en que una concentración de 150 mg/dl (<1,7mmol/l) sería deseable, y la presencia en un paciente de valores más altos, obligaría a buscar otros factores de riesgo vascular asociados.

Según la GPC 2019, continúa existiendo una proporción inaceptablemente alta de pacientes de RCV muy alto, fuera de los objetivos recomendados, debido a intolerancia al régimen terapéutico de estatina recomendado, o a que no se alcanzan los objetivos terapéuticos deseados con monoterapia. En estos casos, se recomienda la combinación

de fármacos como ezetimibe, inhibidor de la proprotein convertase subtilisin kexin 9 (PCSK9), o ácido bempedoico, si el objetivo sigue sin alcanzarse, con la referida asociación de ezetimibe a la estatina.

En la actualidad, se dispone de un potente arsenal terapéutico hipolipemiante aprobado por la Agencia Europea del Medicamento. A continuación, haremos algunos comentarios sobre los mismos.

Las estatinas, se erigen desde hace años como la primera opción terapéutica de las dislipemias. Las estatinas reducen la síntesis de colesterol hepática por inhibición competitiva con la hidroximetilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA), enzima determinante en la síntesis de “novo” del colesterol intracelular.

En muchos pacientes constituye el único tratamiento, y se han podido clasificar en relación con su efecto reductor hipolipemiante en alta intensidad y moderada (reducción de la concentración de cLDL basal al menos en un 50%, o en un 30% respectivamente), asumiendo la existencia de una variabilidad interindividual, de etiología multifactorial, incluyendo la existencia de un perfil genético determinado, que conduce a una respuesta hipolipemiante escasa (64-66).

Las estatinas que disponemos comercializadas en España, incluyen la atorvastatina, simvastatina, fluvastatina, lovastatina y pitavastatina que son lipofílicas, y pravastatina y rosuvastatina que son hidrofílicas.

La rosuvastatina es algo más potente que la atorvastatina, y ambos agentes son significativamente más potentes que la simvastatina, pravastatina, lovastatina, y la fluvastatina (67). A las dosis máximas prescritas, la reducción del cLDL es mayor con la rosuvastatina y la atorvastatina que con las demás estatinas disponibles, aun con

diferencias entre ellas, su efecto sobre las concentraciones de TG, y HDL no es muy importante, dependiendo de sus valores basales en los primeros (68,69).

La ezetimiba inhibe la absorción por bloquear el transportador de colesterol intestinal al unirse a la proteína Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1), ello conduce a una disminución de colesterol trasvasado al hígado, que reacciona aumentando la síntesis de novo de colesterol intracelular, a través de la HMG-CoA reductasa, junto a un aumento de la expresión de receptores de LDL (LDLR) en la superficie del hepatocito, con el consiguiente aclaramiento de estas partículas por interacción con el determinante de unión de la apo B 100. La reducción media de cLDL que se consigue con ezetimiba (10 mg), es de alrededor de un 20%, existiendo variabilidad interindividual. Su asociación a una estatina incrementa su efecto reductor de forma adicional en aproximadamente un 25%, según la estatina que utilizemos, siendo deseable siempre que se pueda su asociación de forma individual o en combinación fija, por su mecanismo de acción que permite obtener un efecto hipolipemiante aditivo (70).

Los dos quelantes de ácidos biliares más conocidos, la colestiramina y el colestipol, y más recientemente el colesevelam, son resinas de intercambio que se unen a los ácidos biliares e impiden la circulación enterohepática del colesterol. El hígado, a partir de las reservas de colesterol, se ve incentivado a sintetizar más ácidos biliares hepático. A dosis máximas se ha observado una disminución del cLDL del 18-25%. Efectos significativos sobre el cHDL no se han notificado, aunque las concentraciones de triglicéridos pueden aumentar en pacientes con algún grado de predisposición. Los efectos secundarios a nivel gastrointestinal (principalmente estreñimiento, flatulencia, náuseas y dispepsia) son comunes lo que dificulta su uso en la práctica clínica, por la falta de adherencia terapéutica (71).

Los fármacos con diana en la PCSK9, como son los anticuerpos monoclonales humanos evolocumab y alirocumab, bloquean a esta proteína impidiendo su unión a la LDLR, ello evita la destrucción del receptor intracelularmente, que se recicla y vuelve de nuevo a la superficie del hepatocito, para continuar su efecto de aclaramiento de las LDL circulantes en el territorio vascular. Su efecto hipolipemiante es muy potente y consigue reducciones de cLDL solos o en combinación con estatinas de alrededor del 60%, dependiendo de la dosis utilizadas y aun superior si adicionalmente se utiliza ezetimiba (72,73%). Su efecto sobre del resto del perfil lipídico (cHDL, apo A, y TG) es también favorable en mayor medida que con las estatinas.

En pacientes con HF heterocigota, enfermedad de transmisión hereditaria dominante, con una prevalencia de 1/1000.000 de habitantes, el evinacumab, un anticuerpo humano anti proteína 3 similar a la angiopoyetina (ANGPTL3) ofrece reducciones de cLDL significativas con indicación en ficha técnica para estos pacientes, y la lomitapida un inhibidor de la PMT (proteína microsomal de transferencia), también se ha utilizado en estos pacientes, con reducción importante de cLDL y un efecto adicional favorable en el perfil lipídico (74,75).

Los fibratos, son agentes hipotrigliceridemiante que en la actualidad están muy cuestionados por su falta de efecto en la reducción del RCV. Su mecanismo de acción se efectúa a través de la activación del receptor activado del proliferador de peroxisomas (PPAR- α), que interviene en diferentes fases del metabolismo lipídico. El fenofibrato, y gemfibrozilo, consiguen reducciones de la concentración de TG de alrededor del 50%, en relación a sus valores basales. El pemafibrato, un reciente agonista PPAR- α , alcanza reducciones superiores, y de la LRTG, pero su efecto en la reducción de ECV no ha resultado satisfactorio, lo que limita su uso como agente hipolipemiante, tal y como se

ha referido (77).

Otros fármacos hipotrigliceridémiantes, son los ácidos omegas 3, sin conocerse con claridad cuál es su efecto real en el RCV. En 2019, la evidencia de los ácidos grasos n-3 se demostró en el ensayo REDUCE-IT, que demostró el beneficio adicional de consumir 4 g / día de EPA (icosapento de etilo), un profármaco purificado de eicosapentaenoico, sin docosaheptaenoico, en dosis de 2 g dos veces al día, para reducir los eventos isquémicos, muerte por ECV y posteriormente retroceso de la placa de ateroma. Aunque los resultados de los ensayos individuales son inconsistentes, los resultados de los ECA agrupados, indican un cierto efecto cardioprotector de los ácidos grasos n-3. La posible explicación de esta heterogeneidad incluye diferencias en las dosis entre los grupos, las diferencias entre los seguimientos del estudio, los tamaños de la muestra y las tasas de eventos más bajas (78).

Como nuevos enfoques terapéuticos hipocolesterolemiantes, consideramos destacables los siguientes fármacos:

El ácido bempedoico, de administración oral, ya comercializado en España, se trata de una pequeña molécula que actúa en la cascada de la síntesis del colesterol en un paso inmediatamente por encima de la HMG-CoA, inhibiendo a la ATP-citrato liasa. Su efecto hipolipemiante a dosis de 180 mg en dosis única, se traduce en un descenso de cLDL de alrededor del 28%, aumentando a un 50% en combinación fija con ezetimiba. La ausencia en el músculo, de la enzima activadora de este profármaco, evita la aparición de los efectos adversos musculares asociados a las estatinas, erigiéndose en la alternativa terapéutica de estos pacientes, intolerantes a las mismas (79).

El inclisiran, consiste en un pequeño RNA de interferencia (siRNA), que inhibe la síntesis hepática de PCSK9, y que en los ensayos realizados han demostrado una reducción de cLDL en un 50%, mediante su administración subcutánea semestral. Este efecto, se mantiene en el tiempo, sin observarse eventos adversos importantes (80,81).

Por otro lado, en relación a fármacos con un efecto reductor de las concentraciones de triglicéridos, mencionar a:

Evinacumab comentado anteriormente, es un anticuerpo monoclonal humano anti proteína 3 similar a la angiopoyetina (ANGPTL3), que estudios de aleatorización mendeliana indicaban que su deficiencia se asociaba a una reducción de la ECV, con resultados similares a los observados en las mutaciones de pérdida de función de ANGPTL3. Los ensayos clínicos realizados, ponen de manifiesto un descenso de los niveles de cLDL, TG y en menor medida de Lp(a) (82-84).

Por último, dentro de los fármacos hipotrigliceridemiantes, hay que referirse al Volanesorsen, un oligoantinucleotido que inhibe por interferencia con el RNA la síntesis de la apo C-III. Su efecto se traduce en una disminución muy importante de las concentraciones de TG y de apo C-III (70 y 80-90% respectivamente), presentando efectos beneficiosos en pacientes con síndrome de hiperquilomicronemia familiar (y estudio genético positivo) (85).

Finalmente, la GPC destaca a nuevos ensayos destinados a elevar las concentraciones de cHDL, que deben mostrar resultados favorables inicialmente de eficacia y seguridad y posteriormente de reducción de EVC (86).

1.4 Efectos secundarias de las estatinas.

Aunque en general las estatinas son bien toleradas, pueden provocar algunos efectos adversos, principalmente en el músculo, en el metabolismo de la glucosa, en el hígado, riñón y en el riesgo de ACVA hemorrágicos. No obstante, un análisis detallado de los mismos conduce a pensar que se ha realizado una generalización inexacta sobre sus posibles efectos adversos (87). Vamos a revisar los efectos secundarios, para centrarnos finalmente en los efectos adversos a nivel muscular.

-Disfunción renal: Las estatinas pueden causar proteinuria, mediante la inhibición del transporte activo de proteínas de pequeño peso molecular, en el túbulo renal. Existen varios informes remitidos a la Food and Drug Administration (FDA), sobre la asociación de proteinuria con estatinas, particularmente en pacientes que reciben simvastatina o rosuvastatina. Sin embargo, aunque se ha planteado preocupación, la información disponible sugiere que los eventos adversos renales con rosuvastatina son raros y similares a los observados con otras estatinas (88,89).

Según un estudio observacional retrospectivo, el empleo de estatinas de alta potencia se asocia con una mayor tasa de diagnóstico de deterioro renal agudo, en ingresos hospitalarios, en comparación con las estatinas de baja potencia (90).

-Disfunción hepática: Se han observado raramente episodios de lesión hepática grave, y un estudio sugirió que éstos ocurren predominantemente tras 3-4 meses de comenzar el tratamiento con estatinas. Sin embargo, la prevalencia de los mismos son similares en pacientes que toman estatinas respecto la población general. La afección de daño hepático más severo atribuido a las estatinas ha incluido lesiones hepatocelulares, colestásicas y autoinmunitarias (91,92). De hecho, la FDA recomienda realizar estudio de

la función hepática al empezar el tratamiento, y solo repetir dichas pruebas según manifestaciones clínicas sugerentes en la evolución del paciente.

-Prodiabetógenas: Se ha comprobado que los pacientes en tratamiento con estatinas tienen un riesgo aumentado de disglucemia, y desarrollo de DM2. Múltiples estudios han indicado este hecho, relacionado además con la dosis de estatina. También se ha observado una elevación, aunque no relevante, de la hemoglobina glicosilada (HbA1c). No obstante, tanto los ensayos aleatorizados como los estudios observacionales sugieren que los efectos positivos de las estatinas sobre los eventos cardiovasculares y la mortalidad, superan cualquier aumento del riesgo conferido por la promoción en el desarrollo de la diabetes (87, 93, 94). Algunos estudios indican que entre todas las estatinas, principalmente la pitavastatina, y la pravastatina tienen el perfil más favorable para el control óptimo glucémico en pacientes diabéticos tipo 2 (95, 96).

-Aumento del riesgo de accidente cerebrovascular hemorrágico: Aunque se ha descrito puntualmente esta asociación, el análisis pormenorizado de los estudios existentes resulta contradictorio y es necesario, por lo tanto, explorar mejor el riesgo de ACVA hemorrágico. No obstante, en otros tipos de accidentes cerebrovasculares (fundamentalmente isquémicos), el beneficio general de las estatinas contrarresta en gran medida este pequeño e incierto riesgo (59).

1.5 Miopatía relacionada con estatinas.

La semiología clínica asociada a las estatinas incluye mialgias, miopatía, miositis y lesión muscular. Aunque la toxicidad muscular sigue siendo una preocupación, la necrosis muscular grave que conduce a la rabdomiólisis clínica es muy rara y afecta aproximadamente al 0,1% de los pacientes (97). A diferencia con los ensayos clínicos aleatorizados, la experiencia en la práctica clínica muestra que los efectos adversos a nivel muscular son relativamente comunes y conducen a la interrupción del tratamiento con estatinas. La explicación de esta diferencia es compleja y posiblemente multifactorial, pero podría estar relacionada de forma determinante, con los criterios de inclusión en los mismos que no permiten la extrapolación de sus resultados a los efectos secundarios observados en una población general más amplia de pacientes, tal y como es en la práctica clínica rutinaria (98).

El mecanismo por el cual las estatinas causan toxicidad muscular o síntomas musculares asociados a las estatinas (SMAE) no es conocido del todo, pero se está avanzando en la comprensión de las relaciones causales, incluidos los estudios genéticos (99, 100).

-Estudios de genes candidatos implicados: Incluyen genes que desempeñan un papel en los SMAE a través de su impacto en el metabolismo de las estatinas. Estos genes incluyen variaciones en los genes del citocromo P450, incluidos CYP3A4, CYP3A5, CYP2D6 y el gen del receptor de vitamina D.

-Estudios genómicos: El gen *SLCO1B1* codifica el polipéptido transportador de aniones orgánicos 1B1 (OATP1B1) que media la absorción hepática de la mayoría de las estatinas. La variante rs4149056 *SLCO1B1* codifica para un transportador de OATP1B1 más débil y se asocia con niveles plasmáticos más altos de estatinas, en particular simvastatina y,

en menor medida, a la atorvastatina, lo que conduce a una mayor exposición sistémica y riesgo de SMAE.

-Estudios sobre Ubiquinona: Las estatinas pueden tener distintos efectos sobre la síntesis de la coenzima Q10 (también denominada ubiquinona), que ejerce un papel importante en la producción de energía de las células musculares. Se ha referido que una reducción de ubiquinona en el músculo esquelético puede contribuir a la lesión muscular inducida por estatinas, sin embargo los metaanálisis realizados en la actualidad no permite demostrar una suficiente evidencia para recomendar la utilización de suplementos de coenzima Q10 (101).

-Autoinmunidad: En la miopatía necrotizante inmunomediada por estatinas, se ha detectado la presencia de autoanticuerpos anti HMG-CoA, que pueden tener un efecto directo sobre el tejido muscular dando como resultado a mialgia, miopatía o mionecrosis (con niveles de creatina quinasa [CK] por encima de 1000 unidades internacionales / L), y necrosis de miofibras presente en la biopsia muscular. Se ha comprobado la existencia de una susceptibilidad para esta última, asociada a la presencia de HLA DR B1, y entre los pacientes que experimentan mialgia, los datos obtenidos muestran que la mialgia persistente puede resultar del estrés celular generado por la susceptibilidad del tejido muscular a padecer esta sintomatología, mediada por antígenos de histocompatibilidad (HLA) de la clase II. La base genética de SMAE está respaldada por una mayor frecuencia de polimorfismos de un solo nucleótido que se encontraron en pacientes con mialgia por estatinas (102).

-Estudios ómicos: Realizados sobre genes relacionados con la proteómica, y lipidómica, que contribuyen a la transcripción, metabolismo y niveles de metabolitos y que pueden

estar relacionados con SMAE.

1.5.1 Factores de riesgo SMAE

-Características de las estatinas: La capacidad de causar lesiones musculares parece variar entre las diferentes estatinas y según la dosis de las mismas empleadas. El riesgo de miopatía parece ser menor con fluvastatina, pravastatina y pitavastatina. Estas estatinas no son metabolizadas por el citocromo P450 3A4 (CYP3A4) y, por tanto, es menos probable que estén implicadas en interacciones farmacológicas. En el caso de la fluvastatina, el menor riesgo puede estar relacionado con la exposición sistémica mucho menor debido a su presentación de liberación prolongada.

El riesgo de lesión muscular aumenta sustancialmente cuando se toman estatinas ampliamente metabolizadas por CYP3A4 como lovastatina, simvastatina y atorvastatina (103).

b) Trastornos neuromusculares preexistentes: En algunos casos, las estatinas pueden causar nuevos trastornos neuromusculares, implicar un mayor riesgo de toxicidad, y en pacientes que probablemente habían tenido una enfermedad subclínica desarrollar una enfermedad clínicamente aparente tras comenzar el tratamiento con estatinas. Los informes sobre enfermedades neuromusculares, que se han hecho clínicamente evidentes en pacientes que toman estatinas incluyen a la miastenia gravis, miopatía mitocondrial, enfermedad de McArdle, deficiencia de maltasa ácida, deficiencia de fosforilasa b quinasa muscular, deficiencia de carnitina-palmitoil transferasa, enfermedad del músculo ondulante, distrofia miotónica tipos 1 y 2, miopatías de cuerpos citoplásmicos y hialinos (almacenamiento de miosina) , neuropatías motoras

(enfermedad de Kennedy y esclerosis lateral amiotrófica), dermatomiositis / polimiositis, miositis por cuerpos de inclusión, déficit de carnitina palmitoiltransferasa II y déficit de mioadenilato desaminasa. Concretamente, en miopatías metabólicas, se han descrito mutaciones de genes que afectan a CACNA1S, CPT2, LPIN1, PYGM y RYR1, detectándose un mayor riesgo de miopatía y/o rabdomiólisis después de la exposición a estatinas (104).

c) Entidades nosológicas diversas: Se ha demostrado un aumento de la susceptibilidad de miopatía relacionada a las estatinas en pacientes con hipotiroidismo, insuficiencia renal aguda o crónica y enfermedad hepática obstructiva. En un paciente con hipotiroidismo, la miopatía se resolvió rápidamente después de la interrupción de la pravastatina y antes de iniciar el reemplazo de la hormona tiroidea, pero en un segundo caso la miopatía persistió hasta que se reemplazó la hormona tiroidea. Estos informes sugieren que el hipotiroidismo puede predisponer al desarrollo de miopatía asociada a estatinas y que el uso de estatinas puede "desenmascarar" la miopatía hipotiroidea. Niveles muy bajos de vitamina D se han relacionado con tasas más altas de mialgia y miopatía. Se ha sugerido reponer los niveles bajos de vitamina D como un enfoque eficaz para mejorar la tolerancia a las estatinas en algunos pacientes con SMAE (104).

d) Farmacoterapia concurrente: La terapia concurrente con varios fármacos, especialmente aquellos que son inhibidores potentes del citocromo P450 (CYP3A4), o de importantes transportadores de fármacos como el OATP1B1 o la glicoproteína P 1 (P-gp), aumentarán la concentración plasmática de ciertas estatinas y potencialmente aumentarán el riesgo de SMAE. Fármacos y sustancias que inhiben CYP3A4 incluyen ciclosporina, antibióticos macrólidos, antifúngicos sistémicos, inhibidores de la proteasa del virus de la hepatitis C, incluidos regímenes potenciados con ritonavir y regímenes

mejorados con cobicistat, amiodarona y antagonistas de los canales de calcio (incluidos no dihidropiridínicos). Adicionalmente, se ha descrito que la utilización concomitante de determinados fármacos puede erigirse de forma independiente como un factor de riesgo de miopatía, así glucocorticoides, ciclosporina, daptomicina, zidovudina y colchicina, puede aumentar el riesgo de su presentación (104).

1.5.2 Definiciones.

La *National Lipid Association* (NLA) define la intolerancia a las estatinas (IE) como la incapacidad de tolerar al menos dos estatinas, una a la dosis inicial diaria más baja y otra a cualquier dosis diaria, ya sea a causa de sintomatología muscular o análisis de laboratorio anormales. Ello, relacionado temporalmente con el tratamiento con estatinas, reversible tras su suspensión, y reproducible por reinicio de la medicación, excluyendo otros factores relacionados conocidos (105).

Un documento reciente de la NLA incluye en la clasificación la intolerancia clínica como completa o parcial, en relación a la incapacidad del paciente de tolerar una dosis de estatinas para lograr los objetivos terapéuticos. Los pacientes incapaces de tolerar ninguna dosis o régimen de estatinas se clasifican como completamente intolerantes. Los pacientes capaces de tolerar una dosis más baja de estatinas, estatinas diferentes o un régimen de dosificación no convencional (por ejemplo, cada dos días o dos veces por semana) se clasifican como parcialmente intolerantes, si la dosis y el régimen tolerados son insuficientes para alcanzar los objetivos terapéuticos (106).

El *Canadian Working Group Consensus* (107), realiza una descripción más amplia de efectos secundarios incluyendo síntomas no específicos leves o efectos secundarios transitorios, tales como molestias gastrointestinales, fatiga y afectación de la piel. Incluye además efectos adversos más específicos de la estatina como son enzimas hepáticas elevadas y síntomas musculares asociados, como mialgia, rigidez y calambres. En relación a su categorización, son ampliamente aceptadas las referidas por el National Lipid Association Statin Muscle Safety Task Force de 2014 (108):

-Mialgia: Descrito como síntoma de malestar muscular, que incluye dolor muscular, rigidez, disestesia o calambres con el ejercicio o poco después de su realización, con un nivel normal de CK. La semiología clínica de la mialgia puede describirse como similar a la que se experimentaría con un síndrome viral por influenza, y se presentan típicamente como dolor muscular simétrico proximal de cintura escapular y pelviana.

-Miopatía: Debilidad muscular (no motivada por dolor), con o sin elevación de CK. Se describen impotencia funcional relacionada con la dificultad para elevar los brazos por encima de la cabeza, incorporarse de una posición sentada, o subir escaleras. El paciente suele describir estos síntomas como fatiga o cansancio. Con menos frecuencia, el malestar es asimétrico. Otros síntomas notificados incluyen calambres (incluidos nocturnos), o rigidez. Se clasifican los síntomas musculares, relacionados con estatinas como probables, posibles e improbables, basado en la distribución regional y simetría, asociación temporal con el inicio de terapia con estatinas, cambios después de su suspensión, y recurrencia tras reinicio.

-Miositis: Término que describe la inflamación muscular que se asocia habitualmente con dolor y aumento de la sensibilidad muscular. Se determina mediante una biopsia del

músculo esquelético y/o resonancia magnética.

-Mionecrosis: Elevación de las enzimas musculares, ajustado por edad, raza y sexo:

- Leve: elevación de 3 a 10 veces de los niveles basales de CK.
- Moderado: ascenso de 10 a 50 veces de los niveles basales de CK.
- Grave: ascenso de 50 veces o más de los valores basales CK.

-Rabdomiólisis clínica: Mionecrosis con mioglobinuria o deterioro de la función renal (aumento de la creatinina sérica $\geq 0,5$ mg/dl).

Un aspecto a resaltar es que, si bien el debut de los síntomas musculares suele aparecer de semanas a meses después del inicio de la terapia con estatinas, también puede ocurrir en cualquier momento durante el tratamiento. Las mialgias y la debilidad suelen resolverse y las concentraciones séricas de CK vuelven a la normalidad durante días o semanas después de la interrupción del fármaco (109).

Un problema a considerar es que en muchos pacientes será difícil establecer si los síntomas musculares se deben a la terapia con estatinas, especialmente teniendo en cuenta la variabilidad, en el tiempo de inicio y final, de un dolor muscular asociada a las estatinas.

Se ha propuesto un sistema de puntuación, el índice clínico SMAE (SMAE-IC), para los síntomas asociados a estas. La validación del sistema de puntuación mostró que una puntuación baja menor de 5 tenía un valor predictivo negativo del 91% para excluir correctamente a los pacientes con mialgia verdadera por estatinas (110). Este índice basado en los resultados del estudio STOMP (111), no ha sido validado aun en un estudio

prospectivo, pero podría ser una buena herramienta para estimar la probabilidad de asociación de molestias musculares con estatinas autodiagnosticadas, en una primera aproximación diagnóstica.

1.5.3 Prevalencia de intolerancia a estatinas y magnitud del problema.

En el estudio *Effects of Statins on Muscle Performance* (STOMP) anteriormente citado, ensayo doble ciego, se determinó la incidencia de síntomas asociados a las estatinas. Los pacientes fueron aleatorizados a atorvastatina 80 mg o placebo y fueron seguidos a través de una llamada telefónica cada dos semanas. Se detectó un aumento del doble de mialgia en los pacientes que recibieron atorvastatina en comparación con placebo (9,4% frente a 4,6%, $p = 0,054$) (111).

En el estudio observacional PRIMO, en casi 8.000 pacientes dislipémicos tratado con altas dosis de estatinas, presentó síntomas musculares el 10,5%, y concretamente el dolor muscular fue la principal causa para no poder realizar actividades físicas, incluso moderadas (112). El estudio DAMA (Defining the Appearance of Associated Myopathy), confirmó la mialgia como la presentación más frecuente en IE (113).

La mayor dificultad radica en determinar la etiología de las mialgias y, en particular, si están asociadas a una estatina y/o afecciones concurrentes como pueden ser enfermedades virales. Así, inicialmente, en el ECA ASCOT-LLA doble ciego ($n = 10.180$), la frecuencia de eventos adversos musculares no difiere entre los pacientes que toman atorvastatina 10 mg al día o placebo, pero posteriormente en la siguiente fase no aleatorizada, se detectó un incremento significativo en los pacientes que tomaban

atorvastatina 10 mg al día (1.26% por año) en comparación con placebo (1,00% anual) (114). Esta observación se atribuyó a un posible efecto nocebo, que consiste en el deterioro subjetivo de los signos o síntomas de una enfermedad, debido a la expectativa de efectos negativos de una medida terapéutica, ya sean consciente o no por parte del paciente (16).

La prevalencia de IE se calcula que alcanza hasta un 15-20% en la práctica clínica diaria, y se ha descrito como uno de los principales motivos de interrupción y mala adherencia al tratamiento (115,116). Sin embargo, como se comentó anteriormente, la incidencia de los efectos adversos musculares inducidos por estatinas es significativamente menor en los ensayos clínicos aleatorizados (ECA). Un metaanálisis de 2022 con datos de 154.664 participantes, que incluye 19 ensayos doble ciego de estatinas versus placebo (n = 123 940) y cuatro ensayos dobles ciego de un régimen de estatinas más intensivo versus uno menos intensivo (n = 30 724) sugirió que más del 90% de los SMAE no eran farmacológicos, estimándose una prevalencia de SMAE farmacológica corregida con placebo del 0,5% (117).

Un metaanálisis reciente con el objetivo de estimar la prevalencia global de IE incluyó un total de 176 estudios con 4. 143. 517 pacientes. De los 176 artículos, 112 fueron ECA (195. 575 pacientes) y los 64 restantes fueron estudios observacionales de cohortes con 3. 947. 942 pacientes. La prevalencia agrupada de IE fue del 9,1%, siendo en los ECA significativamente menor en comparación con los estudios de cohortes 4.9 vs 17% (Tabla 1). Se demostró que la edad avanzada, por encima de 65 años, el sexo femenino, la obesidad, diabetes mellitus, hipotiroidismo, enfermedad hepática crónica e insuficiencia renal crónica, el consumo de alcohol, del mismo modo que el aumento de las dosis de

estatinas y la administración concomitante de agentes antiarrítmicos se asociaron con un mayor riesgo de IE. La diferencia que existe en la prevalencia de ECA vs cohortes, sugiere que la prevalencia de la IE está sobreestimada en los datos de la vida real, pero también es posible que los ECA subestimen su presencia, al excluir en los mismos a los pacientes mayores y aquellos con comorbilidades como enfermedades musculoesqueléticas previas, enfermedades hepáticas y renales crónicas y a aquellos con valores de laboratorio anormales que pueden aumentar el riesgo de IE (118).

	Frecuencia	Rango de frecuencia	Comentarios
Estudios observacionales de cohorte	17%	14-19 %	La prevalencia de la IE está sobreestimada en los datos de la vida real, pero también es posible que los ECA subestimen su presencia, al excluir en los mismos a pacientes mayores y aquellos con comorbilidades como enfermedades musculoesqueléticas previas, enfermedades hepáticas y renales crónicas y a aquellos con valores de laboratorio anormales que pueden aumentar el riesgo de IE.
Ensayos clínicos	4,9%	4-6 %	

Tabla 1. Frecuencia de IE en estudios descriptivos vs ensayos clínicos. IE: intolerancia a estatinas. ECA: ensayo clínico aleatorizado. Derechos autor Bytyçi et al (118).

La Sociedad Europea de Arterioesclerosis, refiere que hasta un 29% del total de pacientes tratados con estatinas pueden presentar síntomas asociados con las mismas, que probablemente contribuyen de forma significativa a las elevadas tasas de abandono del tratamiento (hasta el 75%), dentro de los 2 años siguientes al inicio de su toma. Resaltar que en el 65% de los ex consumidores de estatinas, la razón principal de su interrupción,

fue la aparición sobre todo de efectos adversos musculares (119).

En consonancia con lo expresado, un metaanálisis que incluye un total de 376,162 pacientes, en alrededor del 43% de los pacientes en prevención primaria y del 24% en prevención secundaria, se puede observar que la falta de cumplimentación terapéutica a las estatinas se presenta después del año de su inicio (120). Concretamente, el dolor muscular aumenta la probabilidad de falta de adherencia, y consiguiente interrupción (121), aumentando de forma significativa el riesgo de episodios cardiovasculares y su morbimortalidad asociada (122,123).

Esta falta de adherencia e interrupción del tratamiento produce un gran impacto negativo en el beneficio que las estatinas tienen sobre la ECVA. Así, se detectó en un estudio de cohorte retrospectivo, como la intolerancia a las estatinas se asoció a un aumento cifrado en el 36% de eventos cardiovasculares recurrentes, y de un 43% de nuevos eventos de cardiopatía coronaria (124).

Del mismo modo, un metaanálisis mostró aproximadamente una disminución del 15% de riesgo de ECVA, en los pacientes que tenían una cumplimentación adecuada a las estatinas, en comparación con los que tenían escasa adherencia (125).

Por otro lado, es destacable que algunos de los síntomas que describen estos pacientes no están relacionados con el uso de estatinas, especialmente en aquellos con reacciones atípicas después de períodos largos de tratamiento (126,127). Estos falsos positivos clínicos “autodiagnosticados” en un elevado número de casos, son pacientes de alto y muy alto RCV, que presentan una elevada tasa de abandono del tratamiento con estatinas. Por ello, es de gran relevancia clínica diseñar un enfoque práctico sobre estos

pacientes que permita confirmar a los “verdaderos” IE.

1.6 LDL FACTOR ETIOLÓGICO de la ECVA. Cuanto más bajo y antes mejor.

Hemos referido anteriormente que, en la actualidad, con los resultados proporcionados por diferentes estudios, de forma muy determinante en los estudios genéticos de aleatorización mendeliana, queda absolutamente demostrada la influencia del cLDL en el RVC, considerándose un factor causal o etiológico de la ECVAS, y que, cuanto más intenso sea el descenso de esta lipoproteína, el descenso del RCV será mayor.

En todos los pacientes incluidos en el presente estudio, se han recogido datos demográficos, parámetros analíticos, factores de riesgo cardiovascular, y ECVA. En relación con estos, vamos a realizar algunos comentarios sobre el c-no-HDL y los años de dislipidemia.

El c-no-HDL, está íntimamente asociado a la dislipemia aterogénica, un cluster en donde la elevación de la concentración de TG, de las de LPRT, y disminución de las de cHDL, son componentes principales. Su prevalencia es muy elevada, y es evidente que está infradiagnósticada e infratratada (128,129).

No obstante, partiendo del papel etiológico del cLDL en la ECVA, también se ha demostrado que a pesar de tener concentraciones plasmáticas de cLDL en los objetivos indicados por diferentes sociedades científicas, mediante la implementación de las medidas terapéuticas aconsejadas, los pacientes continúan presentando un RCV elevado, denominado RCV residual de origen lipídico, especialmente aquellos estratificados como de muy alto riesgo cardiovascular, debido a otros factores lipídicos, no dependiente del cLDL, pero con una potente acción proaterogénica (130).

En este riesgo, se refleja algunos aspectos ya comentados anteriormente relacionados con las LPRT, y estudios epidemiológicos muestran la trascendencia de este riesgo residual en el RCV global (131,132). De hecho, hay resultados de ensayos de intervención post-hoc con fibratos, donde se muestran que pacientes con este perfil lipídico característico de dislipemia aterogénica, presentan una reducción del RCV (133).

El valor del c-no-HDL, se calcula sustrayendo del valor del CT, el del cHDL, es decir que refleja el colesterol vehiculado por las LDL, Lp(a), VLDL y sus remanentes, y es considerado indispensable en escenarios como DM2, síndrome metabólico u obesidad, que tienen como denominador común la presencia de resistencia a la insulina, con un perfil lipídico característico de la ya comentada Dislipemia aterogénica, erigiéndose en un marcador del RCV. Es por ello, que en estos pacientes se considera que su determinación es indispensable, o bien de la apo B (su determinación se erige en el marcador inequívoco del número total de lipoproteínas aterogénicas que tiene una persona) -dependiendo de su disponibilidad- ya que se correlacionan de forma más categórica que el cLDL en la estimación del RCV (134,135).

La situación descrita implica que en estas situaciones, con concentraciones de cLDL mas o menos normales, la determinación del cLDL puede infravalorar el RCV, al no estimar el resto de las lipoproteínas proaterogénicas, como ha podido ser demostrado (136, 137). En este sentido, las últimas Guías de endocrinología americana, consideran al c-no-HDL como un FRCV mayor, y en la estratificación de los diferentes grupos de RCV, establece un objetivo del mismo. Así mismo, hacen hincapié en su determinación en situaciones clínicas caracterizadas por aumento de TG por encima de 200 mg/dl, en pacientes diagnosticados de DM2 o con síndrome metabólico, en pacientes que hayan padecido una ECV, para estratificar su RCV, basándose en el incremento del mismo que presentan

aquellos pacientes con c-no-HDL más elevado (138,139).

Finalmente, hay que resaltar para la valoración del c-no-HDL, el documento resultante del consenso entre Sociedad Europea de Arteriosclerosis (EAS) y de la Federación Europea de Química Clínica y de Laboratorio Médico (EFLM) (140), en donde se abordan los retos presentes y futuros en el diagnóstico de laboratorio de las lipoproteínas aterogénicas. De forma concisa, recomiendan que el colesterol total, triglicéridos, cHDL, cLDL y el c-no-HDL calculado, formen el panel de lípidos básico para estimar el riesgo de ECVAS, y se puede medir sin ayunas. En el desarrollo de la guía sostienen que el cLDL es el principal objetivo de las terapias hipolipemiantes. La Lp(a) debe estimarse al menos una vez en todos los pacientes con riesgo de ECVAS, especialmente en aquellos pacientes que las concentraciones de cLDL disminuyen pobremente con estatinas. El riesgo residual de ECVAS, incluso con un tratamiento óptimo para reducir las LDL, también debe evaluarse mediante el c-no-HDL o la apo B, especialmente en pacientes con hipertrigliceridemia de leve a moderada.

Hemos comentado anteriormente que la exposición a cifras bajas de cLDL, disminuye la progresión de la placa de ateroma, y esto se traduce a lo largo de los años en menos eventos cardiovasculares (20,24). La exposición mantenida en el tiempo a concentraciones elevadas de cLDL y otras lipoproteínas que contienen apo B, por su pequeño tamaño, atraviesan el endotelio, son atrapadas en la íntima, reclutan a más lipoproteínas que quedan atrapadas, y conducen a acelerar el crecimiento progresivo de la placa de ateroma, que se traduce en una disminución en años del umbral crítico de exposición para el desarrollo de ECV, al contrario de lo que ocurre con niveles bajos de estas lipoproteínas aterogénicas (Figura 1).

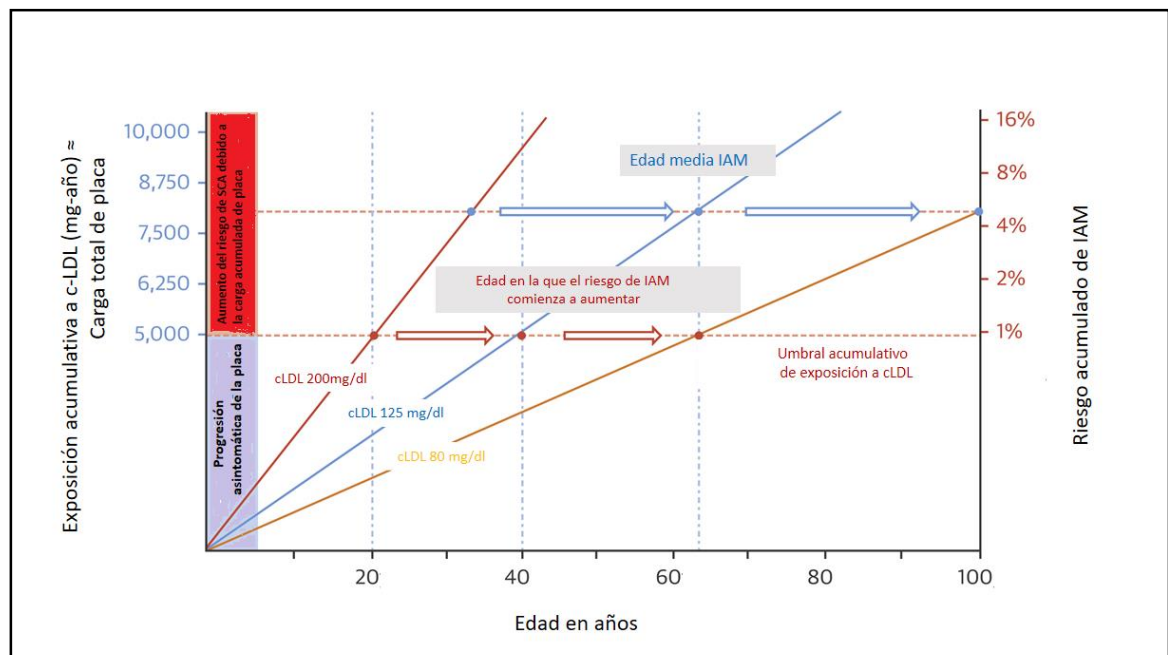


Figura 1. Efecto acumulativo de cLDL sobre el riesgo de enfermedad cardiovascular aterosclerótica. IAM: infarto agudo de miocardio. Adaptada de Ference BA (20).

Asimismo, es muy importante señalar que los polimorfismos de NPC1L1 y HMG-CoA, tienen aproximadamente el mismo efecto sobre el riesgo de eventos vasculares, cuando se miden por unidad de cLDL más bajo. Se mantiene la relación lineal de que el descenso de 1 mmol/L, produce un descenso de aproximadamente un quinto de eventos cardiovasculares. Además, cuando coexisten, los polimorfismos genéticos NPC1L1 y HMG-CoA, parecen tener efectos aditivos independientes y lineales sobre los niveles plasmáticos de cLDL, y efectos aditivos logarítmicos lineales sobre el riesgo de cardiopatía coronaria (141). Estos hallazgos sugieren fuertemente que no hay diferencia en el efecto biológico de un cLDL más bajo sobre el riesgo de enfermedad coronaria mediado por la inhibición de NPC1L1 o HMG-CoA. Por lo tanto, la reducción

del cLDL mediante la inhibición de NPC1L1 con ezetimiba, la inhibición de HMG-CoA con una estatina o la inhibición de ambos con la combinación de ezetimiba y una estatina debería reducir el riesgo de enfermedad coronaria en aproximadamente la misma cantidad por unidad de cLDL más bajo, y que la dimensión del beneficio clínico será proporcional a la magnitud absoluta de la reducción lograda en cLDL, independientemente del tratamiento que se utilice (Figura 2)

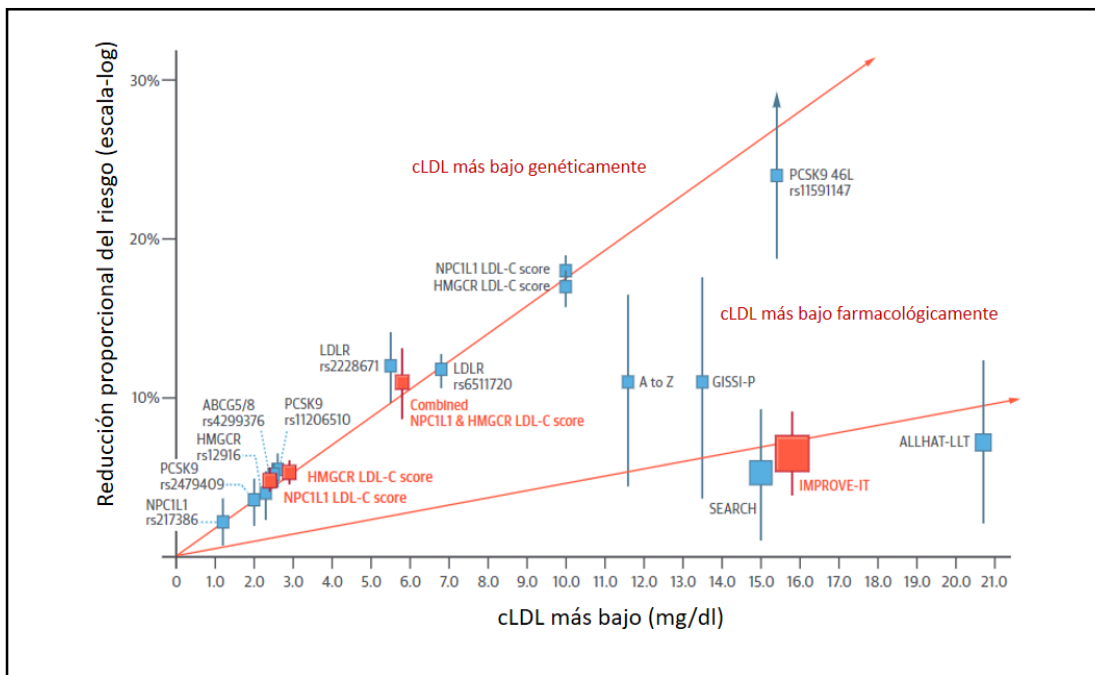


Figura 2. Asociación log-lineal entre el cLDL mediado genética y farmacológicamente y el riesgo de enfermedad coronaria. Adaptada de Ference BA (141).

En definitiva, con estos resultados, tanto por el condicionamiento genético o terapia farmacológica, cuanto antes y cuanto más bajo mejor.

1.7 ncRNA y su papel emergente como herramienta diagnóstica

En los últimos años se ha puesto de manifiesto el papel de los RNA no codificantes (ncRNA) que incluyen los microRNA (miRNA) y los RNA circulantes (circRNAs) entre otros, en el control de diferentes procesos fisiopatológicos. Los ncRNA son considerados reguladores claves del genoma humano, involucrados en todos los procesos celulares. Los miRNA son pequeños RNA no codificantes, con un tamaño de 19-25 nucleótidos, identificados como reguladores importantes de genes involucrados en varios procesos biológicos. Regulan la expresión génica degradando los RNA mensajeros, inhibiendo la síntesis de proteínas o interactuando con los RNA largos no codificantes. Sus propiedades los erigen en los RNA extracelulares más estudiados como marcadores diagnósticos, pronósticos, y terapéuticos en el campo de las ECV. Los miRNA están implicados en casi todas las vías biológicas, regulando procesos tales como la división celular, la apoptosis, la señalización intracelular, la respuesta inmune y el movimiento celular (142, 143). En humanos hay descritos hasta el momento entre 1.200 y 1.500, estimándose que los miRNAs regulan más del 60% de los genes que codifican proteínas y se utilizan en diferentes campos de la medicina. En el contexto de la enfermedad cardiovascular, un gran número de estudios proponen el uso de miRNAs circulantes a corto-medio plazo (144) como potentes biomarcadores de aterosclerosis (145,146), síndrome coronario agudo (147), insuficiencia cardíaca (148, 149), en la miocardiopatía dilatada de etiología genética (150), y como principales reguladores de los niveles de colesterol y de la homeostasis lipídica, tanto en estudios clínicos como en diferentes modelos animales. En un estudio piloto en pacientes dislipémicos tratados durante un mes con diferentes estatinas (atorvastatina o simvastatina) se demostró la influencia

sobre la expresión de un conjunto de miRNAs en las células mononucleares de sangre periférica. En los pacientes tratados con atorvastatina se evidenciaba una disminución de los niveles plasmáticos de seis miRNAs (miR-29a-3p, -29b-3p, -300, -33a-5p, -33b-5p y -454), en cambio, en pacientes tratados con simvastatina aumentaba los niveles de tres miRNAs (miR-106b-5p, -17-3p y -183-5p). Muchos de estos miRNAs regulan genes claves en el metabolismo del colesterol como HMG-CoA, LDLR, LPL, el *ATP* binding cassette transporter 1 (ABCA1), Insulin -induced gene 1 (INSIG1) o Sterol regulatory element-binding transcription factor 1 (SREBF1) (151).

Se ha demostrado que miR-29a actúa como un importante regulador de la respuesta inflamatoria y la expresión de los receptores que interactúan con la LPL (152). En estudios previos también se puso de manifiesto que los niveles séricos de determinados miRNA están elevados en pacientes hiperlipémicos, disminuyendo en los pacientes tratados con estatinas (153), y se ha asociado la sobreexpresión de miR-21 con un perfil lipídico menos aterogénico en pacientes con síndrome coronario agudo (154).

Adicionalmente, se ha relacionado también a los miRNA como marcadores de alteraciones fisiopatológicas del músculo esquelético. Los niveles del miR-133a/b y miRNA-208 se postulan como biomarcadores diferenciales de toxicidad aguda cardíaca y en músculo esquelético en ratas (155). Los niveles de expresión del miR-206, se ven aumentados con la progresión de la esclerosis lateral amiotrófica, tanto en plasma como en músculo esquelético en un modelo de ratón que expresa la superóxido dismutasa-1 humana mutada (156).

Los circRNAs, reconocen y se acoplan a los miRNA, modulando su actividad, directa o indirectamente en la expresión génica de las células (157, 158). Son varios los estudios

que proponen a los circRNAs como biomarcadores emergentes en las ECV. Vausort y colaboradores, identificaron que los niveles plasmáticos bajos del circRNA MICRA, estaban asociados con infarto de miocardio. Además, MICRA demostró ser un predictor de disfunción del ventrículo izquierdo (159). En un estudio más reciente, los pacientes con niveles bajos de MICRA en sangre periférica, en el momento de la reperfusión miocárdica, tuvieron un mayor riesgo de disfunción ventricular izquierda (160). El circRNA hsa_circ_0124644 se ha propuesto como un biomarcador de enfermedad coronaria (161). Recientemente, se ha demostrado que los niveles del circRNA ZNF609 están elevados en biopsias de rhabdomyosarcoma, y que su inhibición bloquea el ciclo celular en la fase G1/S (162).

Hasta ahora, ninguna investigación previa ha evaluado el potencial papel de los ncRNAs como biomarcadores útiles para el diagnóstico de pacientes IE, ni su potencial papel en su fisiopatología. La reconstrucción y caracterización de redes de regulación mediadas por ncRNA, es aún un campo en exploración. Recientemente, la base de datos NPInter publicó una versión actualizada que incluía casi 600.000 interacciones entre ncRNA y proteínas en humanos (163). Cruzando la información de NPInter y los perfiles específicos de expresión de nuestros pacientes, podremos identificar a aquellos ncRNAs directamente implicados en la IE y, que en una posterior valoración podrían erigirse como dianas terapéuticas. Por otro lado, la interacción del fenotipo paciente-ncRNAs, nos puede proporcionar un marco teórico para establecer, por primera vez, las asociaciones entre ncRNA y los diferentes fenotipos de nuestros pacientes (164,165). Esta estrategia de mapeado genotipo-fenotipo permitirá el desarrollo de nuevas estrategias de diagnóstico para los pacientes con IE.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Aunque estatinas son bien toleradas por la mayor parte de la población, existe una proporción significativa de pacientes con falta de adherencia, cuya principal causa son los efectos adversos musculares. No existe una prueba estándar para diagnosticar este efecto adverso. Los SMAE son un autodiagnóstico, que provocan en estos pacientes un incremento en las tasas de eventos cardiovasculares por abandono de esta terapia. Es crucial identificar una herramienta diagnóstica accesible, que detecte adecuadamente la población intolerante a estatinas.

Los miRNA son pequeños ncRNA que han sido identificados como importantes reguladores de genes involucrados en diversos procesos biológicos. Entre sus propiedades destacan ser los RNA extracelulares más estudiados, como marcadores diagnósticos y terapéuticos en las enfermedades cardiovasculares y musculoesqueléticas. Por ello, consideramos que los miRNA pueden erigirse como una herramienta determinante en el diagnóstico de los pacientes IE, por sus efectos adversos musculares.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

El objetivo general de nuestro trabajo es determinar el papel de los miRNAs como biomarcadores periféricos para identificar a la población IE.

Objetivos específicos:

1.1 Identificar una firma de miRNA circulantes que junto al fenotipo de los pacientes dislipémicos, nos permita identificar a los verdaderos pacientes con IE.

1.2 Personalizar algoritmos terapéuticos en los pacientes dislipémicos con un riesgo cardiovascular aterosclerótico alto y muy alto, que sean IE.

MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Población de estudio y diseño

Se trata de un estudio prospectivo multicéntrico de casos y controles. Los pacientes fueron reclutados en tres centros (Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz; Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla; y Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba). Los criterios de inclusión fueron pacientes mayores de 18 años con un riesgo cardiovascular alto y muy alto remitidos a la Unidad de Lípidos de estos centros. La intolerancia a las estatinas en los pacientes, se concentró en aquellos que presentaban sintomatología muscular con marcadores analíticos rutinarios normales. Se incluyeron un total de 84 pacientes consecutivos, que se dividieron en dos cohortes de alto y muy alto riesgo cardiovascular, en un grupo que presentaban intolerancia a la toma de estatinas, IE (n= 39), y una segunda cohorte con tolerancia adecuada a la toma de las mismas, NIE (n= 45). El grupo IE se definió en función de los criterios de la NLA (105). Antes de incluir a estos pacientes en el estudio, aplicamos las Guías de Manejo de Dislipemias ESC/EAS 2019, que establecen el requisito de ofrecer al paciente una estatina diferente a baja dosis, o una dosificación alternativa, cada dos días o dos veces por semana con Atorvastatina, Pitavastatina o Rosuvastatina. Todos los pacientes incluidos abandonaron la alternativa propuesta debido a la presencia de efectos adversos musculares. Los pacientes reclutados tenían un riesgo cardiovascular alto o muy alto basado en la clasificación del grado de riesgo cardiovascular de las guías ESC/EAS (16).

Se definió riesgo cardiovascular alto como aquellos individuos con:

- Colesterol total superior a 310 mg/dL o cLDL superior a 190 mg/dL o presión arterial $\geq 180/110$ mmHg.
- Pacientes con diabetes mellitus (DM), sin afectación de órganos diana, con duración DM ≥ 10 años u otro factor de riesgo adicional
- Enfermedad renal crónica (ERC) moderada, definida por una tasa de filtrado glomerular estimada (TFGe) $< 30-59$ ml/min/1,73 m².
- Un SCORE calculado $\geq 5\%$ y $< 10\%$ de riesgo de ECV mortal a los 10 años.
- HF sin otros factores de riesgo importantes

Se definió muy elevado riesgo cardiovascular en base a las Guías de Manejo de Lípidos por:

-Presencia de ECVA documentada clínicamente/o de forma inequívoca mediante imágenes.

-Pacientes con DM y daño a órganos diana con al menos factores de riesgo importantes; o inicio temprano de DM tipo 1 de larga duración (> 20 años)

- Presencia de ERC grave, definida por TFGe < 30 ml/min/1,73 m².

- Un SCORE calculado \geq del 10% de riesgo de ECV mortal a los 10 años.

- HF con ECVA o con otro factor de riesgo importante

La documentación clínica de las ECVAS incluye angina estable, síndrome coronario agudo previo (infarto de miocardio o angina inestable), procedimientos de revascularización coronaria que incluyen intervención coronaria percutánea, procedimientos de revascularización arterial o injerto de derivación de arteria coronaria,

accidente cerebrovascular isquémico, accidente isquémico transitorio, y enfermedad arterial periférica. Las afecciones consideradas para documentar explícitamente las ECVAS en las imágenes, incluyen hallazgos predictivos de eventos clínicos, como una placa significativa en la angiografía coronaria, tomografía coronaria (enfermedad coronaria multivasculosa con dos arterias epicárdicas con estenosis > 50%), o en la ecografía carotídea.

Los criterios de exclusión fueron pacientes mayores de 80 años o con marcada fragilidad, con una actividad física intensa, consumo excesivo de alcohol, síntomas musculares previos, miopatías, hipotiroidismo, enfermedades inflamatorias crónicas, autoinmunes, neoplasias u otras terapias farmacológicas que interfieren de forma determinante con las rutas metabólicas de las diferentes estatinas, así como altos niveles CK.

Se obtuvo información clínica y farmacológica detallada de cada paciente, incluyendo factores de riesgo cardiovasculares y presencia eventos vasculares previos. En el aspecto ético, a todos los pacientes se les explicó la naturaleza del estudio, incidiendo en la ausencia de beneficio particular económico o clínico para el individuo incluido en el mismo. Se insistió en la libertad de poder abandonar el estudio en cualquier momento del mismo sin perjuicio para el paciente. Se respondieron a todas las dudas de los pacientes antes de la firma del consentimiento informado por escrito. El Comité de Ética de Investigación de Cádiz aprobó el protocolo del estudio. El estudio se realizó en pleno cumplimiento de la Declaración de Helsinki II.

Tras la evaluación clínica de los pacientes y la recogida de los datos clínicos y farmacológico, a todos los pacientes se procedió a la extracción de diez mililitros de sangre periférica en tubos de ácido K2-etilendiaminotetraacético después de 10 h de

ayuno nocturno y se centrifugaron inmediatamente ($1500\times g$, 15 min, 4 °C). La sangre se procesó dentro de las 4 h posteriores al aislamiento. La capa superior que contenía plasma se dividió en alícuotas y se almacenó a -80 °C hasta un análisis adicional.

A todos los pacientes se les realizó un análisis de laboratorio estándar que incluía el perfil tiroideo, renal, lipídico, glucémico y hepático en sangre, así como la CK.

Para el aislamiento del RNA y su posterior análisis se recurrió al grupo de investigación CO27 de INIBICA cuyo responsable es la Dra. Rocío Toro. El RNA total se extrajo de 200 μL de plasma utilizando el *miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit* (Qiagen, Hilden, Alemania). Como control interno se utilizó un protocolo común en el que tras la extracción, se añaden 3,5 μL de *miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Control* ($1,6 \times 10^8$ copias/ μL del imitador de *miRNA* de *C. elegans* miR-39) como control interno. El RNA se eluyó en 20 μL de agua libre de RNasa.

Para evaluar los niveles de expresión de los miRNA y los perfiles de los grupos IE y NIE, se utilizaron *arrays* prediseñados para estudios cardiovasculares de 179 especies de miRNAs presentes en el suero humano utilizando *miRCURY LNA RT Kit* (Qiagen, Hilden, Alemania). La transcripción inversa se realizó con un kit denominado *miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit* (Qiagen) que realiza la amplificación cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) y *Human Serum/Plasma Focus, miRCURY LNA miRNA Focus PCR panels* (Quiagen, Hilden, Alemania). Los valores del umbral de ciclo bruto (Cq) se calibraron entre placas utilizando UniSp3. Los Cqs por encima de 35 ciclos fueron corregidos al nivel mínimo observado para cada miRNA. Como miRNA de limpieza para la normalización de datos, seleccionamos el par de miRNAs expresados de manera más estable (miR-148a-3p y let-7b-5p) según lo determinado por el algoritmo Normfinder (166). En consecuencia, cada

miRNA individual se normalizó como $\Delta Cq = \text{media} (Cq_{\text{miR-148a-3p}} \text{ y } \text{let-7b-5p}) - Cq_{\text{miRNA}}$. Los niveles de miRNA se transformaron logarítmicamente antes de ser utilizados en los análisis estadísticos. Todos estos procedimientos son pasos estándares realizados con anterioridad en el grupo CO27 de INIBICA.

Tras la realización del screening para ejecutar la validación, cada miRNA candidato seleccionado se cuantificó utilizando paneles de PCR personalizados *miRCURY LNA miRNA* (Qiagen, Hilden, Alemania). Así, según los protocolos utilizados con anterioridad por este grupo de investigación, el RNA se transcribió inversamente utilizando el *miRCURY LNA RT Kit* (Qiagen, Hilden, Alemania). La qRT-PCR se realizó utilizando *miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit* (Qiagen, Hilden, Alemania), como se describió anteriormente y las curvas de amplificación se evaluaron con el software CFX Manager™ (BioRad). La especificidad de la amplificación fue corroborada por el análisis de la curva de fusión.

Seguidamente tras validar los miRNAs se procedió a realizar el análisis de interacción miRNAs-mRNA. Se utilizó la base de datos miRNet (<https://www.mirnet.ca>, consultada el 9 de noviembre de 2021) y se estudiaron los miRNAs seleccionados para determinar los genes diana o *targets*. Para ello se procedió a acceder a la base de datos miRNet e identificar cual era la función biológica del miRNA, utilizando un análisis de enriquecimiento de ontología génica (GO) (<http://geneontology.org/>). Esta base de datos continuamente cambiante se consultó el 9 de noviembre de 2021 (167). Asimismo se analizó con el mismo fin la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto (KEGG) <http://www.genome.jp/kegg> (168). La base de datos Search Tool for the

Retrieval of Interacting Genes (STRING) (<http://www.string-db.org/>) (169) se utilizó para analizar las redes de interacción proteína-proteína.

El software en línea miRNet (<https://www.mirnet.ca>), se utilizó para predecir los genes objetivo y construir la red reguladora miRNA-RNA. La herramienta WebGesalt (170), se realizó para el análisis de términos de la vía KEGG y GO. Se emplearon el análisis del término GO para determinar la participación de los 5 miRNAs expresados diferencialmente en procesos biológicos y enfermedades.

4.2 Análisis estadístico

Todas las variables continuas, se expresan como media \pm desviación estándar. Por su parte las variables categóricas se expresan como frecuencia y porcentaje de pacientes (%). Los valores atípicos se identificaron a través del método Rout, utilizando un $Q = 1\%$. El método Rout se ha desarrollado para identificar *outliers* en las regresiones no lineales. La distribución normal de cada variable se confirmó con la prueba de Shapiro-Wilk. Este test contrasta la normalidad de un conjunto de datos. Para realizar las comparaciones entre los grupos de los niveles de miRNAs se utilizaron pruebas de rango no paramétricas de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis para variables continuas. Posteriormente se realizó un análisis de las diferencias entre los grupos mediante el análisis de varianza para confirmar si los resultados son estadísticamente significativos. Se estableció el nivel significancia en $p < 0.05$. Posteriormente se dibujaron las curvas ROC, que caracterizan el desempeño diagnóstico de los miRNAs candidatos y los modelos de regresión logística para determinar el área bajo la curva (AUC) y la especificidad y sensibilidad de los puntos de corte óptimo. De forma que, el área bajo la

curva ROC oscila entre 0.5 y 1. Cuando el modelo binario puede separar perfectamente las clases, entonces el área bajo la curva ROC se aproxima a 1. Las curvas ROC se generaron trazando la sensibilidad frente a la 1-especificidad. Los datos se presentaron como el AUC y los intervalos de confianza del 95%. Los cambios en *los valores p* de sus variables fueron evaluados por la prueba de Wald y una razón de verosimilitud. Para todos los análisis se utilizó el paquete de software estadístico R (Team RC. R: Un lenguaje y un entorno para la computación estadística. <https://www.r-project.org>, consultado el 9 de noviembre de 2021).

Finalmente se realizó un proceso para valorar la capacitación realizándose una validación cruzada de 10 veces utilizando la herramienta de minería de datos Waikato environment for knowledge analysis (Weka). Esta herramienta facilita el procesamiento de conjuntos de datos complejos a través de algoritmos de modelado y herramientas de análisis de datos. Estos algoritmos están categorizados en varios grupos principales entre los que destacan los algoritmos de clasificación. Estos incluyen arboles de decisión, redes neuronales, y máquinas de vectores de soporte.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Parámetros clínicos entre pacientes IE y NIE

En el estudio se reclutaron 84 pacientes, 39 pacientes con IE y 45 pacientes NIE como grupo control. Las características demográficas, clínico/biológicas y el tratamiento recibido en los pacientes de las dos cohortes IE y NIE se muestran en las tablas 2 y 3.

VARIABLES	NIE	IE	p valor
n	45	39	
Demografía			
Edad (años)	66.6 ± 11.5	63.6 ± 10.9	NS
Sexo (femenino,%)	31	61.5	0.01
FRCV y Enfermedades vasculares ateromatosas			
Dislipemia (años)	5.6 ± 6.3	9.1 ± 7.5	0.003
Hipertensión (%)	73	41	0.006
Diabetes Mellitus (%)	38	20.5	NS
ECVA (%)	71	13	< 0.001
Enfermedad renal crónica (%)	18	12.8	NS
Perfil analítico			
Glucemia basal	118.5 ± 36.2	110 ± 44.6	NS
c-no-HDL (mg/dL)	104.9 ± 32.7	169.9 ± 63.5	< 0.001
Triglicéridos (mg/dL)	151.7 ± 97.4	164 ± 93	NS
MDRD-4 (mL/min)	76.5 ± 25.6	82 ± 31.6	NS
Transaminasa GOT (U/L)	23.1 ± 13	23.5 ± 8	NS
Transaminasa GPT (U/L)	27.3 ± 23	24.6 ± 18.9	NS
CK (U/L)	82.8 ± 40.4	165.9 ± 14.7	NS

Tabla 2. Demografía basal, características clínicas y datos de laboratorio de la población con NIE y IE. Los datos se presentan como media ± DS para variables continuas y como porcentaje para variables categóricas. ECVA: enfermedad cardiovascular aterosclerótica, CK: creatina quinasa; MDRD-4: tasas de filtración glomerular; c-no-HDLc: colesterol no HDL; IE: intolerante a las estatinas; NIE: No intolerante a las estatinas; NS: No significativo. Tomada y adaptada con permiso de Alipio Mangas y Rocío Toro de: Int J Mol Sci. 2022 Jul 24; 23(15):8146 (171)

Variables	NIE	IE	p valor
n	45	39	
Medicación			
IECA (%)	11	2.5	NS
ARAI (%)	67	33.3	0.004
ADO (%)	33	18	NS
Insulina (%)	11	10.5	NS
Diuréticos (%)	51	18	0.003
BCC (%)	31	18	NS
Beta-bloqueantes (%)	62	15.4	< 0.001
Alfa-bloqueantes (%)	22	5	0.03
Aspirina (%)	64	18	< 0.001
Acenocumarol (%)	7	7.6	NS
Inhibidores de PCSK9: Evolocumab (%)	13	7.6	NS
Inhibidores de PCSK9: Arilcumab (%)	11	2.5	NS
Atorvastatina 40 mg (%)	20	-	
Atorvastatina 80 mg (%)	15.5	-	
Rosuvastatina 10 mg (%)	17.7	-	
Rosuvastatina 20 mg (%)	35.5	-	
Pitavastatina 4 mg (%)	6.6	-	
Simvastatina 40 mg (%)	4.4	-	
Fenofibrato (%)	18	7.6	NS
Omega-3 (%)	-	5.1	
Colesevelam (%)	-	2.5	
Colestiramina (%)	-	12.8	
Armolid plus (%)	-	41.0	
Ezetimiba 10 mg (%)	42	38	NS

Tabla 3. Tratamiento de la población con NIE y IE. Los datos se presentan como porcentaje. IECA: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; ARAII: bloqueadores de los receptores de angiotensina II; BCC: bloqueadores de los canales de calcio; ADO: medicamentos antidiabéticos orales; PCSK-9: Proprotein Convertase Subtilisin Kexin 9; IE: intolerante a las estatinas. NIE: No intolerante a las estatinas; NS: No significativo. Tomada y adaptada con permiso de Alipio Mangas y Rocío Toro de: Int J Mol Sci. 2022 Jul 24;23(15):8146 (171).

Considerando los grupos, las mujeres IE (61,5%) fueron significativamente más frecuentes ($p = 0,01$); siendo la población masculina mayoría en la población NIE, representando la población femenina el 31% en el grupo de NIE. No hubo diferencias

significativas en cuanto a la edad. La presencia de, los años de dislipidemia (DLP) ($p=0,003$) y la presión arterial alta ($p= 0,006$) fueron significativamente diferentes entre las cohortes.

Es importante señalar que la concentración plasmática c-no-HDL mostró diferencias significativas entre los grupos IE y NIE ($p < 0,001$).

Al considerar la ingesta de medicamentos, el consumo de ARA II ($p = 0,004$), diuréticos ($p = 0,003$), beta bloqueante ($p < 0,001$), alfa bloqueante ($p = 0,03$) y aspirina ($p < 0,001$) fue significativamente diferente entre las cohortes de IE y NIE. En cuanto a la terapia hipolipemiente, la cohorte NIE fue principalmente tratada con Rosuvastatina y, en menor grado, con Atorvastatina. El grupo IE fue tratado con fármacos hipolipemiantes alternativos, de forma mayoritaria con ezetimiba, pero nueve pacientes se negaron a la implementación de cualquier opción terapéutica propuesta.

5.2 Perfil de miRNA plasmático en pacientes con IE

Para evaluar si los miRNAs plasmáticos se expresaron diferencialmente entre los grupos, primero analizamos un panel de 179 miRNAs circulantes, comúnmente encontrados en plasma humano en diez pacientes con IE y diez NIE. Los criterios establecidos para la selección de candidatos a miRNA fueron altos niveles de expresión (mediana de Cq < 35 y detectada en al menos el 80% de todas las muestras) y significación estadística ($p < 0,05$). Un total de 10 miRNAs, let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-128-3p, miR-186-5p, miR-30e-3p, miR-376a-3p, miR-376c-3p, miR-543 y miR-574-3p, se expresaron significativamente de acuerdo con los criterios de selección y se eligieron para su posterior análisis.

5.3 Estudio de validación de miRNAs y su correlación con parámetros clínicos

Validamos estos diez miRNAs en 45 individuos con NIE y 39 IE para confirmar la fuerza diagnóstica en discriminar pacientes con NIE e IE. Nuestros resultados mostraron que let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a-3p y miR-376c-3p fueron significativamente sobreexpresados en el plasma de la cohorte IE con respecto a la de NIE (Figura 3).

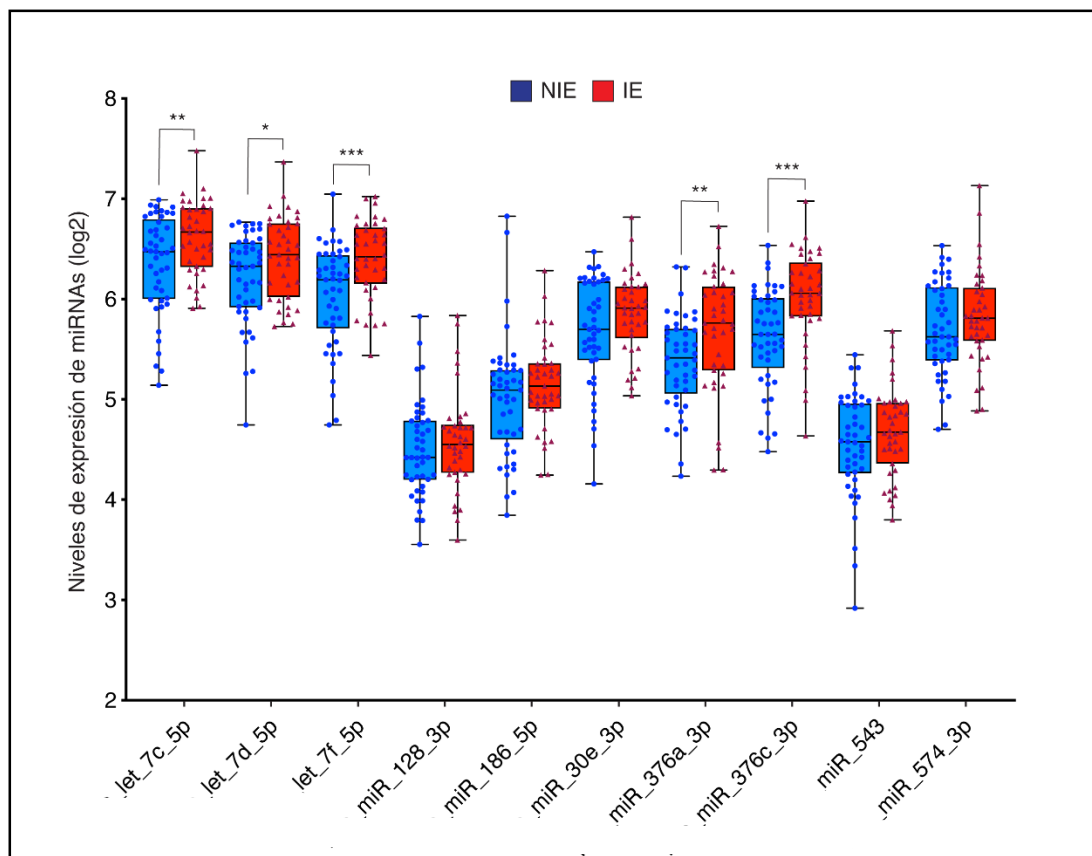


Figura 3. Representación gráfica de los niveles de expresión de miRNA en cohortes NIE e IE. Los datos se representan en log2 como la media \pm DS. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$. NIE: no intolerante a las estatinas; IE: intolerante a las estatinas. Tomada y adaptada con permiso de Alipio Mangas y Rocío Toro de: Int J Mol Sci. 2022 Jul 24;23(15):8146 (171).

Posteriormente se investigó la asociación entre los miRNAs sobreexpresados diferencialmente y parámetros clínico-biológicos, años de dislipemia y c-no-HDL, que mostraron, como se refirió anteriormente, diferencias estadísticamente significativas entre las dos cohortes de nuestro estudio, no encontrándose una correlación significativa entre las mismas (Tabla 4).

microRNAs	Cohorte IE			
	DLP (años de evolución)		c-no-HDL (mg/dL)	
	Pearson r	p	Pearson r	p
Let-7c-5p	-0.164	0.281	0.177	0.244
Let-7d-5p	-0.079	0.603	0.226	0.131
Let-7f-5p	-0.136	0.368	0.168	0.266
miR-376a-3p	-0.173	0.250	0.103	0.498
miR-376c-3p	-0.265	0.079	0.176	0.248

Tabla 4. Correlación entre DLP, c-no-HDLc y los microRNA en pacientes con IE. DLP: años de dislipidemia; c-no-HDL: Colesterol no HDL; IE: intolerante a las estatinas. Coeficiente significativo para $p < 0,05$. Tomada y adaptada con permiso de Alipio Mangas y Rocío Toro de: Int J Mol Sci. 2022 Jul 24;23(15):8146 (171)

5.4 MiRNA circulante como marcador biológico del IE

Evaluamos la capacidad de los miRNAs circulantes expresados diferencialmente para distinguir entre pacientes IE y NIE utilizando el AUC-ROC. De forma separada, miR-376c-3p alcanzó el AUC más alto con un valor de 0,736 (IC del 95%: 0,627–0,845; $p < 0,001$), lo que indica un rendimiento moderado. Let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p y miR-376a-3p muestran valores de AUC de 0.652, 0.627, 0.688 y 0.682, respectivamente (figura 4A). Posteriormente, consideramos el potencial diagnóstico del conjunto 5-miRNA para

diferenciar entre individuos IE y NIE. El AUC para el valor de combinación de nuestro panel miRNA (let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a-3p y miR-376c-3p) fue de 0,936 (IC del 95%: 0,887–0,985; $p < 0,001$) (Figura 4B), mejorando la capacidad diagnóstica. La sensibilidad, especificidad y precisión de cada miRNA y del panel de 5 miRNA se muestran en la tabla 5.

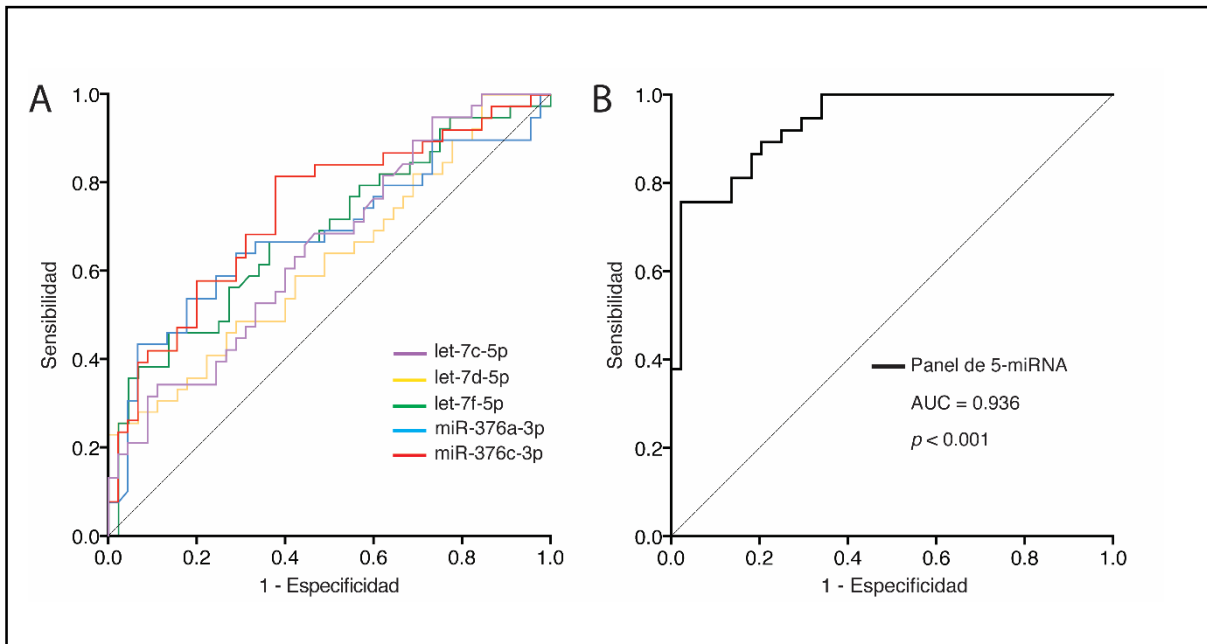


Figura 4. Curvas ROC para evaluar el rendimiento predictivo de miRNAs expresados diferencialmente para discriminar entre IE vs. NIE. **(A)** Curva ROC del valor individual para let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a-3p y miR-376c-3p. **(B)** Curva ROC del valor del panel combinado de los 5-miRNA. AUC: área bajo la curva; miRNA: microRNA. Tomada y adaptada con permiso de Alipio Mangas y Rocío Toro de: Int J Mol Sci. 2022 Jul 24;23(15):8146 (171).

miRNA	AUC (95% IC)	Sensibilidad %	Especificidad %	Precisión %	p valor
Let-7c-5p	0.652 (0.535 - 0.770)	61.70	55.56	59.04	0.017
Let-7d-5p	0.627 (0.507 - 0.747)	52.63	58.70	55.95	0.046
Let-7f-5p	0.688 (0.573 - 0.803)	60,53	64.44	62.65	0.003
miR-376a-3p	0.682 (0.563 - 0.800)	68,89	64.10	66.67	0.004
miR-376c-3p	0.736 (0.627 - 0.845)	70.45	64.10	67.47	< 0.001
Panel de 5-miRNA	0.936 (0.887 - 0.985)	81.25	84.85	82.72	< 0.001

Tabla 5. Valor diagnóstico de los miRNAs expresados individualmente y del panel compuesto de los 5-miRNA (let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a-3p y miR-376c-3p) como biomarcadores para categorizar a los pacientes intolerantes a las estatinas. AUC: área bajo la curva; IC: intervalo de confianza; miRNA: microRNA. Tomada y adaptada con permiso de Alipio Mangas y Rocío Toro de: Int J Mol Sci. 2022 Jul 24;23(15):8146 (171)

5.5 Combinación de miRNAs, años de dislipidemia y c-no-HDLc para categorizar a los pacientes con IE

Investigamos el valor potencial de los miRNAs seleccionados como candidatos para discriminar entre las dos cohortes, y su asociación con parámetros clínico-biológicos de nuestros pacientes. De ellos, solo los años de dislipidemia y el c-no-HDL, fueron significativamente más elevados en los pacientes con IE (Figura 5A, B). Evaluamos el potencial de estos dos parámetros clínicos para distinguir entre ambos grupos. Las curvas ROC de estos factores, años de dislipidemia y c-no-HDL, mostraron valores de AUC de 0,700 y 0,807, respectivamente, lo que indica un rendimiento moderado para discriminar entre pacientes con IE de pacientes NIE, mientras que la combinación de estos dos parámetros alcanzó un valor de AUC de 0,844 (Figura 5C y tabla 6). Desarrollamos un modelo multivariante para aumentar el poder diagnóstico para discriminar entre IE vs NIE combinando miRNAs expresados diferencialmente, años de

dislipidemia y/o niveles plasmáticos de c-no-HDL. El rendimiento diagnóstico del panel de 5-miRNA solo mejoró ligeramente con DLP ya que, aunque el valor de AUC fue similar, este modelo logró una precisión del 84,81% frente al 83.12% mostrado por el panel de 5-miRNA con el c-no-HDL (Figura 5D). En contraste, la capacidad diagnóstica del conjunto de 5-miRNA y la concentración de c-no-HDL fue menor que la del panel de 5-miRNA por sí mismo, mostrando un valor de AUC de 0.88. Sin embargo, la combinación del panel 3-miRNA compuesto por let-7f-5p, miR-376a-3p y miR-376c-3p, y años de dislipidemia junto con el valor del c-no-HDLc, alcanzó el mayor rendimiento diagnóstico con un AUC de 0.954 y una precisión de 89.47% (Figura 5D y tabla 6).

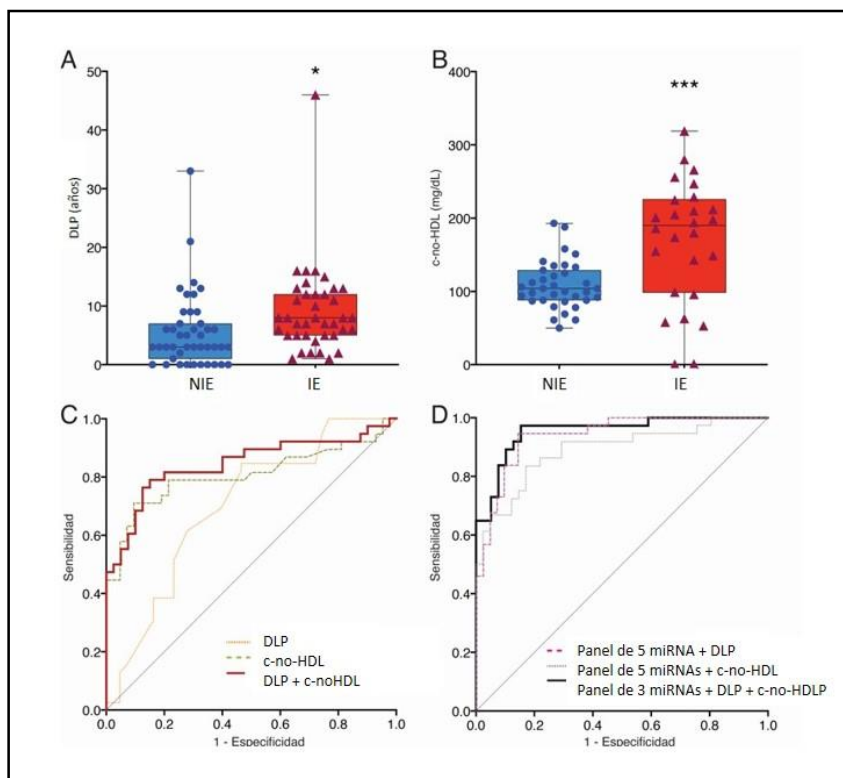


Figura 5. Representación de la evaluación del rendimiento predictivo de factores clínicos con miRNAs. **(A)** Representación gráfica de DLP en sujetos NIE, en azul ($n = 45$) e IE en rojo ($n = 39$). **(B)** Representación gráfica de los niveles c-no-HDLc en sujetos NIE, en azul ($n = 45$) e IE en rojo ($n = 39$). **(C)** Curvas ROC para cada parámetro clínico/biológico, DLP y c-no-HDL, de forma individual y compuesta. **(D)** Curvas ROC del valor combinado del panel 5-miRNA con DLP, 5-miRNA con c-no-HDL y panel de 3-miRNA (let-7f-5p, miR-376a-3p y miR-376c-3p) combinado con DLP y c-no-HDL. DLP: años de evolución de dislipidemia IE: intolerante a las estatinas; NIE: no intolerante a las estatinas; c-no-HDLc: colesterol no HDL. * $p < 0,05$; *** $p < 0,005$. Tomada y adaptada con permiso de Alipio Mangas y Rocío Toro de: Int J Mol Sci. 2022 Jul 24; 23(15):8146 (171)

Modelo multiparamétrico	AUC (95% IC)	Sensibilidad %	Especificidad %	Precisión %	p valor
DLP (años)	0.700 (0.587 - 0.814)	57.89	60.00	58.54	0.017
c-no-HDL (mg/dL)	0.807 (0.703 - 0.911)	77.08	84.38	80.00	< 0.001
DLP + c-no-HDL	0.844 (0.751 - 0.937)	79.55	85.29	82.05	< 0.001
Panel de 5-miRNA + DLP	0.940 (0.892 - 0.989)	85.71	83.78	84.81	< 0.001
Panel de 5-miRNA + c-no-HDL	0.889 (0,814 - 0.964)	85.00	81.08	83.12	< 0.001
Panel de 3-miRNA + DLP + c-no-HDL	0.954 (0.911 - 0.998)	89.74	89.19	89.47	< 0.001

Tabla 6. Evaluación del potencial de los parámetros clínico/biológicos (DLP y c-no- HDL) y de los modelos multivariantes como biomarcadores de IE. AUC, área bajo la curva; IC: intervalo de confianza. DLP: años de dislipidemia; miRNA: microRNA; c-no-HDLc: colesterol no HDL. Tomada y adaptada con permiso de Alipio Mangas y Rocío Toro de: Int J Mol Sci. 2022 Jul 24;23(15):8146 (171).

A continuación, utilizamos la herramienta de minería de datos Weka para evaluar el rendimiento de nuestro modelo utilizando la validación cruzada 10 veces mayor. Ejecutamos todos los clasificadores en Weka y, el algoritmo más exitoso fue Ada Boost M1 logrando una precisión media, sensibilidad, especificidad, MCC y AUC de 86%, 83.67%, 88.57%, 0.714 y 0.891, respectivamente (Figura 6).

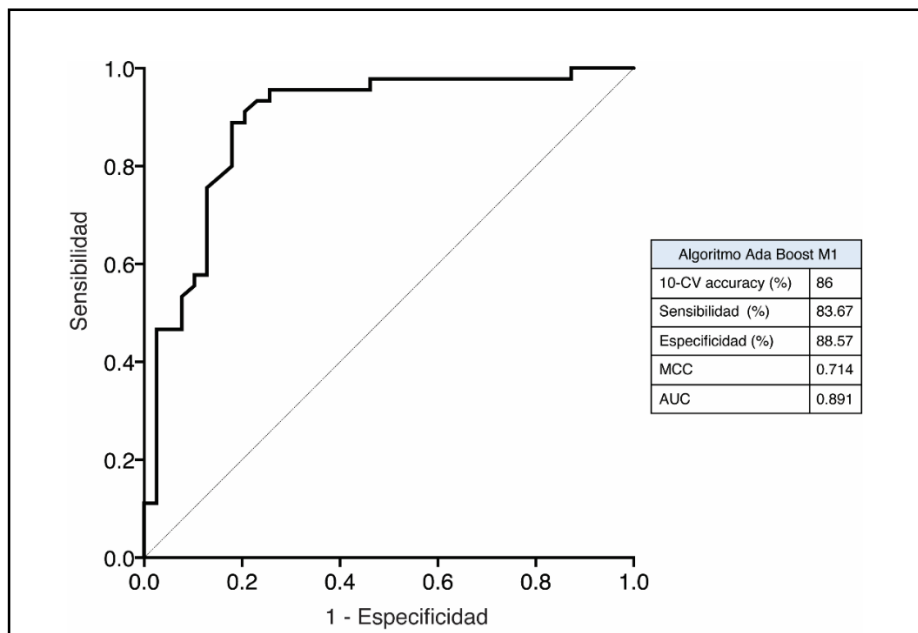


Figura 6. Curva ROC obtenida en la prueba de validación cruzada de 10 veces para panel de 3 miRNA + DLP + c-no-HDL (Ada Boost M1). Tomada y adaptada con permiso de Alipio Mangas y Rocío Toro de: Int J Mol Sci. 2022 Jul 24;23(15):8146 (171).

5.6 Enciclopedia de Kyoto de genes y análisis de enriquecimiento de ontologías génicas y rutas de genomas

A continuación, investigamos la importancia biológica de los cinco miRNAs expresados diferencialmente utilizando el enriquecimiento de GO y el análisis de la vía KEGG. Utilizamos el software en línea miRNet (<https://www.mirnet.ca>, consultado el 9 de noviembre de 2021) para predecir los objetivos supuestos de let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a-3p y miR-376c-3p. Los let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a-3p y miR-376c-3p se asociaron con 516, 394, 397, 112 y 84 miRNAs en la base de datos miRNet, respectivamente. Un objetivo de RNAm, IGF1-R, fue compartido por estos cinco miRNAs. El análisis GO utilizando la herramienta computacional WebGesalt mostró un enriquecimiento significativo de los procesos biológicos relacionados con la respuesta al factor de crecimiento nervioso y el desarrollo de dendritas, el ciclo celular, el silenciamiento génico y la respuesta al factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), entre otros. El análisis de la vía KEGG mostró varias vías, las más significativas de las cuales son la vía de señalización p53, los miembros de Forkhead de la vía de señalización de la clase O (FoxO) (172, 173), y la resistencia al inhibidor de la tirosina quinasa EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico). Finalmente, el análisis de enriquecimiento de la enfermedad identificó que estos cinco miRNAs podrían estar involucrados en procesos como miopatía mitocondrial y DM2, entre otros.

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

Las estatinas son la estrategia principal del tratamiento hipolipemiante y han demostrado ampliamente sus beneficios tanto en la prevención cardiovascular primaria como en la secundaria con ECVA establecida (16, 59). Aunque generalmente se toleran bien, las tasas de falta de adherencia terapéutica son altas, estimándose que alrededor del 43% de los pacientes en prevención primaria y del 24% en prevención secundaria no realizan una cumplimentación adecuada a las estatinas después del año de su inicio (120). La razón principal son los efectos adversos musculares, y sus consecuencias un aumento drástico de la mortalidad y morbilidad cardiovascular (122-125).

Consideramos que la identificación de los pacientes con IE es fundamental para lograr los objetivos establecidos por las guías de práctica clínica, y amortiguar la elevación del RCV de estos pacientes (16). Estos, aunque minoritarios en la población general, precisan un abordaje diferente para atenuar el impacto de su intolerancia y consiguiente aceleramiento del proceso aterosclerótico a lo largo de los años. Es una realidad que el diagnóstico clínico de IE tiene en la mayoría de las ocasiones limitaciones dado que no hay una semiología clínica específica para poder sospechar quién presentará esta circunstancia. La miotoxicidad se expresa de forma muy heterogénea, y el fenotipo que incluye de forma aislada a la mialgia es el más común. Aunque los síntomas musculares más frecuentes afectan a la musculatura proximal de cintura pelviana y escapular, esto no siempre es así, y puede ocurrir de forma inespecífica como debilidad, dolor errático de localización imprecisa y, más raramente, acompañado de una elevación de los niveles plasmáticos de CK como efecto adverso. Algunos estudios han propuesto puntuaciones

para evaluar la mialgia, pero no han sido validadas ni aceptadas en la práctica clínica (110, 111). La falta de conocimiento del mecanismo patológico subyacente que conduce al SMAE, es otro factor importante que impide tomar cualquier medida preventiva. Las pruebas de laboratorio clínico no suelen ser útiles para evaluar el SMAE, la mayoría de los pacientes con SMAE no tienen CK elevada, y además, la CK puede estar aumentada en individuos asintomáticos en tratamiento con estatinas o puede estar elevada por otras razones como el ejercicio, hipotiroidismo, abuso de drogas (cocaína, alcohol) o fármacos (104).

Se han sugerido varias vías patológicas para explicar la toxicidad de las estatinas, a destacar la disfunción mitocondrial a través de la deficiencia de la coenzima Q10, la promoción de la apoptosis muscular, la interacción farmacológica, trastornos neuromusculares preexistentes, el ejercicio o ciertos polimorfismos genéticos, pero sin resultados concluyentes (104). Ante la dificultad para llegar a un diagnóstico clínico, la falta de marcadores circulantes o pruebas no invasivas para detectar este efecto secundario, y las consecuencias del abandono de esta terapia, es preciso continuar investigando en la búsqueda de una herramienta diagnóstica que resuelva el problema.

Los miRNA son pequeños RNA no codificantes involucrados en múltiples procesos biológicos, cuyas propiedades los convierten en los RNA extracelulares más estudiados como marcadores diagnósticos, pronósticos, y terapéuticos en el campo de las ECV. En algunos estudios se ha relacionado los miRNAs con la eficacia y efectos extralipídicos, también conocidos como pleiotrópicos, de las diferentes estatinas sobre las células endoteliales (174-177), sin embargo, la utilización de los miRNAs circulantes como una herramienta diagnóstica para la detección del paciente con IE, no ha sido realizado.

En nuestro trabajo hemos investigado un perfil de miRNA circulantes en una población de alto y muy alto riesgo cardiovascular tratada con y sin estatinas. Los resultados observados muestran, una firma de cinco miRNAs (let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a-3p y miR-376c-3p), que permiten diferenciar a los pacientes IE de aquellos sin intolerancia a estatinas. Además, cuando incluimos información clínico-biológica, como años de evolución de la dislipidemia y valor de c-no-HDL, este conjunto de miRNA circulantes aumenta su precisión diferenciadora. El análisis bioinformático de los miRNA utilizados conduce a los procesos biológicos y moleculares relacionados con la homeostasis muscular, lo cual respalda la validez de dichos miRNAs como biomarcadores diagnósticos.

La revisión pormenorizada de estos miRNA, nos permite observar que el miRNA, let-7f-5p, está involucrado en la atenuación de la actividad muscular de forma temporal, a través del factor de crecimiento beta (TGF- β), que se sabe tiene un efector intracelular Smad3 (Mothers Against Decantaplegic homolog), que inhibe la miogénesis, estimula la adipogénesis y la acumulación de lípidos en las miofibras (178,179). La miastenia gravis es una enfermedad autoinmune neuromuscular causada por anticuerpos que actúan sobre los receptores en la unión neuromuscular. Se ha demostrado que Let-7f-5p, regulado por la familia de factores de transcripción FoxO, se sobreexpresa en la miastenia gravis seropositiva para anticuerpos tirosina quinasa específicos del músculo esquelético (180). En relación con el cuerpo de evidencias disponibles en la actualidad, se ha podido observar que la administración intramuscular de miR-376c-3p, mejoró la atrofia del músculo esquelético y la función muscular en modelos murinos, y propusieron que miR-376c-3p sería un candidato valioso para el desarrollo de terapias destinadas a mantener la homeostasis muscular durante el envejecimiento (181).

Además, en un estudio reciente se ha demostrado como miR-376c-3p y Lef-7f-5p, en pacientes con distrofias musculares de cinturas, presentan una expresión significativamente menor en comparación con los controles, erigiéndose como potenciales biomarcadores de la distrofia muscular de cinturas y posibles dianas terapéuticas (182).

Concretamente, el miR-376a-3p, se ha propuesto como un biomarcador de la enfermedad arterial coronaria a través de la proteína 1, que interactúa con el receptor nuclear (NRIP1), y podría estar relacionado con el efecto de las estatinas en la reducción del riesgo de enfermedad arterial coronaria, mediado por posibles efectos, antiinflamatorios, antitrombóticos y de protección del estrés mitocondrial (183).

Relacionados con la toxicidad de las estatinas, otros miRNAs circulantes han sido descritos, tales como los miR-499 y miR-145 (184). Se han utilizado modelos combinados “in vivo” e “in vitro”, que demuestran una liberación de miR-499-5p, relacionada con una lesión muscular durante el ejercicio, cuando la contracción muscular inducida por carbacol se combina con la ingesta de estatinas. Los niveles circulantes de miR-1, miR-133a y miR-206 se sobreexpresaron en pacientes en terapia con estatinas que practicaron deportes de resistencia y mostraban efectos adversos musculares (185). Se ha podido observar existencia de lesión en el músculo esquelético inducida por estatinas, a través de la sobreexpresión de miR-1, mediante la regulación de la vía de la quinasa 1 activada por mitógenos (MKK1) (186). En modelos murinos, se han realizado estudios, que ponen de manifiesto que la implementación de ejercicio moderado de forma gradual puede tener un papel protector en la acción de las estatinas y su impacto en el músculo esquelético (187,188).

En el análisis del procesamiento biológico, identificamos que estos miRNAs estaban altamente enriquecidos con genes de la vía TGF- β , que a través de la represión transcripcional de Smad3, conduce a la inhibición de la diferenciación de la miogénesis (189, 190). La diferenciación y función miogénica puede precisar de un entorno apropiado que podría verse afectado por las estatinas, y en este escenario estos miRNAs pueden ser factores moduladores en este proceso.

Todos los miRNAs referidos en nuestros resultados, excepto let-7f-5p, compartieron POTE1, BEND4, POTE2 y CASTOR que son genes relacionados con la homeostasis muscular y los procesos apoptóticos. De este modo, CASTOR2, ha sido descrito como un objetivo de la vía proteolítica de FoxO que conduce a la atrofia muscular (191). Se ha demostrado que el receptor de TGF- β tipo I (TGF β R1), común a todos los miRNAs excepto, miR-376a-3p, afecta el crecimiento y la diferenciación muscular (192), y que la vía de señalización de TGF- β , desempeña un papel crítico en la regulación del crecimiento muscular y la atrofia, tanto en miopatías hereditarias como adquiridas (193).

El análisis de predicción del objetivo miRNA, en nuestro estudio, identificó el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF1) como un gen compartido por estos cinco miRNAs. Varios estudios han referido que las estatinas regulan la señalización del receptor de IGF1 (IGF1-R) a diferentes niveles (194, 195). Se ha descrito como IGF1 participa en una cascada de componentes intracelulares que juegan un importante papel en la regulación del crecimiento del músculo esquelético. Un componente central en esta cascada es la quinasa AKT, que controla tanto la síntesis de proteínas, a través de la diana de

rapamicina en células de mamífero (mTOR) como la degradación de proteínas, a través de los factores de transcripción de la familia FoxO (196).

Se ha descrito como las estatinas inhiben la fosforilación de AKT, y se sospecha que este mecanismo está estrechamente asociado con la inhibición de la síntesis de colesterol a nivel de HMG-CoA. Estos hallazgos se han demostrado tanto en modelos in vitro como in vivo, lo que aumenta la importancia de estas vías en la miotoxicidad inducida por estatinas (197).

FoxO es una familia de factores de transcripción que son el objetivo de estos miRNAs. Están implicados en la degradación de proteínas y la apoptosis. Los FoxO están relacionados con la atrofia muscular y la caquexia con el uso de ciertos tratamientos de quimioterapia a través de las vías IGF1/AKT/FoxO (198).

El análisis de enriquecimiento de GO, reveló una relación con las miopatías mitocondriales. Numerosos estudios han demostrado que las mitocondrias juegan un papel importante en las miopatías inducidas por estatinas, y los resultados de diversos estudios, sugieren que las estatinas pueden tener efectos importantes sobre la función mitocondrial, y que algunos de sus efectos adversos podrían estar mediados a través de vías mitocondriales (199, 200, 201).

En el análisis realizado de la vía KEGG, se manifiesta con especial relevancia la vía p53, cuya importancia se ha descrito por su función en el mantenimiento de la homeostasis mediante la reparación o eliminación de células que experimentan daños en su genoma.

En la homeostasis muscular, en modelos murinos, se ha demostrado como p53 regula la mitofagia del músculo esquelético y el funcionamiento mitocondrial después del desuso muscular inducido por la denervación (202). Por lo tanto, nuestros datos

sugieren que estos miRNAs circulantes podrían estar involucrados también en los mecanismos de acción de las estatinas sobre la función mitocondrial.

Recientemente, la International Lipid Expert Panel (ILEP) y la NLA (203, 204), han publicado sendas guías para asesorar el manejo de pacientes con IE. Ambos documentos, a partir de estrategias de comunicación efectivas, y con vistas a reducir el efecto nocebo, antes de iniciar el tratamiento hacen énfasis en proporcionar información a los pacientes sobre los beneficios del tratamiento hipolipemiante. Plantean informar del riesgo de ECV a 10 años del individuo con y sin terapia con estatinas, la probabilidad de efectos adversos incluidos SMAE, detalles acerca de la dosis específica de terapia con estatinas y su objetivo personal de cLDL. Una vez iniciado el tratamiento, realizar un seguimiento rutinario para evaluar la eficacia y seguridad del mismo, durante el cual se debe garantizar que se cumplen los objetivos lipídicos. Se incide en la importancia que el paciente tenga suficiente conocimiento sobre los beneficios comprobados de la terapia con estatinas, dar recomendaciones dietéticas y estilo de vida, tomar una historia detallada de los síntomas y realizar de forma periódica análisis de laboratorio incluidos transaminasas y CK.

Si el paciente notifica SMAE, una vez descartados factores de riesgo precipitantes como ejercicio, hipotiroidismo o interacciones farmacológicas, se aconseja iniciar una estrategia de dosificación de estatinas, para optimizar su tolerabilidad. Una primera opción puede ser utilizar una dosis de estatina más baja o en régimen de días alternos, ésta última reservada para casos más severos en que los pacientes no pueden tolerar ni siquiera la dosis más baja diaria. En estas situaciones se recomienda utilizar estatinas

con vidas medias más largas y mayor potencia (atorvastatina o rosuvastatina). La segunda opción es cambiar de estatina, por ejemplo, usar una estatina que utilice una vía metabólica diferente, o modificar una estatina lipófila por una hidrófila.

Teniendo en cuenta la propuesta de las guías, no existe actualmente un biomarcador diagnóstico útil que detecte con certeza aquellos pacientes IE. Partiendo de esa necesidad, en nuestro estudio, proponemos un potencial biomarcador que facilite la toma de decisiones en pacientes con SMAE asociados presuntamente a las estatinas, mediante un panel discriminativo de miRNAs.

Los resultados del estudio muestran que el panel de miRNAs formado por let-7f-5p, miR-376a-3p y miR-376c-3p, junto con dos parámetros clínico-biológicos, como años de evolución de dislipemia y c-no-HDLc, presentan una precisión diagnóstica de alto rendimiento, y en una evaluación posterior de validación cruzada de 10 veces para estimar el rendimiento de la predicción, corrobora la regularidad del modelo multivariante.

El c-no-HDL es un parámetro lipídico consolidado por todas las sociedades científicas en el cálculo del RCV y riesgo residual, engloba todas las lipoproteínas que contienen apo B, estando estrechamente relacionado con la dislipidemia aterogénica. Por lo tanto, en cualquier contexto clínico se sugiere utilizar c-no-HDL o apo B (sería deseable, si hay disponibilidad), como objetivo terapéutico en lugar de cLDL (134). Esto pone de relieve la importancia del c-no-HDL para un mejor control de la dislipidemia y recientemente se ha publicado una actualización de los índices de cálculo de riesgo SCORE2 (205) y SCORE2-OP (206), que introduce diferentes variaciones en el índice SCORE original, ya que evalúa no solo la mortalidad cardiovascular, sino el riesgo de desarrollar un evento

cardiovascular a los 10 años, e incluye tres variables dicotómicas que son edad, sexo y tabaquismo, y dos cuantitativas: cifras de presión arterial y c-no-HDL. De esta manera, el c-no-HDL se ha postulado como un importante factor de riesgo cardiovascular con el mismo impacto que el cLDL. En determinadas circunstancias, y en términos de riesgo son equivalentes a la presión arterial alta, la diabetes mellitus o la enfermedad renal crónica.

Consideramos que en la actualidad es preciso, en una valoración inicial de la estimación del RCV de nuestros pacientes, tener una visión extendida que permita un control global del mismo, como se recomienda en los estándares de la Sociedad Española de Arteriosclerosis 2022 (207). La aterosclerosis se desarrolla de forma progresiva y continua, con inicio en edades muy tempranas con un periodo subclínico, asintomático o paucisintomático, puede acelerarse por factores genéticos y presencia de otros FRCV, hasta la aparición de complicaciones de la misma en forma de ECVA, ECV o EVP. En esta fase, el tratamiento hipolipemiente tras un evento cardiovascular, actuaría como Prevención secundaria. Por ello, para evitar la aparición de eventos, nosotros debemos tener una actuación precoz en el periodo subclínico (Prevención primaria). En esta etapa de enfermedad cardiovascular subclínica, disponemos de pruebas que nos permiten re-estratificar el RCV, como son el índice tobillo-brazo (especialmente en presencia de diabetes y/o tabaquismo), detección de placas de ateroma en carótidas (con mayor rendimiento diagnóstico que el grosor intima-media [GIM]), cuantificación del calcio coronario (en unidades Agatston), angioTC coronario, cuestionario de dieta (adherencia a la dieta mediterránea [MEDA], validado en el Predimed), y cuestionario de actividad física (IPAQ) (207).

Hemos insistido en este trabajo, que la reducción de cLDL es la única terapia que aborda la ETIOLOGIA de la aterosclerosis (la hipótesis LDL se ha convertido en un axioma), y que a pesar de que los pacientes cuyas cifras de cLDL se encuentran en los valores recomendados en la estratificación de los respectivos grupos de RCV, continua existiendo un riesgo residual de origen lipídico no dependiente de las concentraciones de cLDL, predominantemente en los pacientes clasificados como de muy alto RCV, y de adicionalmente, factores biológicos con biomarcadores específicos establecidos como riesgo residual inflamatorio (PCR ultrasensible), riesgo residual trombótico (sin biomarcador simple establecido), y riesgo residual diabetes (HBA1c). Las concentraciones de triglicéridos y Lp (a), tienen en determinadas circunstancias un papel determinante en el riesgo cardiovascular residual. Así, en circunstancias como hipertrigliceridemia, DM2, síndrome metabólico, obesidad o cLDL bajo, el RCV puede estar infravalorado. En estos casos es necesaria la determinación del c-no-HDL, o aún mejor de la apo B (si existe disponibilidad), para la evaluación del RCV real en estas circunstancias.

Asimismo, la determinación de la concentración de Lp(a), se debe considerar al menos una vez en la vida para estimar el RCV y especialmente relevante en determinadas situaciones clínicas como: ECV prematura, HF, historia familiar de ECV prematura, recurrencia de ECV en tratamiento con estatinas, estenosis aortica, y resistencia al tratamiento con estatinas.

Hemos señalado que existe una reducción lineal entre la reducción absoluta de cLDL y el descenso de eventos CV graves. La disminución de cLDL, se correlaciona con la reducción de eventos CV, cada disminución de 1 mmol/dl de LDL, corresponde una

reducción de aproximadamente un quinto de eventos CV, que incluye a una disminución del 22% de la tasa de eventos CV graves. Asimismo, el tiempo de exposición a una concentración elevada de cLDL es clave en el aceleramiento del proceso aterosclerótico, estableciéndose una relación entre la edad y la exposición acumulativa de cLDL, que se refleja en un umbral teórico de exposición acumulativa de cLDL requerida para el desarrollo de la ECVA. Este umbral puede aumentar o disminuir en función del sexo y la presencia concomitante en un paciente de otros FRCV. Cuanto más bajo y cuanto antes mejor (141).

Con este sólido conocimiento de la aterogénesis, consideramos imprescindible un adecuado manejo de los pacientes con intolerancia a las estatinas, correctamente identificados, para mitigar el impacto que la exposición acumulativa de cLDL puede tener en el umbral del desarrollo de la ECVA. Para ello, teniendo en cuenta la relación lineal entre la reducción de cLDL y descenso de eventos CV, independientemente del tratamiento utilizado, estatinas, ezetimiba, iPCSK-9, inclisiran, y ácido bempedoico, en estos paciente se deben desarrollar algoritmos de actuación sin estatinas, de forma consensuada, que permitan tener a estos pacientes en el objetivo terapéutico deseado, principalmente en aquellos con ECVA establecida clínicamente o de forma inequívoca con pruebas de imagen y en paciente en prevención primaria de alto y/o muy alto riesgo vascular.

Consideramos que la propuesta de las guías de una estrategia de dosificación alternativa de estatinas es una forma práctica de manejar a los pacientes, pero con este planteamiento, al tratarse de una dosis subóptima, exponemos a los pacientes, especialmente aquellos con alto y muy alto RCV, a un riesgo innecesario de encontrarse

muy por debajo de los objetivos terapéuticos establecidos de cLDL, con las nocivas consecuencias que esto conlleva. Esta propuesta que presentamos permite, por lo tanto, establecer una estrategia terapéutica individual. En primer lugar, en pacientes con intolerancia parcial, posibilita reforzar el cumplimiento de una terapia crucial como las estatinas en pacientes con alto y muy alto riesgo cardiovascular. En segundo lugar, en caso de pacientes IE total, con alto y muy alto RCV, la estatina debe sustituirse por otras alternativas terapéuticas que hayan demostrado eficacia en la reducción de cLDL, seguridad, y disminución de eventos cardiovasculares. Para ello, teniendo en cuenta la relación lineal entre la reducción de cLDL y descenso de eventos CV, independientemente del tratamiento utilizado, ya demostrado en el paso de la teoría estatínica a la teoría lipídica, disponemos con estas condiciones en la actualidad de ezetimiba, iPCSK-9, inclisiran, y ácido bempedoico.

En estos pacientes, se deben desarrollar algoritmos de actuación terapéutica alternativa sin demora y, en muchos casos sin estatinas, de forma consensuada, que permitan tener a estos pacientes en objetivo terapéutico, principalmente en aquellos con ECVA establecida clínicamente o de forma inequívoca con pruebas de imagen y en paciente en prevención primaria de alto y muy alto riesgo vascular. Nuestra propuesta de actuación es la siguiente:

Tratamiento hipolipemiante en pacientes de muy alto riesgo (cLDL <55 mg/dl) o alto (cLDL < 70 mg/dl),

Iniciar tratamiento con ezetimiba

Si cLDL >100 añadir terapia diana PCSK: iPCSK o Inclisiran

Si cLDL permanece fuera del objetivo:

Añadir A. Bempedoico a iPCSK-9 o Inclisiran

Añadir icosapento de etilo si cLDL entre 40 y 100 mg/dl y TG>150

Indudablemente, sería deseable establecer qué asociaciones de los fármacos descritos, pueden tener mejores resultados en estos pacientes, pero se parte de una situación que por las características de los fármacos referidos resulta muy contundente.

Nuestro estudio actual tiene varias limitaciones. El tamaño de la muestra del estudio, reclutada de varias unidades, no permitió obtener un modelo sólido de regresión logística multivariante. Como consecuencia, estos resultados deben extenderse y replicarse a una población más grande, antes de que los nuevos biomarcadores puedan aplicarse rutinariamente en la práctica clínica. Finalmente, no tenemos confirmación sobre la secreción directa de estos miRNAs circulantes en el espacio extracelular. Son necesarios estudios confirmativos más amplios sobre los miRNAs circulantes para generar una firma diagnóstica mejor y reproducible para el IE.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. Un total de 10 miRNA, miR let-7c-5p, miR let-7d-5p, miR let-7f-5p, miR-128-3p, miR-186-5p, miR-30e-3p, miR-376a-3p, miR-376c-3p, miR-543 y miR-574-3p, se expresaron significativamente de acuerdo con los criterios de selección y se escogieron para un análisis posterior.

2. La validación de estos 10 miRNA en la población total, mostraron que let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a-3p y miR-376c-3p estaban significativamente sobreexpresados en plasma de la cohorte de los pacientes intolerantes a las estatinas.

3. De forma aislada, miR-376c-3p logró el área bajo la curva (AUC) más alto. No obstante, el potencial diagnóstico del conjunto de los 5-miRNA muestra un mejor rendimiento diagnóstico.

4. En la evaluación del potencial diagnóstico de los fenotipos de los pacientes, destacaron dos parámetros clínicos/biológicos para distinguir entre los grupos IE y NIE, años de evolución de la dislipidemia y el colesterol no HDL, que de forma combinada tenían un mayor poder discriminativo en la diferenciación de las dos cohortes, que de forma independiente.

5. En un modelo multivariante para aumentar el poder diagnóstico combinando los miRNA expresados diferencialmente, se incluyeron los años de dislipidemia y/o niveles plasmáticos de c-no-HDL. El mayor rendimiento diagnóstico se alcanzó con la combinación del panel de 3 miRNA compuesto por let-7f, miR-376a-3p y miR-376c-3p, años de dislipidemia y colesterol no HDL.

6. El diagnóstico de certeza de pacientes intolerantes a las estatinas permite el establecimiento de una estrategia terapéutica alternativa a las estatinas en estos pacientes.

ABREVIATURAS

8. ABREVIATURAS

ACVA: Accidente cerebrovascular agudo

ANGPTL3: Proteína 3 similar a la angiopoyetina

apo: Apolipoproteína

AUC: Área bajo la curva

cHDL: Colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad

circRNAs: RNA circulares

cLDL: Colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad

c-no-HDL: Colesterol no HDL

CR: Colesterol remanente

CV: Cardiovascular

DLP: años de dislipidemia

DM: Diabetes mellitus

DM2: Diabetes mellitus tipo 2

EAS: Sociedad Europea de Arteriosclerosis

EC: Enfermedad coronaria

ECA: Ensayo clínico controlado y aleatorizado

ECV: Enfermedades cardiovasculares

ECVAS: Enfermedades cardiovasculares ateroscleróticas

ERC: Enfermedad renal crónica

ESC: Sociedad Europea de Cardiología

EVP: Enfermedad vascular periférica

FDA: Food and Drug Administration de Estados Unidos

FoxO: Forkhead de la vía de señalización de la clase O

FRCV: Factor de riesgo cardiovascular

GO: Gene Ontology

GPC: Guía de práctica clínica

HbA1c: Hemoglobina glicosilada

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

HF: Hipercolesterolemia familiar

HMG-CoA: Hidroximetilglutaril coenzima A reductasa

IAM: Infarto agudo de miocardio

IDL: Lipoproteínas de densidad intermedia
IE: Intolerancia a las estatinas
IGF1: Factor de crecimiento similar a la insulina
IGF1-R: Receptor de IGF1
KEGG: Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto
LDL: Lipoproteínas de baja densidad
LDLR: Receptores de lipoproteínas de baja densidad
Lp(a): Lipoproteína (a)
LPL: Lipoprotein lipasa
LRTG: Lipoproteínas ricas en triglicéridos
NIE: No intolerantes a las estatinas
NLA: National Lipid Association
NPC1L1: Niemann-Pick C1-Like 1
miRNA: MicroRNA
ncRNA: RNA no codificantes
PCSK9: Proprotein Convertase Subtilisin Kexin 9
PPAR- α : Receptor alfa de proliferador de peroxisoma activado
RCV: Riesgo cardiovascular.
siRNA: RNA de interferencia
Smad3: Mothers Against Decantaplegic homolog
SMAE: Síntomas musculares asociados a estatinas.
TFGe: tasa de filtrado glomerular estimada
TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta.
TGF β R1: Receptor de TGF- β tipo I
TG : Triglicéridos
VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad
Weka: Waikato environment for knowledge analysis

BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2019;139(10):56-528
2. Townsend N, Kazakiewicz D, Lucy Wright F, Timmis A, Huculeci R, Torbica A, Gale CP, Achenbach S, Weidinger F, Vardas P. Epidemiology of cardiovascular disease in Europe. *Nat Rev Cardiol*. 2022;19(2):133-143
3. Bueno H, Pérez-Gómez B. Global Rounds: Cardiovascular Health, Disease, and Care in Spain. *Circulation*. 2019;140(1):13-15.
4. Cayuela L, Gómez Enjuto S, Olivares Martínez B, Rodríguez-Domínguez S, Cayuela A. Is the pace of decline in cardiovascular mortality decelerating in Spain? *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2021;74(9):750-756.
5. Vasan RS, Sullivan LM, Wilson PW, Sempos CT, Sundström J, Kannel WB, Levy D, D'Agostino RB. Relative importance of borderline and elevated levels of coronary heart disease risk factors. *Ann Intern Med*. 2005;142(6):393-402
6. Stamler J, Stamler R, Neaton JD, Wentworth D, Daviglus ML, Garside D et al. Low risk-factor profile and long-term cardiovascular and noncardiovascular mortality and life expectancy: findings for 5 large cohorts of young adult and middle-aged men and women. *JAMA*. 1999;282(21):2012-2018.
7. Patel SA, Winkel M, Ali MK, Narayan KM, Mehta NK. Cardiovascular mortality associated with 5 leading risk factors: national and state preventable fractions estimated from survey data. *Ann Intern Med*. 2015;163(4):245-253
8. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). 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(25):3143-3421.
9. Roncaglioni MC, Santoro L, D'Avanzo B, et al. Role of family history in patients with myocardial infarction. An Italian case-control study. GISSI-EFRIM Investigators. *Circulation*. 1992;85(6):2065-2072
10. Genest JJ Jr, Martin-Munley SS, McNamara JR, et al. Familial lipoprotein disorders in patients with premature coronary artery disease. *Circulation*. 1992;85(6):2025-2033.
11. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*. 2004;364(9438):937-952
12. Ference BA, Bhatt DL, Catapano AL, et al. Association of Genetic Variants Related to Combined Exposure to Lower Low-Density Lipoproteins and Lower Systolic Blood Pressure With Lifetime Risk of Cardiovascular Disease. *JAMA*. 2019;322(14):1381-1391.

13. Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, et al. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med*. 1995;333(20):1301-1307.
14. Downs JR, Clearfield M, Weis S, et al. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *JAMA*. 1998;279(20):1615-1622
15. Sacks FM, Pfeffer MA, Moya LA, et al. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N Engl J Med*. 1996;335(14):1001-1009.
16. Mach F, Baigent C, Catapano AL, Koskinas KC, Casula M, Badimon L, et al. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur Heart J*. 2020;41(1):111-188.
17. Reiner Ž. Hypertriglyceridaemia and risk of coronary artery disease. *Nat Rev Cardiol*. 2017;14(7):401-411.
18. Tabas I, Williams KJ, Borén J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation*. 2007;116(16):1832-1844.
19. Borén J, Williams KJ. The central role of arterial retention of cholesterol-rich apolipoprotein-B-containing lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis: a triumph of simplicity. *Curr Opin Lipidol*. 2016;27(5):473-483.
20. Ference BA, Graham I, Tokgozoglul L, Catapano AL. Impact of Lipids on Cardiovascular Health: JACC Health Promotion Series. *J Am Coll Cardiol*. 2018;72(10):1141-1156
21. Emerging Risk Factors Collaboration, Di Angelantonio E, Gao P, et al. Lipid-related markers and cardiovascular disease prediction. *JAMA*. 2012;307(23):2499-2506.
22. Willer CJ, Schmidt EM, Sengupta S, et al. Discovery and refinement of loci associated with lipid levels. *Nat Genet*. 2013;45(11):1274-1283
23. Nikpay M, Goel A, Won HH, et al. A comprehensive 1,000 Genomes-based genome-wide association meta-analysis of coronary artery disease. *Nat Genet*. 2015;47(10):1121-1130.
24. Ference BA, Yoo W, Alesh I, et al. Effect of long-term exposure to lower low-density lipoprotein cholesterol beginning early in life on the risk of coronary heart disease: a Mendelian randomization analysis. *J Am Coll Cardiol*. 2012;60(25):2631-2639.
25. Silverman MG, Ference BA, Im K, et al. Association Between Lowering LDL-C and Cardiovascular Risk Reduction Among Different Therapeutic Interventions: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA*. 2016;316(12):1289-1297
26. Ference BA, Ginsberg HN, Graham I, et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J*. 2017;38(32):2459-2472.
27. Ference BA, Kastelein JJP, Ray KK, et al. Association of Triglyceride-Lowering LPL Variants and LDL-C-Lowering LDLR Variants With Risk of Coronary Heart

- Disease. *JAMA*. 2019;321(4):364-373.
28. Emerging Risk Factors Collaboration, Di Angelantonio E, Sarwar N, et al. Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. *JAMA*. 2009;302(18):1993-2000.
 29. Voight BF, Peloso GM, Orho-Melander M, et al. Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: a mendelian randomisation study [published correction appears in *Lancet*. 2012 Aug 11;380(9841):564]. *Lancet*. 2012;380(9841):572-580.
 30. Barter PJ, Caulfield M, Eriksson M, et al. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N Engl J Med*. 2007;357(21):2109-2122.
 31. AIM-HIGH Investigators, Boden WE, Probstfield JL, et al. Niacin in patients with low HDL cholesterol levels receiving intensive statin therapy [published correction appears in *N Engl J Med*. 2012 Jul 12;367(2):189]. *N Engl J Med*. 2011;365(24):2255-2267.
 32. Schwartz GG, Olsson AG, Abt M, et al. Effects of dalcetrapib in patients with a recent acute coronary syndrome. *N Engl J Med*. 2012;367(22):2089-2099.
 33. HPS2-THRIVE Collaborative Group. HPS2-THRIVE randomized placebo-controlled trial in 25 673 high-risk patients of ER niacin/laropiprant: trial design, pre-specified muscle and liver outcomes, and reasons for stopping study treatment. *Eur Heart J*. 2013;34(17):1279-1291.
 34. Lincoff AM, Nicholls SJ, Riesmeyer JS, Barter PJ, Brewer HB, Fox KAA et al. Evacetrapib and Cardiovascular Outcomes in High-Risk Vascular Disease. *N Engl J Med*. 2017;376(20):1933-1942.
 35. Budoff M. Triglycerides and Triglyceride-Rich Lipoproteins in the Causal Pathway of Cardiovascular Disease. *Am J Cardiol*. 2016;118(1):138-145.
 36. Kockx M, Kritharides L. Triglyceride-Rich Lipoproteins. *Cardiol Clin*. 2018;36(2):265-275.
 37. Varbo A, Benn M, Tybjaerg-Hansen A, Jørgensen AB, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG. Remnant cholesterol as a causal risk factor for ischemic heart disease [published correction appears in *J Am Coll Cardiol*. 2019 Mar 5;73(8):987-988]. *J Am Coll Cardiol*. 2013;61(4):427-436.
 38. Varbo A, Benn M, Nordestgaard BG. Remnant cholesterol as a cause of ischemic heart disease: evidence, definition, measurement, atherogenicity, high risk patients, and present and future treatment. *Pharmacol Ther*. 2014;141(3):358-367.
 39. Varbo A, Freiberg JJ, Nordestgaard BG. Extreme nonfasting remnant cholesterol vs extreme LDL cholesterol as contributors to cardiovascular disease and all-cause mortality in 90000 individuals from the general population. *Clin Chem*. 2015;61(3):533-543.
 40. Jepsen AM, Langsted A, Varbo A, Bang LE, Kamstrup PR, Nordestgaard BG. Increased Remnant Cholesterol Explains Part of Residual Risk of All-Cause Mortality in 5414 Patients with Ischemic Heart Disease. *Clin Chem*. 2016;62(4):593-604.
 41. Bernelot Moens SJ, Verweij SL, Schnitzler JG, et al. Remnant Cholesterol Elicits Arterial Wall Inflammation and a Multilevel Cellular Immune Response in Humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37(5):969-975.

42. Hansen SEJ, Madsen CM, Varbo A, Nordestgaard BG. Low-Grade Inflammation in the Association between Mild-to-Moderate Hypertriglyceridemia and Risk of Acute Pancreatitis: A Study of More Than 115000 Individuals from the General Population. *Clin Chem*. 2019;65(2):321-332.
43. Nordestgaard BG, Abildgaard S, Wittrup HH, Steffensen R, Jensen G, Tybjaerg-Hansen A. Heterozygous lipoprotein lipase deficiency: frequency in the general population, effect on plasma lipid levels, and risk of ischemic heart disease. *Circulation*. 1997;96(6):1737-1744.
44. Pennacchio LA, Rubin EM. Apolipoprotein A5, a newly identified gene that affects plasma triglyceride levels in humans and mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(4):529-534
45. Nilsson SK, Heeren J, Olivecrona G, Merkel M. Apolipoprotein A-V; a potent triglyceride reducer. *Atherosclerosis*. 2011;219(1):15-21.
46. Khera AV, Won HH, Peloso GM, O'Dushlaine C, Liu D, Stitzel NO et al. Association of Rare and Common Variation in the Lipoprotein Lipase Gene With Coronary Artery Disease. *JAMA*. 2017;317(9):937-946
47. Jørgensen AB, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. Loss-of-function mutations in APOC3 and risk of ischemic vascular disease. *N Engl J Med*. 2014;371(1):32-41
48. TG and HDL Working Group of the Exome Sequencing Project, National Heart, Lung, and Blood Institute, Crosby J, Peloso GM, et al. Loss-of-function mutations in APOC3, triglycerides, and coronary disease. *N Engl J Med*. 2014;371(1):22-31.
49. Dewey FE, Gusarova V, O'Dushlaine C, Gottesman O, Trejos J, Hunt C et al. Inactivating Variants in ANGPTL4 and Risk of Coronary Artery Disease. *N Engl J Med*. 2016;374(12):1123-1133
50. Myocardial Infarction Genetics and CARDIoGRAM Exome Consortia Investigators; Stitzel NO, Stirrups KE, Masca NG, Erdmann J, Ferrario PG, König IR et al. Coding Variation in ANGPTL4, LPL, and SVEP1 and the Risk of Coronary Disease. *N Engl J Med*. 2016;374(12):1134-1144.
51. Ference BA, Kastelein JJP, Ray KK, Ginsberg HN, Chapman MJ, Packard CJ, Laufs U et al. Association of Triglyceride-Lowering LPL Variants and LDL-C-Lowering LDLR Variants With Risk of Coronary Heart Disease. *JAMA*. 2019;321(4):364-373.
52. Emerging Risk Factors Collaboration; Di Angelantonio E, Gao P, Pennells L, Kaptoge S, Caslake M et al. Lipid-related markers and cardiovascular disease prediction. *JAMA*. 2012;307(23):2499-2506.
53. Harari G, Green MS, Magid A, Zelber-Sagi S. Usefulness of Non-High-Density Lipoprotein Cholesterol as a Predictor of Cardiovascular Disease Mortality in Men in 22-Year Follow-Up. *Am J Cardiol*. 2017;119(8):1193-1198.
54. Nordestgaard BG, Langsted A. Lipoprotein (a) as a cause of cardiovascular disease: insights from epidemiology, genetics, and biology. *J Lipid Res*. 2016;57(11):1953-1975
55. Nordestgaard BG, Chapman MJ, Ray K, Borén J, Andreotti F, Watts GF, Ginsberg et al. Lipoprotein(a) as a cardiovascular risk factor: current status. *Eur Heart J*.

2010;31(23):2844-2853.

56. Emerging Risk Factors Collaboration; Erqou S, Kaptoge S, Perry PL, Di Angelantonio E, Thompson A et al. Lipoprotein(a) concentration and the risk of coronary heart disease, stroke, and nonvascular mortality. *JAMA*. 2009;302(4):412-423.
57. Burgess S, Ference BA, Staley JR, Freitag DF, Mason AM, Nielsen SF et al. Association of LPA Variants With Risk of Coronary Disease and the Implications for Lipoprotein(a)-Lowering Therapies: A Mendelian Randomization Analysis. *JAMA Cardiol*. 2018;3(7):619-627
58. Parish S, Hopewell JC, Hill MR, Marcovina S, Valdes-Marquez E, Haynes R, Offer A et al. Impact of Apolipoprotein(a) Isoform Size on Lipoprotein(a) Lowering in the HPS2-THRIVE Study. *Circ Genom Precis Med*. 2018;11(2):e001696.
59. Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaboration; Baigent C, Blackwell L, Emberson J, Holland LE, Reith C, Bhalra N et al. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials. *Lancet*. 2010;376(9753):1670-1681.
60. Hsia J, MacFadyen JG, Monyak J, Ridker PM. Cardiovascular event reduction and adverse events among subjects attaining low-density lipoprotein cholesterol <50 mg/dl with rosuvastatin. The JUPITER trial (Justification for the Use of Statins in Prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin). *J Am Coll Cardiol*. 2011;57(16):1666-1675.
61. McCormack T, Dent R, Blagden M. Very low LDL-C levels may safely provide additional clinical cardiovascular benefit: the evidence to date. *Int J Clin Pract*. 2016;70(11):886-897
62. Sabatine MS, Giugliano RP, Keech AC, et al. Evolocumab and Clinical Outcomes in Patients with Cardiovascular Disease. *N Engl J Med*. 2017;376(18):1713-1722.
63. Schwartz GG, Steg PG, Szarek M, Bhatt DL, Bittner VA, Diaz R, Edelberg JM; ODYSSEY OUTCOMES Committees and Investigators. Alirocumab and Cardiovascular Outcomes after Acute Coronary Syndrome. *N Engl J Med*. 2018;379(22):2097-2107
64. Boekholdt SM, Hovingh GK, Mora S, Arsenault BJ, Amarenco P, Pedersen TR, et al. Very low levels of atherogenic lipoproteins and the risk for cardiovascular events: a meta-analysis of statin trials. *J Am Coll Cardiol*. 2014;64(5):485-494.
65. Chasman DI, Giulianini F, MacFadyen J, Barratt BJ, Nyberg F, Ridker PM. Genetic determinants of statin-induced 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.
66. Reiner Z. Resistance and intolerance to statins. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2014;24(10):1057-1066.
67. Jones PH, Davidson MH, Stein EA, Bays HE, McKenney JM, Miller E, Cain VA, Blasetto JW; STELLAR Study Group. Comparison of the efficacy and safety of rosuvastatin versus atorvastatin, simvastatin, and pravastatin across doses (STELLAR* Trial). *Am J Cardiol*. 2003;92(2):152-60.
68. Moriarty PM, Thompson PD, Cannon CP, Guyton JR, Bergeron J, Zieve FJ et al. Efficacy and safety of alirocumab vs ezetimibe in statin-intolerant patients, with a

- statin rechallenge arm: The ODYSSEY ALTERNATIVE randomized trial. *J Clin Lipidol*. 2015;9(6):758-769.
69. Stroes E, Colquhoun D, Sullivan D, Civeira F, Rosenson RS; GAUSS-2 Investigators. Anti-PCSK9 antibody effectively lowers cholesterol in patients with statin intolerance: the GAUSS-2 randomized, placebo-controlled phase 3 clinical trial of evolocumab. *J Am Coll Cardiol*. 2014;63(23):2541-2548.
 70. Phan BA, Dayspring TD, Toth PP. Ezetimibe therapy: mechanism of action and clinical update. *Vasc Health Risk Manag*. 2012;8:415-427
 71. Mazidi M, Rezaie P, Karimi E, Kengne AP. The effects of bile acid sequestrants on lipid profile and blood glucose concentrations: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Int J Cardiol*. 2017;227:850-857
 72. Abifadel M, Varret M, Rabès JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet*. 2003;34(2):154-156
 73. Norata GD, Tibolla G, Catapano AL. Targeting PCSK9 for hypercholesterolemia. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2014;54:273-293.
 74. Cuchel M, Meagher EA, du Toit Theron H, Blom DJ, Marais AD; Phase 3 HoFH Lomitapide Study investigators. Efficacy and safety of a microsomal triglyceride transfer protein inhibitor in patients with homozygous familial hypercholesterolaemia: a single-arm, open-label, phase 3 study. *Lancet*. 2013;381(9860):40-46.
 75. Cuchel M, Bloedon LT, Szapary PO, Kolansky DM, Wolfe ML, Sarkis A et al. Inhibition of microsomal triglyceride transfer protein in familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med*. 2007;356(2):148-156.
 76. Chapman MJ, Redfern JS, McGovern ME, Giral P. Niacin and fibrates in atherogenic dyslipidemia: pharmacotherapy to reduce cardiovascular risk. *Pharmacol Ther*. 2010;126(3):314-345.
 77. Araki E, Yamashita S, Arai H, Yokote K, Satoh J, Inoguchi T et al. Efficacy and safety of pemafibrate in people with type 2 diabetes and elevated triglyceride levels: 52-week data from the PROVIDE study. *Diabetes Obes Metab*. 2019;21(7):1737-1744.
 78. Rodriguez D, Lavie CJ, Elagizi A, Milani RV. Update on Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Cardiovascular Health. *Nutrients*. 2022 Dec 3;14(23):5146.
 79. Saeed A, Ballantyne CM. Bempedoic Acid (ETC-1002): A Current Review. *Cardiol Clin*. 2018;36(2):257-264
 80. Fitzgerald K, White S, Borodovsky A, Bettencourt BR, Strahs A, Clausen V et al. A Highly Durable RNAi Therapeutic Inhibitor of PCSK9. *N Engl J Med*. 2017;376(1):41-51
 81. Ray KK, Landmesser U, Leiter LA, Kallend D, Dufour R, Karakas M et al. Inclisiran in Patients at High Cardiovascular Risk with Elevated LDL Cholesterol. *N Engl J Med*. 2017;376(15):1430-1440.
 82. Stitzel NO, Khera AV, Wang X, Bierhals AJ, Vourakis AC; PROMIS and Myocardial Infarction Genetics Consortium Investigators. ANGPTL3 Deficiency and Protection Against Coronary Artery Disease. *J Am Coll Cardiol*. 2017;69(16):2054-2063

83. Gaudet D, Gipe DA, Pordy R, Ahmad Z, Cuchel M, Shah PK et al. ANGPTL3 Inhibition in Homozygous Familial Hypercholesterolemia. *N Engl J Med.* 2017;377(3):296-297
84. Ahmad Z, Banerjee P, Hamon S, Chan KC, Bouzelmat A, Sasiela WJ, Pordy R et al. Inhibition of Angiopoietin-Like Protein 3 With a Monoclonal Antibody Reduces Triglycerides in Hypertriglyceridemia. *Circulation.* 2019;140(6):470-486.
85. Witztum JL, Gaudet D, Freedman SD, Alexander VJ, Digenio A, Williams KR, Yang Q et al. Volanesorsen and Triglyceride Levels in Familial Chylomicronemia Syndrome. *N Engl J Med.* 2019;381(6):531-542.
86. Kosmas CE, Martinez I, Sourlas A, Bouza KV, Campos FN, Torres V, Montan PD, Guzman E. High-density lipoprotein (HDL) functionality and its relevance to atherosclerotic cardiovascular disease. *Drugs Context.* 2018;7:212525
87. Mach F, Ray KK, Wiklund O, Corsini A, Catapano AL; European Atherosclerosis Society Consensus Panel. Adverse effects of statin therapy: perception vs. the evidence - focus on glucose homeostasis, cognitive, renal and hepatic function, haemorrhagic stroke and cataract. *Eur Heart J.* 2018 ;39(27):2526-2539.
88. Sidaway JE, Davidson RG, McTaggart F, Orton TC, Scott RC, Smith GJ, Brunskill NJ. Inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase reduce receptor-mediated endocytosis in opossum kidney cells. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(9):2258-2265.
89. Alsheikh-Ali AA, Ambrose MS, Kuvin JT, Karas RH. The safety of rosuvastatin as used in common clinical practice: a postmarketing analysis. *Circulation.* 2005;111(23):3051-3057.
90. Dormuth CR, Hemmelgarn BR, Paterson JM, James MT, Teare GF; Canadian Network for Observational Drug Effect Studies. Use of high potency statins and rates of admission for acute kidney injury: multicenter, retrospective observational analysis of administrative databases. *BMJ.* 2013;346:f880
91. Russo MW, Hoofnagle JH, Gu J, Fontana RJ, Barnhart H, Kleiner DE, Chalasani N, Bonkovsky HL. Spectrum of statin hepatotoxicity: experience of the drug-induced liver injury network. *Hepatology.* 2014;60(2):679-86.
92. Cohen DE, Anania FA, Chalasani N; National Lipid Association Statin Safety Task Force Liver Expert Panel. An assessment of statin safety by hepatologists. *Am J Cardiol.* 2006;97(8A):77C-81C
93. Ridker PM, Pradhan A, MacFadyen JG, Libby P, Glynn RJ. Cardiovascular benefits and diabetes risks of statin therapy in primary prevention: an analysis from the JUPITER trial. *Lancet.* 2012;380(9841):565-571.
94. Wang KL, Liu CJ, Chao TF, Huang CM, Wu CH, Chen SJ et al. Statins, risk of diabetes, and implications on outcomes in the general population. *J Am Coll Cardiol.* 2012;60(14):1231-1238.
95. Mita T, Watada H, Nakayama S, Abe M, Ogihara T, Shimizu T et al. Preferable effect of pravastatin compared to atorvastatin on beta cell function in Japanese early-state type 2 diabetes with hypercholesterolemia. *Endocr J.* 2007;54(3):441-7.
96. Yamakawa T, Takano T, Tanaka S, Kadonosono K, Terauchi Y. Influence of pitavastatin on glucose tolerance in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Atheroscler Thromb.* 2008;15(5):269-275.

97. Graham DJ, Staffa JA, Shatin D, Andrade SE, Schech SD, La Grenade L et al. Incidence of hospitalized rhabdomyolysis in patients treated with lipid-lowering drugs. *JAMA*. 2004;292(21):2585-90
98. Joy TR, Hegele RA. Narrative review: statin-related myopathy. *Ann Intern Med*. 2009;150(12):858-868
99. Brunham LR, Baker S, Mammen A, Mancini GBJ, Rosenson RS. Role of genetics in the prediction of statin-associated muscle symptoms and optimization of statin use and adherence. *Cardiovasc Res*. 2018;114(8):1073-1081.
100. Mammen AL. Statin-Associated Autoimmune Myopathy. *N Engl J Med*. 2016;374(7):664-669. 100.
101. Ferreira Alfaya Francisco Javier. Evidencia del manejo de miopatías asociadas a estatina con coenzima Q10. *Ars Pharm* [Internet]. 2022Mar [citado 2022 Jul12] ;63(1):78-91
102. Elam MB, Majumdar G, Mozhui K, Gerling IC, Vera SR, Fish-Trotter H et al. Patients experiencing statin-induced myalgia exhibit a unique program of skeletal muscle gene expression following statin re-challenge. *PLoS One*. 2017;12(8):e0181308.
103. Wiggins BS; Saseen JJ, Page R; American Heart Association Clinical Pharmacology Committee of the Council on Clinical Cardiology; Council on Hypertension; Council on Quality of Care and Outcomes Research; and Council on Functional Genomics and Translational Biology. Recommendations for Management of Clinically Significant Drug-Drug Interactions With Statins and Select Agents Used in Patients With Cardiovascular Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*. 2016;134(21):e468-e495.
104. Turner RM, Pirmohamed M. Statin-Related Myotoxicity: A Comprehensive Review of Pharmacokinetic, Pharmacogenomic and Muscle Components. *J Clin Med*. 2019;9(1):22
105. Guyton JR, Bays HE, Grundy SM, Jacobson TA, The newman Statin Intolerance Panel. An assessment by the Statin Intolerance Panel: 2014 update. *J Clin Lipidol*. 2014;8(3 Suppl):S72-S81.
106. Cheeley MK, Saseen JJ, Agarwala A, Ravilla S, Ciffone N, Jacobson TA, et al. NLA scientific statement on statin intolerance: a new definition and key considerations for ASCVD risk reduction in the statin intolerant patient. *J Clin Lipidol*. 2022;16(4):361-375
107. Mancini, G. B. J. *et al*. Diagnosis, Prevention, and Management of Statin Adverse Effects and Intolerance: Canadian Consensus Working Group Update (2016). *Can. J. Cardiol*. **32**, S35–S65 (2016).
108. Rosenson RS, Baker SK, Jacobson TA, Kopecky SL, Parker BA, The National Lipid Association's Muscle Safety Expert Panel. An assessment by the Statin Muscle Safety Task Force: 2014 update. *J Clin Lipidol*. 2014;8(3 Suppl):S58-S71.
109. Sathasivam S, Lecky B. Statin induced myopathy. *BMJ*. 2008;337:a2286.
110. Taylor BA, Sanchez RJ, Jacobson TA, Chibedi-De-Roche D, Manvelian G, Rosenson RS et al. Application of the Statin-Associated Muscle Symptoms-Clinical Index to a Randomized Trial on Statin Myopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2017;70(13):1680-1681

111. Parker BA, Capizzi JA, Grimaldi AS, Clarkson PM, Cole SM, Keadle J, et al. Effect of statins on skeletal muscle function. *Circulation*. 2013;127(1):96-103.
112. Bruckert E, Hayem G, Dejager S, Yau C, Bégaud B. Mild to moderate muscular symptoms with high-dosage statin therapy in hyperlipidemic patients--the PRIMO study. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2005;19(6):403-414
113. Pedro-Botet J, Millán Núñez-Cortés J, Chillarón JJ, Flores-Le Roux JA, Rius J. Severity of statin-induced adverse effects on muscle and associated conditions: data from the DAMA study. *Expert Opin Drug Saf*. 2016;15(12):1583-1587.
114. Gupta A, Thompson D, Whitehouse A, Collier T, Dahlof B, Poulter N, Collins R, Sever P; ASCOT Investigators. Adverse events associated with unblinded, but not with blinded, statin therapy in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial-Lipid-Lowering Arm (ASCOT-LLA): a randomised double-blind placebo-controlled trial and its non-randomised non-blind extension phase. *Lancet*. 2017;389(10088):2473-2481.
115. Mefford MT, Tajeu GS, Tanner RM, Colantonio LD, Monda KL, Dent R et al. Willingness to be Reinitiated on a Statin (from the REasons for Geographic and Racial Differences in Stroke Study). *Am J Cardiol*. 2018;122(5):768-774.
116. Toth PP, Patti AM, Giglio RV, Nikolic D, Castellino G, Rizzo M, Banach M. Management of Statin Intolerance in 2018: Still More Questions Than Answers. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2018;18(3):157-173
117. Cholesterol Treatment Trialists' Collaboration. Effect of statin therapy on muscle symptoms: an individual participant data meta-analysis of large-scale, randomised, double-blind trials. *Lancet*. 2022 Sep 10;400(10355):832-845
118. Bytyçi I, Penson PE, Mikhailidis DP, Wong ND, Hernandez AV, Sahebkar A et al. Prevalence of statin intolerance: a meta-analysis. *Eur Heart J*. 2022;43(34):3213-3223
119. Stoes ES, Thompson PD, Corsini A, Vladutiu GD, Raal FJ; European Atherosclerosis Society Consensus Panel. Statin-associated muscle symptoms: impact on statin therapy-European Atherosclerosis Society Consensus Panel Statement on Assessment, Aetiology and Management. *Eur Heart J*. 2015;36(17):1012-22.
120. Naderi SH, Bestwick JP, Wald DS. Adherence to drugs that prevent cardiovascular disease: meta-analysis on 376,162 patients. *Am J Med*. 2012;125(9):882-7.e1
121. Kashani A, Phillips CO, Foody JM, et al. Risks associated with statin therapy: a systematic overview of randomized clinical trials. *Circulation*. 2006;114(25):2788-2797.
122. De Vera MA, Bhole V, Burns LC, Lacaille D. Impact of statin adherence on cardiovascular disease and mortality outcomes: a systematic review. *Br J Clin Pharmacol*. 2014;78(4):684-698
123. Turner RM, Yin P, Hanson A, FitzGerald R, Morris AP, Stables RH, Jorgensen AL, Pirmohamed M. Investigating the prevalence, predictors, and prognosis of

suboptimal statin use early after a non-ST elevation acute coronary syndrome. *J Clin Lipidol*. 2017;11(1):204-214.

124. Serban MC, Colantonio LD, Manthripragada AD, Monda KL, Bittner VA, Banach M, Chen L, Huang L, Dent R, Kent ST, Muntner P, Rosenson RS. Intolerancia a las estatinas y riesgo de eventos cardíacos coronarios y mortalidad por todas las causas después del infarto de miocardio. *J Am Coll Cardiol*. 2017;69(11):1386-1395
125. Chowdhury R, Khan H, Heydon E, Shroufi A, Fahimi S, Moore C et al. Adherence to cardiovascular therapy: a meta-analysis of prevalence and clinical consequences. *Eur Heart J*. 2013;34(38):2940-2948.
126. Banach M, Rizzo M, Toth PP, Farnier M, Davidson MH, Al-Rasadi K et al. Statin intolerance - an attempt at a unified definition. Position paper from an International Lipid Expert Panel. *Expert Opin Drug Saf*. 2015;14(6):935-55.
127. Rosenson RS, Baker S, Banach M, Borow KM, Braun LT, Bruckert E et al. Optimizing Cholesterol Treatment in Patients With Muscle Complaints. *J Am Coll Cardiol*. 2017;70(10):1290-1301.
128. Pedro-Botet J, Flores-Le Roux JA, Mostaza JM, Pintó X, de la Cruz JJ, Banegas JR; en nombre del grupo de investigadores EDICONDIS-ULISEA. Atherogenic dyslipidemia: prevalence and management in lipid clinics. *Rev Clin Esp (Barc)*. 2014;214(9):491-8.
129. Halcox JP, Banegas JR, Roy C, Dallongeville J, De Backer G, Guallar E, Perk J, Hajage D, Henriksson KM, Borghi C. et al Prevalence and treatment of atherogenic dyslipidemia in the primary prevention of cardiovascular disease in Europe: EURIKA, a cross-sectional observational study. *BMC Cardiovasc Disord*. 2017;17(1):160.
130. Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaborators, Kearney PM, Blackwell L, et al. Efficacy of cholesterol-lowering therapy in 18,686 people with diabetes in 14 randomised trials of statins: a meta-analysis. *Lancet*. 2008;371(9607):117-125.
131. Millán Núñez-Cortés J, Montoya JP, Salas XP, Hernández Mijares A, Carey VJ, Hermans MP, Sacks FM, Fruchart JC. The REALIST (RESiduAl risk, Lipids and Standard Therapies) study: an analysis of residual risk attributable to lipid profile in acute coronary syndrome. *Endocrinol Nutr*. 2011 Jan;58(1):38-47
132. Fruchart JC, Davignon J, Hermans MP, Al-Rubeaan K, Amarenco P, Assmann G et al. Residual Risk Reduction Initiative (R3i). Residual macrovascular risk in 2013: what have we learned? *Cardiovasc Diabetol*. 2014;13:26.
133. Sacks FM, Carey VJ, Fruchart JC. Combination lipid therapy in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2010;363(7):692-695.
134. Millán J, Hernández-Mijares A, Ascaso JF, Blasco M, Brea A; Grupo de trabajo sobre Dislipemia Aterogénica. Sociedad Española de Arteriosclerosis. La auténtica dimensión del colesterol-no-HDL: colesterol aterogénico [The real measurement of non-HDL-cholesterol: Atherogenic cholesterol]. *Clin Investig Arterioscler*. 2016;28(6):265-270.
135. Verbeek R, Hovingh GK, Boekholdt SM. Non-high-density lipoprotein cholesterol:

- current status as cardiovascular marker. *Curr Opin Lipidol*. 2015;26(6):502-510.
136. Boekholdt SM, Arsenault BJ, Mora S, Pedersen TR, LaRosa JC, Nestel PJ et al. Association of LDL cholesterol, non-HDL cholesterol, and apolipoprotein B levels with risk of cardiovascular events among patients treated with statins: a meta-analysis. *JAMA*. 2012;307(12):1302-1309.
 137. Jun JE, Choi YJ, Lee YH, Kim DJ, Park SW, Huh BW, Lee EJ, Jee SH, Hur KY, Choi SH, Huh KB. ApoB/ApoA-I ratio is independently associated with carotid atherosclerosis in type 2 diabetes mellitus with well-controlled LDL cholesterol levels. *Korean J Intern Med*. 2018 Jan;33(1):138-147.
 138. Jellinger PS, Handelsman Y, Rosenblit PD, et al. AMERICAN ASSOCIATION OF CLINICAL ENDOCRINOLOGISTS AND AMERICAN COLLEGE OF ENDOCRINOLOGY GUIDELINES FOR MANAGEMENT OF DYSLIPIDEMIA AND PREVENTION OF CARDIOVASCULAR DISEASE. *Endocr Pract*. 2017;23(Suppl 2):1-87.
 139. Liu H, Deng X, Peng Y, Zeng Q, Song Z, He W et al. Meta-analysis of serum non-high-density lipoprotein cholesterol and risk of coronary heart disease in the general population. *Clin Chim Acta*. 2017;471:23-28
 140. Nordestgaard BG, Langlois MR, Langsted A, Chapman MJ, Aakre KM; European Atherosclerosis Society (EAS) and the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Joint Consensus Initiative. Quantifying atherogenic lipoproteins for lipid-lowering strategies: Consensus-based recommendations from EAS and EFLM. *Atherosclerosis*. 2020;294:46-61
 141. Ference BA, Majeed F, Penumetcha R, Flack JM, Brook RD. Effect of naturally random allocation to lower low-density lipoprotein cholesterol on the risk of coronary heart disease mediated by polymorphisms in NPC1L1, HMGCR, or both: a 2 × 2 factorial Mendelian randomization study. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65(15):1552-61
 142. Zhao G. Significance of non-coding circular RNAs and micro RNAs in the pathogenesis of cardiovascular diseases. *J Med Genet*. 2018;55(11):713-720.
 143. Calderon-Dominguez M, Belmonte T, Mangas A, de Gonzalo-Calvo D, Toro R et al. Emerging role of microRNAs in dilated cardiomyopathy: evidence regarding etiology. *Transl Res*. 2020;215:86-101.
 144. Condrat CE, Thompson DC, Barbu MG, Bugnar OL, Boboc A, Cretoiu D, et al. miRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis. *Cells*. 2020;9(2):276
 145. Romaine SP, Tomaszewski M, Condorelli G, Samani NJ. MicroRNAs in cardiovascular disease: an introduction for clinicians. *Heart*. 2015;101(12):921-928.
 146. Gonzalo-Calvo D, Iglesias-Gutiérrez E, Llorente-Cortés V. Epigenetic Biomarkers and Cardiovascular Disease: Circulating MicroRNAs. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2017;70(9):763-769
 147. Paiva S, Agbulut O. MiRroring the Multiple Potentials of MicroRNAs in Acute Myocardial Infarction. *Front Cardiovasc Med*. 2017;4:73.
 148. Marfella R, Di Filippo C, Potenza N, Sardu C, Rizzo MR, Siniscalchi M et al. Circulating microRNA changes in heart failure patients treated with cardiac resynchronization therapy: responders vs. non-responders. *Eur J Heart Fail*.

2013;15(11):1277-88.

149. Kennel PJ, Schulze PC. A Review on the Evolving Roles of MiRNA-Based Technologies in Diagnosing and Treating Heart Failure. *Cells*. 2021;10(11):3191.
150. Belmonte T, Mangas A, Calderon-Dominguez M, Quezada-Feijoo M, de Gonzalo-Calvo D, Toro R et al. Peripheral microRNA panels to guide the diagnosis of familial cardiomyopathy. *Transl Res*. 2020;218:1-15.
151. Zambrano T, Hirata RDC, Hirata MH, Cerda Á, Salazar LA. Statins differentially modulate microRNAs expression in peripheral cells of hyperlipidemic subjects: A pilot study. *Eur J Pharm Sci*. 2018 May 30;117:55-61. .
152. Chen T, Li Z, Tu J, et al. MicroRNA-29a regulates pro-inflammatory cytokine secretion and scavenger receptor expression by targeting LPL in oxLDL-stimulated dendritic cells. *FEBS Lett*. 2011;585(4):657-663.
153. Simionescu N, Niculescu LS, Sanda GM, Margina D, Sima AV. Analysis of circulating microRNAs that are specifically increased in hyperlipidemic and/or hyperglycemic sera. *Mol Biol Rep*. 2014;41(9):5765-5773.
154. Miśkowiec D, Lipiec P, Wierzbowska-Drabik K, Kupczyńska K, Michalski B, Wdowiak-Okrojek K et al. Association between microRNA-21 concentration and lipid profile in patients with acute coronary syndrome without persistent ST-segment elevation. *Pol Arch Med Wewn*. 2016;126(1-2):48-57.
155. Calvano J, Achanzar W, Murphy B, DiPiero J, Hixson C, Parrula C et al. Evaluation of microRNAs-208 and 133a/b as differential biomarkers of acute cardiac and skeletal muscle toxicity in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2016;312:53-60
156. Toivonen JM, Manzano R, Oliván S, Zaragoza P, García-Redondo A, Osta R. MicroRNA-206: a potential circulating biomarker candidate for amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One*. 2014;9(2):e89065.
157. Santer L, Bär C, Thum T. Circular RNAs: A Novel Class of Functional RNA Molecules with a Therapeutic Perspective. *Mol Ther*. 2019;27(8):1350-1363.
158. Gabriel AF, Costa MC, Enguita FJ. Circular RNA-Centered Regulatory Networks in the Physiopathology of Cardiovascular Diseases. *Int J Mol Sci*. 2020;21(2):456.
159. Vausort M, Salgado-Somoza A, Zhang L, Leszek P, Scholz M, Teren A et al. Myocardial Infarction-Associated Circular RNA Predicting Left Ventricular Dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 2016;68(11):1247-1248
160. Salgado-Somoza A, Zhang L, Vausort M, Devaux Y. The circular RNA MICRA for risk stratification after myocardial infarction. *Int J Cardiol Heart Vasc*. 2017;17:33-36.
161. Zhao Z, Li X, Gao C, Jian D, Hao P, Rao L, Li M. Peripheral blood circular RNA hsa_circ_0124644 can be used as a diagnostic biomarker of coronary artery disease. *Sci Rep*. 2017 ;7:39918
162. Rossi F, Legnini I, Megiorni F, Colantoni A, Santini T, Morlando M et al. Circ-ZNF609 regulates G1-S progression in rhabdomyosarcoma. *Oncogene*. 2019;38(20):3843-3854
163. Teng X, Chen X, Xue H, Tang Y, Zhang P, Kang Q et al. NPInter v4.0: an integrated database of ncRNA interactions. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(D1):D160-D165
164. Díaz-Santiago E, Jabato FM, Rojano E, Seoane P, Pazos F, Perkins JR, Ranea JAG. Phenotype-genotype comorbidity analysis of patients with rare disorders provides

- insight into their pathological and molecular bases. *PLoS Genet.* 2020;16(10):e1009054.
165. Bueno A, Rodríguez-López R, Reyes-Palomares A, Rojano E, Corpas M, Nevado J et al. Phenotype-loci associations in networks of patients with rare disorders: application to assist in the diagnosis of novel clinical cases. *Eur J Hum Genet.* 2018;26(10):1451-1461.
 166. Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 2004;64(15):5245-5250.
 167. Mi H, Muruganujan A, Ebert D, Huang X, Thomas PD. PANTHER version 14: more genomes, a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D419-D426.
 168. Clum A, Huntemann M, Bushnell B, Foster B, Foster B, Roux S et al. DOE JGI Metagenome Workflow. *mSystems.* 2021;6(3):e00804-20
 169. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D607-D613.
 170. Liao Y, Wang J, Jaehnig EJ, Shi Z, Zhang B. WebGestalt 2019: gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(W1):W199-W205.
 171. Mangas A, Pérez-Serra A, Bonet F, Muñiz O, Fuentes F, Gonzalez-Estrada A, Campuzano O, Rodriguez Roca JS, Alonso-Villa E, Toro R. A microRNA Signature for the Diagnosis of Statins Intolerance. *Int J Mol Sci.* 2022 Jul 24;23(15):8146.
 172. Lee S, Dong HH. FoxO integration of insulin signaling with glucose and lipid metabolism. *J Endocrinol.* 2017;233(2):R67-R79.
 173. Mallinson JE, Constantin-Teodosiu D, Sidaway J, Westwood FR, Greenhaff PL. Blunted Akt/FOXO signalling and activation of genes controlling atrophy and fuel use in statin myopathy. *J Physiol.* 2009;587(1):219-230.
 174. Leal K, Saavedra K, Rebolledo C, Salazar LA. MicroRNAs hsa-miR-618 and hsa-miR-297 Might Modulate the Pleiotropic Effects Exerted by Statins in Endothelial Cells Through the Inhibition of ROCK2 Kinase: *in-silico* Approach. *Front Cardiovasc Med.* 2021;8:704175.
 175. Raucci A, Macrì F, Castiglione S, Badi I, Vinci MC, Zuccolo E. MicroRNA-34a: the bad guy in age-related vascular diseases. *Cell Mol Life Sci.* 2021;78(23):7355-7378
 176. Hirota T, Fujita Y, Ieiri I. An updated review of pharmacokinetic drug interactions and pharmacogenetics of statins. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2020;16(9):809-822
 177. Mohammadzadeh N, Montecucco F, Carbone F, Xu S, Al-Rasadi K, Sahebkar A. Statins: Epidrugs with effects on endothelial health? *Eur J Clin Invest.* 2020;50(12):e13388
 178. Mitchell CJ, D'Souza RF, Schierding W, Zeng N, Ramzan F, O'Sullivan JM et al. Identification of human skeletal muscle miRNA related to strength by high-

- throughput sequencing. *Physiol Genomics*. 2018;50(6):416-424
179. Liu D, Black BL, Derynck R. TGF-beta inhibits muscle differentiation through functional repression of myogenic transcription factors by Smad3. *Genes Dev*. 2001;15(22):2950-2966.
 180. Fiorillo AA, Heier CR, Huang YF, Tully CB, Punga T, Punga AR. Estrogen Receptor, Inflammatory, and FOXO Transcription Factors Regulate Expression of Myasthenia Gravis-Associated Circulating microRNAs. *Front Immunol*. 2020;11:151.
 181. Shin Y.J., Kwon E.S., Lee S.M., Kim S.K., Min K.W., Lim J.Y., Lee B., Kang J.S., Kwak J.Y., Son Y.H., et al. A subset of microRNAs in the Dlk1-Dio3 cluster regulates age-associated muscle atrophy by targeting Atrogin-1. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2020;11:1336–1350.
 182. Magri F, Napoli L, Ripolone M, Ciscato P, Moggio M, Corti S, Comi GP, Sciacco M, Zanotti S. The Profiling of 179 miRNA Expression in Serum from Limb Girdle Muscular Dystrophy Patients and Healthy Controls. *Int J Mol Sci*. 2023 Dec 12;24(24):17402
 183. Du L, Xu Z, Wang X, Liu F. Integrated bioinformatics analysis identifies microRNA-376a-3p as a new microRNA biomarker in patient with coronary artery disease. *Am J Transl Res*. 2020;12(2):633-648.
 184. Min PK, Park J, Isaacs S, Taylor BA, Thompson PD, Troyanos C et al. Influence of statins on distinct circulating microRNAs during prolonged aerobic exercise. *J Appl Physiol* (1985). 2016;120(6):711-20
 185. Siracusa J, Koulmann N, Sourdrille A, Chapus C, Verret C, Bourdon S et al. Phenotype-Specific Response of Circulating miRNAs Provides New Biomarkers of Slow or Fast Muscle Damage. *Front Physiol*. 2018;9:684
 186. Fu CN, Song JW, Song ZP, Wang QW, Bai WW, Guo T et al. Excessive expression of miR-1a by statin causes skeletal injury through targeting mitogen-activated protein kinase kinase 1. *Aging (Albany NY)*. 2021;13(8):11470-11490.
 187. Bouitbir J, Daussin F, Charles AL, Rasseneur L, Dufour S, Richard R, et al. Mitochondria of trained skeletal muscle are protected from deleterious effects of statins. *Muscle Nerve*. 2012;46(3):367-73.
 188. Lotteau S, Ivarsson N, Yang Z, Restagno D, Colyer J, Hopkins P et al. A Mechanism for Statin-Induced Susceptibility to Myopathy. *JACC Basic Transl Sci*. 2019 Aug 26;4(4):509-523.
 189. Liu L, Cao P, Zhang L, Qi M, Wang L, Li Z, Shao G et al. Comparisons of adipogenesis- and lipid metabolism-related gene expression levels in muscle, adipose tissue and liver from Wagyu-cross and Holstein steers. *PLoS One*. 2021;16(2):e0247559.
 190. Bai W, Ren M, Cheng W, Lu X, Liu D, Wang B. Qindan Capsule Attenuates Myocardial Hypertrophy and Fibrosis in Pressure Overload-Induced Mice Involving mTOR and TGF- β 1/Smad Signaling Pathway Inhibition. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2021;2021:5577875.
 191. Oyabu M, Takigawa K, Mizutani S, Hatazawa Y, Fujita M, Ohira Y et al. FOXO1 cooperates with C/EBP δ and ATF4 to regulate skeletal muscle atrophy

- transcriptional program during fasting. *FASEB J.* 2022;36(2):e22152
192. Hillege MMG, Shi A, Galli RA, Wu G, Bertolino P, Hoogaars WMH, Jaspers RT. Lack of *Tgfbr1* and *Acvr1b* synergistically stimulates myofibre hypertrophy and accelerates muscle regeneration. *Elife.* 2022;11:e77610
 193. Burks TN, Cohn RD. Role of TGF- β signaling in inherited and acquired myopathies. *Skelet Muscle.* 2011;1(1):19.
 194. Forbes K, Shah VK, Siddals K, Gibson JM, Aplin JD, Westwood M. Statins inhibit insulin-like growth factor action in first trimester placenta by altering insulin-like growth factor 1 receptor glycosylation. *Mol Hum Reprod.* 2015;21(1):105-114.
 195. Jang HJ, Hong EM, Park SW, Byun HW, Koh DH, Choi MH, Kae SH, Lee J. Statin induces apoptosis of human colon cancer cells and downregulation of insulin-like growth factor 1 receptor via proapoptotic ERK activation. *Oncol Lett.* 2016;12(1):250-256.
 196. Schiaffino S, Mammucari C. Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. *Skelet Muscle.* 2011 Jan 24;1(1):4.
 197. Bonifacio A, Sanvee GM, Bouitbir J, Krähenbühl S. The AKT/mTOR signaling pathway plays a key role in statin-induced myotoxicity. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1853(8):1841-1849.
 198. Zhang H, Chi M, Chen L, Sun X, Wan L, Yang Q, Guo C. Linalool Prevents Cisplatin Induced Muscle Atrophy by Regulating IGF-1/Akt/FoxO Pathway. *Front Pharmacol.* 2020;11:598166.
 199. Apostolopoulou M, Corsini A, Roden M. The role of mitochondria in statin-induced myopathy. *Eur J Clin Invest.* 2015;45(7):745-754.
 200. Auer J, Sinzinger H, Franklin B, Berent R. Muscle- and skeletal-related side-effects of statins: tip of the iceberg?. *Eur J Prev Cardiol.* 2016;23(1):88-110.
 201. Mollazadeh H, Tavana E, Fanni G, Bo S, Banach M, Pirro M, von Haehling S, Jamialahmadi T, Sahebkar A. Effects of statins on mitochondrial pathways. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2021;12(2):237-251
 202. Memme JM, Oliveira AN, Hood DA. p53 regulates skeletal muscle mitophagy and mitochondrial quality control following denervation-induced muscle disuse. *J Biol Chem.* 2022 Feb;298(2):101540.
 203. Penson PE, Bruckert E, Marais D, Reiner Ž, Pirro M, Sahebkar A, et al; International Lipid Expert Panel (ILEP). Step-by-step diagnosis and management of the nocebo/drucebo effect in statin-associated muscle symptoms patients: a position paper from the International Lipid Expert Panel (ILEP). *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2022 Jun;13(3):1596-1622.
 204. Warden BA, Guyton JR, Kovacs AC, Durham JA, Jones LK, Dixon DL, Jacobson TA, Duell PB. Assessment and management of statin-associated muscle symptoms (SAMS): A clinical perspective from the National Lipid Association. *J Clin Lipidol.* 2023 Jan-Feb;17(1):19-39
 205. SCORE2 working group and ESC Cardiovascular risk collaboration. SCORE2 risk prediction algorithms: new models to estimate 10-year risk of cardiovascular disease in Europe. *Eur Heart J.* 2021;42(25):2439-2454.
 206. SCORE2-OP working group and ESC Cardiovascular risk collaboration. SCORE2-OP risk prediction algorithms: estimating incident cardiovascular event risk in older persons in four geographical risk regions. *Eur Heart J.* 2021;42(25):2455-2467.

207. Mostaza JM, Pintó X, Armario P, Masana L, Real JT, Valdivielso P et al. SEA 2022 Standards for Global Control of Cardiovascular Risk. *Clin Investig Arterioscler*. 2022 May-Jun;34(3):130-179.