



**Instituto Politécnico Nacional**

**CIIDIR-IPN Unidad Durango**

**Doctorado en Ciencias en Biotecnología**

**Proyecto de Tesis de Doctorado**

**Asociación de la respuesta terapéutica a simvastatina con CYP3A4/3A5,  
miRNAS y la expresión de genes CLOCK**

**Saúl Flores Unzueta**

**Dr. en C. Carlos Galaviz Hernández**

**Director de Tesis**

**Dra. en C. Martha G. Sosa Macías**

**Co-Director**

**Investigadores Asociados**

**Dra. Laurence A. Marchat Marchau**

**Dr. Ismael Lares Assef.**

**Dr. Omar F. Carrasco Ortega**



SIP-13-BIS

### INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

#### ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

México, D.F. a 19 de junio del 2018

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-IPN Durango en su sesión Ordinaria No. 1 celebrada el día 13 del mes de enero conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

FLORES	UNZUETA	SAÚL
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre (s)

Con registro: 

B	1	4	0	6	7	9
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de: Doctorado en Ciencias en Biotecnología

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:  
Asociación de la respuesta terapéutica a simvastatina con CYP3A4/3A5, miRNAs y la expresión de genes CLOCK

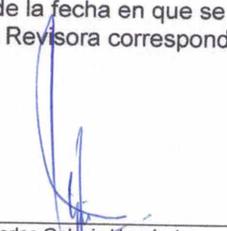
De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:

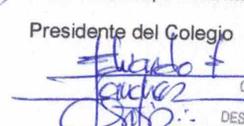
2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:  
Dra. Martha Guadalupe Sosa Macías y Dr. Carlos Galaviz Hernández

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en:  
El CIIDIR-IPN Unidad Durango  
que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Directores de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Carlos Galaviz Hernández  
Aspirante  
  
\_\_\_\_\_  
M. en C. Saúl Flores Unzueta

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Martha Guadalupe Sosa Macías  
Presidente del Colegio  
  
\_\_\_\_\_  
Dr. Eduardo Sánchez Ortiz  
UNIDAD DURANGO  
IPN





SIP-14-BIS

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Durango, Dgo. siendo las 9:00 horas del día 19 del mes de junio del 2018 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del: CIIDIR-IPN Unidad Durango para examinar la tesis titulada:

Asociación de la respuesta terapéutica a simvastatina con CYP3A4/3A5, miRNAs y la expresión de genes CLOCK

Presentada por la alumna:

Table with columns for Apellido paterno (FLORES), Apellido materno (UNZUETA), and Nombre(s) (SAÚL). Includes a registration number: B 1 4 0 6 7 9.

DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron APROBAR LA TESIS, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Signatures and names of Dr. Carlos Galaviz Hernández, Dr. Laurence Annie Marchat Marchau, and Dr. Omar Francisco Carrasco Ortega.

Signatures and names of Dra. Martha Guadalupe Sosa Macías and Dr. José Ismael Antonio Lares Asef.

Signature and name of Dr. Eduardo Sánchez Ortiz, Presidente del Colegio de Profesores.





**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*CARTA CESIÓN DE DERECHOS*

En la Ciudad de Durango, Dgo., el día **06** del mes de **junio** del año **2018** el que suscribe **Saúl Flores Unzueta** alumno del Programa de **Doctorado en Ciencias en Biotecnología**, con número de registro **B140679**, adscrito al **Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Durango. CIIDIR-IPN Unidad Durango**, manifiesta que es el autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del **Dr. Carlos Galaviz Hernández** y de la **Dra. Martha Guadalupe Sosa Macías** y cede los derechos del trabajo titulado **“Asociación de la respuesta terapéutica a simvastatina con CYP3A4/3A5, miRNAs y la expresión de genes CLOCK”**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones [drsaulflores@hotmail.com](mailto:drsaulflores@hotmail.com), [carlosgalavizhernandez55@gmail.com](mailto:carlosgalavizhernandez55@gmail.com) y [sosa.martha@gmail.com](mailto:sosa.martha@gmail.com). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

---

SAUL FLORES UNZUETA

## V. LUGAR DONDE SE REALIZÓ

El presente trabajo de Tesis se realizó en el Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Durango, como parte del programa de Doctorado en Ciencias en Biotecnología

## VI. DEDICATORIA

Dedicado a mi Familia, Amigos, Asesores y Maestros, que me apoyaron, y me permitieron trabajar con libertad estos 4 años.

## VII ÍNDICE GENERAL.

1. Portada	1
2. SIP 13	2
3. SIP 14	3
4. Cesión de derechos	4
5. Lugar donde se realizó	5
6. Dedicatoria	6
7. Índice General	7
8. Relación de Tablas	10
9. Relación de figuras	12
10. Glosario	14
11. Lista de acrónimos	15
12. Resumen	17
13. Abstract	19
14. Introducción	21
15. Antecedentes	23
15.1 Lípidos	23
15.2 15.1.1 Clasificación de lípidos	23
15.3 15.1.2 Metabolismo de lípidos	23
15.4 15.1.3 Condiciones que afectan el metabolismo de los lípidos	24

Saúl Flores Unzueta	CIIDIR IPN Unidad Durango	Doctorado en Ciencias en Biotecnología
15.515.1.4	Diagnóstico de la hiperlipidemia	25
15.1.4.1	Diagnóstico clínico	25
15.1.4.2	Pruebas de laboratorio	26
15.1.5	Tratamiento de la hiperlipidemia	27
15.1.5.1	Tratamiento no farmacológico	
15.1.5.2	Tratamiento farmacológico	28
	- Estatinas	
	- Niacina y Fibratos	
	- Secuestradores de ácido Biliar	
15.2	Descripción de simvastatina	29
15.2.1	Mecanismo de acción	29
15.2.2	Farmacocinética (ADME)	30
15.2.3	Indicaciones y contraindicaciones	32
15.2.4	Reacciones adversas	33
15.2.5	15.3 Factores de afectan la respuesta de la simvastatina	33
15.3.1	Factores Genéticos.	33
15.3.1.1	Polimorfismos en CYP3A4/5	35
15.3.1.2	Polimorfismos en transportadores	36
15.3.2	Cronobiología	38
15.3.2.1	El ritmo circadiano	
15.3.2.2	Regulación del ciclo circadiano por los genes CLOCK	39

15.3.3 Mecanismos epigenéticos	41
15.3.3.1 Generalidades	41
15.3.3.2 Biogénesis de los microARNs	41
15.3.3.3 Influencia de los microRNAs en el metabolismo de simvastatina	42
15.3.3.4 Influencia de los microRNAs en el transporte de simvastatina.	43
15.3.3.5 Relación de los microRNAs y el ritmos circadiano	44
16. Justificación	45
17. Hipótesis	45
18. Objetivos	46
19. Metodología y desarrollo del trabajo	47
20. Resultados.	59
21. Discusión.	79
22. Conclusiones.	88
23. Recomendaciones y sugerencias.	90
24. Referencias documentales	91
25. Agradecimientos	100
26. Anexos	101

## VIII RELACIÓN DE TABLAS

Tabla 1. Categorías de riesgo de enfermedad Cardiovascular Aterosclerótica y metas de tratamiento para LDL.	27
Tabla 2. Terapia con estatinas, indicaciones e intensidades.	29
Tabla 3. Vólmenes de los componentes de Master Mix para la síntesis de cDNA.	56
Tabla 4. Condiciones de temperatura en el termociclador para la síntesis de cDNA.	56
Tabla 5. Vólmenes de la reacción para medir la expresión de los diferentes miRNAs.	57
Tabla 6. Condiciones de temperatura en el termociclador para cuantificación de los niveles de expresión de los diferentes miRNAs.	57
Tabla 7. Comparación Perfil de lípidos de los voluntarios estudiados de los grupos matutinos y vespertino.	59
Tabla 8. Polimorfismos involucrados en genes del transporte y metabolismo de simvastatina en los pacientes estudiados	61
Tabla 9. Mediciones de TAS, TAD, FC, y temperatura, durante el estudio vespertino del paciente 1.	63

Tabla 10. Mediciones de TAS, TAD, FC, y temperatura, durante el estudio matutino y vespertino del paciente 2.	65
Tabla 11. Concentraciones plasmáticas de simvastatina del paciente 2, dosis matutina y dosis vespertina.	67
Tabla 12. Mediciones de TAS, TAD, FC, y temperatura, durante el estudio matutino y vespertino del paciente 11.	70
Tabla 13. Mediciones de TAS, TAD, FC, y temperatura, durante el estudio matutino y vespertino del paciente 16.	72
Tabla 14. Concentraciones plasmáticas del Paciente 16 estudio matutino.	74
Tabla 15. Comparación del RQ de los estudios del miRNA-182, en la farmacocinética realizada a los pacientes.	75
Tabla 16. Comparación del RQ de los estudios del microRNA-27b en la PK realizada a los pacientes.	77
Tabla 17. Número de pacientes de ambos grupos, quienes alcanzaron los valores normales de referencia para cada uno de los tipos de colesterol.	80

## IX. RELACIÓN DE FIGURAS

Figura 1. Estructura molecular de la simvastatina.	30
Figura 2. Vía de disposición de simvastatina en el sistema gastrointestinal humano.	32
Figura 3. Regulación de los genes CLOCK.	40
Figura 4. Biosíntesis de los microRNAs.	43
Figura 5. Etapa 1 de los procedimientos del estudio.	51
Figura 6. Etapa 2 de los procedimientos del estudio.	52
Figura 7A presión arterial y frecuencia cardiaca paciente 1, estudio vespertino	63
Figura 7b, temperatura paciente 1, estudio vespertino	64
Figura 8A. tas, tad, paciente 2 estudios vespertino y matutino	66
Figura 8B. temperatura paciente 2, estudios matutino y vespertino	66
Figura 9A. Curso Temporal de Simvastatina en muestras de paciente 2 mat	68
Figura 9B. Curso Temporal de Simvastatina en muestras de paciente 2 vespertino	69
FIGURA 10a. TAS, TAD, PACIENTE 11, ESTUDIO VESPERTINO y matutino	71
Figura 10b. temperaturo paciente 11, estudios matutino y vespertino	71

Figura 11a. tas, tad, paciente 16, estudios matutino y vespertino	73
Figura 11b. temperatua, paciente 16, estudios matutino y vespertino	73
Figura 12A. Curso Temporal de Simvastatina en muestras de plasma de paciente 16 Matutino	74
FIGURA 13. Comparación miRNA 182 MAT VS VESP	76
FIGURA 14. Comparación 27B MAT VS VESP	78
FIGURA 15. Comparación de las concentraciones plasmáticas de simvastatina, estudio Vespertino y Matutino, del paciente 2 y los RQ del microRNA-27b	87

## X. GLOSARIO.

Parámetros farmacocinéticos de simvastatina. Se define como: El comportamiento farmacocinético de un determinado compuesto que se caracteriza a través de una serie de parámetros; están determinados por la concentración plasmática máxima (Cpmax), la concentración plasmática mínima (Cpmin), el área bajo la curva (ABC), el tiempo de vida media de eliminación ( $t_{1/2el}$ ), el volumen de distribución (Vd) y el aclaramiento (Cl).

Polimorfismo. Son alelos que existen en una población con una frecuencia de 1% como mínimo.

Respuesta terapéutica a la simvastatina. Paciente que posterior a un mes de tratamiento con simvastatina de 40 mg disminuye en más de un 30% sus niveles de colesterol, triglicéridos, LDL o VLDL.

Ciclo circadiano. Son oscilaciones de las variables biológicas en intervalos regulares de tiempo (alrededor de 24 horas).

Pro-fármaco. es una sustancia farmacológica que se administra en forma inactiva o poco activa. Posteriormente, el profármaco es metabolizado hasta un metabolito activo

Miopatía. La miopatía por estatinas es un trastorno en el que se afectan los músculos esqueléticos como consecuencia del efecto indeseado de los fármacos de tipo estatinas. Una miopatía en general es una enfermedad en la que el tejido muscular degenera sin existir una lesión traumática.

Grupo matutino. Pacientes con ritmos matutinos de acuerdo al cuestionario de matutinidad-vespertinidad (Horne-Östberg).

Grupo vespertino. Pacientes con ritmos vespertino o nocturnos de acuerdo al cuestionario de matutinidad-vespertinidad (Horne-Östberg).

## XI. LISTA DE ACRÓNIMOS.

ABC: Área bajo la curva  
DNA (siglas en inglés): Ácido desoxirribonucleico  
ADME: absorción, distribución, metabolismo, eliminación  
ADR: reacciones adversas a medicamentos  
ALT: alanino aminotransferasa  
Apo: apolipoproteína  
AUC: área bajo la curva  
AST: aspartato aminotransferasa  
CAR: receptor constitutivo de androstano  
CE: colesterol esterificado  
Cl: aclaramiento  
CK: creatinina cinasa  
COL: colesterol  
Cpmax: Concentración plasmática máxima  
Cpmin: Concentración plasmática mínima  
DNAc: Ácido desoxirribonucleico complementario  
dNTPs: 2'-desoxinucleósido'trifosfatos  
ECV: Enfermedad Cardiovascular  
FL: fosfolípidos  
GGT: Gamma glutamil transpeptidasa  
HDL: lipoproteína de alta densidad  
HMGCR: 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa  
IMC: índice de masa corporal  
LDL: lipoproteína de baja densidad  
Mat: Matutino  
miRNA (siglas en inglés): MicroRNA  
mRNA (siglas en inglés): RNA mensajero  
NSQ: núcleo supraquiasmático  
pb: pares de bases

RAM: reacción adversa a medicamentos

PXR: receptor X de pregnano

RQ: expresión relativa

Rfc: fuerza centrífuga relativa, fuerza g

RNA (siglas en inglés): ácido ribonucleico

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

SV: simvastatina

TG: triglicéridos

Vd: Volumen de distribución

Vmax: La máxima velocidad de cambio que puede alcanzarse.

Vesp: Vespertino

VLDL: lipoproteína de muy baja densidad

$t_{1/2el}$ : Tiempo de vida media de eliminación

## XII. RESUMEN

La simvastatina es un fármaco indicado para disminuir el colesterol, las lipoproteínas y los niveles de triglicéridos. El objetivo de este estudio fue analizar la diferencia en la reducción del perfil lipídico entre pacientes con horarios matutinos y patrones regulares de alimentación y sueño (en adelante grupo matutino) y pacientes con horarios de predominio vespertino y patrones irregulares de alimentación y sueño (en adelante grupo vespertino) después de la administración de 40 mg de simvastatina, evaluando su farmacocinética y su relación con polimorfismos en los genes *CYP3A4/5*, *SLOC1B1*, *ABCB1* la expresión de los genes *Clock* y miRNAs.

Posterior a un escrutinio bioquímico en 42 voluntarios, se eligieron 19 pacientes con dislipidemia, quienes de acuerdo con el Cuestionario de Mañana-Tarde reducido, se clasificaron en dos grupos: 10 pacientes con ritmos matutinos y 9 con ritmos vespertinos.

Se administró una dosis única diaria de 40 mg de simvastatina (régimen moderado) durante 4 semanas a cada paciente, bajo el mismo régimen dietético. Se solicitó a los pacientes que informaran de cualquier malestar muscular para detectar una reacción adversa potencial. Ninguno de los pacientes fue sometido a algún tratamiento concomitante. Se determinó el perfil de lípidos al final del tratamiento con simvastatina; el cual mostró una disminución significativamente mayor en los pacientes del grupo matutino para TG, HDL y VLDL.

Se evaluaron 10 polimorfismos en genes del transporte (*SLCO1B1* y *ABCB1*), y metabolismo (*CYP3A4* y *CYP3A5*) de simvastatina; sin diferencias significativas para las frecuencias alélicas y genotípicas entre ambos grupos.

Entre los 9 sujetos del grupo vespertino, 2 presentaron miopatía leve caracterizada por inflamación muscular, debilidad y dolor, de acuerdo con criterios bien establecidos. Nuestros resultados sugieren que la miopatía en pacientes bajo tratamiento con simvastatina podría estar influenciada por los ritmos circadianos.

A 2 pacientes del grupo matutino y 2 pacientes del grupo vespertino se les realizaron dos estudios de farmacocinética: uno con dosis matutina y otro con dosis vespertina

de simvastatina. Durante estos estudios, se evaluó en diferentes tiempos de muestreo la expresión de los miRNAs-182 y 27b, relacionados al ritmo circadiano y al metabolismo hepático (*CYP3A4*), respectivamente.

La presencia de ritmos circadianos alterados se hace evidente de diferentes maneras. Observamos que los pacientes del grupo vespertino, presentaron anomalías en los diferentes estudios que realizamos: en primer lugar, se encontró una pobre disminución en el perfil de lípidos en respuesta a simvastatina, y/o la presencia de un evento adverso (miopatía); de igual manera los polimorfismos detectados en los genes del transporte y metabolismo de simvastatina estuvieron presentes en pacientes con y sin miopatía, siendo poco útiles como marcadores de riesgo en población mexicana. Finalmente, la expresión de los miRNAs en los diferentes tiempos del estudio farmacocinético, mostró un comportamiento similar posterior a la administración matutina y vespertina del fármaco en los pacientes matutinos. Los pacientes vespertinos mostraron un perfil de expresión errático al comparar la administración matutina y vespertina de simvastatina.

## XIII. ABSTRACT

Simvastatin is a drug indicated to decrease cholesterol, lipoproteins and triglyceride levels. The objective of this study was to analyze the differences in lipid profile reduction between patients with morning schedules and regular eating and sleeping patterns (referred to as the morning group) and patients with evening prevalence schedules and irregular eating and sleeping patterns (referred to as evening group) after the administration of 40 mg of simvastatin; evaluating its pharmacokinetics and its relationship with polymorphisms in *CYP3A4/5*, *SLOC1B1*, *ABCB1* genes, and the expression of the *Clock* genes and miRNAs.

After a scrutiny of 42 patients, 19 of them with dyslipidemia were chosen, whom according to the reduced Morning-Afternoon Questionnaire, were classified into two groups: 10 patients with morning rhythms and 9 with evening rhythms.

A single daily dose of 40 mg of simvastatin (moderate regimen) was administered for 4 weeks to each patient, under the same diet pattern. Patients were asked to report any type of muscle reaction to detect an adverse reaction. None of the patients received a concomitant treatment.

The lipid profile was evaluated at the end of the treatment with simvastatin, showing a significant reduction in evening group patients for TG, HDL and VLDL ( $p < 0.05$ ).

Ten polymorphisms on genes involved in transport (*SLCO1B1* and *ABCB1*) and metabolism (*CYP3A4* and *CYP3A5*) of simvastatin were evaluated. No differences in allele and genotype frequencies were found between groups.

Among the 9 subjects of the evening group, 2 were affected with mild myopathy, characterized by muscle inflammation, weakness and pain, according to well-established criteria. Our results suggest that myopathy in patients under treatment with simvastatin could be influenced by circadian rhythms.

Two patients in the morning and two in the evening groups were evaluated through 2 pharmacokinetic studies: one with morning dose and one with an evening dose of simvastatin.

During pharmacokinetic studies, the expression of miRNA 182 and 27b, related to circadian rhythm and hepatic metabolism (CYP3A4) respectively, was evaluated at different sampling times.

The presence of altered circadian rhythms becomes evident in different ways. We observed that the patients of the evening group, present anomalies in the different studies that we carried out: firstly, a poor lipid lowering effect in response to simvastatin administration was observed and/or the presence of an adverse event (myopathy). Similarly, these patients present polymorphisms in the transport and metabolism genes that may be related to the presence of myopathy; Finally, the expression of the miRNAS was not homogeneous in these patients as in the morning patients.

Similarly, the detected polymorphisms in the genes involved in the transport and metabolism of simvastatin were observed either in patients with myopathy and those unaffected. Hence, these markers are not useful as risk markers in Mexican population. Finally, the expression of the miRNAS on different sampling times of the pharmacokinetic study, showed a similar behavior after morning and evening administration of simvastatin in morning patients. Conversely, the evening patients showed an erratic expression profile when comparing the morning vs evening administration of the drug.

#### XIV. INTRODUCCIÓN

Los principales lípidos del organismo son los triglicéridos (TG), el colesterol libre (COL), el colesterol esterificado (CE) y los fosfolípidos (FL). Los triglicéridos almacenados en el tejido adiposo constituyen la reserva energética más importante. El colesterol forma parte de las membranas celulares, es el precursor de las hormonas esteroideas y de los ácidos biliares.

La simvastatina es un fármaco indicado para disminuir el colesterol, las lipoproteínas de baja (LDL, de “low-density lipoprotein” y VLDL de “very low-density lipoprotein”) y alta densidad (HDL, de “high-density lipoprotein”) y los niveles de triglicéridos. Además, la simvastatina reduce la síntesis de colesterol a través de la inhibición de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa (HMGCR) (Sadeghi, 2000). Clínicamente, disminuye el riesgo de mortalidad asociado al infarto agudo al miocardio. El polipéptido SLCO1B1 (de “solute carrier organic anion transporter family member 1B1”) también conocido como LST1, HBLRR, LST-1, OATP2, OATPC, OATP-C, OATP1B1 y SLC21A6, se encuentra en la membrana basolateral (sinusoidal) de los hepatocitos. SLCO1B1 es un factor determinante para el transporte (absorción) de varios inhibidores de la enzima HMGCR (como las estatinas) de la circulación portal a los hepatocitos (Ingelman-Sundberg, 2007). Específicamente, el polimorfismo SLCO1B1-521 (rs4149056) se ha asociado a una absorción hepática reducida y al aumento de la concentración sanguínea de varias estatinas, lo que podría incrementar el riesgo de reacciones adversas a estos medicamentos (ADR), como se ha descrito para el polimorfismo SLCO1B1-388 (rs2306283) el cual se ha implicado en el desarrollo de miopatías (Pasanen, 2007).

Después de su transporte al hígado, la simvastatina se metaboliza principalmente por las enzimas CYP3A4/5 (Prueksaritanont, 2003) que están reguladas por factores extrínsecos/ambientales (dieta, medicamentos concomitantes) y factores intrínsecos (edad, sexo, etnia, estado patológico, disfunción orgánica, constitución genética y ciclo circadiano) (Franceschi, 2008). Se ha observado una alta variabilidad en el metabolismo de sustratos de CYP3A4/5 in vivo (Thummel, 1998) debido en parte a la presencia de polimorfismos genéticos que alteran la actividad de las enzimas (Jiang F,

2017). Además, la expresión de *CYP3A4* también está regulada por mecanismos epigenéticos como los microRNAs (miRNAs); uno de ellos el miRNA-27, disminuye su expresión (Kim, 2014).

Por otra parte, el polimorfismo 3435C>T en el gen transportador *ABCB1*, representa un biomarcador útil para predecir la respuesta al tratamiento con estatinas. El uso de estos fármacos durante más de 5 meses puede aumentar el riesgo de miopatía (Fiegenbaum, 2005).

Otros estudios indican que los patrones de sueño alterados y largas jornadas de trabajo (por ej., trabajadores nocturnos) están asociados con malos hábitos alimenticios que aumentan el riesgo de sobrepeso/obesidad (Balieiro, 2014) y alteran el perfil lipídico y las hormonas involucradas en el control central del apetito (leptina y grelina) (Efstratiadis, 2007). Por este motivo, los patrones de sueño alterados podrían aumentar el riesgo de enfermedad cardiovascular (ECV).

La respuesta a los medicamentos también puede estar influenciada por el ciclo circadiano (el efecto de oscilación de la luz y la oscuridad en un día sobre variables biológicas). Los ritmos circadianos en humanos están regulados por los genes *Clock* (de “circadian locomotor output cycles kaput”) (Ko, 2006), que a su vez interactúan con los genes controlados por CLOCK (CCG, del inglés). Entre estos, el *DBP* [sitio D de la proteína de unión al promotor de albúmina (albúmina D-box)] está implicado en la regulación de la actividad transcripcional de *CYP3A4* (Foster, 2007).

La actividad circadiana de *CYP3A4*, la variación diurna en la síntesis de colesterol en el hígado y la formulación de liberación inmediata de simvastatina de uso común (vida media, 1.9-3 horas) (Jones, 1990) justifican la administración del fármaco por la noche. Sin embargo, en otros estudios, no se han encontrado cambios en la disminución de LDL-c (de “LDL-cholesterol”) (Wright, 2011) con respecto al momento de la administración de simvastatina (Kim, 2013).

El objetivo de este estudio fue evaluar la diferencia en la reducción del perfil lipídico entre pacientes con horarios matutinos y patrones regulares de alimentación y sueño (en adelante grupo matutino) y pacientes con horarios de predominio vespertino y patrones irregulares de alimentación y sueño (en adelante grupo vespertino) después

de la administración de 40 mg de simvastatina y su relación con *CYP3A4/5*, *SLOC1B1*, *ABCB1* la expresión de los genes *Clock* y miRNAS.

## XV. ANTECEDENTES

### 15.1 Lípidos

#### 15.1.1 Clasificación

Los lípidos, por su carácter hidrofóbico, no se encuentran circulando libres en el plasma, sino que se unen a proteínas. Las lipoproteínas transportan todos los lípidos que circulan en el plasma: colesterol libre y esterificado, triglicéridos y fosfolípidos. Sólo una pequeña proporción de los ácidos grasos forman parte de las lipoproteínas, ya que la mayoría de ellos circulan unidos a la albúmina. Algunas subclases de lipoproteínas y lipoproteínas modificadas con riesgo aterogénico son las LDL, que constituyen un grupo heterogéneo de lipoproteínas (Krauss, 1982). El diámetro de estas partículas es inferior a los 255 Å y se las asocia con mayor riesgo coronario (Austin, 1988), hipertrigliceridemia, HDL bajo y acompañan al síndrome de resistencia insulínica (Selby, 1993). Las HDL disminuidas son consideradas un factor de riesgo cardiovascular, mientras que su elevación es un factor protector; así por 1 mg/dl de elevación hay una disminución de 2.5% del riesgo, la relación es más fuerte para la mujer y no declina con la edad. Las VLDL tiene la función de transportar los triglicéridos de síntesis endógena, que son secretados a la circulación, impidiendo así la esteatosis hepática, además de redistribuir ácidos grasos a diferentes tejidos que los requieran (Selby, 1993).

#### 15.1.2 Metabolismo

Existen tres vías para el transporte de las lipoproteínas en el organismo: 1) Vía exógena: Transporta los lípidos de la dieta desde el intestino a sus diferentes destinos metabólicos en diversos tejidos. Los triglicéridos, colesterol y fosfolípidos que provienen del intestino son ensamblados en los quilomicrones (QM) que contienen la apo-B 48 sintetizada en el intestino; ésta es una apoproteína B más corta que la B100 de origen hepático (Tabas, 1999). 2) Vía endógena: Es un sistema mediado por apo B100 de síntesis hepática que forma parte de la estructura de las VLDL, IDL (de

“intermediate-density lipoproteins”) y LDL. Esta vía se inicia en el hígado donde primero se ensamblan y luego se secretan las VLDL. La síntesis hepática de estas lipoproteínas aumenta con la ingestión de grasa e hidratos de carbono. Las VLDL transportan triglicéridos hacia los tejidos periféricos (tejido adiposo y músculo), y colesterol hacia las suprarrenales y membranas plasmáticas. El colesterol es transportado en las VLDL como colesterol esterificado y colesterol libre. Las VLDL provenientes del hígado, entran en la circulación e intercambian con las HDL, apo C-I, apo C-II activador de la lipoproteinlipasa (LPL), apo C-III inhibidor de la LPL y apo E, modulando la unión de las VLDL con receptores en la superficie celular.

Sin embargo, el 75% de la captación de las LDL ocurre en el hígado, el resto en las suprarrenales y tejido adiposo. Para que el proceso se realice es esencial la presencia de apo B 100 y de receptores para su reconocimiento. Una vez en el interior de la célula la partícula es desarmada en sus componentes proteicos y lipídicos, el colesterol libre en exceso es re-esterificado por acil-CoA-colesterol aciltransferasa (ACAT) para el almacenamiento intracelular (Tabas, 1999).

3) Vía para el transporte del colesterol desde la periferia al hígado (vía de retorno). Es un sistema mediado por apo AI, contenido en las HDL, utilizado en el transporte del colesterol desde la periferia hacia el hígado. Este sistema está interconectado con la vía exógena y endógena del transporte de lípidos (Tall, 1999).

### **15.1.3 Condiciones que afectan el metabolismo de los lípidos**

El metabolismo de lípidos puede ser afectado por diferentes factores como la edad, el sexo, la presencia de enfermedades metabólicas como la diabetes, factores genéticos, entre otros (Juvevics, 2000). Todos estos factores son responsables de la variabilidad en el metabolismo de lípidos, lo que tiene como consecuencia el desarrollo de diferentes dislipidemias.

#### **Hipolipidemias**

La disminución de lípidos en sangre suele estar asociada a enfermedades como el hipotiroidismo, la desnutrición, malabsorción gastrointestinal o anemia, o encontrarse en el rango bajo de la normalidad; no teniendo significado clínico por sí mismo.

En la hipobetalipoproteinemia la LDL está disminuida, en la abetalipoproteinemia o síndrome de Bassen-Korzweig o acantocitosis, hay retraso mental y heces grasas entre otros síntomas; y en la enfermedad de Tangier o hipoalfalipoproteinemia hay descenso de HDL, polineuropatía y depósitos de colesterol en hígado y bazo.

Otros trastornos raros del metabolismo de los lípidos son la xantomatosis cerebrotendinosa y la sitosterolemia.

## **Hiperlipidemias**

Los niveles aumentados de colesterol y otros tipos de lípidos, como tal, cursan habitualmente asintomáticas, pero las alteraciones en los lípidos se han demostrado relacionadas con enfermedades cardiovasculares.

### **Hiperlipidemias hereditarias**

Hipertrigliceridemia de herencia autosómica recesiva (hiperlipoproteinemia tipo I), cursa con episodios de dolor abdominal, pancreatitis y depósitos grasos en la piel (xantomas).

Hipercolesterolemia familiar por deficiencia del receptor de las LDL (hiperlipoproteinemia tipo IIa), cursa con arteriosclerosis coronaria prematura y xantomas.

Hiperlipidemia combinada (Tipo IIb), hay aumento de colesterol y triglicéridos.

Disbetalipoproteinemia (Tipo III), cursa con xantomas y arteriosclerosis precoz.

Hipertrigliceridemia familiar (hiperlipidemia tipo IV), cursa con obesidad, hiperglucemia y arteriosclerosis.

Hipertrigliceridemia mixta (Tipo V), se asocia a obesidad, hiperglucemia e hiperuricemia.

Déficit de lecitina colesterol acil-transferasa, cursa con problemas hepáticos, renales, oculares, anemia y arteriosclerosis acelerada (Jurevics, 2000).

## **15.1.4 Diagnóstico de Hiperlipidemias**

### **15.1.4.1 Diagnóstico Clínico**

Actualmente el diagnóstico de hiperlipidemias y su consecuente tratamiento se basa en la Guía para el Tratamiento de la Hiperlipidemia ACC/AHA (ATP IV, 2013). Esta

Guía clasifica a los pacientes de acuerdo a sus niveles de riesgo cardiovascular al considerar la concentración de colesterol total, de LDL, obesidad, tabaquismo, HDL inferior a 35 mg/dl, sedentarismo, género masculino, posmenopausia, diabetes, historia familiar de evento cardiovascular (ECV) precoz y antecedentes de evento cerebrovascular en:

- Riesgo ligero. Pacientes con concentración de colesterol plasmático total entre 200 y 300 mg/dl, sin otros factores de riesgo cardiovascular asociados. En estas circunstancias el riesgo de enfermedad cardiovascular empieza a aumentar de forma notable, pero en ausencia de factores de riesgo asociados, la actitud debe ser relativamente conservadora.

- Riesgo moderado. Individuos con concentraciones de colesterol plasmático total entre 200 y 300 mg/dl asociado a un factor de riesgo no-lipídico o a una concentración de LDL inferior a 35 mg/dl. Aunque es una situación similar a la anterior, la presencia del citado factor aumenta el riesgo de ECV y por tanto se requiere una mayor atención del individuo portador.

- Alto riesgo. Individuos con concentración de colesterol plasmático total superior a 300 mg/dl, independientemente de la presencia concomitante de otros factores de riesgo cardiovascular asociados. La coexistencia de otros factores de riesgo cardiovascular potenciaría aún más el riesgo global. Individuos con concentración de colesterol plasmático total entre 200 y 300 mg/dl con dos o más factores de riesgo cardiovascular asociados o con un factor de riesgo de grado severo. Individuos que han padecido un accidente cardiovascular agudo independientemente de la concentración de colesterol actual.

#### **15.1.4.2 Pruebas de Laboratorio**

La Asociación Americana de Endocrinólogos Clínicos (AACE 2017 Guidelines) recomienda realizar exámenes de laboratorio de acuerdo con las metas de tratamiento de pacientes con riesgo cardiovascular (Tabla 1).

Tabla 1. Categorías de riesgo de enfermedad Cardiovascular Aterosclerótica y metas de tratamiento para LDL-C

<b>Categoría de riesgo</b>	<b>Factores de riesgo</b>	<b>LDL-C (mg/dl)</b>	<b>No-HDL-C (mg/dl)</b>	<b>Apo B (mg/dl)</b>
Riesgo Extremo	-CVD (del inglés: "cardiovascular disease") -CVD establecida en pacientes con diabetes -Historia de CVD prematura (<55 hombres, <65 mujeres)	<55	<80	<70
Riesgo muy alto	-ACS (del inglés: "acute coronary syndrome") establecida o reciente hospitalización, enfermedad coronaria, de carótida o vascular periférica. -Diabetes con uno o más factores.	<70	<100	<80
Riesgo Alto	<2 factores y 10 años de riesgo 10-20% Diabetes sin otros factores.	<100	<130	<90
Riesgo Moderado	<2 factores de riesgo y 10 años de riesgo <10%	<100	<130	<90
Riesgo Bajo	Sin factores de riesgo	<100	<160	NR

NR, no recomendado

### 15.1.5 Tratamiento de la hiperlipidemia

#### 15.1.5.1 Tratamiento no farmacológico

- Se recomienda realizar actividad física, terapia nutricional médica (disminución de ácidos grasos no saturados) y las recomendaciones de las guías de las Recomendaciones y Efectos Clínicos Nutricionales; además se recomienda la interrupción del tabaquismo (AACE 2017 Guidelines).

### **15.1.5.2 Tratamiento farmacológico con hipolipemiantes.**

Existen diversos tratamientos para disminuir los diferentes tipos de colesterol y sus transportadores.

#### **Estatinas**

De acuerdo con la Guía para el tratamiento de hiperlipidemia ACC/AHA (ATP IV, 2013), la cual da prioridad al uso de estatinas de alta y moderada intensidad en el manejo del colesterol, se han definido cuatro grupos de sujetos que se benefician de este tipo de medicamentos (Tabla 2). No se aconsejan terapias con otros fármacos “no estatinas” en el manejo de colesterol, salvo que exista intolerancia demostrada a las estatinas. Entre éstas se encuentran Atorvastatina, Fluvastatina, Lovastatina, Pitavastatina, Pravastatina, Simvastatina y Rosuvastatina.

#### **Niacina y Fibratos**

En numerosos estudios, la niacina y los fibratos han mostrado un efecto favorable a todos los componentes que caracterizan la dislipidemia aterogénica. Entre ellos se encuentran el bezafibrato, el ezetimibe, el gemfibrozil, entre otros (Jellinger, 2017).

#### **Secuestradores de ácido biliar**

La colestiramina es el medicamento actualmente aprobado para el tratamiento de hipercolesterolemia en niños. Su mecanismo de acción está relacionado al secuestro del ácido biliar encargado de emulsificar los ácidos grasos.

Tabla 2. Terapia con estatinas, indicaciones e intensidades

	Alta Intensidad	Moderada Intensidad
Reducción aproximada de colesterol LDL	≥ 50%	30%-49%
Indicaciones		
Grupo 1	Enfermedad aterosclerótica cardiovascular, Edad <75 años	Enfermedad aterosclerótica cardiovascular, Edad ≥ 75 años
Grupo 2	LDL ≥ 190 mg/dL	LDL ≥ 190 mg/dL, si no tolera dosis alta estatina
Grupo 3	Diabetes Edad 40-75 años LDL 70-189 mg/dL Riesgo 10 años ≥ 7.5%	Diabetes Edad 40-75 años LDL 70-189 mg/dL Riesgo 10 años ≤ 7.5%
Grupo 4	No diabetes Edad 40-75 años LDL 70-189 mg/dL Riesgo 10 años ≥ 7.5%	No diabetes Edad 40-75 años LDL 70-189 mg/dL Riesgo 10 años ≤ 7.5%
Estatinas (ejemplos)	Atorvastatina 40-80 mg Rosuvastatina 20-40 mg	Atorvastatina 10-20 mg Rosuvastatina 5-10 mg Simvastatina 20-40 mg Pravastatina 40-80 mg Lovastatina 40 mg Pitavastatina 2-4 mg
		Pravastatina 2-4 mg

(AACE 2017 Guidelines)

## 15.2 Descripción de la simvastatina

### 15.2.1 Mecanismo de acción

La simvastatina es un profármaco (Figura 1) cuyo metabolito principal es un potente inhibidor competitivo de la enzima HMGCR por lo cual reduce el colesterol total, las LDL, los TG y las apo B, y aumenta las HDL (Sayar, 2016).

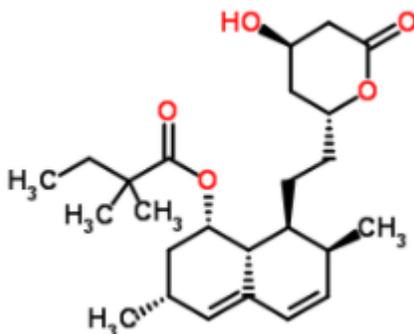


Figura 1. Estructura molecular de la simvastatina ( $C_{25}H_{38}O_5$ )

### 15.2.2 Farmacocinética de simvastatina

La simvastatina se absorbe en el intestino como un profármaco, que es transportado al hepatocito por SLCO1B1 y metabolizado por CYP3A4 y CYP3A5 para generar el metabolito activo  $\beta$ -simvastatina hidroxilácida (Graefe-Mody, 2010), que tiene una función hipolipidémica.

Aunque el 85% de la dosis de simvastatina se absorbe después de ser administrada por vía oral, solamente 5% de ésta alcanza la circulación sistémica debido a un metabolismo extenso de primer paso (Figura 2).



Su concentración máxima se alcanza entre 1.3 - 2.4 horas posterior a su administración. El 95% de la fracción que alcanza la circulación se encuentra unida a proteínas. En dosis de 5 a 80 mg al día, se ha observado una farmacocinética lineal. La administración de una dieta baja en grasas no afecta de manera importante la farmacocinética de simvastatina. Esta sufre un intenso efecto de primer paso hepático, con una biodisponibilidad <5%. Los principales metabolitos de simvastatina son 3'-hidroxi (SV), 6' $\beta$ -hidroximetil (SV) y 6'-exometileno (SV). La simvastatina es metabolizada principalmente ( $\geq 80\%$ ) por *CYP3A4* y *CYP3A5* (*Prueksaritanont, 2003*). Presenta un tiempo de vida media de 2 hrs. La excreción ocurre principalmente en las heces (60%) y en la orina (13%), por los transportadores *ABCB1* y *ABCC2* (Zhou, 2013).

### 15.2.3 Indicaciones y contraindicaciones

La simvastatina está indicada en el tratamiento de hipercolesterolemia, hiperlipoproteinemia y/o hipertrigliceridemia concomitante a una dieta controlada (pacientes con hipercolesterolemia primaria, dislipidemia mixta -tipo Fredrickson IIa y IIb-, hipertrigliceridemia con VLDL aumentadas - tipo Fredrickson IV - o beta-dislipoproteinemia primaria - tipo Fredrickson III).

También está indicada, en el tratamiento de pacientes con hipercolesterolemia familiar homocigótica (Tsimihodimos, 2000)), para retardar la progresión de la arteriosclerosis coronaria, prevención del infarto y del ictus

La simvastatina ha demostrado ser eficaz en la prevención del infarto coronario reduciendo la mortalidad por causas coronarias y el riesgo de los procedimientos de revascularización en pacientes con hipercolesterolemia y enfermedad coronaria. Además, la simvastatina reduce el riesgo de ictus y de accidentes vasculares cerebrales en los pacientes con hipercolesterolemia, y está indicada en el tratamiento de la esclerosis múltiple (Agencia española de medicamentos y productos sanitarios).

Por otro lado, se recomienda la administración nocturna de la simvastatina (como la mayoría de las estatinas), debido a la variación diurna en la síntesis de colesterol en el hígado (Jones, 1990), que es cuando alcanza mayores concentraciones. Sin

embargo, otros estudios sugieren que la disminución de LDL por la administración de simvastatina durante la noche no es superior a la dosis matutina (Wright, 2011).

#### **15.2.4 Reacciones adversas**

Se debe advertir a los pacientes sobre el riesgo de miopatía, incluida la rabdomiólisis con dosis desde 80 mg. El riesgo aumenta con dosis más altas y el uso concomitante de ciertos medicamentos que inhiben a *CYP3A4* y *CYP3A5*. Los factores predisponentes incluyen edad avanzada ( $\geq 65$  años), sexo femenino, e insuficiencia renal. Se han notificado casos raros de rabdomiólisis con insuficiencia renal aguda secundaria a mioglobinuria.

Se debe aconsejar a los pacientes que informen rápidamente cualquier dolor muscular inexplicable y/o persistente, sensibilidad o debilidad. La simvastatina debe interrumpirse inmediatamente si se diagnostica o sospecha una miopatía.

### **15.3 Factores que afectan la respuesta a simvastatina**

La respuesta de simvastatina está influenciada por diferentes factores, como la edad, el género (femenino), el origen étnico, la dieta, las interacciones medicamentosas, exposición a contaminantes ambientales, uso de tabaco y alcohol, presencia de comorbilidades metabólicas y los factores genéticos (Kitzmilller, 2016).

Entre los factores genéticos se encuentran los polimorfismos en genes encargados del transporte (*SLCO1B1* y *ABCB1*) y metabolismo (*CYP3A4/5*) de simvastatina (Voora, 2009, Wilke, 2012).

#### **15.3.1 Factores genéticos**

##### **15.3.1.1 Polimorfismos genéticos en *CYP3A4/5***

Las enzimas del citocromo P450 (*CYP450*) son las principales encargadas del metabolismo hepático. Esta superfamilia está compuesta por 18 familias y 45 subfamilias, codificadas por 57 genes *CYP* (Nelson, 1996)

La enzima CYP3A4 metaboliza del 30 al 40% de los fármacos utilizados actualmente, entre estos se encuentran los procinéticos, inmunosupresores, bloqueadores de los canales de calcio, agentes quimioterapéuticos para el cáncer, sedantes y estrógenos sintéticos (Wonjnowski, 2004). CYP3A4 está involucrado en otros procesos como en el metabolismo de la vitamina D (Shirmer, 2006), y en la hidroxilación de esteroides con un importante papel en el catabolismo de varios de estos agentes endógenos como testosterona, progesterona, cortisol y ácidos biliares.

Esta enzima se expresa principalmente en hígado e intestino delgado. La proteína CYP3A4 se localiza en el retículo endoplásmico y su expresión es inducida por glucocorticoides y algunos agentes farmacológicos (Zanger, 2013). El gen *CYP3A4* exhibe una región reguladora de alta complejidad sensible a los ligandos endógenos y exógenos PXR y CAR (Qiu, 2010).

Se han descrito 44 variantes alélicas o polimorfismos del gen *CYP3A4*, una de las más frecuentes es el alelo *CYP3A4\*1B* (-392A>G, rs2740574). Este polimorfismo se asoció en un principio con un mayor grado y estadio tumoral en el cáncer de próstata y mostró una mayor actividad de nifedipina oxidasa en hígados humanos (Rebbeck, 1998).

En un estudio realizado por Shirmer (Schirmer, 2006), *CYP3A4\*1B* mostró un efecto sobre la expresión de RNAm y la actividad de CYP3A4 evaluada como  $V_{max}$  de 6 beta-hidroxilación de testosterona en hígado. El alelo *CYP3A4\*1B* se asocia con menores concentraciones plasmáticas de estatinas, particularmente en mujeres y en presencia del alelo 3435T del gen *ABCB1* (Becker, 2010).

Actualmente, el efecto funcional de esta variante es aún cuestionable debido a resultados controversiales descritos en varios estudios realizados tanto in vitro como en hígado humano.

El polimorfismo *CYP3A4\*1B* está presente en poblaciones indígenas de origen Tepehuano y en Mestizos mexicanos con frecuencias de 8.0-8.8%, respectivamente;

en caucásicos la frecuencia varía de 2 al 9% y es muy alta en afroamericanos (53%) (Reyes-Hernández, 2008).

### 15.3.1.2 Polimorfismos genéticos en *CYP3A5*

Se han observado alteraciones farmacocinéticas de estatinas asociadas con polimorfismos en *CYP3A5*, a pesar de que su rol en el metabolismo de este tipo de fármacos es menos prominente que *CYP3A4* (Park, 2008). El polimorfismo más frecuentemente estudiado de *CYP3A5* es *CYP3A5\*3* (g.6986A>G) cuyo cambio genera un sitio de corte y empalme crítico en el intrón 3, lo que provoca un transcrito aberrante que causa una proteína *CYP3A5* truncada. Por lo tanto, individuos con genotipo *CYP3A5\*3/\*3* no expresan una proteína activa (Jatinder, 2016).

La frecuencia del alelo *CYP3A5\*3* varía ampliamente entre las poblaciones humanas. En las poblaciones caucásicas, la frecuencia del alelo *CYP3A5\*3* es de 0.82-0.95, en afroamericanos de 0.33, en japoneses de 0.85, en chinos de 0.65, en mexicanos de 0.75 y en Amerindios del suroeste de los Estados Unidos de 0.40 (Kivistö, 2004).

Kivisto et al (2004) reportó que la reducción en el colesterol total fue mayor en portadores homocigotos de *CYP3A5\*3* comparados con aquellos que tenían un alelo funcional en pacientes utilizando simvastatina; dicha reducción no fue reportada por Ragia et al (Ragia, 2015) en un estudio de 99 pacientes quienes recibieron 20 mg de simvastatina diaria durante 6 meses.

Existen otras proteínas que participan en la regulación del metabolismo de simvastatina tales como los factores de transcripción DBP, TEF y HLF (miembros de la familia PAR bZIP) (49), los cuales representan algunas de las proteínas mejor conservadas en los mamíferos. Estas proteínas se expresan de una manera circadiana en el hígado, el riñón y el intestino delgado, donde contribuyen a la desintoxicación y el metabolismo de los fármacos; por ejemplo, DBP activa la transcripción de *CYP3A4* humano, *cyp3a11* de ratón y *Cyp2c6* de rata (Kosir, 2013).

### 15.3.1.3 Polimorfismos genéticos en *SLCO1B1* y *ABCB1*

Como ya se mencionó, posterior a su administración, la simvastatina se absorbe en el intestino como pro-fármaco y posteriormente es transportado hacia el interior del hígado por *SLCO1B1*. A nivel hepático, el gen *SLCO1B1* codifica una proteína específica de la familia de transportadores de aniones orgánicos; es un receptor transmembrana que media la absorción independiente de sodio de numerosos compuestos endógenos que incluyen bilirrubina, 17-beta-glucuronosil estradiol y leucotrieno C4. Esta proteína también está involucrada en la eliminación de compuestos farmacológicos tales como estatinas, bromosulfoftaleína y rifampicina. Las enfermedades asociadas con *SLCO1B1* incluyen hiperbilirrubinemia tipo rotor y toxicidad de estatinas. Se expresa en diferentes tejidos como el hígado, riñón, intestinos, pulmones, entre otros (Abe, 1999).

Varios polimorfismos en *SLCO1B1* dan como resultado un transporte alterado de estatinas y sus metabolitos en el hígado. Es dentro de los hepatocitos que las estatinas ejercen su acción reductora de lípidos a través de la inhibición de la síntesis de colesterol por la enzima HMG-CoA. A pesar del papel de *SLCO1B1* en el transporte de estatinas, las variantes en *SLCO1B1* se han asociado solo con efectos menores en la respuesta a este tipo de fármacos (Peters, 2010). Dos de los polimorfismos más estudiados en *SLCO1B1* son el 521 T>C presente en el exón 5 y el 388 A>G presente en el exón 4. Un ensayo farmacocinético clínico *in vivo* determinó que los dos polimorfismos se asociaron con una reducción significativa en la depuración oral de pravastatina, sin embargo, la asociación entre los polimorfismos del gen *SLCO1B1* y la eficacia de la estatina ha sido difícil de determinar (Dai, 2015).

Dos estudios han demostrado que el polimorfismo 521 T>C se asoció con un efecto significativo hipolipemiente por parte de simvastatina, atorvastatina, lovastatina y pravastatina (Dai, 2015; Yang, 2006). El polimorfismo 521T>C, afecta significativamente la farmacocinética de simvastatina y el riesgo de presentar toxicidad (Yang, 2006). El área bajo la curva (AUC) de simvastatina fue aproximadamente el doble en sujetos con el polimorfismo 521T>C que con el tipo silvestre (n=41, p<0.01)

(Donnelly, 2011). En población mexicana, se ha descrito una frecuencia de sujetos homocigotos del alelo 521T>C de 1.8% y de 17.5% de heterocigotos (TC); en brasileños la frecuencia de homocigotos es de 2.1% y de 23.8% la de sujetos (TC), en nigerianos e italianos la frecuencia de homocigotos es de 1.4% y 3.9%, mientras que la de heterocigotos es de 24.5% y 37.3%, respectivamente (Agnes, 2015).

Se han reportado asociaciones del polimorfismo 521 T>C con la disminución del transporte de simvastatina al interior de los hepatocitos, el incremento de sus concentraciones sistémicas, y mayor riesgo de miopatía. Lo anterior, impulsó la implementación del Consorcio de Farmacogenética Clínica (CPIC), para establecer recomendaciones formales de prescripción para simvastatina que se basan en las categorías de riesgo de miopatía (bajo, intermedio, o alto) según el genotipo 521T>C (Maningat, 2013, Josephine, 2014).

Por otro lado, la frecuencia de homocigotos del polimorfismo 388 A>G en población brasileña es de 8.4% y de 35.7% de heterocigotos (AG), en población china es de 64% (GG) y de 31% (AG) (Agnes, 2015). El polimorfismo 388 A> G no se ha asociado con la reducción en los niveles séricos de TC, LDL-C y TG. Sin embargo, el colesterol de las lipoproteínas de alta densidad aumentó significativamente en presencia de este polimorfismo en sujetos bajo tratamiento con atorvastatina ( $p=0.02$ ) (Prado, 2015).

Por otra parte, el transporte hepato-biliar y renal-urinario de las estatinas y sus metabolitos, ocurre por la vía de la proteína transportadora ABCB1. Este transportador se expresa en las células del epitelio intestinal, donde expulsa xenobióticos (como toxinas o fármacos) previamente absorbidos hacia el lumen intestinal. En las células del hígado ABCB1 secreta los xenobióticos hacia los conductos biliares; en las células del riñón los transporta hacia los túbulos urinarios, y en las células del endotelio capilar forma parte de la barrera hematoencefálica y la hematotesticular. Algunas células tumorales también expresan gran cantidad de ABCB1, siendo esta una causa importante de la multi-resistencia a los fármacos de algunos tipos de cáncer (Dean, 2006).

Tres polimorfismos en *ABCB1* se han asociado con la farmacocinética y toxicidad de estatinas (1236T>C, 2677C>T/A, 3435T>C); aquellos con un haplotipo TTT, tuvieron un AUC de simvastatina cerca de un 60% mayor que con el haplotipo CCT ( $p= 0.039$ ) (Keskitalo, 2008).

### **15.3.2 Cronobiología**

#### **15.3.2.1 El ritmo circadiano**

La absorción, distribución, metabolismo y eliminación (sistema ADME) de un fármaco describe su disposición en el organismo. Este sistema está influenciado por factores fisiológicos que oscilan en un periodo de 24-h. Esto es la base de la Cronofarmacología y la Cronoterapia que representa la interacción entre los ritmos circadianos y el uso de fármacos. La Cronofarmacología evalúa los efectos terapéuticos y adversos de los fármacos relacionados a los cambios en las funciones biológicas durante 24 horas. La Cronoterapia se enfoca más en el horario del día cuando los fármacos deben administrarse para obtener su máxima eficacia y mínimos eventos adversos en sincronía con el reloj endógeno.

El núcleo supraquiasmático (NSQ) localizado a nivel hipotalámico en el cerebro, es el reloj maestro que coordina la relación que se establece entre varios órganos y sistemas fisiológicos y el ambiente en todos los momentos del día. El NSQ envía señales a través de la retina al resto del cerebro y osciladores periféricos y tejidos para coordinar el tiempo “interno” del cuerpo durante un periodo de 24 hrs (Gachon, 2006). Es decir, la cantidad de luz ambiental es detectada en la retina por fotorreceptores circadianos diferentes a los que intervienen en la visión, los cuales sincronizan al NSQ con el ciclo día-noche (Yan, 2016). Estos ritmos de 24 horas regulan funciones corporales, dependiendo de la hora.

Diferentes funciones o actividades realizadas en diversos tejidos presentan ritmos circadianos, como es la presión arterial, la frecuencia cardíaca, la temperatura y la secreción de melatonina (Azama, 2007).

La melatonina es una hormona secretada por la glándula pineal del sistema endócrino y se encarga entre otras cosas de regular el “reloj biológico”, esto permite hacer más

consciente el tiempo y sus ciclos. Provoca sueño por la noche, cuando aumenta la cantidad de melatonina en el organismo; presenta un periodo tanto diario y estacional, se ha convertido en un elemento clave de la investigación en cronobiología. En los mamíferos, la melatonina pineal es esencial para la transducción de la información de la duración del día en las respuestas fisiológicas estacionales. Es probable que el ritmo diario de melatonina endógena desempeñe un papel en el mantenimiento de la sincronía entre los relojes circadianos en todo el cuerpo de un adulto (Johnston, 2015).

#### **15.3.2.2 Regulación del ciclo circadiano por los genes *CLOCK***

Los ritmos circadianos en el ser humano son regulados por los genes reloj (*CLOCK*, de “circadian locomotor output cycles kaput”) (Figura 3) que modulan dos circuitos de retroalimentación: en el primero de ellos al inicio del día circadiano (primeras horas de la mañana), el heterodímero *CLOCK*/ *BMAL1*, activa la transcripción de los genes *PER* y *CRY*. Hacia la mitad del día circadiano (comienzo de la noche), las proteínas *PER* y *CRY* forman heterodímeros que secuestran a *CLOCK*/*BMAL1*, por lo tanto, *PER* y *CRY* actúan como un sistema de retroalimentación negativo (Ko, 2006).

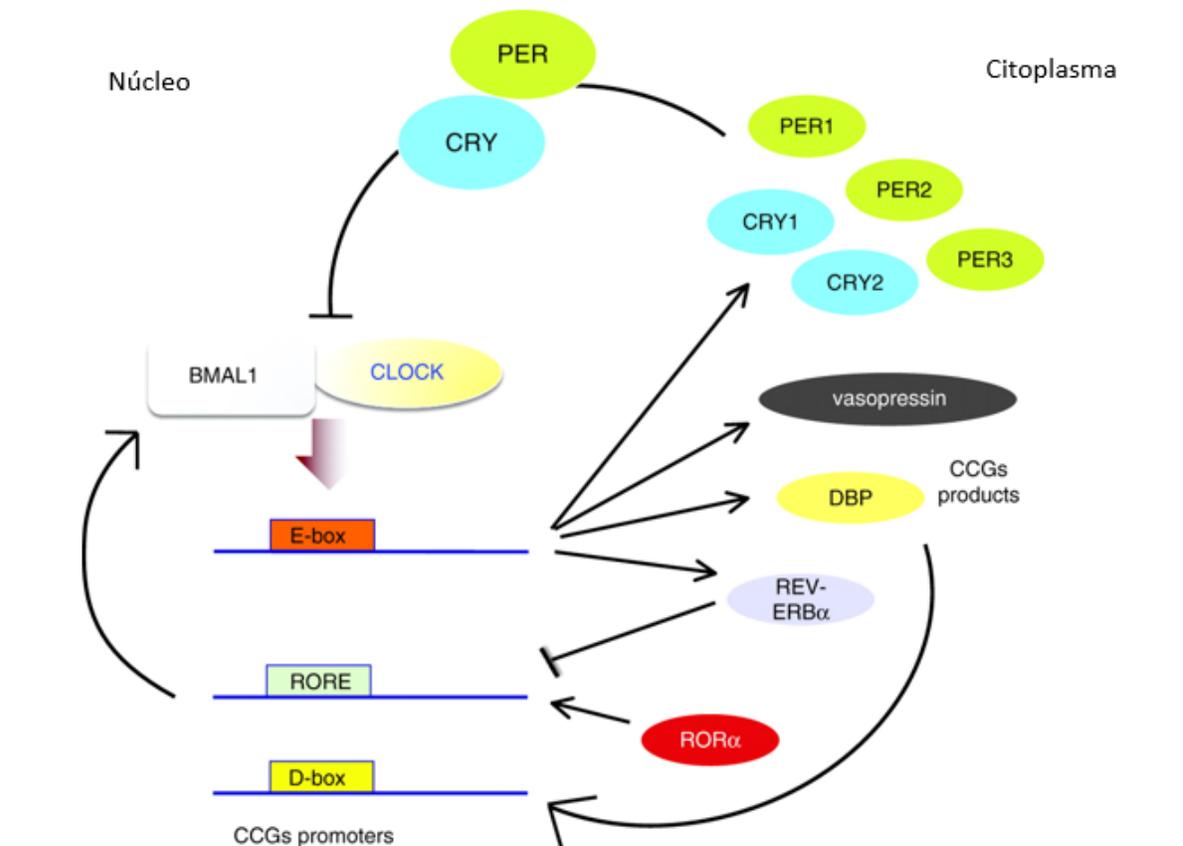


Figura 3. Regulación de genes *CLOCK*. (Albrecht, 2002)

El segundo circuito consiste en la activación transcripcional del gen *REV-ERB* alfa por *CLOCK/BMAL1*. El gen *REV-ERB* codifica para un receptor huérfano nuclear (*REV-ERB*), que una vez en el núcleo, se une al promotor del gen *BMAL1* y reprime su transcripción. Por otro lado, los dímeros de las proteínas *PER/CRY* inhiben la transcripción de *REV-ERB* e indirectamente estimulan la transcripción del gen *BMAL1* (Foster, 2007).

Los niveles máximos y mínimos en la expresión de los genes *CLOCK* y *BMAL1*, ocurren con una periodicidad cercana a las 24 horas, de esta manera establecen el ritmo circadiano de otros genes en el organismo. A estos genes se les denomina genes controlados por el reloj (CCG, "clock controlled genes"). Entre los CCG se encuentra *DBP*, el cual regula el receptor nuclear *CAR*, que a su vez regula la expresión de varias enzimas metabolizadoras incluyendo *CYP3A4* (Foster, 2007).

### **15.3.3 Mecanismos epigenéticos**

#### **15.3.3.1 Generalidades**

El término Epigenética se refiere a los cambios heredables en la estructura y organización del DNA que no involucran cambios en la secuencia y que modulan la expresión génica. Los mecanismos tradicionales de regulación epigenética incluyen metilación del DNA y modificación de histonas (proteínas encargadas de empaquetar el DNA), mecanismos que participan en la modulación de los complejos que remodelan la cromatina. También se encuentran los miRNA (Reggie, 2012), que son RNAs de cadena sencilla que varían en tamaño desde 17 hasta 25 pb, con un tamaño común de 21 pb. Los miRNAs son moléculas pequeñas no codificantes de RNA, con la capacidad de reconocer por complementariedad de bases ciertas regiones de un RNA mensajero (mRNA) blanco. Una particularidad importante de los miRNAs es que todos sus precursores forman estructuras tipo tallo y asa, lo que se ha convertido en una propiedad esencial para los grupos que están interesados en su identificación. Participan en un sinnúmero de procesos, regulando la expresión de una gran cantidad de RNAs mensajeros involucrados en diferentes procesos tales como la diferenciación, la proliferación y la muerte celular (Bohnsack, 2004).

#### **15.3.3.2 Biogénesis de los miRNAs**

Los miRNAs primarios (pri-miRNAs) se transcriben de las regiones exónicas o intrónicas del genoma, así como de regiones intergénicas por la RNA polimerasa II. Estos pri-miRNAs contienen una estructura en forma de tallo y horquilla de 33pb, un bucle terminal y una secuencia flanqueante de cadena simple de cientos de bases o incluso varias kilobases. Por lo general, en su extremo 5' los pri-miRNA son modificados por un proceso llamado "capping" que consiste en la unión de un nucleótido de guanina ligado al RNA mediante un enlace trifosfato 5'-5', mientras que su extremo 3' es poliadenilado. Después de la transcripción, Drosha una RNasa III, procesa el pri-miRNA al cortarlo a una distancia de 11pb de la estructura de tallo y horquilla. Este proceso puede ocurrir co-transcripcionalmente o antes del procesamiento del RNA ("splicing"), cuyo producto es una molécula de RNA

intermediario conocida como pre-miRNA con 22 pb en la estructura de tallo y 48 pb en el bucle terminal.

Los pre-microRNAs se exportan desde el núcleo celular hasta el citoplasma por medio de la proteína Exportina-5 (una proteína dependiente de Ran-GTP dsRNA-de unión al RNA) en un proceso dependiente de GTP. Exportina-5 además, protege los pre-miRNA contra degradación nuclear. En el citoplasma, Dicer, otra RNasa III digiere los pre-microRNAs en un miRNA dúplex maduro de 22 pb (Hutvágner, 2001; Ketting, 2011). La proteína Dicer se caracteriza por poseer un dominio PAZ (“Piwi/Argonaute/Zwile”), un dominio de unión a dsRNA y dos dominios RNasa III. Gracias al dominio PAZ es capaz de unirse a la región 3’UTR de los pre-microRNAs, y mediante la actividad de sus dominios RNasa III corta en cada una de las cadenas que conforman el pre-microRNA (Ketting, 2011). Después de la generación del dúplex de miRNA, las hebras se desenrollan en un proceso independiente de ATP (no se sabe aún como es que ocurre este proceso). Una cadena (el miRNA guía) se carga en el complejo silenciador inducido por RNA (RISC) formado por la unión de Dicer, TRBP, PACT, la proteína Argonauna 2 (Ago2) y GW182. Es importante observar que las proteínas accesorias pueden regular la biogénesis del miRNA en cada uno de estos pasos de progresión. En la figura 4, un miRNA se muestra como una cadena azul, el cual es conducido por el complejo RISC hacia un mRNA para inducir su desestabilización o la represión de su traducción.

### **15.3.3.3 Influencia de los miRNAs en el metabolismo de simvastatina**

En un estudio hecho *in vitro* llevado a cabo por PAN y colaboradores (Pan, 2009), describieron que el miRNA-27b se dirige a la región 3'UTR de los genes *CYP3A4* y *VDR* (receptor de vitamina D), lo que lleva a la regulación negativa de *CYP3A4*. Además, algunos datos sugieren que la baja regulación de *CYP3A4* a través de las vías mediadas por miRNA se traduce en un aumento significativo de la sensibilidad a algunos fármacos, como a la ciclofosfamida. Estos hallazgos pueden proporcionar una mayor comprensión de la regulación de *CYP3A4*, y ofrecen nuevas pistas sobre el papel de los miRNAs en el metabolismo y la disposición de los fármacos. Los miRNAs

regulan la expresión de CYP3A4 mediante direccionamiento directo e indirecto, un ejemplo de este último es miR-148 (in vitro) (Takagi, 2008). La expresión de CYP3A4 es regulada también por otros factores epigenéticos como la acetilación de la histona H4 inducida por dexametasona (Assenat, 2004).

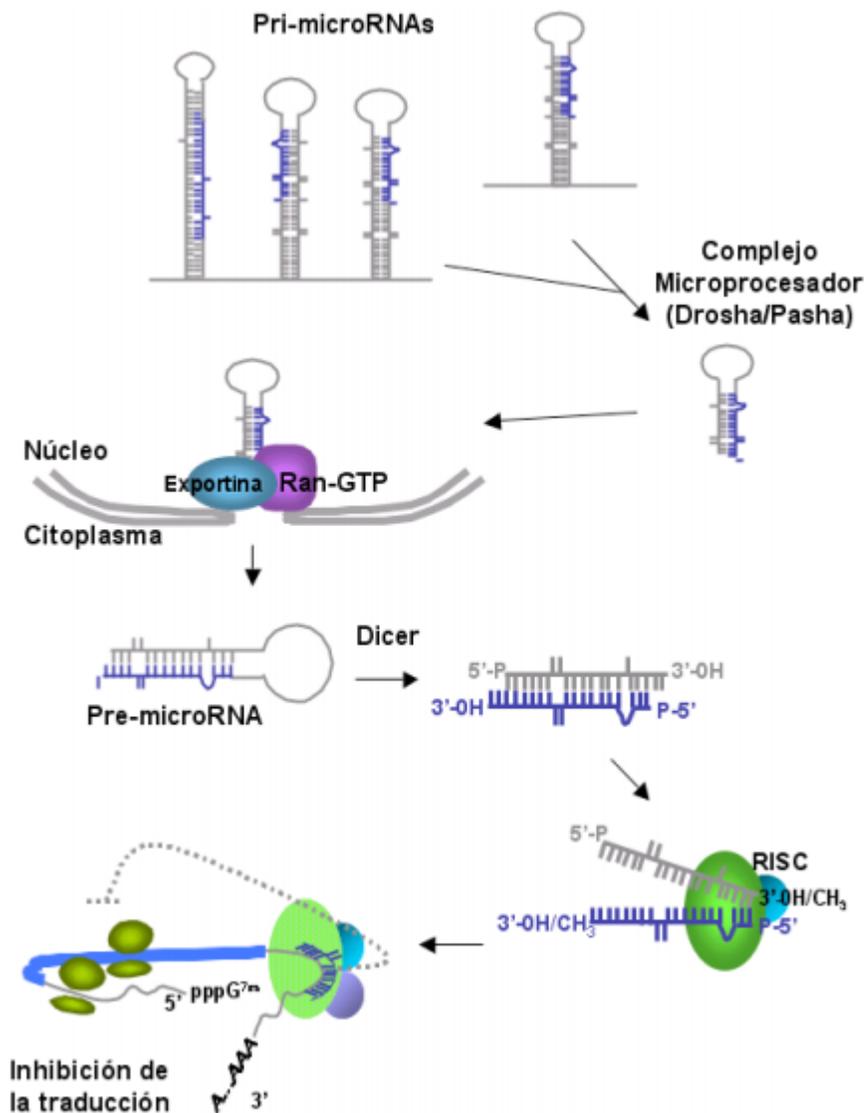


Figura 4. Biosíntesis de los miRNAs

#### 15.3.3.4 Influencia de los miRNAs en el transporte de simvastatina

En el transporte de simvastatina, Peng y colaboradores (Peng, 2014), encontraron que *SLCO1B1* es el gen blanco de miR-511, en un estudio que usó muestras de hígado de

ratones con esteatosis, además la expresión de *SLCO1B1* disminuyó cuando las células del hígado fueron transfectadas con miR-511.

#### **15.3.3.5 Relación de los miRNAs y el ritmo circadiano.**

Se ha estudiado el papel de los miRNAs relacionados al ritmo circadiano, por ejemplo, miRNA-182 en el insomnio tardío (que implica despertares por la mañana) y el miRNA-142-3p que regula la transcripción del gen *BMAL1* en los osciladores circadianos periféricos (Shende, 2006).

La expresión de los genes activadores del reloj circadiano, *Clock* y *BMAL1*, están inversamente correlacionados con la expresión de miR-182 y miR-141, respectivamente (Ding, 2015). Sin embargo, en otro estudio, en un cultivo de células nocturnas, miRna-182 se sobre-expresó por la noche (Marcola, 2016).

Con respecto al miR-27b, Figueredo (Figueredo, 2013), investigó su expresión diurna en leucocitos humanos. De los 5 pacientes estudiados en 24 hrs, miR-27b presentó un ritmo circadiano evidente en los 5 sujetos, pero sólo en dos de ellos se expresó en las mismas horas del estudio.

## XVI. JUSTIFICACIÓN

Existe gran variabilidad interindividual en la respuesta a simvastatina la cual depende de múltiples factores. Una de las principales fuentes de variabilidad son los polimorfismos en los genes encargados de su transporte (*SLOC1B1*, *ABCB1*) y metabolismo (*CYP3A4* y *CYP3A5*). Asimismo, la expresión del gen *CYP3A4* está regulada por el miRNA-27, que representa otro factor de variación. La farmacocinética puede presentar variaciones circadianas, ya que los genes que controlan estos ritmos proporcionan cambios en las diferentes etapas del sistema ADME. Los principales genes involucrados en la regulación circadiana son *CLOCK* y *BMAL*, cuya expresión es en parte dependiente de miR-182. *CLOCK* y *BMAL* regulan a su vez al gen *DBP*, el cual es un activador de la transcripción de *CYP3A4*. La expresión de *DBP* está sujeta al ritmo circadiano (mañana/tarde) y puede determinar la variación en la respuesta a los fármacos dependiendo del tiempo de administración, regulado por los genes *Clock* (*CLOCK* y *BMAL*). La evaluación de la influencia de los factores ya descritos sobre la respuesta a simvastatina podría ser de utilidad para predecir su respuesta y la de otros fármacos que sean blanco de las proteínas *SLOC1B1*, *ABCB1*, *CYP3A4* y *CYP3A5*.

## XVII. HIPÓTESIS.

La respuesta a simvastatina, dependiente de horario, se asocia con *CYP3A4/5*, *SLOC1B1*, *ABCB1*, la expresión de los genes *CLOCK* y los miRNAs hsa-miR-182 y hsa-miR-27B.

## XVIII. OBJETIVOS

### **Objetivo General**

Evaluar la asociación entre la respuesta terapéutica de simvastatina, horario dependiente y CYP3A4/5, SLOC1B1, ABCB1, los miRNAs hsa-miR-182 y hsa-miR-27B.

### **Objetivos Específicos**

- Evaluar el efecto reductor de lípidos de la simvastatina administrada a pacientes con un perfil lipídico alterado y patrones de sueño-vigilia (matutino y vespertinos).
- Determinar los parámetros farmacocinéticos de simvastatina administrada en dosis matutinas y vespertinas, a pacientes con patrones matutinos y vespertinos, y su asociación con el efecto hipolipemiante.
- Determinar la asociación entre los polimorfismos en *SLCO1B1*, *ABCB1*, *CYP3A4/5* con la farmacocinética de simvastatina y el efecto hipolipemiante.
- Determinar la expresión de los miRNAs hsa-miR-182 y hsa-miR-27B después de la administración de simvastatina en dosis matutinas y vespertinas en pacientes con patrones matutinos y vespertinos.
- Determinar la correlación de los miRNAs con el efecto hipolipemiante.

## XIX. METODOLOGÍA Y DESARROLLO DEL TRABAJO

### a. Diseño del estudio.

Se realizó un estudio prospectivo y comparativo el cual fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación del Hospital 450 en Durango, México según la declaración de Helsinki. Se solicitó a todos los pacientes que firmaran una carta de consentimiento informado.

### b. Población de Estudio

Participaron 19 voluntarios de población abierta con perfil de lípidos alterado que cumplieran los criterios de inclusión.

### c. Grupos de Estudio

Se dividieron en dos grupos: 10 voluntarios con patrones de sueño-alimentación regulares matutinos y 9 voluntarios con patrones de sueño-alimentación irregulares vespertinos.

### d. Criterios de inclusión

Que firmaran la carta de consentimiento informado por escrito, edad:  $\geq 35$  y  $\leq 45$ , mujeres y hombres, IMC  $\geq 20$  y  $\leq 35$ , voluntarios con patrones regulares de sueño-vigilia con una puntuación de matutino moderado (59-69 puntos) o vespertino moderado (31-41 puntos) del cuestionario de Matutinidad-Vespertinidad de Horne y Österbrg (78). Colesterol  $>200$  U/L, LDL  $>40$  U/L, Triglicéridos  $>150$  U/L. Pruebas de funcionamiento hepático (ALT, AST, GGT) 1.5 veces menor que el valor de referencia.

### e. Criterios de Exclusión

Historia previa de enfermedad psiquiátrica que afecte el ciclo circadiano [depresión mayor (DP), trastorno bipolar (TB), esquizofrenia crónica (EZ), ansiedad, enfermedad de Alzheimer (AZ) y enfermedad de Parkinson]; haber viajado entre zonas horarias los últimos 6 meses, utilizar medicamentos concomitantes, sustratos, inhibidores o inductores del CYP3A4 (APÉNDICE I), con alguna enfermedad crónica degenerativa o cualquier enfermedad progresiva no cardíaca fatal, que se encuentren tomando alguna hierba o componente de dieta que tenga el potencial de influir en algún signo vital como es la presión arterial, frecuencia cardíaca, temperatura, o en pruebas de funcionamiento hepático, niveles en el perfil de lípidos (Apéndice II), antecedentes

de enfermedad renal inestable o de progreso rápido, enfermedad hepática significativa, incluyendo hepatitis activa crónica, hipersensibilidad conocida a simvastatina.

f. Criterios de eliminación

Pacientes que retiren su consentimiento, degradación de muestras biológicas.

### **VARIABLES DEL ESTUDIO**

Variable dependiente: Parámetros farmacocinéticos de simvastatina, respuesta terapéutica a la simvastatina.

Variables Independientes: ciclo circadiano; expresión de los miRNAs hsa-miR-182, hsa-miR-142-3P y hsa-miR-27B; polimorfismos en los genes *CYP3A4/5*, *SLCO1B1* y *ABCB1*.

Variables intervinientes: edad, género, peso corporal, dieta, tabaquismo, ingesta de alcohol, actividad física.

### **Definición operativa de las variables.**

Parámetros farmacocinéticos de simvastatina. Se define como: El comportamiento farmacocinético de un determinado compuesto que se caracteriza a través de una serie de parámetros; están determinados por la concentración plasmática máxima ( $C_{pmax}$ ), la concentración plasmática mínima ( $C_{pmin}$ ), el área bajo la curva (ABC), el tiempo de vida media de eliminación ( $t_{1/2el}$ ), el volumen de distribución (Vd) y el aclaramiento (Cl).

Respuesta terapéutica a la simvastatina. paciente que posterior a un mes de tratamiento con simvastatina de 40 mg disminuye en más de un 30% sus niveles de colesterol, triglicéridos, LDL o VLDL (Karlson, 2016).

Ciclo circadiano. son oscilaciones de las variables **biológicas** en intervalos regulares de tiempo (alrededor de 24 horas).

Expresión de los genes *CLOCK*, *BMAL1*, *DBP*. Proceso de transcribir ADN a ARNm de los genes activadores de ritmo circadiano (*CLOCK* y *BMAL1*) y el gen controlado por estos: *DBP*.

Expresión de *hsa-miR-182*, *hsa-miR-142-3P* y *hsa-miR-27B*. Proceso de generar a partir de ADN, el producto funcional de los miRNAs relacionados al ritmo circadiano (*hsa-miR-182*, *hsa-miR-142-3P*) y al metabolismo hepático (*hsa-miR-27B*).

Polimorfismos en los genes *CYP3A4/5*, *SLCO1B1* y *ABCB1*. Cambios en la secuencia del ADN de estos genes, cuya frecuencia varía entre los individuos de una población.

Edad. Mayores de 18 años.

Género. Masculino y Femenino

Peso corporal. Presentan un índice de masa corporal (peso/talla<sup>2</sup>): >20 y <30

Dieta. Control o regulación de la cantidad y tipo de alimentos que toma una persona o un animal, generalmente con un fin específico

Tabaquismo. Consumo agudo o crónico del tabaco

Ingesta de alcohol. Consumo agudo o crónico del alcohol

Actividad física. Actividad realizada por los voluntarios que requiere energía y movimiento de los músculos del cuerpo.

Valores de referencia (Programa de tratamiento de la aterosclerosis [ATPIII] 2009)

Colesterol	110-200 mg/dL
Triglicéridos	45-150 mg/dL
Colesterol HDL	30-85 mg/dL
Colesterol LDL	40-160 mg/dL
Colesterol VLDL	8-34 mg/dL
Aspartato-aminotransferasa	5-40 mg/dL
Alanino-Aminotrasferasa	5-40 mg/dL
Gammaglutamil Traspeptidasa	10-66 mg/dL

## Procedimientos

### Este estudio se dividió en dos etapas

**Etapa I (Figura 5):** Participaron 19 voluntarios que cumplieron con los criterios de selección. Se formaron dos grupos de estudio: 10 voluntarios con patrones de sueño-vigilia matutino (>59 puntos) y 9 voluntarios con patrones vespertinos moderado (<41 puntos) del cuestionario de Horne y Österberg. Posterior a la determinación de los valores iniciales de colesterol, LDL, triglicéridos, AST, ALT y GGT en ambos grupos, se procedió a la administración de simvastatina (40 mg), por la noche, durante 4 semanas. Al término de este tiempo se realizaron las pruebas de laboratorio mencionadas para valorar la repuesta al tratamiento. Se determinó el genotipo de *CYP3A4/5*, *SLCO1B1* y *ABCB1* a cada paciente.

**Etapa II (Figura 6):** De cada grupo de pacientes, se seleccionaron dos pacientes no respondedores al tratamiento y dos pacientes que sí respondieron al tratamiento para realizar los estudios farmacocinéticos.

Se realizaron dos estudios farmacocinéticos por paciente, uno con una dosis de simvastatina matutina y otro con una dosis nocturna. El intervalo entre cada estudio fue de 5 a 7 días. El fármaco se administró vía oral, y se tomaron muestras sanguíneas (5 ml) a cada paciente en los siguientes tiempos: 0 (predosis) y 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 9.0, 12.0, 18 y 24.0 hrs (post-dosis). En los tiempos de muestreo 0, 3.0, 18.0 y 24.0 del estudio matutino, y 0, 5.0, 6.0 y 9.0 del estudio vespertino. Se realizó medición de la tensión arterial, frecuencia cardíaca y temperatura en cada tiempo de muestreo.

**Tiempos de muestreo para los ensayos de expresión miRNAs.**

Los tiempos de muestreo para la evaluación de expresión de los miRNAs para ambos estudios fueron 0, 1, 2 y 12 hrs, que correspondieron a los tiempos en predosis, absorción, Cmax y eliminación del fármaco, respectivamente.

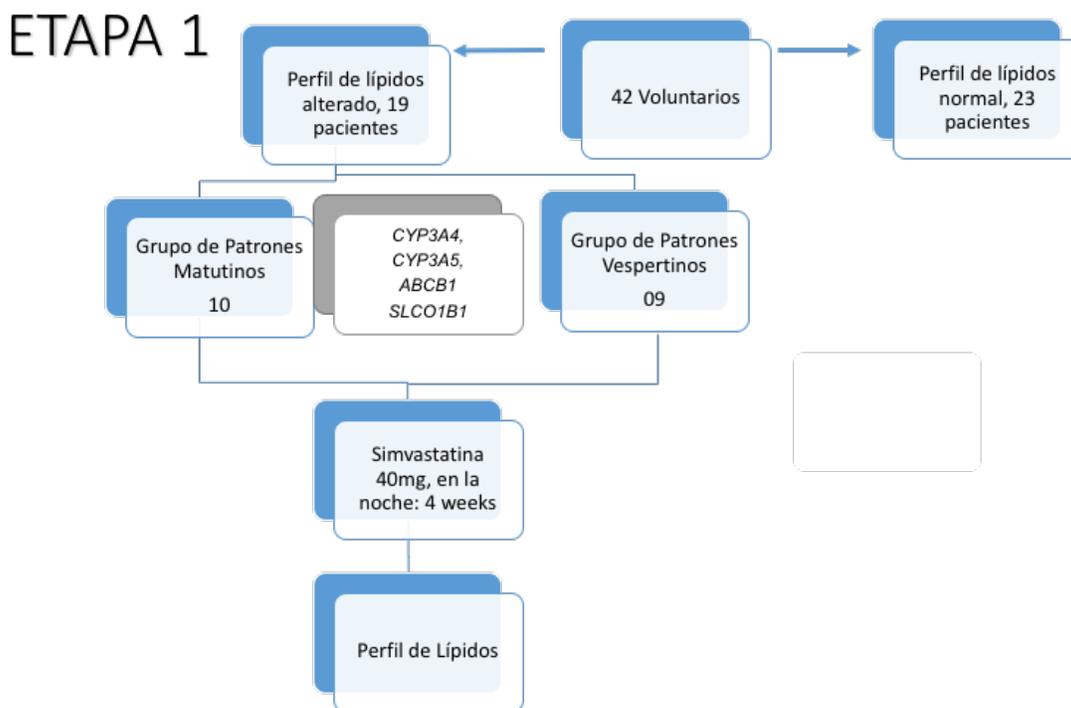


Figura 5. Primera etapa del estudio. Clasificación de los pacientes de acuerdo con perfil de lípidos, tratamiento con simvastatina y genotipificación.

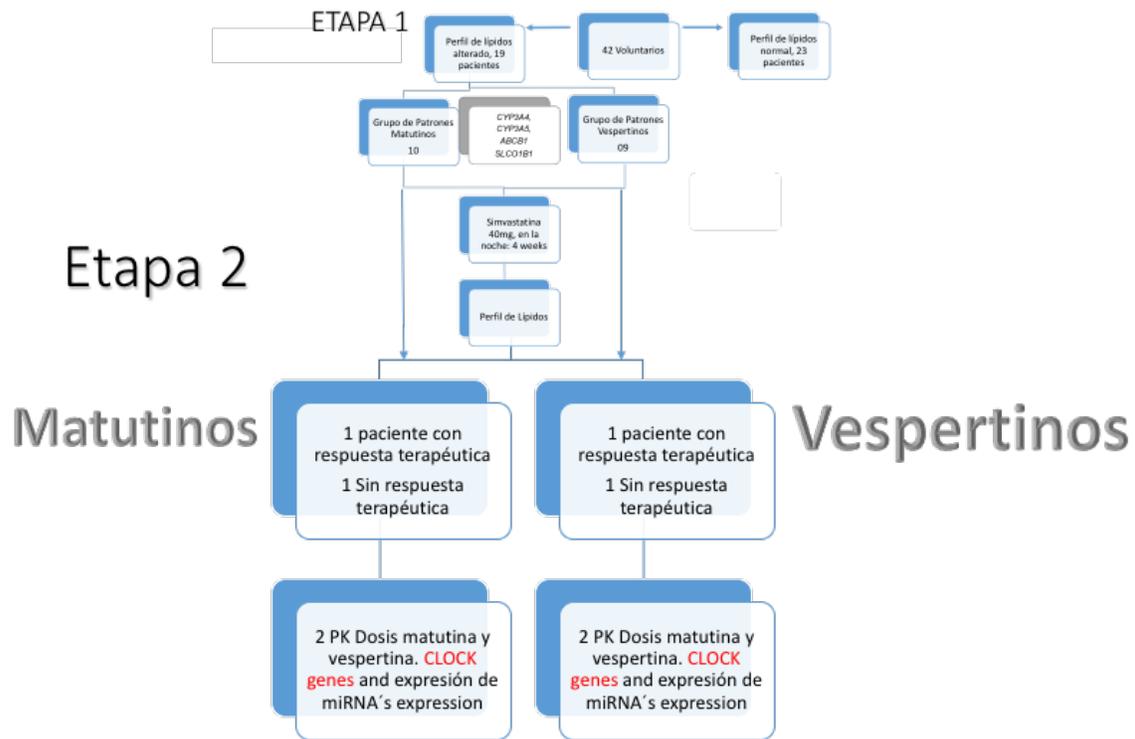


Figura 6. Segunda etapa del estudio. Estudio farmacocinético y análisis de expresión de miRNAs.

### **Extracción y cuantificación de ADN**

El DNA se extrajo de muestras de sangre total con el kit comercial Qiagen™ (DNeasy Blood & Tissue Kits). La pureza y la concentración se verificaron por espectrofotometría a 260/280 nm en un equipo Nanodrop 2000c (ThermoScientificW, Suwanee, GA 30024 USA). La integridad del DNA se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

### **Genotipificación**

La genotipificación se realizó por duplicado en un instrumento PCR StepOne™ en tiempo real (Applied Biosystems), usando las siguientes sondas MGB TaqMan para la evaluación de los diferentes SNPs.

Para el gen **SLCO1B1**

C\_1901697, 388 A>G (rs2306283).

C\_30633906, 521 T>C (rs4149056).

Para el gen **CYP3A4**

C\_\_\_1837671\_50 CYP3A4 \*1B -392A>G (rs2740574)

Para el gen **CYP3A5**

C\_\_26201809\_30 CYP3A5\*3 g.6986A>G (rs776746)

Para el gen **ABCB1**

C\_\_\_7586657\_20, C3435T (rs1045642)

C\_\_\_7586662\_10, C1236T (rs1128503)

C\_11711720C\_30, G2677T (rs2032582)

Los componentes de la reacción fueron los siguientes:

20 ng totales de DNA genómico.

0.3 ul de sonda

3.2 ul de Master mix

Las condiciones de reacción fueron las siguientes:

Un ciclo de desnaturalización inicial (95°C / 10 min)

40 ciclos (95°C / 15 seg-60°C / 1 min).

### **Farmacocinética de Simvastatina**

Se obtuvieron los parámetros farmacocinéticos de simvastatina. Los niveles plasmáticos del fármaco se determinaron por HPLC, de acuerdo con el método descrito por Yang (2016). Se utilizó una columna analítica de fase estacionaria: Luna

C18, con una fase móvil acetonitrilo-agua. Se desarrolló cromatografía líquida junto con espectrometría de masas de simple cuadrupolo, de ionización a presión atmosférica, equipado con una interfaz ESI y con ionización positiva (LC/ESI /MS). Se usó lovastatina como estándar interno. Después de la extracción con acetato de etilo, los solutos se separaron en una columna C con una fase móvil que consistió en metanol-agua. La cuantificación de simvastatina se realizó calculando la relación de área pico de los extractos analizados en modo SIM y comparándolos con la curva de calibración ( $r = 0.9997$ ). La exactitud y la precisión para el ensayo se determinaron calculando la variación entre lotes a tres concentraciones 0,1, 5.0, 10.0 ng/ml; la desviación estándar relativa intra-lote (DSR) fue menor al 10% y varió de 1.8 a 8.5%. El límite de detección fue de 0.05 ng/ml.

### **Análisis de miRNAs.**

Se hizo la evaluación del miRNA 182 y miRNA-27b obtenidos en los tiempos de muestreo previamente descritos, usando sondas TaqMan a través de PCR semicuantitativa.

Este procedimiento implicó la ejecución de 4 pasos.

1. Separación de leucocitos con la técnica de dextrano salino:
  - Se homogenizaron en un rotador las muestras de sangre total.
  - Se preparó previamente una solución de dextrano salino al 6% con solución fisiológica de NaCl a 0.9%.
  - A una alícuota de 4.5 ml de sangre total de cada muestra se añadió 1.5 ml de dextrano salino al 6% y se mezcló suavemente.
  - Se dejó sedimentar 40 min a 30.5°C.
  - Se trasladó la fase superior a otro tubo de 1.5 ml (dos por cada muestra) y se centrifugó a 500 rcf, 10 min.
  - Se decantó el sobrenadante y se unieron los dos tubos de cada muestra en una sola, de esta manera quedaron dos tubos, con un botón más grande de cada muestra.
  - Se realizó lisis celular de los eritrocitos contaminantes con un 1 ml de solución fría de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  al 0.83%.

- Se centrifugó a 500 rcf, 10 min y se decantó el sobrenadante.
- El proceso de lisado con NH<sub>4</sub>CL y centrifugación se realizó 4 veces.
- Después, las células se resuspendieron en 1 ml de PBS y se centrifugaron a 500 rcf, 10 min.
- Finalmente, se decantó el PBS.

## 2. Extracción de RNA total con TRIZOL™

- Al botón de leucocitos obtenido del método anterior, se le adicionó 1 ml de TRIZOL y se resuspendió.
- Luego se incubó 15 min a 30.5°C.
- Se añadieron 0.2 ml de cloroformo (por cada 1 ml de TRIZOL usado al inicio del procedimiento), se agitó vigorosamente e incubó de 2 -3 min a una temperatura de 15 – 30°C.
- Se centrifugó a no más de 12 000 rcf durante 15 min a 4°C.
- Se transfirió la fase acuosa a otro tubo y el RNA se precipitó con 0.5 ml de alcohol isopropílico (por cada 1 ml de TRIZOL usado al inicio del procedimiento).
- Luego se incubó 10 min a una temperatura de 15 – 30°C.
- Se centrifugó a 12 000 rfc 10 min a 4°C.
- Se removió el sobrenadante y la pastilla se lavó con 1 ml de etanol al 75% (se añade 1 ml de etanol por cada 1 ml de TRIZOL usado al inicio del procedimiento).
- Luego se centrifugó a 7500 rcf por 5 min a 4°C. (se repitió este paso)
- Se decantó el etanol y el tubo destapado se dejó secar a temperatura ambiente. Cuando estuvo completamente seco, se le añadieron 50µl de agua libre de RNasas y se almacenó a -80°C.
- El RNA se visualizó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. En un pozo se colocaron 3 µl de RNA mas 2 µl de colorante de corrida. En otro pozo se agregó un marcador de peso molecular.

## 3. Síntesis de DNAC por transcripción reversa con el kit TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit.

- Se cuantificó cada muestra en el nanodrop
- Se preparó Master Mix usando el Kit de Transcripción reversa TaqMan MicroRNA de la siguiente manera (Tabla 3):

Tabla 3. Volúmenes de los componentes de Master Mix para la síntesis de cDNA.	
Reactivos	Master mix ( $\mu\text{L}$ )
100mM dNTPs	0.15
Transcriptasa reversa MultiScribe, 50 U/ $\mu\text{L}$	1.00
10X Buffer de transcripción reversa	1.5
Inhibidor de RNase, 20U/ $\mu\text{L}$	0.19
Nucleasa	4.16
Total	7.0

- Se mezcló suavemente con la pipeta.
- Se colocó el máster mix en el block del termociclador para que permaneciera frío.
- Cada reacción consistió en 7 $\mu\text{L}$  de master mix, 3 $\mu\text{L}$  de primer específico y 5 $\mu\text{L}$  de muestra (previamente en concentraciones de 1 a 10ng).
- La reacción se realizó en un termociclador de punto final en las condiciones siguientes (Tabla 4):

Tabla 4. Condiciones de temperatura en el termociclador para la síntesis de cDNA.		
Etapas	Time (min)	Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )
1	30	16
2	30	42
3	5	85
4	$\infty$	4

4. Cuantificación de los niveles de expresión relativa de los miRNAs hsa-miR-182, y hsa-miR-27B, usando sondas TaqMan mediante la técnica  $\Delta\Delta Ct$ .
- Se diluyeron muestras de DNAc para obtener una concentración de 500 ng en 20  $\mu$ l (de acuerdo con la curva estándar, previamente realizada):
  - Se preparó master mix de la siguiente manera (Tabla 5):

Tabla 5. Volúmenes de la reacción para medir la expresión de los diferentes miRNAs.	
Reactivo	Volumen ( $\mu$ l)
Ensayo Taqman MicroRNA (20X)	1.0
Producto de reacción de Transcripción reversa	1.33
Taqman 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG	10.00
Nucleasa	7.67
Total	20

- Se centrifugó la reacción y se colocó en el termociclador con las siguientes condiciones (Tabla 6):

Tabla 6. Condiciones de temperatura en el termociclador para cuantificación de los niveles de expresión de los diferentes miRNAs			
	PCR		
	Condiciones	40 ciclos	
		Desnaturalización	Alineamiento/ Extensión
Tiempo	10 min	15 seg	60 seg
Temperatura °C	95	95	60

### **Análisis estadístico**

Los datos se presentan como medias  $\pm$  desviación estándar. La comparación de la media entre los grupos matutino y vespertino se realizó por la prueba chi-cuadrada. La asociación entre los polimorfismos y los datos bioquímicos se realizó mediante regresión logística con el programa SNPstat (<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>). Las pruebas estadísticas se realizarán en el programa SPSS (versión 11.0) para Windows y XVI.I programa Statgraphics Centurion. Los valores estadísticamente significativos se consideraron con una  $p < 0.05$ .

## XX. RESULTADOS

**20.1 Perfil bioquímico.** Se determinó el perfil de lípidos en 42 voluntarios con sobrepeso/obesidad y de este grupo se identificaron 19 pacientes quienes presentaron resultados por arriba de los valores de referencia (colesterol y lipoproteínas) (Tabla 7, i= inicio). Estos pacientes (10 sujetos matutinos y 9 sujetos vespertinos) presentaron un promedio de edad de  $41.8 \pm 4.5$  y un IMC de  $28.6 \pm 5.4$ ; el grupo matutino estuvo integrado por 3 mujeres y 7 hombres, y el grupo vespertino por una mujer y 8 hombres. Después de cuatro semanas de tratamiento con simvastatina (40 mg) se determinó nuevamente el perfil lipídico en los 19 voluntarios, el cual se muestra en la tabla 7, f= final. La disminución del perfil de lípidos (TG, HDL y VLDL), después de la administración de simvastatina fue significativamente mayor en los pacientes con patrones matutinos con ritmos regulares de alimentación y sueño que en los pacientes vespertinos.

Tabla 7. Comparación perfil de lípidos en 19 voluntarios matutinos y vespertinos.

Prueba	Matutinos	Vespertinos	Valor de p*
	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	
CLi	212.8 $\pm$ 22.6	218.0 $\pm$ 50.0	0.87
CLf	147.8 $\pm$ 34.6	176.1 $\pm$ 47.9	0.25
Tgi	300.7 $\pm$ 124.6	499.5 $\pm$ 353.9	0.16
TGf	160.8 $\pm$ 67.8	284.0 $\pm$ 123.5	<b>0.018</b>
HDLi	37.1 $\pm$ 10.8	30.4889 $\pm$ 3.7	0.17
HDLf	39.4 $\pm$ 8.7	32.5 $\pm$ 5.0	<b>0.05</b>
LDLi	132.1 $\pm$ 36.6	128.0 $\pm$ 48.8	0.46
LDLf	87.2 $\pm$ 35.2	115.0 $\pm$ 41.6	0.25
VLDLi	56.2 $\pm$ 23.1	99.8 $\pm$ 70.8	0.07
VLDLf	32.1 $\pm$ 13.7	56.7 $\pm$ 24.7	<b>0.018</b>
NO-HDL i	175.7	108.5	0.87
NO-HDL f	187.5	143.6	0.09

\*Chi cuadrada. i, inicio, f, final.

## **20.2 Genotipificación**

El análisis de los polimorfismos en genes encargados del transporte y metabolismo de simvastatina en los 19 voluntarios estudiados se muestra en la tabla 8. La frecuencia observada del polimorfismo *SLCO1B1* 388 A>G fue 0.44 en el grupo vespertino y de 0.35 en los individuos del turno matutino. Con respecto al polimorfismo *SLCO1B1* 521 T>C, la frecuencia del alelo C fue de 0.05 en el grupo matutino y de 0.06 en el grupo vespertino. El polimorfismo *CYP3A4\*1B* A>G no se observó en el grupo matutino, pero su frecuencia fue de 0.11 en el grupo vespertino. Se identificó el polimorfismo *CYP3A5\*3* A>G con una alta frecuencia en los dos grupos (>0.80), y el alelo A (silvestre) se encontró en estado homocigoto y heterocigoto en los grupos de la mañana y la tarde, respectivamente. La evaluación de genotipos en *ABCB1* reveló una distribución heterogénea de polimorfismos en la población estudiada.

### **Presencia de reacción adversa a simvastatina**

En el transcurso del estudio, dos pacientes del grupo vespertino presentaron miopatía leve definida por la presencia de inflamación muscular, debilidad, malestar y dolor. A continuación, se hace la descripción de los casos.

**Caso No.1.** Hombre de 42 años, con 24.16 de IMC, sin antecedentes patológicos de importancia o tratamiento concomitante al momento del estudio. Después de dos semanas de tratamiento con 40 mg de simvastatina por la noche, el paciente informó síntomas de miopatía (debilidad muscular, hiperestesia muscular esporádica) de intensidad leve y frecuencia esporádica. En la tercera semana, la intensidad aumenta y aparece dolor muscular leve, por lo tanto, se interrumpió el medicamento. Después de esto, la evaluación bioquímica reveló que solo 2 (TG y VLDL) entre 5 tipos de parámetros del perfil lipídico se redujeron en más del 30%. El análisis de polimorfismos reveló la presencia de mutaciones en los genes relacionados con el metabolismo y el transporte (afluencia y eflujo) de simvastatina, ver tabla 8.

Tabla 8. Polimorfismos en genes involucrados en transporte y metabolismo de simvastatina en 19 voluntarios estudiados.

	Transporte (afluencia)		Metabolismo		Transporte (eflujo)				
	<b>SLCO1B1</b>		<b>CYP3A4</b>	<b>CYP3A5</b>	<b>ABCB1</b>				
	388 A>G	521 T>C	*1B A>G	*3 A>G	3435 T>C	1236 T>C	2677 C>A	2677 C>T	
<b>Pacientes vespertinos</b>									
◆•1	A/G	T/C	A/G	G/G	C/C	T/T	C/A	C/C	
◆•2	G/G	T/T	A/A	A/G	T/C	T/C	C/A	C/C	
3	A/A	T/T	A/A	G/G	T/C	T/C	C/A	C/C	
4	G/G	T/T	A/A	G/G	T/C	T/T	A/A	T/T	
5	G/G	T/T	A/A	A/A	C/C	T/C	C/C	C/C	
6	A/G	T/T	A/G	G/G	T/C	T/C	C/A	C/C	
7	A/A	T/T	A/A	G/G	T/C	T/C	A/A	T/T	
8	A/A	T/T	A/A	G/G	T/C	T/C	C/A	C/C	
9	A/A	T/T	A/A	G/G	T/C	T/C	A/A	T/T	
<b>Alelo</b>	<b>A</b> (0.56)	<b>T</b> (0.94)	<b>A</b> (0.89)	<b>A</b> (0.17)	<b>T</b> (0.39)	<b>T</b> (0.61)	<b>C</b> (0.39)	<b>C</b> (0.67)	
	<b>G</b> (0.44)	<b>C</b> (0.06)	<b>G</b> (0.11)	<b>G</b> (0.83)	<b>C</b> (0.61)	<b>C</b> (0.39)	<b>A</b> (0.61)	<b>T</b> (0.33)	
<b>Pacientes matutinos</b>									
10	A/A	T/T	A/A	G/G	T/C	T/C	A/A	T/T	
•11	A/A	T/T	A/A	G/G	T/C	T/C	A/A	T/T	
12	A/A	T/T	A/A	G/G	T/C	T/C	A/A	T/T	
13	G/G	T/C	A/A	G/G	T/C	T/C	C/A	C/C	
14	A/G	T/T	A/A	A/A	C/C	T/C	A/A	C/C	
15	A/A	T/T	A/A	G/G	T/C	T/C	A/A	T/T	
•16	G/G	T/T	A/A	G/G	C/C	T/C	C/C	C/C	
17	A/G	T/T	A/A	G/G	T/C	T/C	A/A	T/T	
18	A/G	T/T	A/A	G/G	T/C	T/C	C/A	C/C	
19	A/A	T/T	A/A	G/G	C/C	T/C	C/C	C/C	
<b>Alelo</b>	<b>A</b> (0.65)	<b>T</b> (0.95)	<b>A</b> (1.0)	<b>A</b> (0.10)	<b>T</b> (0.35)	<b>T</b> (0.50)	<b>C</b> (0.30)	<b>C</b> (0.50)	
	<b>G</b> (0.35)	<b>C</b> (0.05)	<b>G</b> (0.0)	<b>G</b> (0.90)	<b>C</b> (0.65)	<b>C</b> (0.50)	<b>A</b> (0.60)	<b>T</b> (0.50)	

◆ Pacientes con miopatía

• Pacientes que realizaron la Etapa 2, estudio de farmacocinética.

**Caso No.2.** Hombre, 35 años, con 28.05 de IMC, sin tratamiento al momento de ingreso al estudio. Después de tres semanas de tratamiento con simvastatina, el paciente refirió dolores musculares leves y síntomas de miopatía, por lo que se interrumpió la administración del medicamento. Este sujeto tuvo una reducción >30% solamente en LDL, después de las tres semanas de tratamiento. Se encontraron mutaciones en los genes implicados en el metabolismo y el transporte (afluencia y eflujo) de simvastatina, ver tabla 8.

### **Farmacocinética de simvastatina**

Se realizó el estudio farmacocinético de simvastatina con dos pacientes de cada grupo (matutino y vespertino); en cada grupo un paciente respondió y otro no respondió al tratamiento (Figura 6). La farmacocinética de simvastatina se realizó en dos ocasiones en cada paciente, una con la administración de una dosis matutina y otra con una dosis vespertina. En uno de los sujetos vespertinos, solo pudo hacerse el estudio farmacocinético con la dosis vespertina hasta el tiempo de muestreo 12, debido a la presencia de hipotensión y taquicardia.

De esta manera, se realizaron 7 estudios de farmacocinética, 3 estudios con dosis matutina y 4 estudios con dosis vespertina.

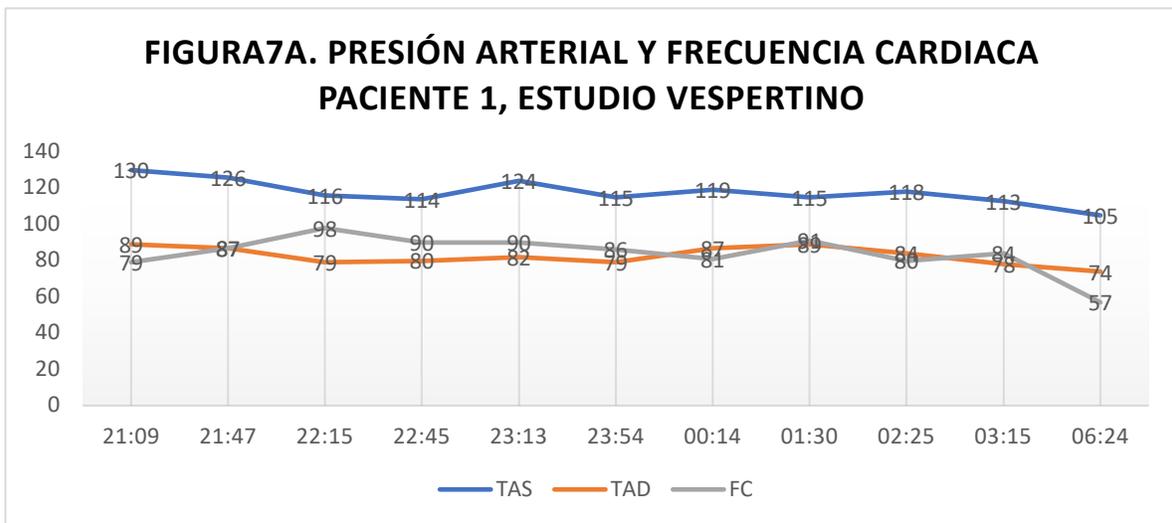
A continuación, se muestran las concentraciones y curvas farmacocinéticas de simvastatina.

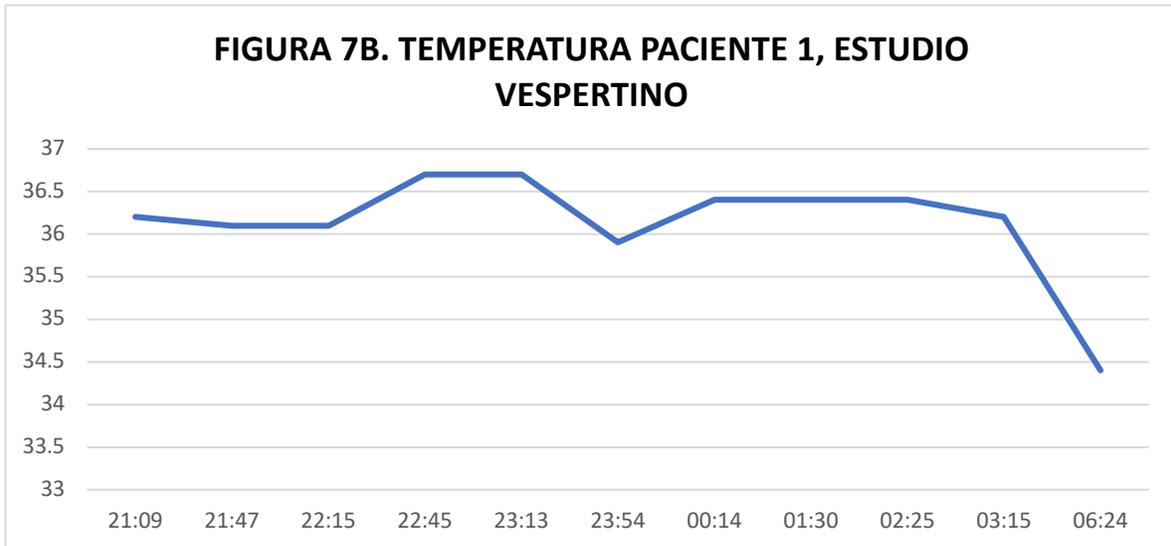
### **Paciente 1 (ritmo vespertino)**

Para el paciente 1 se realizó el estudio vespertino de farmacocinética, hasta el tiempo de muestreo 9 debido a que durante el estudio presentó un evento adverso posterior a las 6hrs de haber administrado el medicamento, caracterizado por confusión, hipotensión y bradicardia. Las mediciones de la presión arterial sistólica (TAS), presión arterial diastólica (TAD), frecuencia cardiaca (FC) y temperatura en los tiempos de muestreo realizados se muestran a continuación (Tabla 9 y Figura 7A y 7B).

Tabla 9. Mediciones de TAS, TAD, FC, y temperatura, durante el estudio vespertino del paciente 1.

Tiempo muestreo	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3	4	5	6	9
Hora	21:09	21:47	22:15	22:45	23:13	23:54	00:14	01:30	02:25	03:15	06:24
TAS	130	126	116	114	124	115	119	115	118	113	105
TAD	89	87	79	80	82	79	87	89	84	78	74
FC	79	87	98	90	90	86	81	91	80	84	57
Temp	36.2	36.1	36.1	36.7	36.7	35.9	36.4	36.4	36.4	36.2	34.4





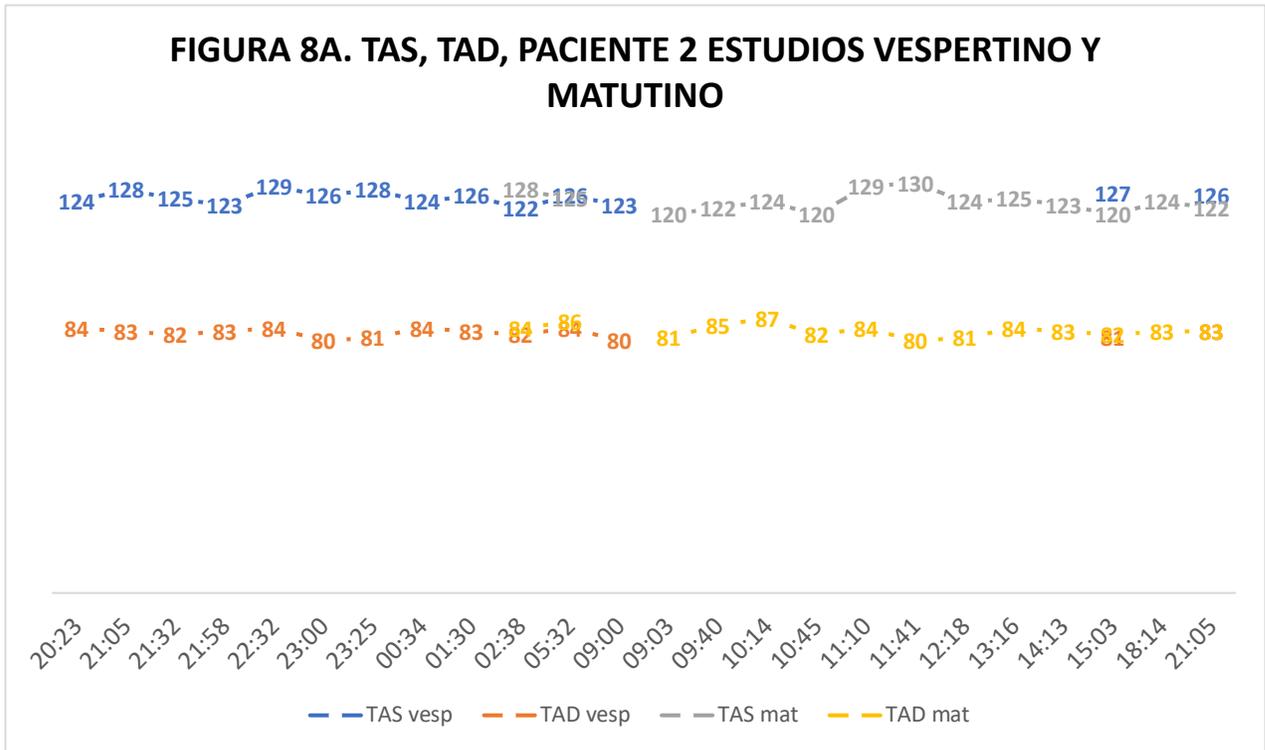
### **Paciente 2 (ritmo vespertino)**

Se realizaron dos estudios farmacocinéticos, uno con dosis vespertina y otro con dosis matutina, con más de 2 semanas entre cada estudio. Las mediciones de la presión arterial sistólica (TAS), presión arterial diastólica (TAD), frecuencia cardiaca (FC) y temperatura en los tiempos de muestreo realizados al paciente se muestran en el estudio vespertino y matutino a continuación (Tabla 10 y Figura 8A y 8B):

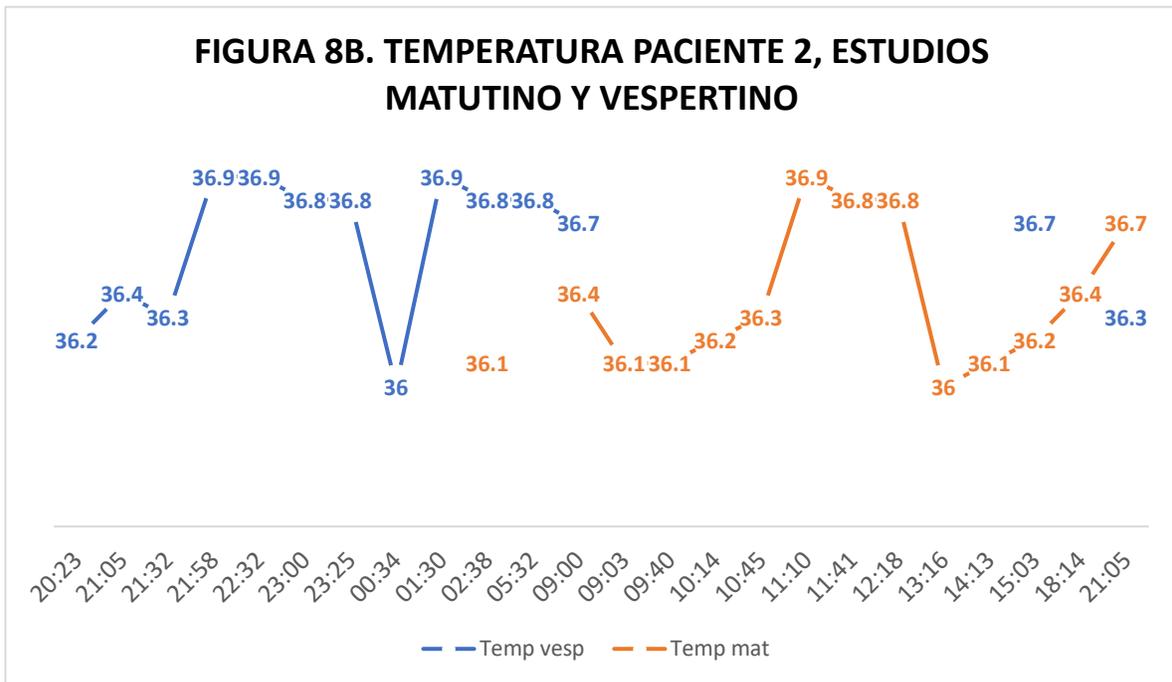
Tabla 10. Mediciones de TAS, TAD, FC, y temperatura, durante el estudio matutino y vespertino del paciente 2.

<b>Estudio matutino paciente 2</b>														
<b>Tiempo muestreo</b>	<b>0</b>	<b>0.5</b>	<b>1</b>	<b>1.5</b>	<b>2</b>	<b>2.5</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>12</b>	<b>18</b>	<b>24</b>
<b>Hora</b>	09:03	09:40	10:14	10:45	11:10	11:41	12:18	13:16	14:13	15:00	18:14	21:10	03:15	09:20
<b>TAS</b>	120	122	124	120	129	130	124	125	123	120	124	122	128	125
<b>TAD</b>	81	85	87	82	84	80	81	84	83	82	83	83	84	86
<b>FC</b>	64	65	80	83	74	79	78	75	68	71	74	76	69	73
<b>Temp</b>	36.1	36.1	36.2	36.3	36.9	36.8	36.8	36	36.1	36.2	36.4	36.7	36.1	36.4
<b>Estudio vespertino paciente 2</b>														
<b>Tiempo muestreo</b>	<b>0</b>	<b>0.5</b>	<b>1</b>	<b>1.5</b>	<b>2</b>	<b>2.5</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>12</b>	<b>18</b>	<b>24</b>
<b>Hora</b>	20:23	21:05	21:32	21:58	22:32	23:00	23:25	00:34	01:30	02:38	05:32	09:00	15:03	21:05
<b>TAS</b>	124	128	125	123	129	126	128	124	126	122	126	123	127	126
<b>TAD</b>	84	83	82	83	84	80	81	84	83	82	84	80	81	83
<b>FC</b>	78	75	68	71	74	79	71	74	79	71	79	71	74	73
<b>Temp</b>	36.2	36.4	36.3	36.9	36.9	36.8	36.8	36	36.9	36.8	36.8	36.7	36.7	36.3

**FIGURA 8A. TAS, TAD, PACIENTE 2 ESTUDIOS VESPERTINO Y MATUTINO**



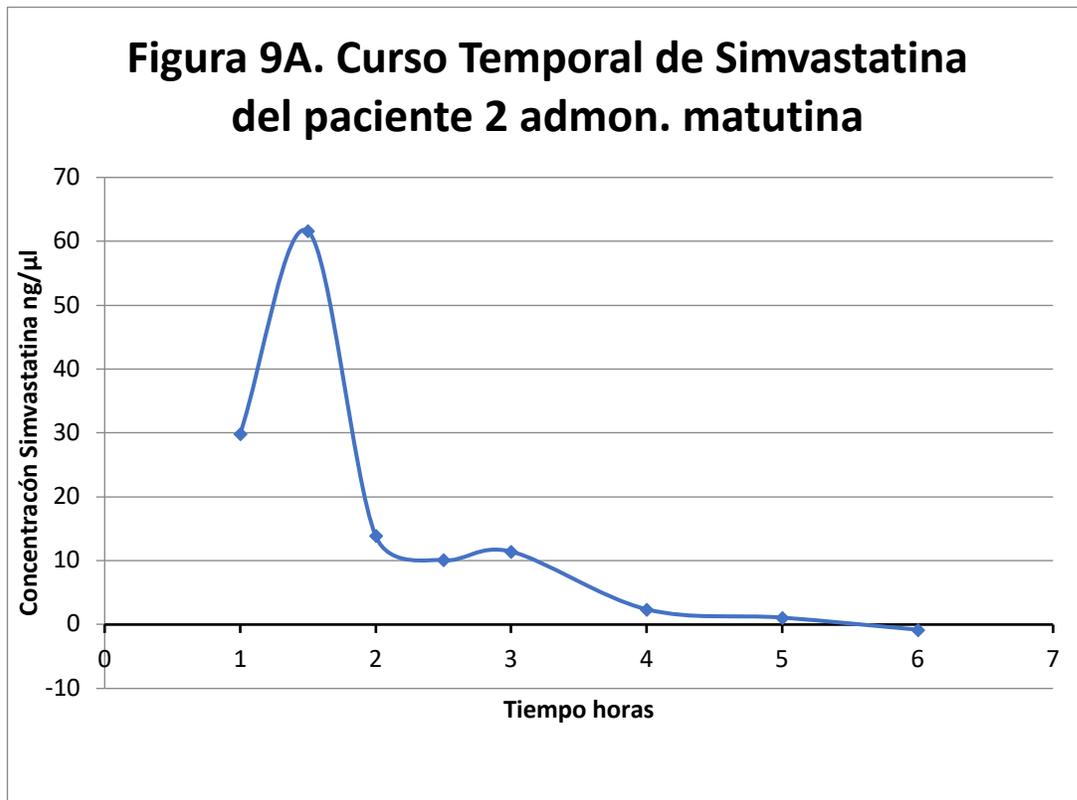
**FIGURA 8B. TEMPERATURA PACIENTE 2, ESTUDIOS MATUTINO Y VESPERTINO**

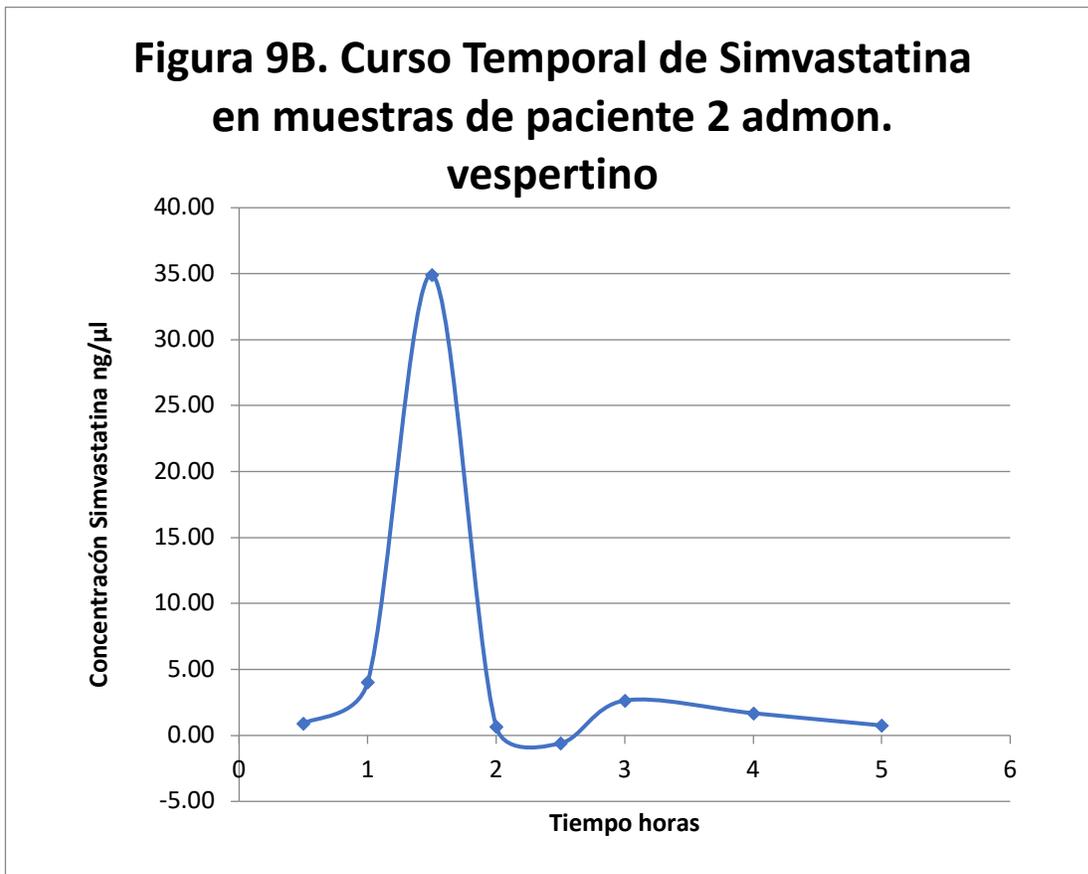


A continuación, se muestran las concentraciones plasmáticas de simvastatina del paciente 2 (ritmo vespertino) en el estudio de farmacocinética (Tabla 11, y Figura 9A y 9B):

Tabla 11. Concentraciones plasmáticas de simvastatina del paciente 2, en dosis matutina y vespertina.

<b>Tiempo de Muestreo</b>	<b>Concentración ng/ml</b>	
	<b>Dosis matutina</b>	<b>Dosis vespertina</b>
<b>T0.5</b>		0.91
<b>T1</b>	23.92	4.03
<b>T1.5</b>	49.34	34.92
<b>T2</b>	13.89	0.68
<b>T2.5</b>	10.09	-0.59
<b>T3</b>	11.43	2.65
<b>T4</b>	2.39	1.69
<b>T5</b>	1.09	0.76
<b>T6</b>	-0.8	





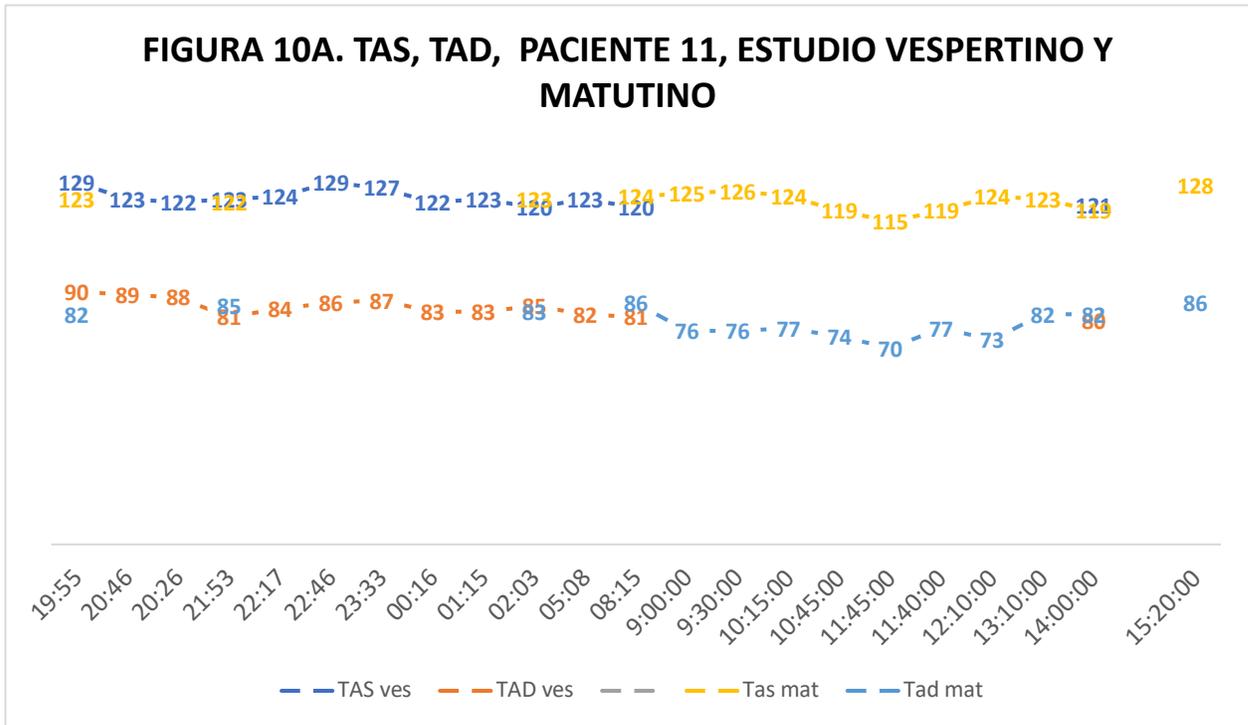
**Paciente 11 (ritmo matutino).**

Se realizaron dos estudios farmacocinéticos, uno con dosis vespertina y otro con dosis matutina, con más de 2 semanas entre cada estudio. Las mediciones de la presión arterial sistólica (TAS), presión arterial diastólica (TAD), frecuencia cardiaca (FC) y temperatura en los tiempos de muestreo se muestran en el estudio vespertino y matutino a continuación (Tabla 12 y Figura 10A y 10B):

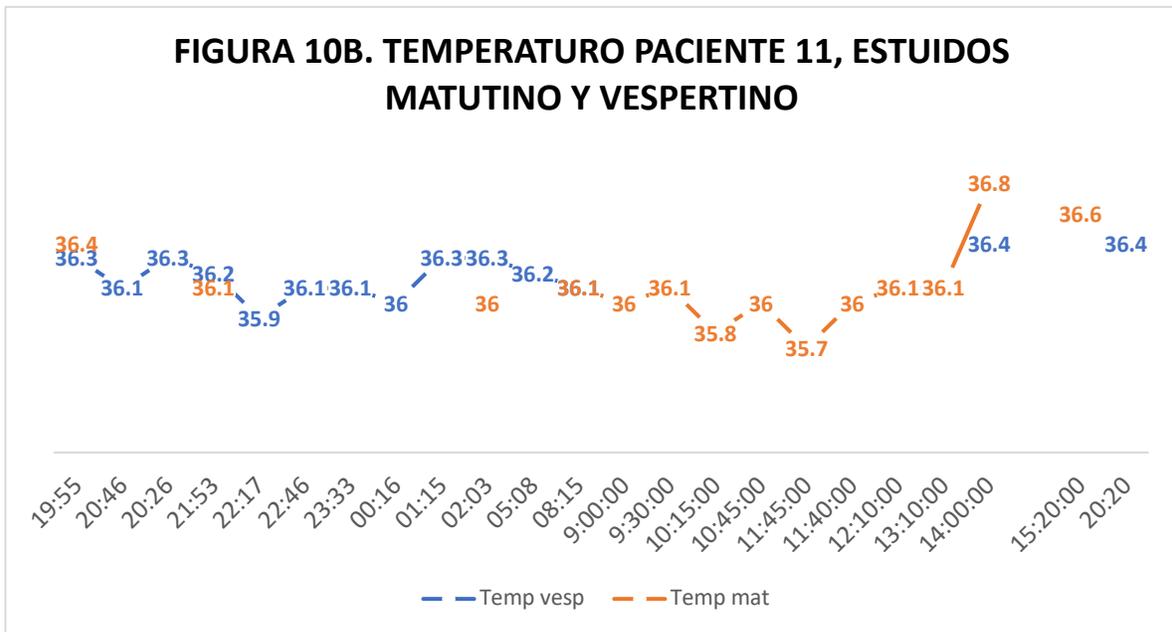
Tabla 12. Mediciones de TAS, TAD, FC, y temperatura, durante el estudio matutino y vespertino del paciente 11.

<b>Estudio vespertino</b>														
<b>Tiempo muestreo</b>	<b>0</b>	<b>0.5</b>	<b>1</b>	<b>1.5</b>	<b>2</b>	<b>2.5</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>12</b>	<b>18</b>	<b>24</b>
<b>Hora</b>	19:55	20:46	20:26	21:53	22:17	22:46	23:33	00:16	01:15	02:03	05:08	08:15	14:15	20:20
<b>TAS</b>	129	123	122	123	124	129	127	122	123	120	123	120	121	119
<b>TAD</b>	90	89	88	81	84	86	87	83	83	85	82	81	80	74
<b>FC</b>	68	73	72	69	68	70	67	67	68	69	67	68	76	79
<b>Temp</b>	36.3	36.1	36.3	36.2	35.9	36.1	36.1	36	36.3	36.3	36.2	36.1	36.4	36.4
<b>Estudio matutino</b>														
<b>Tiempo muestreo</b>	<b>0</b>	<b>0.5</b>	<b>1</b>	<b>1.5</b>	<b>2</b>	<b>2.5</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>12</b>	<b>18</b>	<b>24</b>
<b>Hora</b>	9:00	9:30	10:15	10:45	11:45	11:40	12:10	13:10	14:00	15:20	18:20	21:14	3:20	9:00
<b>TAS</b>	125	126	124	119	115	119	124	123	119	128	123	122	123	124
<b>TAD</b>	76	76	77	74	70	77	73	82	82	86	82	85	83	86
<b>FC</b>	72	78	90	85	81	81	71	76	73	72	74	70	74	74
<b>Temp</b>	36	36.1	35.8	36	35.7	36	36.1	36.1	36.8	36.6	36.4	36.1	36	36.1

**FIGURA 10A. TAS, TAD, PACIENTE 11, ESTUDIO VESPERTINO Y MATUTINO**



**FIGURA 10B. TEMPERATURA PACIENTE 11, ESTUDIOS MATUTINO Y VESPERTINO**



**Paciente 16 (ritmo matutino).**

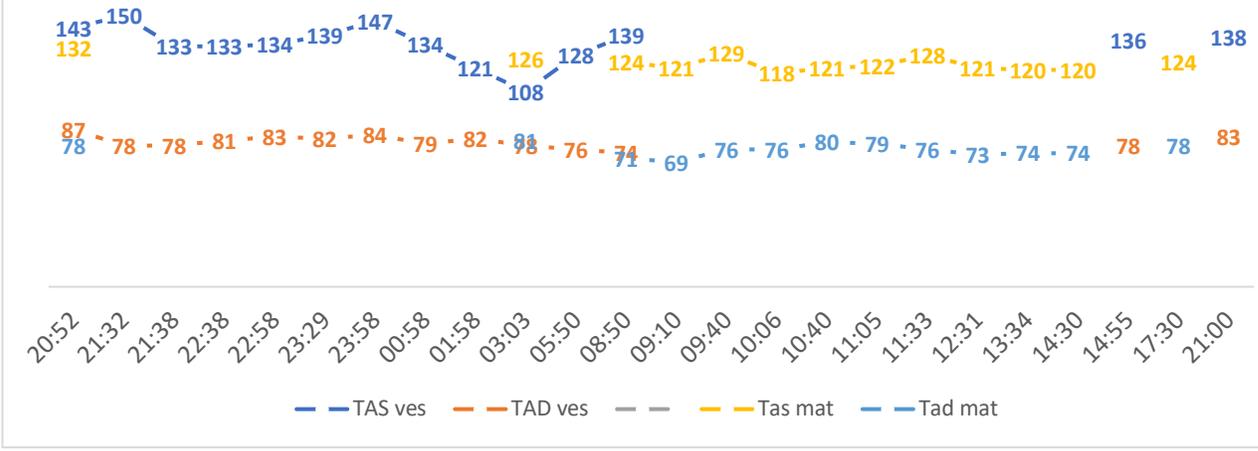
Se realizaron dos estudios farmacocinéticos, uno con dosis vespertina y otro con dosis matutina, con más de 2 semanas entre cada estudio. Las mediciones de la presión arterial sistólica (TAS), presión arterial diastólica (TAD), frecuencia cardiaca (FC) y

temperatura en los tiempos de muestreo se muestran en el estudio vespertino y matutino a continuación (Tabla 13 y Figura 11A y 11B). Las concentraciones plasmáticas de la administración matutina de simvastatina, se muestran en la tabla 14; la curva de farmacocinética se muestra en la figura 12A.

Tabla 13. Mediciones de TAS, TAD, FC, y temperatura, durante el estudio matutino y vespertino del paciente 16.

<b>Estudio vespertino</b>														
<b>Tiempo muestreo</b>	<b>0</b>	<b>0.5</b>	<b>1</b>	<b>1.5</b>	<b>2</b>	<b>2.5</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>12</b>	<b>18</b>	<b>24</b>
<b>PK</b>	20:52	21:32	21:38	22:38	22:58	23:29	23:58	00:58	01:58	03:03	05:50	08:50	14:55	21:00
<b>TAS</b>	143	150	133	133	134	139	147	134	121	108	128	139	136	138
<b>TAD</b>	87	78	78	81	83	82	84	79	82	78	76	74	78	83
<b>FC</b>	87	78	78	81	83	82	84	79	82	78	76	74	81	82
<b>Temp</b>	36	36.2	35.8	35.8	35.7	36.5	36.2	36.2	35.6	35.9	36.2	35.8	35.9	35.8
<b>Estudio matutino</b>														
<b>Tiempo muestreo</b>	<b>0</b>	<b>0.5</b>	<b>1</b>	<b>1.5</b>	<b>2</b>	<b>2.5</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>12</b>	<b>18</b>	<b>24</b>
<b>PK</b>	08:30	09:10	09:40	10:06	10:40	11:05	11:33	12:31	13:34	14:30	17:30	20:32	02:36	08:25
<b>TAS</b>	124	121	129	118	121	122	128	121	120	120	124	132	126	130
<b>TAD</b>	71	69	76	76	80	79	76	73	74	74	78	78	81	82
<b>FC</b>	71	69	76	76	80	79	76	73	74	74	78	81	83	81
<b>Temp</b>	36.4	36.4	37	36.4	36	35.9	36	36.2	36.3	35.6	35.9	36.2	35.6	36.2

**FIGURA 11A. TAS, TAD, PACIENTE 16, ESTUDIOS MATUTINO Y VESPERTINO**



**FIGURA 11B. TEMPERATURA, PACIENTE 16, ESTUDIOS MATUTINO Y VESPERTINO**

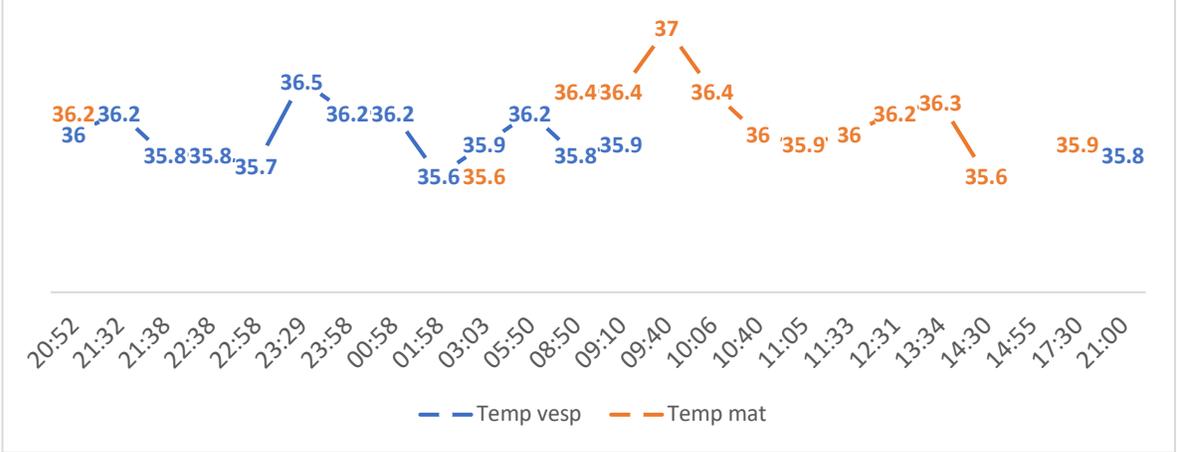


Tabla 14. Concentraciones plasmáticas del Paciente 16 estudio matutino.

Muestra	Concentración
Hora	ng/ml
0	1.16
0.5	2.6
1	1.71
1.5	1.96
2	3.44
2.5	6.45
3	2.8
4	1.93
5	1.55
6	1.62
18	2.03



**Evaluación de miRNAs**

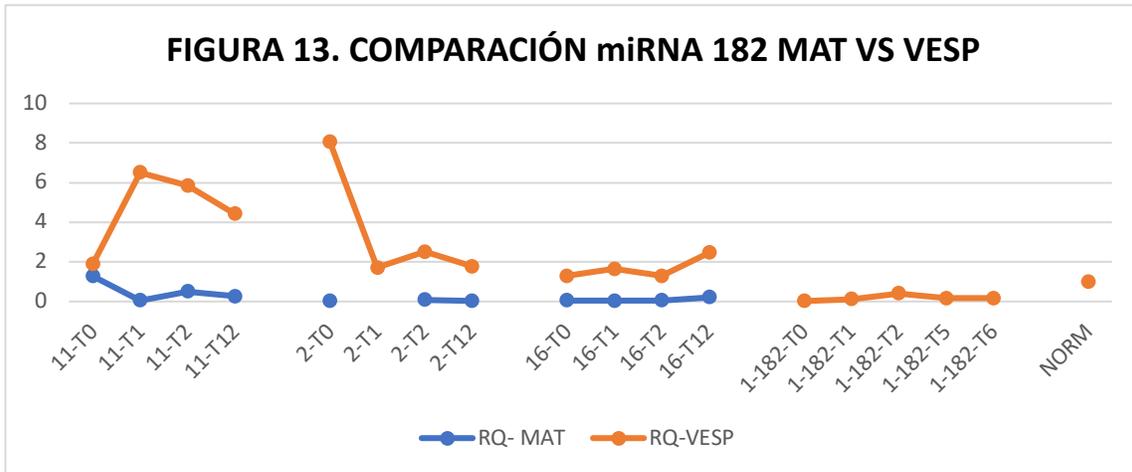
Se evaluó el perfil de expresión de los miRNAs 182 y 27b, previo a la administración de la simvastatina (tiempo 0) y en 3 diferentes tiempos de la farmacocinética (1, 2 y 12 hrs) en los 4 pacientes, y en los dos horarios de administración. En la tabla 15 se muestran los niveles de expresión del miRNA-182 en los pacientes evaluados.

La figura 13 muestra comparativamente las curvas de expresión del miRNA-182 en los 4 pacientes en los dos horarios de administración.

Se aprecia que el paciente 1 no presenta curva relacionada al turno matutino, como se describió anteriormente.

Tabla 15. Comparación del RQ de los estudios del miRNA-182, en la farmacocinética realizada a los pacientes.

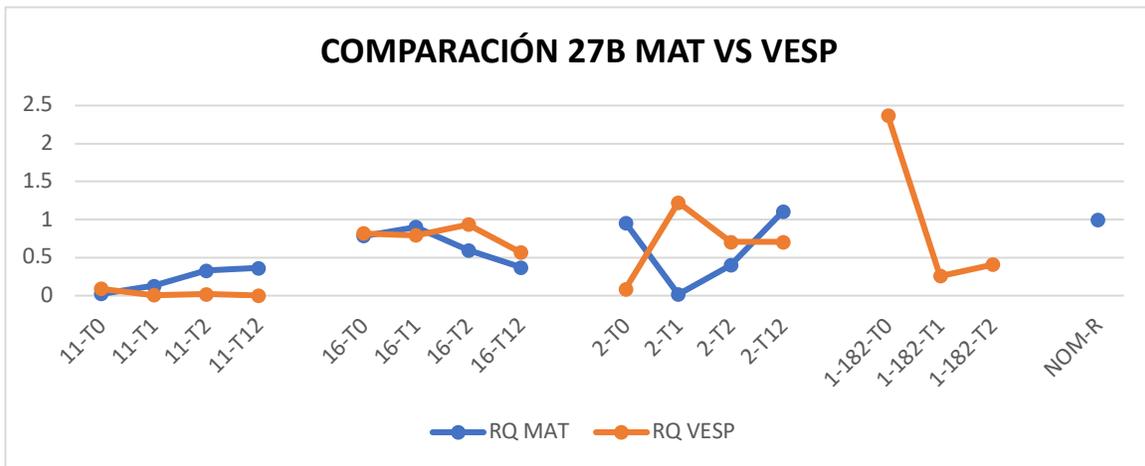
MUESTRA	RQ- MAT	RQ-VESP
11-T0	1.280	1.882
11-T1	0.052	6.504
11-T2	0.504	5.844
11-T12	0.259	4.419
2-T0	0.039	8.053
2-T1		1.707
2-T2	0.076	2.509
2-T12	0.028	1.765
16-T0	0.057	1.283
16-T1	0.040	1.637
16-T2	0.052	1.294
16-T12	0.206	2.457
1-T0		0.019
1-T1		0.1111
1-T2		0.401
1-T5		0.157
1-182-T6		0.159



En la tabla 16 se muestran los valores de RQ de los estudios de expresión del miRNA-27b. La figura 14 muestra comparativamente las curvas de expresión del miRNA-27b en los 4 pacientes en los dos horarios de administración.

Tabla 16. Comparación del RQ de los estudios del miRNA-27b en la farmacocinética realizada a los pacientes.

MUESTRA	RQ MAT	RQ VESP
11-T0	0.022	0.092
11-T1	0.128	0.007
11-T2	0.331	0.019
11-T12	0.363	0.002
2-T0	0.958	0.085
2-T1	0.017	1.223
LAZ-T2	0.401	0.706
2-T12	1.108	0.705
16-T0	0.784	0.817
16-T1	0.903	0.793
16-T2	0.596	0.936
16-T12	0.37	0.567
1-182-T0		2.369
1-182-T1		0.258
1-182-T2		0.409
NOM-R		1



## XXI. DISCUSIÓN

### **Respuesta Terapéutica**

En un estudio realizado por Balieiro (2014), en el que se evaluó el estado nutricional y los hábitos alimenticios de conductores de camiones diurnos y nocturnos, se encontró que aquellos con turnos nocturnos tenían una dieta más alta en carbohidratos. Mota (Mota, 2014) estudió el perfil de lípidos de individuos con jornadas de trabajo tanto matutino como vespertino, presentando estos últimos niveles más altos de TG que aquellos con turnos o patrones matutinos, lo que concuerda con nuestros resultados, aunque las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas.

Después del tratamiento con simvastatina, se encontraron diferencias significativas en algunos tipos de colesterol entre los pacientes matutinos y vespertinos; aunque la disminución no fue mayor al 30% al comparar ambos grupos. Cuando se realiza una evaluación individual, la perspectiva en la reducción de los niveles del perfil de lípidos en cada paciente parece tomar una gran importancia clínica.

De acuerdo con el ATP IV, la guía menciona que el nivel normal de TG debe ser <150 mg/dl, y el tratamiento debe ser de al menos 3 meses con la posterior evaluación del perfil de lípidos.

Por ejemplo, posterior a un mes de tratamiento con simvastatina, el paciente 2 del grupo matutino, presentó TG de 438 mg/dl y TG final de 158 mg/dl (reducción del 63.72%); en el grupo vespertino el paciente 17 presentó un valor de TG inicial de 382.1 y final de 211.9 mg/dl (reducción del 44.62%); así, estos pacientes no necesitarían los 3 meses de tratamiento según el ATP IV.

El tratamiento con estatinas se enfoca en la disminución de LDL, principal lipoproteína relacionada a riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares. El ATP IV, menciona un LDL óptimo menor a 100 mg/dl; al respecto, el paciente 9 (grupo matutino), con LDL inicial de 160.9 mg/dl y final de 78.4 mg/dl (51.27%), no necesitó más de un mes de tratamiento. Caso contrario del paciente 19 (grupo vespertino) quien tuvo una reducción del 25.01%, con LDL inicial de 229.1 mg/dl y final de 171.8 mg/dl; éste paciente presentó niveles más elevados que el paciente 9, y necesitó más de un mes de tratamiento. Otro ejemplo de la importancia de la evaluación individual es el paciente 10 (grupo matutino), quien presentó una reducción de LDL del 81.69% (inicial

138.2 mg/dl, final 25.3 mg/dl), y que de haber recibido más de un mes de tratamiento, habría rebasado el límite inferior considerado como el mínimo óptimo, que es de 20 mg/dl.

En la tabla 17, se muestra el número de pacientes de cada grupo de estudio, que alcanzaron o no, el límite normal de cada uno de los tipos de colesterol evaluados.

Tabla 17. Número de pacientes de ambos grupos, quienes alcanzaron los valores normales de referencia para cada uno de los tipos de colesterol.

	Colesterol <200 mg/dl			Triglicéridos <150 mg/dl			HDL > 40 mg/dl			LDL <100 mg/dl			VLDL < 30 mg/dl	
	Mat	Vesp		Mat	Vesp		Mat	Vesp		Mat	Vesp		Mat	Vesp
<b>SI</b>	9	7	<b>SI</b>	5	2	<b>SI</b>	5	0	<b>SI</b>	6	2	<b>SI</b>	5	1
<b>NO</b>	1	2	<b>NO</b>	5	7	<b>NO</b>	5	9	<b>NO</b>	4	7	<b>NO</b>	5	8
p= 0.465693		p= 0.210096		p= 0.0135		p=0.2301		0.1846						

Se puede apreciar que para el HDL, hay una diferencia significativa al comparar el grupo matutino contra el vespertino. Esto es debido a que la mitad del grupo matutino, después de un mes de tratamiento subió sus niveles de HDL por arriba de 40 mg/dl; y se observa que ningún paciente del grupo vespertino alcanzó este nivel. Para TG, LDL y VLDL, se aprecian diferencias no significativas entre los grupos.

### Parametros bioquímicos y polimorfismos

Los resultados del análisis de regresión logística no revelaron una asociación significativa de los alelos o haplotipos evaluados con los parámetros bioquímicos.

Algunos estudios han demostrado diferentes resultados en la disminución de los tipos de colesterol con polimorfismos genéticos. En un estudio de 69 caucásicos quienes recibieron lovastatina, simvastatina o atorvastatina, Kivistö et al reportaron que la reducción de la media porcentual de colesterol total fue mayor (31% vs 17%) en portadores homocigotos de *CYP3A5*\*3 comparados con aquellos con un alelo funcional *CYP3A5* (Kivistö, 2004). Por el contrario, Ragia et al no encontraron

asociación entre la disminución de LDL y *CYP3A5\*3*, (Ragia, 2015), en un estudio con 99 pacientes de ancestría Europea, quienes recibieron 20 mg de simvastatina al día; lo cual podría ser similar a nuestros resultados.

Sin embargo, se encontró que pueden tener influencia sobre el desarrollo de alteraciones clínicas tales como la miopatía, la cual ha sido descrita en asociación con algunos de los polimorfismos analizados.

### **Miopatía como evento adverso**

Nuestros resultados sugieren que la miopatía en pacientes bajo tratamiento con simvastatina es influenciada por los ritmos circadianos.

Aumentar la dosis de simvastatina a más de 40 mg o administrarla durante más tiempo aumentaría el riesgo de eventos adversos, como la miopatía (Food and Drug Administration -FDA- simvastatin label-2016). En este estudio, los 19 pacientes recibieron la misma dosis, 40 mg de simvastatina por la noche y solo 2 sujetos vespertinos presentaron miopatía.

Algunos factores de riesgo asociados con estatinas son: edad avanzada, bajo índice de masa corporal, medicamentos inhibidores de CYP3A y SLCO1B1, sexo femenino, alcoholismo, diabetes, hipotiroidismo, hiperuricemia, enfermedad hepática y trastornos musculares (Kitzmilller, 2016). En nuestro estudio, todos los pacientes fueron seleccionados con una edad entre 35-50 años ( $41.84 \pm 4.52$ ) y el índice de masa corporal promedio fue de  $28.58 \pm 5.42$ . Solo se seleccionaron sujetos saludables no alcohólicos sin medicación concomitante. Aunque, ser del sexo femenino representa un factor de riesgo para desarrollar miopatía, (Stulc, 2015) en el presente estudio, solo un par de hombres presentaron RAM.

En nuestro estudio, el primer paciente afectado, es un sujeto vespertino con heterocigosidad compuesta para 388 A>G y 521 T>C en el gen *SLCO1B1*. Aunque se ha descrito la falta de asociación entre estos polimorfismos y RAM como la miopatía (7); la asociación entre el polimorfismo 388 A>G y la miopatía se ha descrito solo en combinación con 521 T>C (William, 2014).

De hecho, el polimorfismo 521 T>C en sí mismo es capaz de inducir miopatía en pacientes bajo tratamiento con simvastatina (Jiang, 2017; Wilke, 2012, Ramsey, 2014; Brunham, 2012; Hou, 2015). Es de destacar que observamos una mujer no afectada en el grupo matutino, también heterocigota para el polimorfismo 521 T>C. La falta de asociación entre los últimos con eventos adversos se ha informado en pacientes checos tratados con dosis bajas de estatinas (Hou, 2015). Es notable que, aunque ambos pacientes tienen el polimorfismo 521 T> C, solo el paciente vespertino desarrolló miopatía, lo que sugiere un componente circadiano para el desarrollo de eventos adversos.

El primer paciente afectado también es heterocigoto para el polimorfismo *CYP3A4\*1B*, que se ha relacionado con miopatía; Wilke et al (2012), informaron una asociación entre *CYP3A4\*1B* y la elevación de la CK sérica en pacientes que experimentan mialgia. Sin embargo, este polimorfismo no puede asociarse con la miopatía en este estudio porque es compartido por un sujeto vespertino no afectado.

El segundo sujeto afectado vespertino es un homocigoto para 388 A>G. En este caso particular, es posible especular que el polimorfismo 388 A>G es el responsable del evento adverso tal como ha sido descrito por William (2014); sin embargo, este polimorfismo también se comparte con los sujetos no afectados 3 y 5 de los grupos matutino y vespertino, respectivamente. Lo anterior sugiere que el polimorfismo "388" no es un factor determinante para el desarrollo de miopatía en nuestra población. Llama la atención que a pesar de que este paciente presenta miopatía, no presenta el polimorfismo 521 T>C.

Curiosamente, este paciente es heterocigoto para *CYP3A5\*3*, que a través de la generación de tres metabolitos diferentes (6-b-hidroxi SV, 3'5'-Dihidro diol SV y 6'-exomethylene SV) podría explicar el desarrollo del evento adverso (Prueksaritanont, 2003). En oposición a esto, se encontró un sujeto sano con *CYP3A5\*1* (silvestre) en el grupo matutino, por lo tanto, al menos en nuestra población, *CYP3A5* parece no estar involucrado en el desarrollo de RAM, lo que coincide con el estudio de Fiegenbaum (2005).

La evaluación de *ABCB1* reveló una distribución heterogénea de polimorfismos en los grupos matutino y vespertino, lo que dificulta establecer una asociación con el

desarrollo del evento adverso. Por el contrario, en 2008, Keskitalo (2008) describió que los pacientes con el haplotipo TTT (alelos 1236T, 2677T y 3435T) tenían una AUC casi 60% mayor para la simvastatina ácida ( $p=0.039$ ) en comparación con aquellos sin este haplotipo (Keskitalo, 2008), lo que aumenta el riesgo de eventos adversos.

La presencia de RAM solo en sujetos vespertinos podría depender del ritmo circadiano, ya que controla la actividad de las enzimas metabolizadoras de fármacos y los transportadores. Un ejemplo es *CYP3A4* que está regulado por DBP, controlado por el heterodímero CLOCK/BMAL1 cuya expresión se produce con una periodicidad cercana a las 24 horas (13). La fluctuación en la actividad relativa del CYP3A osciló entre un 10% por encima del promedio alrededor de las 15:00 y un 10% por debajo de alrededor de las 3:00 (patrón diurno en la actividad hepática) (Tomalik, 2014).

Otros ejemplos de proteínas sujetas a variación circadiana y que están implicadas en el transporte de fármacos son P-gp (codificado por *ABCB1*) (Tomalik, 2014) y BCRP (codificado por *ABCG2*) (Hamdan, 2012), que presentan variaciones circadianas. Curiosamente, en ratones, *Mdr1a* (*Abcb1*) (Murakami, 2008) involucrado en el transporte de drogas, es regulado por los factores de transcripción PARbZip (DBP, TEF y HLF), que a su vez están sujetos a regulación por los genes *Clock* y *Bmal1* (DeBruyne, 2014). En 2008, Stearns, demostró en ratas una mayor expresión de *Mdr1* en la mañana respecto al tiempo de la tarde (Stearns, 2008).

Además del metabolismo y transporte, se han evaluado otros mecanismos asociados al desarrollo de miopatía por simvastatina (Moßhammer, 2014). Entre estos, se ha descrito la inducción por simvastatina de proteínas ligadas a atrofia muscular, atrogin-1 (*Fbxo32*) y MuRF1 que pertenecen al proteasoma UPP involucrado en el sistema intracelular principal para la degradación de proteínas (Mallinson, 2009). Curiosamente, tanto *Fbxo32* como MuRF1 están sujetas a ciclo circadiano y su pico de expresión se alcanza durante la noche en ayunas (McCarthy, 2007). Por lo tanto, es posible especular que la miopatía observada en los pacientes vespertinos del presente estudio podría ser el resultado de una sobreexpresión de *Fbxo32*, MuRF1 o ambos, producto de la inducción por simvastatina y la mayor expresión génica durante la noche. En oposición a esto, 7 sujetos vespertinos no mostraron miopatía, lo que podría explicarse en cierta medida por diferencias en el patrón de alimentación por un

lado y polimorfismos en los genes *Fbxo32* y *MuRF1* en otro, modificando su expresión y función.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que la miopatía inducida por simvastatina podría ser influenciada por un desajuste circadiano y de esta manera la administración de simvastatina en pacientes vespertinos debería evaluarse cuidadosamente debido al riesgo incrementado de desarrollar miopatía.

### **Expresión de miRNAs**

Shende (2006) identificó diferentes polimorfismos en el precursor del miRNA-182 asociado con insomnio tardío (que involucra despertares en la madrugada cercanos al amanecer) en pacientes que sufrían depresión mayor. Nuestro interés en estudiar el miRNA-182 es debido a que regula uno de los genes activadores del reloj circadiano, *BMAL1*, lo que probablemente explicaría la RAM en el grupo vespertino de la población estudiada.

Los valores de RQ del miRNA-182 de los pacientes 2, 11 y 16 fueron mayores en el estudio vespertino que en el estudio matutino (Tabla 15). Por otro lado, el paciente 1 no tiene evaluación matutina ya que presentó un evento adverso durante la realización del estudio farmacocinético vespertino. En él se observa que la expresión del miRNA-182 en dosis vespertina, es similar a los niveles de expresión del estudio matutino de los pacientes 2, 11 y 16. Se ha descrito que el miRNA-182 tiene una expresión mayor en el día, que concuerda con los valores de RQ de los pacientes 2, 11 y 16 del turno matutino y es contrario a la expresión observada en el paciente 1. En este paciente los valores de RQ se relacionan con la expresión de *Clock* y *Bmal1* (pico de expresión 3:00 a 5:00 hrs) (Minou, 2017).

En un estudio donde compararon CD133 de células de dos grupos de ratones, uno controlado con ritmos matutinos y otro expuesto a oscuridad, se encontró que en éstos últimos hay una mayor expresión del miRNA-182 en la madrugada (Marina, 2014), lo cual concuerda con los valores observados con el paciente 1 y es contrario a lo encontrado por Minou (2017).

Comprender la regulación de *CYP3A4* por miRNAs, es otro factor importante que puede influir en el metabolismo y disposición de los fármacos. Tal es el caso del miRNA-27b, que se dirige a la región 3'UTR de *CYP3A4*, lo que conduce a su regulación negativa. La regulación de *CYP3A4* a través de algunos miRNAs en células PANC1, incrementa la sensibilidad a la ciclofosfamida, la cual es uno de sus sustratos (Yu-Zhuo, 2009).

En la Figura 14, se muestra la comparación de los niveles de expresión (RQ) del miRNA-27b, en los diferentes tiempos de la farmacocinética de simvastatina en dosis matutina y vespertina. Se aprecia que los pacientes 11 y 16 presentan una expresión de miRNA-27b mas homogénea en los tiempos matutino y vespertino, a diferencia del paciente 2 cuyos niveles de expresión matutino y vespertino no siguen la misma tendencia. Esta misma observación no puede hacerse en relación con paciente 1 ya que solo tiene el estudio vespertino debido a que durante este estudio presentó un evento adverso, imposibilitando la realización del estudio matutino posterior.

Lo anterior sugiere que la expresión del miRNA-27b podría depender de ritmos circadianos.

Aunque los pacientes 1 y 2 son vespertinos, se parecía que en el T0 los niveles de expresión basal del miRNA-27b son opuestos, lo cual puede deberse a la inducción de este miRNA por diferentes factores que pueden ser dieta, etnia, tabaquismo, alcoholismo, ejercicio, entre otros.

### **Análisis de estudios Farmacocinéticos**

En la tabla 11 se muestran las concentraciones plasmáticas de simvastatina del paciente 2, en dosis matutina y vespertina. Los resultados muestran que para ambas dosis, la C<sub>max</sub> fue alcanzada en el T1.5, con una mayor concentración en la dosis matutina (49.34 ng/ml) que en la dosis vespertina (34.92 ng/ml) Esta diferencia puede indicar que el metabolismo y la eliminación de simvastatina son más rápidos en la dosis vespertina. Llama la atención que del tiempo 1.5 al 2 en la dosis matutina, las concentraciones de simvastatina disminuyeron 4.3 veces contrario a lo que ocurre en la dosis vespertina donde se aprecia una disminución de 13.2 veces, lo que sugiere

que en esta última la simvastatina se degradó. En la tabla 14 se muestran las concentraciones plasmáticas de simvastatina del paciente 16 en dosis matutina; la  $C_{max}$  (6.54ng/ml) fue alcanzada en el T2.5, la cual es similar a la descrita en el estudio de Jari et al (1998) y diferente a la observada en el paciente 2. Esta diferencia puede deberse a diferentes factores como el ciclo circadiano (paciente 2 con ritmos vespertinos y paciente 16 con ritmos matutinos), factores genéticos (Tabla 8), hábitos dietéticos, alcoholismo, tabaquismo, entre otros.

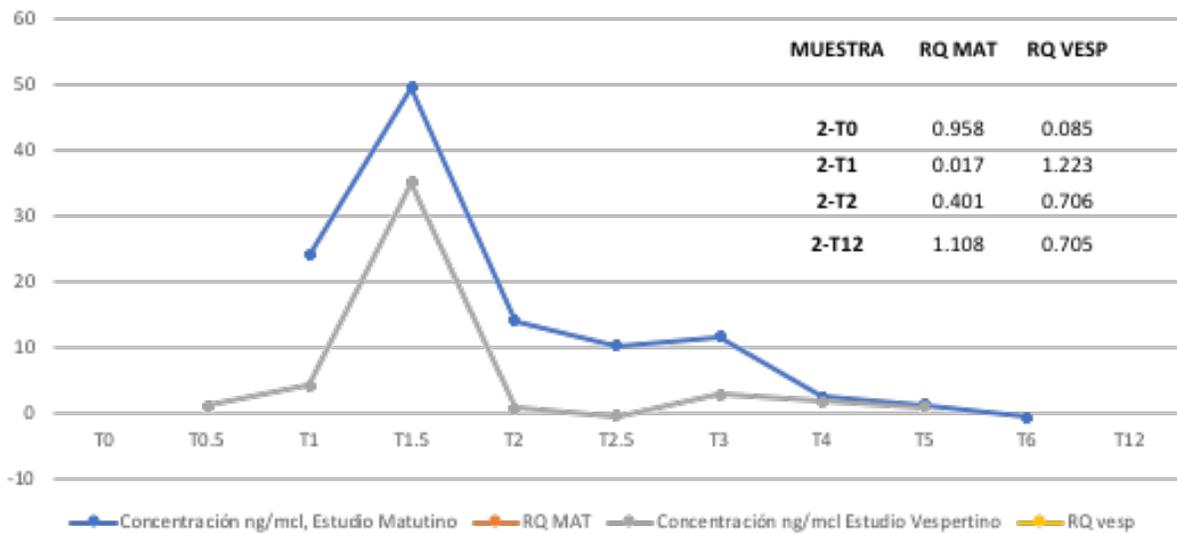
### **Análisis del estudio farmacocinético y polimorfismos**

La evaluación de la farmacocinética del paciente 2 y el paciente 16 no mostró relación con alguno de los polimorfismos evaluados. Esto indica que quizá existan otros polimorfismos en los genes del transporte y metabolismo de simvastatina que no fueron analizados.

### **Análisis del estudio farmacocinético y miRNAs**

En la figura 15 se muestra la comparación de los estudios de farmacocinética realizados al paciente 2, además de los niveles de expresión del miRNA-27b, tanto para el estudio matutino como el vespertino. Se hace notar que la  $C_{max}$  (T1.5) es mayor en el estudio matutino lo cual se corresponde con una mayor expresión del miRNA-27b en este mismo estudio en T0 antes de alcanzar la  $C_{max}$ . Con relación al paciente 16 no se encontró una relación entre la farmacocinética del estudio matutino y la expresión del miRNA-27. Cabe mencionar que hasta el momento no se cuenta con el resultado del estudio farmacocinético vespertino.

**Figura 15. Comparación de las concentraciones plasmáticas de simvastatina, estudio Vespertino y Matutino, del paciente 2 y los RQ del microRNA-27b**



La comparación de los estudios de farmacocinética realizados al paciente 2 y 16 con respecto a los niveles de expresión del miRNA-182 no mostró algún tipo de relación.

Quizá para estudios posteriores, sería conveniente buscar la relación entre el ritmo circadiano y el aumento de la concentración plasmática de simvastatina en la dosis matutina.

## XXII. CONCLUSIONES.

Como se mencionó, encontramos diferencias significativas en el nivel final de TG, HDL y VLDL, entre los grupos matutino y vespertino; sin embargo, la respuesta (medida como una disminución en más del 30% del valor inicial), no es significativa entre los grupos. De esta manera, la evaluación individual, en la práctica clínica, resulta muy importante para establecer el tiempo de tratamiento con simvastatina, y de esta manera reducir el riesgo de presentar algún evento adverso, como la miopatía.

Nuestros resultados sugieren que la miopatía en pacientes bajo tratamiento con simvastatina puede ser el resultado de diferentes combinaciones de algunos polimorfismos en genes implicados en el transporte (*SLCO1B1*), así como un desajuste de los ritmos circadianos. De esta manera la administración de simvastatina en pacientes vespertinos debería evaluarse cuidadosamente debido al riesgo incrementado de desarrollar miopatía.

La regulación del transporte y metabolismo de simvastatina, por los miRNAs, es un factor que puede influir en la disposición de los fármacos, y por consecuencia en la respuesta al tratamiento y en la presencia de eventos adversos como la miopatía. Por ejemplo, estudiar el momento que el miRNA-27b regula el metabolismo hepático, en la curva farmacocinética (en la absorción, en la distribución o eliminación del mismo), podrá ayudar a entender la verdadera influencia de éste, con los parámetros farmacocinéticos y la respuesta de simvastatina en los pacientes.

La presencia de ritmos circadianos alterados se hace evidente de diferentes maneras. Observamos que los pacientes del grupo vespertino, presentaron anomalías en los diferentes estudios que realizamos: en primer lugar, se encontró una pobre respuesta a simvastatina observada en el perfil de lípidos, y/o la presencia de un evento adverso (miopatía). De igual manera los polimorfismos detectados en los genes del transporte y metabolismo de simvastatina estuvieron presentes en pacientes con y sin miopatía, haciéndolos poco útiles como marcadores de riesgo en población mexicana.

Finalmente, la expresión de los miRNAs en los diferentes tiempos del estudio farmacocinético, mostró un comportamiento similar posterior a la administración matutina y vespertina del fármaco en los pacientes matutinos. Los pacientes vespertinos mostraron un perfil de expresión errático al comparar la administración matutina y vespertina de simvastatina.

### XXIII. RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS

Estudios para evaluar la prevalencia de los diferentes polimorfismos estudiados y su relación con la respuesta terapéutica, en la ciudad de Durango, quizá sean muy importantes para establecer pautas de tratamientos más reales, y así evitar la presencia de eventos adversos como lo es la miopatía. Además, futuros estudios son necesarios para establecer con exactitud la regulación miRNA-27b y los parámetros farmacocinéticos, con un perfil de expresión completo que abarque mayores tiempos de muestreo.

## XXIV. REFERENCIAS DOCUMENTALES

- 1- Abe T, Kakyo M, Tokui T, Nakagomi R, Nishio T, Nakai D, Nomura H, Unno M, Suzuki M, Naitoh T, Matsuno S, Yawo H. Identification of a novel gene family encoding human liver-specific organic anion transporter LST-1. *J Biol Chem*. 1999 Jun 11;274(24):17159-63
- 2- Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. Información de fichas técnicas autorizadas).  
<https://sinaem4.agemed.es/consaem/fichasTecnicas>
- 3- Agnes Nagy, Csilla Sipeky, Renata Szalai, Bela Imre Melegh, Petra Matyas, Alma Ganczer, Kalman Toth, and Bela Melegh Marked differences in frequencies of statin therapy relevant SLCO1B1 variants and haplotypes between Roma and Hungarian populations *BMC Genet*. 2015; 16: 108.
- 4- Albrecht. Invited review: regulation of mammalian circadian clock genes. Albrecht U1.). *J Appl Physiol* (1985). 2002 ar;92(3):1348-55
- 5- Assenat (2004). Interleukin 1beta inhibits CAR-induced expression of hepatic genes involved in drug and bilirubin clearance. *Hepatology*, 40:951–60.
- 6- Austin MA et al. Low density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. *JAMA* 1988; 260: 1917-21.
- 7- Azama (2007). Altered expression profiles of clock genes hPer1 and hPer2 in peripheral blood mononuclear cells of cancer patients undergoing surgery. *Life Sciences* 80, 1100-1108.
- 8- Balieiro LC1, Rossato LT, Waterhouse J, Paim SL, Mota MC, Crispim CA. Nutritional status and eating habits of bus drivers during the day and night. *Chronobiol Int*. 2014 Dec;31(10):1123-9. doi: 10.3109/07420528.2014.957299. Epub 2014 Sep 18.
- 9- Balieiro LC1, Rossato LT, Waterhouse J, Paim SL, Mota MC, Crispim CA. Nutritional status and eating habits of bus drivers during the day and night. *Chronobiol Int*. 2014 Dec;31(10):1123-9. doi: 10.3109/07420528.2014.957299. Epub 2014 Sep 18.
- 10-Becker ML1, Visser LE, van Schaik RH, Hofman A, Uitterlinden AG, Stricker BH. Influence of genetic variation in CYP3A4 and ABCB1 on dose decrease or switching during simvastatin and atorvastatin therapy. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 2010 Jan;19(1):75-81. doi: 10.1002/pds.1866.
- 11-Bohnsack MT1, Czapinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*. 2004 Feb;10(2):185-91.
- 12-Brunham LR, Lansberg PJ, Zhang L, Miao F, Carter C, Hovingh GK, et al. Differential effect of the rs4149056 variant in SLCO1B1 on myopathy

- associated with simvastatin and atorvastatin. *The Pharmacogenomics J.* 2012; 12: 233–7.
- 13-Dai R, Feng J, Wang Y, Yang Y, Deng C, Tang X, Zhao Y, Zhou H, Zhang F. Association between SLCO1B1 521 T>C and 388 A>G Polymorphisms and Statins Effectiveness: A Meta-Analysis. *J Atheroscler Thromb.* 2015 Aug 26;22(8):796-815
- 14-Dean, Michael (2002). *The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily.* US: National Library of Medicine. Archivado desde el original el 12 de febrero de 2006.
- 15-DeBruyne JP, Weaver DR, Dallmann R. The hepatic circadian clock modulates xenobiotic metabolism in mice. *J Biol Rhythms.* 2014; 294:277-87.
- 16-Ding X1, Sun B1, Huang J2, Xu L3, Pan J3, Fang C4, Tao Y3, Hu S5, Li R1, Han X1, Miao P1, Wang Y1, Yu J1, Feng X6.. The role of miR-182 in regulating pineal CLOCK expression after hypoxia-ischemia brain injury in neonatal rats. *Neurosci Lett.* 2015 Mar 30;591:75-80. doi: 10.1016/j.neulet.2015.02.026. Epub 2015 Feb 12.
- 17-Donnelly LA, Doney AS, Tavendale R, et al. Common nonsynonymous substitutions in SLCO1B1 predispose to statin intolerance in routinely treated individuals with type 2 diabetes: a go-DARTS study. *Clin Pharmacol Ther.* 2011;89(2):210–216.
- 18-Efstratiadis, Nikolaidou C1, Vergoulas G2 ,Leptin as a cardiovascular risk factor, Nephrology Department, Hippokratia General Hospital, Thessaloniki 2. Organ Transplant Unit, Hippokratia General Hospital, Thessaloniki, HIPPOKRATIA 2007, 11, 4: 163-175
- 19-Fiegenbaum M, da Silveira FR, Van der Sand CR, Van der Sand LC, Ferreira ME, Pires RC, et al. The role of common variants of ABCB1, CYP3A4, and CYP3A5 genes in lipid-lowering efficacy and safety of simvastatin treatment. *Clin Pharmacol Ther.* 2005; 78:551-8.
- 20-Figueroa Dde S1, Barbosa MR, Gitaí DL, de Andrade TG. Predicted microRNAs for mammalian circadian rhythms. *J Biol Rhythms.* 2013 Apr;28(2):107-16. doi: 10.1177/0748730413476827.
- 21-Foster. Light, photoreceptors, and circadian clocks. *Methods Mol. Biol.* 2007, 362, 3–28.
- 22-Franceschi (2008). Prevalence, clinical features and avoid-ability of adverse drug reactions as cause of admission to a geriatric unit: a prospective study of 1756 patients. *Drug Saf.,* 31(6):545–56.
- 23-Gachon (2006). The circadian PAR-domain basic leucine zipper transcription factors DBP, TEF, and HLF modulate basal and inducible xenobiotic detoxification. *Cell Metab. ,* 4, 25–36.

- 24-Graefe-Mody, Huettner S, Stähle H, Ring A, Dugi KA. Effect of linagliptin (BI 1356) on the steady-state pharmacokinetics of simvastatin. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2010 Jun;48(6):367-74.
- 25-Hamdan AM, Koyanagi S, Wada E, Kusunose N, Murakami Y, Matsunaga N, et al. Intestinal expression of mouse Abcg2/breast cancer resistance protein (BCRP) gene is under control of circadian clock-activating transcription factor-4 pathway. *J Biol Chem.* 2012; 287:17224–31.
- 26-Hesselink (2004). Population pharmacokinetics of cyclosporine in kidney and heart transplant recipients and the influence of ethnicity and genetic polymorphisms in the MDR-1, CYP3A4, and CYP3A5 genes. *Clin Pharmacol,* 76: 545–556.
- 27-Hou Q, Li S, Li L, Li Y, Sun X, Tian H. Association Between SLCO1B1 Gene T521C Polymorphism and Statin-Related Myopathy Risk: A Meta-Analysis of Case-Control Studies. *Medicine (Baltimore).* 2015; 94: e1268.
- 28-Hubáček JA, Dlouhá D, Adámková V, Zlatohlavek L, Viklický O, Hrubá P, et al. SLCO1B1 polymorphism is not associated with risk of statin-induced myalgia/myopathy in a Czech population. *Med Sci Monit.* 2015; 21:1454-9.
- 29-Hutvagner G1, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bálint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science.* 2001 Aug 3;293(5531):834-8. Epub 2001 Jul 12
- 30-Ingelman-Sundberg (2007). Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects. . *Pharmacol Ther,* 116:496-526.
- 31-Jasmine,. (2015). Individual and combined associations of genetic variants in CYP3A4, CYP3A5, and SLCO1B1 with simvastatin and simvastatin acid plasma concentrations. *J Cardiovasc Pharmacol,* 66(1): 80–85.
- 32-Jatinder Lamba,a Joan M. Hebert,b Erin G. Schuetz,d Teri E. Klein,b and Russ B. Altmanc PharmGKB summary: very important pharmacogene information for CYP3A5
- 33-Jellinger PS, Handelsman Y, Rosenblit PD, Bloomgarden ZT, Fonseca VA, Garber AJ, Grunberger G, Guerin CK, Bell DSH, Mechanick JI, Pessah-Pollack R, Wyne K, Smith D, Brinton EA, Fazio S, Davidson M.. American association of clinical endocrinologists and american college of endocrinology guidelines for management of dyslipidemia and prevention of cardiovascular disease. *Endocr Pract.* 2017 Apr;23(Suppl 2):1-87
- 34-Jiang F, Choi JY, Lee JH, Ryu S, Park ZW, Lee JG, et al. The influences of SLCO1B1 and ABCB1 genotypes on the pharmacokinetics of simvastatin, in relation to CYP3A4 inhibition. *Pharmacogenomics.* 2017; 18:459-69.
- 35-Johnston (2015). Regulation of mammalian neuroendocrine physiology and rhythms by melatonin. *J Endocrinol,* JOE-15-0119.

- 36-Jones (1990). Evidence for diurnal periodicity in human cholesterol synthesis. *J Lipid Res*, 31:667-673.
- 37-Josephine LH, Joy SV, Haga SB, et al. Genetically guided statin therapy on statin perceptions, adherence, and cholesterol lowering: a pilot implementation study in primary care patients. *J Pers Med*. 2014;4(2):147–162.
- 38-Jurevics, H.; Hostettler, J.; Barrett, C.; Morell, P.; Toews, A.D. Diurnal and dietary-induced changes in cholesterol synthesis correlate with levels of mRNA for HMG-CoA reductase. *J. Lipid. Res*. 2000, 41, 1048–1054.
- 39-Karlson. (2016). Variability of low-density lipoprotein cholesterol response with different doses of atorvastatin, rosuvastatin, and simvastatin: results from VOYAGER. *Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother*, pii: pvw006.
- 40-Keskitalo J, Kurkinen K, Neuvonen P, Niemi M. ABCB1 haplotypes differentially affect the pharmacokinetics of the acid and lactone forms of simvastatin and atorvastatin. *Clin Pharmacol Ther*. 2008;84(4):457–461
- 41-Ketting RF. microRNA Biogenesis and Function : An overview. *Adv Exp Med Biol*. 2011;700:1-14. doi: 10.1007/978-1-4419-7823-3\_1.
- 42-Kim (2014). Epigenetic Changes in Gene Expression for Drug-Metabolizing Enzymes and Transporters. *Pharmacotherapy*, 34(2):140–150.
- 43-Kim SH1, Kim MK, Seo HS, Hyun MS, Han KR, Cho SW, Kim YK, Hoon Park S. Efficacy and safety of morning versus evening dose of controlled-release simvastatin tablets in patients with hyperlipidemia: a randomized, double-blind, multicenter phase III trial. *Clin Ther*. 2013 Sep;35(9):1350-60.e1.
- 44-Kittles. (2002). CYP3A4-V and prostate cancer in African Americans: causal or confounding association because of population stratification? *Hum Genet*, 110: 553–560.
- 45-Kitzmilller JP, Mikulik EB, Dauki AM, Murkherjee C, Luzum JA. Pharmacogenomics of statins: understanding susceptibility to adverse effects. *Pharmacogenomics Pers Med*. 2016; 9:97-106.
- 46-Kivistö KT, Niemi M, Schaeffeler E, et al. Lipid-lowering response to statins is affected by CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics*. 2004;14(8):523–525.
- 47-Ko (2006). Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum. Mol. Genet*, R271–R277.
- 48-Ko (2006). Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum. Mol. Genet*, R271–R277.
- 49-Kosir. (2013). Circadian Events in Human Diseases and in Cytochrome P450-Related Drug Metabolism and Therapy. *Life*, 65(6):487-496.
- 50-Krauss RM et al. Identification of multiple subclasses of plasma low density lipoproteins in normal humans. *J Lipid Res* 1982; 23: 97-104
- 51-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; 587:219-30.

- 52-Maningat P, Gordon BR, Breslow JL. How do we improve patient compliance and adherence to long-term statin therapy? *Curr Atheroscle Rep.* 2013;15(1):291.
- 53-Marçola M1, Lopes-Ramos CM2, Pereira EP1, Cecon E1, Fernandes PA1, Tamura EK1, Camargo AA2, Parmigiani RB2, Markus RP1. Light/Dark Environmental Cycle Imposes a Daily Profile in the Expression of microRNAs in Rat CD133(+) Cells. *J Cell Physiol.* 2016 Sep;231(9):1953-63. doi: 10.1002/jcp.25300. Epub 2016 Jan 14.
- 54-Marina Marçola, Camila M. Lopes-Ramos, Eliana P. Pereira, Erika Cecon, Pedro A. Fernandes, Eduardo K. Tamura, Anamaria A. Camargo, Raphael B. Parmigiani, Regina P. Markus. Light/Dark Environmental Cycle Imposes a Daily Profile in the Expression of microRNAs in Rat CD133+ Cells. *Journal of Physiology.* Volume 231, Issue 9.
- 55-McCarthy JJ, Andrews JL, McDearmon EL, Campbell KS, Barber BK, Miller BH, et al. Identification of the circadian transcriptome in adult mouse skeletal muscle. *Physiol Genomics.* 2007; 31:86-95.
- 56-Minou Nirvani, Cuong Khuu, Tor Paaske Utheim, Henriette Stavik Hollingen, Simon Furre Amundsen, Lars Peter Sand & Amer Sehic. Circadian rhythms and gene expression during mouse molar tooth development. *Journal Acta Odontologica Scandinavica* Volume 75, 2017 - Issue 2
- 57-Moßhammer D, Schaeffeler E, Schwab M, Mörike K. Mechanisms and assessment of statin-related muscular adverse effects. *Br J Clin Pharmacol.* 2014; 78:454-66.
- 58-Mota MC1, Waterhouse J, De-Souza DA, Rossato LT, Silva CM, Araújo MB, Tufik S, de Mello MT, Crispim CA. Sleep pattern is associated with adipokine levels and nutritional markers in resident physicians. *Chronobiol Int.* 2014 Dec;31(10):1130-8. doi: 10.3109/07420528.2014.957300. Epub 2014 Sep 18.
- 59-Murakami Y, Higashi Y, Matsunaga N, Koyanagi S, Ohdo S. Circadian clock-controlled intestinal expression of the multidrug-resistance gene *mdr1a* in mice. *Gastroenterology.* 2008. 135:1636-44.
- 60-Nelson. (1996). P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6,, 1-42.
- 61-Okyar A, Dressler C, Hanafy A, Baktir G, Lemmer B, Spahn-Langguth H. Circadian variations in exsorbitive transport: in situ intestinal perfusion data and in vivo relevance. *Chronobiol Int.* 2012; 29:443-53.
- 62-Pan YZ1, Gao W, Yu AM. MicroRNAs regulate CYP3A4 expression via direct and indirect targeting. *Drug Metab Dispos.* 2009 Oct;37(10):2112-7. doi: 10.1124/dmd.109.027680. Epub 2009 Jul 6.

- 63-Park JE, Kim KB, Bae SK, Moon BS, Liu KH, Shin JG. Contribution of cytochrome P450 3A4 and 3A5 to the metabolism of atorvastatin. *Xenobiotica*. 2008;38(9):1240–1251.
- 64-Pasanen MK, F. H. (2007). Different effects of SLCO1B1 polymorphism on the pharmacokinetics of atorvastatin and rosuvastatin. *Clin Pharmacol Ther.*, 82(6):726-33. Epub 2007 May 2.
- 65-Peng W1, Yang J2, Yang B1, Wang L3, Xiong XG1, Liang Q1. Impact of statins on cognitive deficits in adult male rodents after traumatic brain injury: a systematic review. *Biomed Res Int*. 2014;2014:261409. doi: 10.1155/2014/261409. Epub 2014 Jul 23
- 66-Peters BJ, Rodin AS, Klungel OH, et al. Pharmacogenetic interactions between ABCB1 and SLCO1B1 tagging SNPs and the effectiveness of statins in the prevention of myocardial infarction. *Pharmacogenomics*. 2010;11(8):1065–107
- 67-Prado Y, Saavedra N, Zambrano T, Lagos J, Rosales A, Salazar LA. SLCO1B1 c.388A>G Polymorphism Is Associated with HDL-C Levels in Response to Atorvastatin in Chilean Individuals. *Int J Mol Sci*. 2015 Aug 31;16(9):20609-19).
- 68-Prueksaritanont T, Ma B, Yu N. The human hepatic metabolism of simvastatin hydroxy acid is mediated primarily by CYP3A, and not CYP2D6. *Br J Clin Pharmacol*. 2003 Jul;56(1):120-4.
- 69-Prueksaritanont, Bennett Ma, and Nathan Yu. The human hepatic metabolism of simvastatin hydroxy acid is mediated primarily by CYP3A, and not CYP2D6. *Br J Clin Pharmacol*. 2003 Jul; 56(1) 120-124.
- 70-Qiu H, Mathäs M, Nestler S, Bengel C, Nem D, Gödtel-Armbrust U, Lang T, Taudien S, Burk O, Wojnowski L (March 2010). "The unique complexity of the CYP3A4 upstream region suggests a nongenetic explanation of its expression variability". *Pharmacogenetics and Genomics*. 20 (3): 167–78.
- 71-Ragia G, Kolovou V, Tavridou A, et al. No effect of CYP3A4 intron 6 C>T polymorphism (CYP3A4\*22) on lipid-lowering response to statins in Greek patients with primary hypercholesterolemia. *Drug Metab Pers Ther*. 2015 Mar;30(1):43-8. doi: 10.1515/dmdi-2014-0021.
- 72-Ramsey LB, Johnson SG, Caudle KE, Haidar CE, Voora D, Wilke RA, et al. The clinical pharmacogenetics implementation consortium guideline for SLCO1B1 and simvastatin-induced myopathy: 2014 update. *Clin Pharmacol Ther*. 2014; 96:423-8.
- 73-Rebbeck, T. R., Jaffe, J. M., Walker, A. H., Wein, A. J., and Malkowicz, S. B. (1998). Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J. Natl. Cancer Inst*. 90, 1225–1229.
- 74-Reggie García Robles, PhD1 , Paola Andrea Ayala Ramírez, Bac2 , Sandra Paola Perdomo Velásquez B. Sc, PhD, Post Doc1 Recibido: julio 15 de 2011 •

- Epigenética: definición, bases moleculares e implicaciones en la salud y en la evolución humana Epigenetics: definition, molecular bases and implications in human health and evolution Epigenética: definição, bases moleculares e implicações na saúde e na evolução humana Aprobado: febrero 17 de 2012  
Para citar este artículo: García R, Ayala PA, Perdomo SP. Epigenética: definición, bases moleculares e implicaciones en la salud y en la evolución humana. *Rev. Cienc. Salud* 2012; 10 (1):59-
- 75-Reyes-Hernández,. (2008). A comparative study of CYP3A4 polymorphisms in Mexican Amerindian and Mestizo populations. *Pharmacology*, 81(2):97-103.
- 76-Sadeghi Mehran M., Collinge Mark, Pardi Ruggero and Jeffrey R. Bender. Simvastatin Modulates Cytokine-Mediated Endothelial Cell Adhesion Molecule Induction: Involvement of an Inhibitory G Protein. *J Immunol* September 1, 2000, 165 (5) 2712-2718; DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.5.2712>
- 77-Sayar. (2016). Association of Serum Lipid Indices and Statin Consumption with Periodontal Status. *Oral Dis.*, 10.1111/odi.12545.
- 78-Schirmer M1, Toliat MR, Haberl M, Suk A, Kamdem LK, Klein K, Brockmüller J, Nürnberg P, Zanger UM, Wojnowski L. Genetic signature consistent with selection against the CYP3A4\*1B allele in non-African populations. *Pharmacogenet Genomics*. 2006 Jan;16(1):59-71.
- 79-Selby JV et al. LDL subclass phenotypes and the insulin resistance syndrome in woman. *Circulation* 1993; 88: 381-7.
- 80-Shende. (2006). Expression and rhythmic modulation of circulating microRNAs targeting the clock gene Bmal1 in mice. *PLoS One*, e22586.
- 81-Stearns AT, Balakrishnan A, Rhoads DB, Ashley SW, Tavakkolizadeh A. Diurnal rhythmicity in the transcription of jejunal drug transporters. *J Pharmacol Sci*. 2008; 108:144-8.
- 82-Stulc T, Ceška R, Gotto AM Jr. Statin Intolerance: The Clinician's Perspective. *Curr Atheroscler Rep*. 2015;17(12):69.
- 83-Tabas I, Krieger M. Lipoprotein receptors and cellular cholesterol metabolism. In health and disease. In *Molecular basis of cardiovascular disease. A companion to Braunwald's Heart Disease* Chien KR, Copyright 1999 by Saunders Company pp 428-57.
- 84-Taillard J1, Philip P, Chastang JF, Bioulac B. Validation of Horne and Ostberg morningness-eveningness questionnaire in a middle-aged population of French workers. *J Biol Rhythms*. 2004 Feb;19(1):76-86.
- 85-Takagi. (2008). Post-transcriptional regulation of human pregnane X receptor by micro-RNA affects the expression of cytochrome P450 3A4. *J Biol Chem*, 283:9674–80.
- 86-Tall AR, Dammerman M, Breslow JL. Disorders of lipoprotein metabolism in *Molecular basis of cardiovascular disease. A companion to Braunwald's Heart Disease* Chien KR, Copyright 1999 by Saunders Company. pp 413-27.

- 87-Thummel (1998). In vitro and in vivo drug interactions involving human CYP3A. *Annu Rev Pharmacol Toxicol, Rev Pharmacol Toxicol* 1998;
- 88-Tomalik-Scharte D, Suleiman AA, Frechen S, Kraus D, Kerkweg U, Rokitta D, et al. Population pharmacokinetic analysis of circadian rhythms in hepatic CYP3A activity using midazolam. *J Clin Pharmacol.* 2014; 54:1162-9.
- 89-Tsimihodimos V, Miltiados G, Elisaf M. Therapy with statins is effective in some patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 2000 Dec;153(2):527
- 90-Voora D., Shah S. H., Spasojevic I., Ali S., Reed C. R., Salisbury B. A. and Ginsburg G. S. (2009). The SLCO1B1\*5 Genetic Variant Is Associated With Statin-Induced Side Effects. *Journal of American College of Cardiology,* 54(17):1609-1616.
- 91-Whirl-Carrillo M, McDonagh EM, Hebert JM, Gong L, Sangkuhl K, Thorn CF, Altman RB, Klein TE. Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine. *Clin Pharmacol Ther.* 2012 Oct;92(4):414-7.
- 92-Wilke R. A., Ramsey L. B., Johnson S. G., Maxwell W. D., McLeod H. L., Voora D., Krauss R. M., Roden D. M., Feng Q., Cooper-DeHoff R. M., Gong L., Klein T. E, Wadelius M. and Niemi M. (2012). The Clinical Pharmacogenomics Implementation Consortium: CPIC Guideline for SLCO1B1 and Simvastatin-Induced Myopathy. *Clinical Pharmacology & Therapeutics,* 1-7.
- 93-William J. Ca nestaro, MSc, Melissa A. Austin, PhD, MS and Kenneth E. Thummel, PHD. Genetic factors affecting statin concentrations and subsequent myopathy: a HuGENet systematic review. *Genet Med.* 2014 Nov; 16(11) 810-819.
- 94-Wojnowski. (2004). Genetics of the variable expression of CYP3A4 in humans. *Ther Drug Monit,* 26(2):192-199.
- 95-Wright. (2011). The influence of dosing time, variable compliance and circadian low-density lipoprotein production on the effect of simvastatin: simulations from a pharmacokinetic-pharmacodynamic model. *Basic Clin Pharmacol Toxicol,* 109(6):494-8.
- 96-Yan. (2016). The effect of lens aging and cataract surgery on circadian rhythm. *Int J Ophthalmol,* 18;9(7):1066-74.
- 97-Yang. (2006). Nuclear receptor expression links the circadian clock to metabolism. *Cell,* 801–810.
- 98-Yu-Zhuo Pan, Wenqing Gao, and Ai-Ming Yu. MicroRNAs Regulate CYP3A4 Expression via Direct and Indirect Targeting. *Drug Metab Dispos.* 2009 Oct; 37(10): 2112–2117.
- 99-Zanger UM1, Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. Schwab M. *Pharmacol Ther.* 2013 Apr;138(1):103-41.  
doi:10.1016/j.pharmthera.2012.12.007. Epub 2013 Jan 16.

- 100- Zhou. (2013). Simvastatin pharmacokinetics in healthy Chinese subjects and its relations with CYP2C9, CYP3A5, ABCB1, ABCG2 and SLCO1B1 polymorphisms. *Pharmazie*, 68(2):124-

## XXV AGRADECIMIENTOS

A Martha y Carlos, por permitirme escoger y trabajar, con libertad en este proyecto de Tesis. Gracias por su apoyo.

A Lirio y mis hijos, por siempre estar presentes cuando más lo necesitaba, apoyarme y compartir todas las horas de trabajo en equipo que se necesitaron para terminar este proyecto.

A todos mis compañeros y amigos del Doctorado, quienes fueron un apoyo, un desahogo, y motivación en estos 4 años.

A Margarita, Diana, Alejandra, Mayra, Amelia, Claudia, Denisse y a todos los que me apoyaron durante la tesis y al ser representante de alumnos.

A Toño A y Vicente, por la amistad formada, los aprendizajes y pláticas que me regalaron.

Y a todo el CIIDIR Durango, que me llevo en el corazón los colores y el alma del IPN conmigo.

## XXVI. ANEXOS

## APÉNDICE I

**SUSTRATOS:-** Bloquantes de los canales de calcio: diltiazem, nifedipino, felodipino, verapamil.

- Inmunosupresores: ciclosporina, tacrolimus, sirolimus.
- Quimioterapéuticos: cyclofosfamida, docetaxel, doxorubicina, etopósido, isofosfamida, paclitaxel, tamoxifeno, tenipósido, vindesina, gefitinib.
- Benzodiacepinas: flunitrazepam, midazolam, alprazolam, triazolam, clonazepam.
- Azoles antifúngicos: ketoconazol, itraconazol, clotrimazol.
- Antidepresivos tricíclicos: amitriptylina, imipramina, clomipramina, antibióticos macrolidos, eritromicina, claritromicina.
- Recaptación de serotonina (ISRS): citalopram, fluoxetina y norfluoxetina, sertralina.
- Estatinas: atorvastatina, lovastatina, simvastatina.
- Inhibidores de la PDE5: sildenafil, buspirona, haloperidol, venlafaxina, amiodarona, etililestradiol, quinina.
- Inhibidores de la proteasa: indinavir, ritonavir, saquinavir, nelfinavir, mirtazapina, nefazodona, pimozide, reboxetina, zopiclona.
- Inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos: nevirapina, alfentanil, budesonida, donepezilo, esomeprazol, omeprazol, finasterida, glibenclamida, cisaprida, terfenadina, toremifeno.
- Barbitúricos: fenobarbital, carbamazepina, codeína, dextrometorfano, digoxina.
- Alcaloides del ergot: estradiol, fentanilo, ivabradina, levonorgestrel, lidocaína, metadona, mifepristona, montelukast, ondansetron, paracetamol, quinidina, testosterona, teofilina, valproato, warfarina, tetrahydrocannabinol.
- Antisicóticos: aripiprazol, risperidona, ziprasidona.

**INHIBIDORES.**

- Antibióticos macrólidos: eritromicina, telitromicina, claritromicina

- Azoles antifúngicos: ketoconazol, itraconazol, nefazodona, bergamotina, aprepitant, quercetina, amiodarona, aprepitant, cimetidina, ciprofloxacino, ciclosporina, diltiazem, imatinib, equinacea, enoxacina, ergotamina, metronidazol, mifepristona, tofisopam.
- Inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos: efavirenz, nevirapina, gestodene, mibefradil.
- Inhibidores de la proteasa: saquinavir, indinavir.
- ISRS: fluoxetina, piperina, verapamil.
- Fluconazol, ritonavir.
- Jugo de pomelo, jugo de naranja, vino.
- Hierba de San Juan, ajo

#### **INDUCTORES:**

- Barbitúricos: fenobarbital, carbamazepina, hiperforina.
- Inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa inversa: efavirenz, nevirapina, etravirina, fenitoína, rifampicina, modafinilo, dexametasona, felbamato, glucocorticoides, griseofulvina, pioglitazona, topiramato, troglitazona, rifabutina, cafestol.

#### **APÉNDICE II**

Extractos de Hierbas de sospechosa o probada toxicidad:

- Hierbas que contienen alcaloides pirrolizidínicos: Consuelda, tusilago.
- Hierbas que contienen otras toxinas: sazafrán, muérdago, ginseng, regaliz, amigdalina, aristoloquia, poleo real o hierba de San Juan.
- Plantas medicinales con acción sobre Corazón: adonís, lirio de los valles, corrigia.
- Plantas medicinales con acción diurética: adonis, hierba de San Juan, zazafrán, trinitaria (pensamiento).
- Plantas con efecto sedante: acónito, lúpulo, adormidera, pasionaria.
- Plantas con acción antihipertensiva: espino inglés, rauwolfia, eleboro, muérdago.
- Planta con acción anticoagulante: Cataño de indias.

**Tiempos de muestreo para los ensayos de expresión de genes CLOCK y miRNAs**

Los tiempos de muestreo para la evaluación de expresión de los genes CLOCK, miRNAs y la melatonina se detallan a continuación:

		Intervalo de muestreo											
	<b>Ensayo de expresión</b>	Predosis (-3 hrs)	Predosis (-0.5)	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr	5 hr	6 hr	9 hr	12 hr	18 hr	24 hr
<b>MATUTINO</b>	<b>CLOCK</b>	X	X			X						X	X
	<b>BMAL</b>	X	X			X						X	X
	<b>DBP</b>		X	X	X						X		
	<b>miRNA's</b>		X	X	X						X		
	<b>MELATONINA</b>		X	X							X	X	X
<b>VESPERTINO</b>	<b>CLOCK</b>						X	X	X	X			
	<b>BMAL</b>						X	X	X	X			
	<b>DBP</b>		X	X	X						X		
	<b>miRNA's</b>		X	X	X						X		
	<b>MELATONINA</b>				X		X		X		X		X

Los horarios de los genes Clock están de acuerdo al momento de expresión de acuerdo la bibliografía. Los tiempos de los miRNAs se establecieron un punto predosis, un punto en la absorción, un punto en la Cmax y un punto en la eliminación.

## CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Protocolo Num \_\_\_\_\_

Titulo y número del proyecto	Asociación de la respuesta terapéutica de simvastatina con CYP3A4 y la expresión cronobiológica de miRNAs y genes CLOCK
Investigador principal	Dr. Saúl Flores Unzueta
Nombre de la institución	CIIDIR-IPN Unidad Durango
Dirección	Sigma 119, Fraccto. 20 de noviembre II; Dgo.
Teléfono	618 129 4111
Núm. de identificación del sujeto	
Iniciales del sujeto	

**Naturaleza y propósito del estudio.**

Se le invita a participar, de manera voluntaria, en un estudio de investigación sobre

**Asociación de la respuesta terapéutica de simvastatina con CYP3A4 y la expresión cronobiológica de miRNAs y genes CLOCK**

Para que usted pueda decidir si participa o no en este estudio, es importante que conozca y entienda los posibles riesgos y beneficios que le permitan tomar una decisión informada.

La persona responsable de la realización del estudio en la institución es el **Dr. Saúl Flores Unzueta**.

**El propósito del estudio es:**

Etapa I: Evaluar la respuesta terapéutica de Simvastatina administrada durante un mes de tratamiento a diferentes horarios (mañana y noche)

Etapa II: Caracterizar la manera en como el organismo actúa sobre la simvastatina para una eliminación en un periodo de 24 hrs en tres ocasiones, así como relacionar las variaciones genéticas con el metabolismo de este medicamento.

### **Procedimientos del estudio.**

La primera etapa se le pedirá integrar su expediente clínico, y se le realizarán preguntas para llenar su historial médico, además de medir algunos signos vitales como es la presión arterial y medir su peso. Posteriormente se le pedirá acudir a un laboratorio local para la medición en sangre de sus niveles de LDL y Triglicéridos, además pruebas de funcionamiento hepático (sin ningún costo); de esta manera si es candidato de acuerdo a estas pruebas realizadas, se le administrará Simvastatina 40 mg durante 28 días, indicado por la noche o por la mañana (según se le asigne); cuando termine este periodo, nuevamente se le pedirá acudir al laboratorio para analizar la reducción de sus niveles de LDL y Triglicéridos.

La segunda etapa del estudio evaluará este fármaco en la sangre con un estudio de farmacocinética, el cual requiere muestras de sangre durante 24 hrs. posterior a la ingesta del medicamento; sin embargo de los 40 pacientes que se ingresarán a la etapa I, sólo se escogerán a 8 participantes para esta etapa.

También es posible que estas muestras sirva para realizar algún otro estudio de investigación que nos permita aportar mayor conocimiento sobre su enfermedad, con el entendido que su confidencialidad siempre será respetada.

### **Molestias y riesgos.**

Generalmente, Simvastatina es bien tolerado; sin embargo, se puede presentar dolor abdominal, constipación, flatulencia, astenia y cefalea (la mayoría leves y pasajeras). Eventualmente también se han observado casos de miopatía.

Las molestias para la obtención de la muestra venosa son mínimas ya que la obtención de la muestra se realiza de forma habitual por personal capacitado y con experiencia.

**Beneficios.**

Los conocimientos logrados a partir de este estudio podrán ayudar a tener un vigilancia de sus signos vitales como son la Presión Arterial, frecuencia cardíaca, así como la revisión de pruebas de laboratorio, además la información obtenida podría también pueden ayudar a otras personas en el futuro.

**Confidencialidad de sus registros.**

Usted tiene derecho a su privacidad y toda la información recopilada durante este estudio es confidencial, en conformidad con la ley. El comité de Ética de su institución y las autoridades de salud pueden examinar su expediente médico en relación con este estudio. Si se publican los resultados de este estudio, su identidad permanecerá secreta. Esta información puede divulgarse a las autoridades oficiales de los Estados Unidos Mexicanos.

**Tratamiento médico en caso de lesiones.**

Si usted llegará a sufrir una lesión como resultado **DIRECTO** de los procedimientos de obtención de la muestra para este estudio, se le brindará atención médica necesaria en la institución participante. El investigador asume la responsabilidad del costo derivado de dicha atención médica, siempre y cuando exista una relación **DIRECTA** entre el daño y los procedimientos del estudio. No habrá otra forma de compensación.

**Obtención de información adicional.**

Se le anima a que usted haga preguntas en cualquier momento del estudio sobre sus derechos como sujeto participante, sobre la evolución o resultados del estudio por favor póngase en contacto con el **Dr. Saúl Flores Unzueta al 045-55-45-13-34-09 o Dr. en C Carlos Galaviz Hernández al 618-814-2091 o al 044-618-149-2868.**

Si usted tiene alguna pregunta con respecto a sus derechos como participante en el estudio de investigación, también puede ponerse en contacto con una persona no involucrada con el equipo de investigadores de este estudio el C.

\_\_\_\_\_ representante del Comité de Ética de esta  
institución participante al teléfono \_\_\_\_\_

### **Bases para la participación**

Su participación en este estudio es totalmente voluntaria y puede interrumpirla en cualquier momento. Su decisión de participar o no en el estudio no afectará la atención médica que recibirá y su médico le ofrecerá las mejores opciones terapéuticas disponibles. En caso de existir cualquier información nueva que pudiera influir en su voluntad de seguir participando en el estudio esta se le comunicará oportunamente.

### **Declaración y firma del paciente.**

He leído este consentimiento informado y he tenido la oportunidad de discutir el contenido con el **Dr. Saúl Flores Unzueta**. He tenido la oportunidad de hacer preguntas acerca de los procedimientos del estudio, sus inconveniencias, riesgos y posibles efectos secundarios. Se ha dado respuesta a todas mis preguntas a mi completa satisfacción. Toda la información verbal y por escrito y las pláticas sobre el estudio se me han proporcionado y han sido en mi propio idioma (Español). Mi firma indica que voluntariamente consiento en participar en este estudio después de haber leído detenidamente, entendido y recibido una explicación completa de la anterior información. Entiendo que puedo decidir retirarme en cualquier momento sin que esto afecte mi atención médica futura en la institución participante. He recibido una copia completa de este documento

### **14. FIRMA**

Para firmarse de manera simultánea, (es decir, en la misma fecha), por todas las partes:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

NOMBRE DEL PARTICIPANTE

FECHA

\_\_\_\_\_  
FIRMA DEL PARTICIPANTE

\_\_\_\_\_  
NOMBRE DEL INVESTIGADOR

FECHA

(o persona que realiza el proceso de consentimiento)

\_\_\_\_\_  
FIRMA DEL INVESTIGADOR

(o persona que realiza el proceso de consentimiento)

\_\_\_\_\_  
NOMBRE DEL TESTIGO(1)

\_\_\_\_\_  
FIRMA DEL TESTIGO(1)

FECHA

\_\_\_\_\_  
DIRECCION DEL TESTIGO (1)

PARENTESCO

\_\_\_\_\_  
NOMBRE DEL TESTIGO(2)

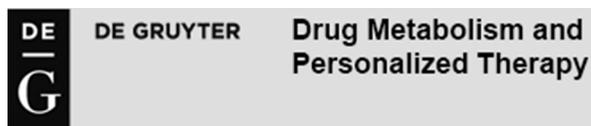
\_\_\_\_\_  
FIRMA DEL TESTIGO(2) FECHA

\_\_\_\_\_  
DIRECCION DEL TESTIGO (2)

PARENTESCO

**Distribución: original para el médico, y para el paciente.**





## Simvastatin-related myopathy in shift workers. Report of two cases.

Journal:	<i>Drug Metabolism and Personalized Therapy</i>
Manuscript ID	DMPT.2018.0016
Manuscript Type:	Case Report
Date Submitted by the Author:	04-Jun-2018
Complete List of Authors:	Flores-Unzueta, Saul; Instituto Politecnico Nacional, CIIDIR-Durango, Academia de Genomica Sosa-Macías, Martha; Instituto Politecnico Nacional, CIIDIR-Durango, Academia de Genomica Marchat, Laurence; Instituto Politecnico Nacional Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, Laboratorio de Biología Molecular II Lares-Asseff, Ismael; Instituto Politecnico Nacional, CIIDIR-Durango, Academia de Genomica Carrasco-Ortega, Omar; Universidad Nacional Autonoma de Mexico Facultad de Medicina, Department of Pharmacology Correa-Ramirez, Miguel; Instituto Politecnico Nacional, CIIDIR-Durango, Entomology Guerrero-Romero, Fernando; Mexican Social Security Institute, Unidad de Investigación Biomédica Galaviz-Hernández, Carlos; Instituto Politecnico Nacional, CIIDIR-Durango, Genomica
Section/Category:	Pharmacokinetics and Pharmacogenomics
Keywords:	Simvastatin, Myopathy, Circadian misalignment
Classifications:	
Abstract:	<p>Background. Simvastatin is a widely used drug for dyslipidemia treatment. The best therapeutic effects are achieved in night time. Simvastatin administration has been associated to the development of myopathy. Some polymorphisms in genes involved in the metabolism and transport of simvastatin seem to have an important role in the development of simvastatin-associated myopathy. The administration of 40 mg of simvastatin to 19 hyperlipidemic subjects with Regular sleep Rhythms (RR) and shift workers (SW) with predominant evening rhythms and sleep-wake disturbances, uncovered two SW volunteers who developed myopathy. Case presentations. We report two SW who developed simvastatin-dependent myopathy, after three weeks of treatment. The SLCO1B1 521T&gt;C major risk allele was observed in one myopathy-affected and one unaffected subjects; the second affected patient shared polymorphisms with unaffected subjects. Conclusion. The lack of consonance in the studied genotypes between SW, affected with simvastatin-associated myopathy,</p>

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

	could be related to circadian misalignment, hence other genes with circadian behavior and induced by simvastatin should be evaluated in future studies.

SCHOLARONE™  
Manuscripts

For Review Only

**Simvastatin-related myopathy in shift workers. Report of two cases.****Short title: Simvastatin-related myopathy in two shift workers**

Saul Flores-Unzueta<sup>1</sup>, Martha Sosa-Macias<sup>1</sup>, Laurence A Marchat<sup>2</sup>, Ismael Lares-Assef<sup>1</sup>, Omar Carrasco-Ortega<sup>3</sup>, Miguel Correa-Ramirez<sup>4</sup>, Fernando Guerrero-Romero<sup>5</sup> and Carlos Galaviz-Hernandez<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto Politecnico Nacional, CIIDIR-Durango, Academia de Genomica, Durango, Mexico, <sup>2</sup>Instituto Politecnico Nacional Escuela Nacional de Medicina y Homeopatia, Laboratorio de Biología Molecular II, Ciudad de Mexico, Mexico, <sup>3</sup>Universidad Nacional Autonoma de Mexico Facultad de Medicina, Department of Pharmacology, Ciudad de Mexico, Mexico, <sup>4</sup>Instituto Politecnico Nacional, CIIDIR-Durango, Academia de Entomología, Durango, Mexico, <sup>5</sup>Unidad de Investigación Biomédica, IMSS-Durango

\* Correspondence to: Dr. Carlos Galaviz-Hernandez MD, PhD

Instituto Politecnico Nacional. CIIDIR-Durango. Laboratorio de Biología Molecular.

Sigma 119 Fracc 20 de Noviembre II. Durango, Dgo, Mexico C.P. 34220

Tel 011 52 (618) 814-2091ext 82648/82642 Fax 011 52 (618) 814-4540

Email address: carlosgalavizhernandez55@gmail.com

**Total word count: 1301**

**Number of tables: 1**

## Abstract

**Background.** Simvastatin is a widely used drug for dyslipidemia treatment. The best therapeutic effects are achieved in night time. Simvastatin administration has been associated to the development of myopathy. Some polymorphisms in genes involved in the metabolism and transport of simvastatin seem to have an important role in the development of simvastatin-associated myopathy. The administration of 40 mg of simvastatin to 19 hyperlipidemic subjects with Regular sleep Rhythms (RR) and shift workers (SW) with predominant evening rhythms and sleep-wake disturbances, uncovered two SW volunteers who developed myopathy. **Case presentations.** We report two SW who developed simvastatin-dependent myopathy, after three weeks of treatment. The *SLCO1B1* 521T>C major risk allele was observed in one myopathy-affected and one unaffected subjects; the second affected patient shared polymorphisms with unaffected subjects. **Conclusion.** The lack of consonance in the studied genotypes between SW, affected with simvastatin-associated myopathy, could be related to circadian misalignment, hence other genes with circadian behavior and induced by simvastatin should be evaluated in future studies.

**Keywords.** Simvastatin, myopathy, circadian misalignment

## Introduction

Simvastatin decreases different types of serum cholesterol and lipoproteins through inhibition of the enzyme 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase and reduces the risk of myocardial infarction [1]. The administration of simvastatin has been associated with adverse drug reactions (ADRs), such as myopathy characterized by muscle inflammation, weakness, pain, and increased blood concentration of creatinine kinase (CK) [2]. The observed incidences of statin-associated muscle symptoms vary from 7%–29% [3].

After simvastatin treatment myopathy can develop, which has been associated to polymorphisms in genes related to metabolism (*CYP3A4\*1B*, *CYP3A5\*3*) and transport (521 T>C, 388 A>G in *SLCO1B1* and the 3435 T>C, 1236 T>C, 2677 C>A/T in *ABCB1*) of the drug [4].

A higher reduction of LDL-C concentrations after simvastatin administration in the evening has been described [5], suggesting that circadian rhythms could influence both drug response and the potential development of myopathy.

A prospective and comparative study was conducted after approval by the ethic and research committee of the Hospital 450 in Durango, Mexico according to Helsinki declaration, Good Clinical Practices, and Mexican General Health Law. All patients were asked to sign an informed consent letter. The therapeutic response to simvastatin was evaluated in 19 dyslipidemic patients with Regular sleep Rhythms (RR) (N=10), and shift workers (SW) with predominant evening rhythms and sleep-wake disturbances (N=9) who were treated with an evening daily dose of 40 mg of the drug, for one-month period. In the course of the study, a couple of SW [according to the reduced Morningness-

1  
2  
3 Eveningness Questionnaire (rMEQ)], were identified with myopathy [2], and treatment  
4 was discontinued. So, to determine if the observed myopathy in SW with potential  
5 circadian misalignment, is related to polymorphisms on genes involved in metabolism  
6 and transport of simvastatin, the 19 dyslipidemic patients were genotyped in a real-time  
7 PCR StepOne® instrument, using the MGB TaqMan probes: C\_1901697 for *SLCO1B1*  
8 388; C\_30633906 for *SLCO1B1* 521; C\_\_1837671\_50 for *CYP3A4\*1B*;  
9 C\_\_26201809\_30 for *CYP3A5\*3*; C\_\_7586657\_20, C\_\_7586662\_10,  
10 C\_11711720C\_30 and C\_11711720D\_40 for *ABCB1* polymorphisms. A total of 20 ng of  
11 genomic DNA was used under real time PCR standard conditions.  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23

### 24 **Cases presentation**

25  
26 **Case No.1, (SW).** Male, 42 years old, with 24.16 of BMI, no pathological antecedents of  
27 importance or concomitant treatment at the time of the study. After two weeks of  
28 treatment, the patient reported symptoms of myopathy (muscle weakness, sporadic  
29 muscular hyperesthesia) of mild intensity and sporadic frequency. In the third week,  
30 intensity increases and mild muscle pain appears, therefore the medication was  
31 discontinued. The analysis of polymorphisms revealed the presence of mutations in  
32 *SLCO1B1*, *CYP3A4*, *CYP3A5* and *ABCB1* genes (Table 1).  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41

42 **Case No.2, (SW).** Male, 35 years old, with 28.05 of BMI, no treatment. After three weeks  
43 of treatment, patient referred mild muscle pain and symptoms of myopathy, so  
44 administration of simvastatin was interrupted. Mutations were found in *SLCO1B1*,  
45 *CYP3A5* and *ABCB1* genes (Table 1).  
46  
47  
48  
49  
50

### 51 **Discussion**

1  
2  
3 In the present study, 19 hyperlipidemic patients received 40 mg simvastatin at evening,  
4 and only 2 SW presented myopathy which could be related to circadian misalignment.  
5

6  
7 Some risk factors associated to statin ADRs are advanced age, low body mass index,  
8 CYP3A and SLCO1B1 inhibiting medications, female gender, alcoholism, diabetes,  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
Some risk factors associated to statin ADRs are advanced age, low body mass index, CYP3A and SLCO1B1 inhibiting medications, female gender, alcoholism, diabetes, hypothyroidism, hiperuricemia, liver disease and muscle disorders [6]. All patients were selected with an age between 35- 50 years old ( $41.84 \pm 4.52$ ) and the average body mass index was  $28.58 \pm 5.42$ . Only non-alcoholic healthy subjects without concomitant medications were selected. Although, to be a woman represent a risk factor to develop myopathy, in the present study only a couple of men presented ADR.

In regard to *SLCO1B1* gene, the first reported patient is a SW with compound heterozygosity for 388 A>G and 521 T>C polymorphisms. The 521 T>C polymorphism by itself, is able to induce myopathy in patients under treatment with simvastatin [4]. It is noteworthy that we observed an unaffected female subject in the RR group, also heterozygote for 521 T>C polymorphism. Lack of association between 521 T>C with myopathy has been reported in Czech patients treated with low statin doses (20 mg) [7]. The second affected subject is also a SW who presents a wild type genotype 521TT; so, the lack of 521 T>C, does not warrant the absence of myopathy. This patient is also a mutant homozygote for 388 A>G. In this study, the “388 polymorphism” was also found in 3 and 5 unaffected subjects from the RR and SW groups respectively, suggesting that this polymorphism is not a determinant factor for ADRs development in the studied group. This lack of association between 388 A>G and myopathy, was previously reported in a meta-analysis [4].

Together these data, suggest that an altered sleep pattern could influence the development of simvastatin associated myopathy in this group of patients.

1  
2  
3 The first affected patient is also heterozygote for *CYP3A4\*1B* and *CYP3A5\*3*  
4 polymorphisms. In this study, *CYP3A4\*1B* is also found in one unaffected SW, therefore  
5 its lack of involvement in simvastatin-associated myopathy results evident. This agrees  
6 with the results of Voora et al. [8] who found no association between *CYP3A4\*1B* and  
7 simvastatin-associated myopathy. On the other side, *CYP3A5\*3* is present in two  
8 heterozygous *3A5\*3*, healthy RR and SW subjects. The evaluation of *ABCB1*, revealed  
9 a heterogeneous distribution of polymorphisms in the morning and evening groups and  
10 between affected and unaffected subjects, making hard to establish an association with  
11 ADR development.

12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24 The presence of myopathy only in SW subjects, could rely on the circadian rhythm, as it  
25 controls the activity of drug metabolizing enzymes, and transporters. One example is  
26 *CYP3A4* which is positively regulated during day time by DBP, which in turn is controlled  
27 by the CLOCK/BMAL1 heterodimer whose expression occur with a periodicity close to  
28 24 hours [9].

29  
30  
31  
32  
33  
34  
35 Other mechanisms associating simvastatin and myopathy development have been  
36 evaluated, such as the induction by simvastatin of muscle atrophy-linked proteins,  
37 atrogen-1 (*Fbxo32*) and *MuRF1* which belongs to UPP- proteasome, engaged in the  
38 main intracellular system for protein degradation; both *Fbxo32* and *MuRF1* are  
39 subjected to circadian cycle and, their peak expression is reached at night time in fasting  
40 state [10]. Therefore, it is possible to speculate that the observed myopathy in the two  
41 SW patients of the present study, could be, among other factors, the result of an over-  
42 expression of *FBXO32*, *MURF1* or both, product of the induction by simvastatin and the  
43 highest gene expression at night. In opposition to this, 7 SW subjects did not displayed  
44 myopathy, which could be explained in some extent through differences in feeding

1  
2  
3 pattern on one side, and individual variability in the expression and function of *FBXO32*  
4  
5 and *MURF1* genes.  
6

7  
8 To the best of our knowledge, no previous reports exist describing a potential  
9  
10 association between circadian misalignment and development of myopathy after  
11  
12 simvastatin intake. Some limitations in the present study deserve to be mentioned as  
13  
14 follows: no measurements of CK were performed in the affected individuals; only  
15  
16 polymorphisms in genes involved in metabolism and transport of simvastatin were  
17  
18 evaluated; the levels of melatonin to confirm circadian misalignment were not measured  
19  
20 and the administration time of simvastatin was not long enough to uncover more  
21  
22 potential affected patients.  
23  
24

25  
26 Thus, further studies are needed to complement our results, such as increase the  
27  
28 number of SW and RR subjects; to evaluate additional polymorphisms in the studied  
29  
30 genes; to analyze the muscle expression and polymorphisms in genes such as *FBXO32*  
31  
32 and *MURF1* and lastly to evaluate other potential mechanisms involved in the  
33  
34 development of simvastatin-induced myopathy in this type of patients.  
35  
36

37  
38 In conclusion, our results suggest that simvastatin-induced myopathy could be  
39  
40 influenced by the circadian misalignment and, hence the administration of simvastatin in  
41  
42 SW should be carefully evaluated, because the increased risk to develop myopathy.  
43  
44  
45

#### 46 47 **Declaration of interest**

48  
49 The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the  
50  
51 content and writing of this article.  
52

#### 53 54 **Acknowledgments**

This work was supported by FONSEC-Salud CONACYT- México, grant number 162338 and Instituto Politécnico Nacional-México, SIP 20181809, SIP 20181811.

## References

1. Sadeghi MM, Collinge M, Pardi R, Bender JR. Simvastatin modulates cytokine-mediated endothelial cell adhesion molecule induction: involvement of an inhibitory G protein. *J Immunol* 2000; 165:2712-18.
2. Bays H. Statin safety: an overview and assessment of the data. *Am J Cardiol* 2006; 97:6C–26C.
3. Stroes ES, Thompson PD, Corsini A, Vladutiu GD, Raal FJ, Ray KK, et al. Statin-associated muscle symptoms: impact on statin therapy-European Atherosclerosis Society Consensus Panel Statement on Assessment, Aetiology and Management. *Eur Heart J* 2015; 36:1012-22.
4. Canestaro WJ, Austin MA, Thummel KE. Genetic factors affecting statin concentrations and subsequent myopathy: a HuGENet systematic review. *Genet Med* 2014; 16:810-9.
5. Kaur G, Phillips CL, Wong K, McLachlan AJ, Saini B. Timing of Administration: For Commonly-Prescribed Medicines in Australia. *Pharmaceutics* 2016; 8(2). pii: E13.
6. Kitzmiller JP, Mikulik EB, Dauki AM, Murkherjee C, Luzum JA. Pharmacogenomics of statins: understanding susceptibility to adverse effects. *Pharmgenomics Pers Med* 2016; 9:97-106.

- 1  
2  
3 7. Hubáček JA, Dlouhá D, Adámková V, Zlatohlavek L, Viklický O, Hrubá P, et al.  
4  
5 SLCO1B1 polymorphism is not associated with risk of statin-induced  
6  
7 myalgia/myopathy in a Czech population. *Med Sci Monit* 2015; 21:1454-9.  
8  
9
- 10 8. Voora D, Shah SH, Spasojevic I, Ali S, Reed CR, Salisbury BA, et al. The  
11  
12 SLCO1B1\*5 genetic variant is associated with statin-induced side effects. *J Am*  
13  
14 *Coll Cardiol* 2009 Oct 20;54(17):1609-16)  
15  
16
- 17 9. Foster RG, Hankins MW, Peirson SN. Light, photoreceptors, and circadian  
18  
19 clocks. *Methods Mol Biol* 2007; 362:3–28.  
20  
21
- 22 10. McCarthy JJ, Andrews JL, McDearmon EL, Campbell KS, Barber BK, Miller BH,  
23  
24 et al. Identification of the circadian transcriptome in adult mouse skeletal muscle.  
25  
26 *Physiol Genomics* 2007; 31:86-95.  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Table 1. Polymorphisms in genes involved in transport and metabolism of simvastatin in the studied patients.

	<i>Transport (input)</i>		<i>Metabolism</i>		<i>Transport (efflux)</i>			
	<b>SLCO1B1</b>		<b>CYP3A4</b>	<b>CYP3A5</b>	<b>ABCB1</b>			
	388 A>G	521 T>C	*1B A>G	*3 A>G	3435 T>C	1236 T>C	2677 C>A	2677 C>T
	<b>Shift worker patients</b>							
◆1	A/G	T/C	A/G	G/G	C/C	T/T	C/A	C/C
◆2	G/G	T/T	A/A	A/G	T/C	T/C	C/A	C/C
3	A/A	T/T	A/A	G/G	T/C	T/C	C/A	C/C
4	G/G	T/T	A/A	G/G	T/C	T/T	A/A	T/T
5	G/G	T/T	A/A	A/A	C/C	T/C	C/C	C/C
6	A/G	T/T	A/G	G/G	T/C	T/C	C/A	C/C
7	A/A	T/T	A/A	G/G	T/C	T/C	A/A	T/T
8	A/A	T/T	A/A	G/G	T/C	T/C	C/A	C/C
9	A/A	T/T	A/A	G/G	T/C	T/C	A/A	T/T
	<b>Regular rhythm patients</b>							
1	A/A	T/T	A/A	G/G	T/C	T/C	A/A	T/T
2	A/A	T/T	A/A	G/G	T/C	T/C	A/A	T/T
3	A/A	T/T	A/A	G/G	T/C	T/C	A/A	T/T
4	G/G	T/C	A/A	G/G	T/C	T/C	C/A	C/C
5	A/G	T/T	A/A	A/A	C/C	T/C	A/A	T/T
6	A/A	T/T	A/A	G/G	T/C	T/C	A/A	T/T
7	G/G	T/T	A/A	G/G	C/C	T/C	C/C	C/C
8	A/G	T/T	A/A	G/G	T/C	T/C	A/A	T/T
9	A/G	T/T	A/A	G/G	T/C	T/C	C/A	C/C
10	A/A	T/T	A/A	G/G	C/C	T/C	C/C	C/C

◆ Affected patients