

PRESENCIA DE ANTI-SLA EN UNA POBLACIÓN EN TRATAMIENTO CON ESTATINAS.

Departament de Medicina / Universitat Autònoma de Barcelona

Autor: Dra. Irene Fernández Castaño

Director: Dr. Alexandre Roca-Cusachs

Treball de recerca – Convocatòria de Juny de 2010

CERTIFICAT DEL DIRECTOR DEL TREBALL DE RECERCA

El Dr. Alexandre Roca-Cusachs, Professor associat del Departament de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona, Consultor i Cap Clínic de la Unitat d'Hipertensió Arterial del Servei de Medicina Interna de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau,

FA CONSTAR,

que el treball titulat "**Presencia de ANTI-SLA en una población en tratamiento con estatinas**" ha estat realitzat sota la meva direcció pel llicenciat **Irene Fernández Castaño**, trobant-se en condicions de poder ser presentat com a treball d'investigació de 12 crèdits, dins el programa de doctorat en Medicina Interna (curs 2009-2010), a la convocatòria de juny.

Barcelona, 25 de maig de 2010.

ÍNDICE

Resumen.....	pág 3
Introducción.....	pág 4
Hipótesis.....	pág 4
Objetivos.....	pág 4
Pacientes y métodos.....	pág 5
Resultados.....	pág 7
Discusión.....	pág 12
Conclusiones.....	pág 14
Bibliografía.....	pág 15

RESUMEN

Los inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMA-CoA) reductasa, más comúnmente conocidos como estatinas, son los fármacos más utilizados en el tratamiento de la hipercolesterolemia y en la prevención tanto primaria como secundaria de enfermedades cardiovasculares y asociadas a aterosclerosis. A pesar de que son bien toleradas por la mayoría de los pacientes y de tener un perfil muy seguro algunos pacientes presentan clínica de miopatía. Una de las posibles hipótesis en la génesis de esta lesión es que el tratamiento con estatinas, en presencia de una alteración de base en forma de existencia de auto anticuerpos dirigidos contra selenoproteinas (anti-SLA), podría favorecer la lesión muscular. Analizamos por tanto la existencia de anti-SLA y se valora además el posible aumento del título de ANAs, la evolución de los niveles de CK y la existencia de síntomas de miopatía con el uso de estos fármacos.

Se han evaluado 26 pacientes que nunca habían recibido tratamiento con estatinas, realizándose una analítica basal previa al inicio del tratamiento, una a los 3 meses y otra a los 6 meses de iniciarla.

No se ha observado la existencia de anticuerpos anti-SLA en ninguno de los pacientes durante el seguimiento. No se ha observado un aumento estadísticamente significativo del título de ANAs en las muestras recogidas a los 3 (test de Wilcoxon, $p = 1.000$) y a los 6 meses (prueba de Friedman, $p=0.657$). Tampoco se ha observado un aumento estadísticamente significativo de los niveles de CK a los 3 meses (test de “t”, $p = 0.285$), ni a los 6 meses (test de “t”, $p = 0.298$). Y ninguno de los pacientes ha presentado síntomas de miopatía a lo largo del seguimiento.

INTRODUCCIÓN

Los inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMA-CoA) reductasa, más comúnmente conocidos como estatinas, son los fármacos más utilizados en el tratamiento de la hipercolesterolemia y en la prevención tanto primaria como secundaria de enfermedades cardiovasculares y asociadas a aterosclerosis (1-3). Alrededor de 25 millones de personas están en tratamiento con estatinas en el mundo. A pesar de que son bien toleradas por la mayoría de los pacientes y de tener un perfil muy seguro (4,5) algunos pacientes presentan clínica de miopatía. Los problemas miopáticos asociados al tratamiento con estatinas podrían clasificarse en varios grupos, desde los más leves como son pacientes que presentan calambres o mialgias, a los más graves que consisten en casos de mialgias con elevación de niveles de creatinkinasa (CK), miositis y rabdomiolisis (6). De todas maneras la incidencia de estos efectos adversos es baja: un 9% de los pacientes presentan síntomas de mialgia, se observan unos 2-3 casos de miopatía por cada 10000 tratados y solo 0.15 casos de rabdomiolisis letal por cada millón de tratados (7,8). Pero dado que el número de personas en tratamiento con estatinas es muy elevado creemos que se trata de un problema clínicamente relevante y por tanto a tener en cuenta.

Hipótesis

1. Los pacientes con riesgo de presentar alteraciones musculares secundarias al tratamiento con estatinas podrían tener una alteración de base en forma de existencia de auto anticuerpos dirigidos contra selenoproteínas (anti-SLA).
2. Los pacientes en tratamiento con estatinas presentan un aumento del título de anticuerpos antinucleares (ANAs).

Objetivos

1. Objetivo principal:
Determinar la incidencia de auto anticuerpos anti-SLA en una serie de pacientes hipertensos con dislipemia en tratamiento con estatinas y su relación con desarrollo de miositis.
2. Objetivos secundarios:

- a. Determinar la incidencia de aumento de niveles de ANAs en una serie de pacientes hipertensos con dislipemia en tratamiento con estatinas.
- b. Relacionar la presencia o aparición de auto anticuerpos anti-SLA y el título de ANAs en pacientes dislipémicos en tratamiento con estatinas con la incidencia de síntomas de miopatía.
- c. Determinar la incidencia de aumento de niveles de creatinkinasa (CK) en sangre en pacientes dislipémicos en tratamiento con estatinas.

PACIENTES Y MÉTODOS

- Estudio prospectivo que evalúa la existencia de anticuerpos anti-SLA en pacientes hipertensos en tratamiento con estatinas, la evolución del título de ANAs y la incidencia de miopatía y aumento de CK en estos pacientes.
- Criterios de inclusión: pacientes hipertensos y con dislipemia que inicialmente no estaban en tratamiento con estatinas y a los que se le iniciaba dicho tratamiento. Se incluyeron 26 pacientes visitados en las consultas de la Unidad de Hipertensión del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau desde octubre de 2006 hasta febrero de 2009.
- Se excluyeron para este estudio los pacientes que ya habían recibido previamente tratamiento con estatinas.
- Se registraron los datos demográficos, clínicos y analíticos, con especial referencia al tipo de estatina, título de ANAs, anti-SLA, CK y perfil lipídico. Se recogieron los síntomas de miopatía durante las visitas de seguimiento.
- Se realizó una determinación analítica basal previa al inicio del tratamiento con estatinas, una nueva determinación a los 3 meses y otra a los 6 meses.
- En las visitas se preguntaba a los pacientes si tenían algún síntoma compatible con miopatía: mialgias, dolores articulares, fatiga, etc...

Explicación de las técnicas utilizadas

- Obtención de las muestras:

Se obtuvo 10 ml de sangre por venopunción o por vía venosa periférica.

- Determinación de título de anti-SLA:

Los niveles de anti-SLA en suero se determinan mediante técnica de enzimoinmunoensayo (ELISA) que consiste en incubar la muestra de suero en

micropozos de poliestireno recubiertos del antígeno SLA. Los posibles anticuerpos anti-SLA se unirán al antígeno en el micropozo formando un complejo antígeno-anticuerpo. Se incuba con anti-IgG humana marcada con peroxidasa y se añade el cromógeno TMB (tetrametilbencidina clorhidrato) que es el sustrato de la peroxidasa. La intensidad del producto coloreado resultante de la actividad enzimática es proporcional a la cantidad de anticuerpos existentes y esto se lee mediante un sistema óptico de detección de ELISA en microplaca.

- Determinación de título de ANAs:

Los niveles de ANAs en suero se determinan mediante técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) que consiste en incubar un tejido de rata con el suero problema para favorecer la interacción de los posibles anticuerpos con las estructuras celulares, después aplicar anticuerpo anti inmunoglobulinas humanas marcado con fluoresceína y leer en microscopio de fluorescencia. De cada suero problema se realizarán diluciones de 1/40, 1/80, 1/160 y 1/320. Un tercio de la población sana tienen un título bajo de ANAs por lo que son significativos títulos superiores a 1/160.

Análisis estadístico

Para la descripción de las variables categóricas se ha facilitado el número de casos y su porcentaje. En las variables ordinales, la mediana, así como el valor mínimo y máximo; finalmente en las variables cuantitativas, se ha calculado el valor promedio (media aritmética) con su correspondiente desviación típica.

La estadística inferencial, para buscar relaciones entre variables, ha consistido en un análisis de la varianza de medidas repetidas en el caso de estudiar la evolución de tres lecturas (basal, 3 y 6 meses), mediante el procedimiento GLM. Si se tenían solo 2 de los valores se ha empleado el test de “t” para datos apareados. En casos de variables ordinales, la comparación se ha evaluado mediante el test de Friedman o test de Wilcoxon, según fueran el número de lecturas disponibles de 3 o solo 2, respectivamente.

El nivel de significación en todos los casos, ha sido el usual del 5% ($\alpha = 0.05$), con una aproximación bilateral.

El software empleado para el análisis ha sido el paquete estadístico SPSS (versión 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL).

Cálculo de la muestra

No existen datos concluyentes en la literatura para realizar un cálculo fidedigno de la muestra.

Aspectos éticos

El protocolo se aprobó por el Comité Ético del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Los pacientes que aceptaron participar en el estudio firmaron, tras recibir la adecuada información verbal y escrita, un consentimiento informado.

RESULTADOS

Se incluyeron 26 pacientes hipertensos y dislipémicos de las consultas de la Unidad de Hipertensión del Hospital de Sant Pau a los que se les iniciaba tratamiento con estatinas visitados entre octubre de 2006 y febrero de 2009. Durante el estudio se han perdido 4 casos de los que solo tenemos determinación analítica basal y a los 3 meses, por lo que se han analizado los datos comparando la determinación basal y a los 3 meses en los 26 casos y solo en 22 se ha podido comparar las tres determinaciones.

Características demográficas:

En nuestra muestra la media de edad es de 62.31 años (edad mínima de 18, máxima de 78 y con desviación estándar de 12.815) y hay 12 mujeres (46%). Diecisiete (65.4%) estaban en tratamiento con pravastatina, 7 (26.9%) con atorvastatina y 2 (7.7%) con simvastatina a dosis de entre 10 y 40 mg. Ninguno de los pacientes estaba en tratamiento con fibratos y solo había un paciente diabético.

Incidencia de anti-SLA:

La presencia de anti-SLA no se ha detectado en ninguno de los 26 pacientes en ninguna de las determinaciones durante el seguimiento, ni a los 3 ni a los 6 meses.

Evolución de título de ANAs:

Se ha analizado la titulación de ANAs comparando la determinación basal con la de los 3 y la de los 6 meses sin observar un aumento estadísticamente significativo de los

niveles. Para realizar los análisis se ha recodificado los valores de títulos de ANA, siendo 1=valores negativos, 2=1/40, 3=1/80, 4=1/160 y 5=1/320.

Al comparar la titulación de ANAs entre la determinación basal y la de los 3 meses, en 4 casos aumentaba, en 4 disminuía y en 18 quedaba igual, sin ser estos cambios estadísticamente significativos (test de Wilcoxon, $p = 1.000$) en ninguno de los casos. En esta tabla se pueden ver los valores comparativos de niveles de ANAs en la analítica basal y en la de los 3 meses.

	ANA basal	ANA 3m	Diferencia
Caso 1	1	2	-1
Caso 2	3	4	-1
Caso 3	3	4	-1
Caso 4	3	4	-1
Caso 5	1	1	0
Caso 6	1	1	0
Caso 7	1	1	0
Caso 8	1	1	0
Caso 9	1	1	0
Caso 10	1	1	0
Caso 11	1	1	0
Caso 12	1	1	0
Caso 13	1	1	0
Caso 14	1	1	0
Caso 15	1	1	0
Caso 16	1	1	0
Caso 17	3	3	0
Caso 18	3	3	0
Caso 19	3	3	0
Caso 20	3	3	0
Caso 21	4	4	0
Caso 22	5	5	0
Caso 23	2	1	1
Caso 24	2	1	1
Caso 25	2	1	1
Caso 26	4	3	1

Estadísticos de contraste: prueba de Wilcoxon

	ANA 3m – ANA basal
Z	,000
Sig. asintót. (bilateral)	1,000

Al analizar la titulación de ANAs comparando la determinación basal, la de los 3 meses y la de los 6 meses, tampoco se observa un aumento de la titulación estadísticamente significativo (prueba de Friedman, $p=0.657$).

Informe

	ANA basal	ANA 3m	ANA 6m
N	26	26	22
Mediana	1,50	1,00	2,00
Mínimo	1	1	1
Máximo	5	5	5
Media	2,04	2,04	2,32
Desv. tí.	1,216	1,341	1,492

Rangos

Estadísticos de contraste: prueba de Friedman

	Rango promedio	N	22
ANA basal	1.93	Chi-cuadrado	,839
ANA 3m	1.98	g	2
ANA 6m	2.09	Sig. asintót.	,657

Evolución de los valores de CK:

En este caso la recogida de datos ha sido muy variable. En 9 casos tenemos la determinación basal y a los 3 meses y no se observa una diferencia en los niveles de CK estadísticamente significativa (test de “t”, $p = 0.285$).

Estadísticos de muestras relacionadas

	Media	N	Desviación típ.	Error típ. de la media
CK basal	111,00	9	37,229	12,410
CK 3m	127,89	9	72,860	24,287

Prueba de muestras relacionadas

	Diferencias relacionadas				
				95% Intervalo de confianza para la diferencia	
	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	Inferior	Superior
CK basal – CK 3m	-16,889	44,253	14,751	-50,905	17,127

Test de t de student

	t	gl	Sig. (bilateral)
CK basal- CK 3m	-1,145	8	,285

Y solo en 6 de los casos disponemos de determinación basal y a los 6 meses y tampoco en estos se observa una diferencia estadísticamente significativa en los niveles de CK (test de “t”, p = 0.298).

Estadísticos de muestras relacionadas

	Media	N	Desviación típ.	Error típ. de la media
CK basal	112,50	6	55,612	22,704
CK 6m	154,67	6	129,972	53,061

Prueba de muestras relacionadas

	Diferencias relacionadas				
				95% Intervalo de confianza para la diferencia	
	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	Inferior	Superior
CK basal – CK 6m	-42,167	88,944	36,311	-135,507	51,174

Test de t de student

	t	gl	Sig. (bilateral)
CK basal- CK 6m	-1,161	5	,298

Síntomas de miopatía:

Ninguno de los 26 pacientes expresaron síntomas de miopatía durante el seguimiento.

Niveles de colesterol:

Los niveles de colesterol se han analizado como control de la toma de estatinas, si el paciente se está tomando la estatina se tiene que observar una disminución de los niveles de colesterol a lo largo del tiempo.

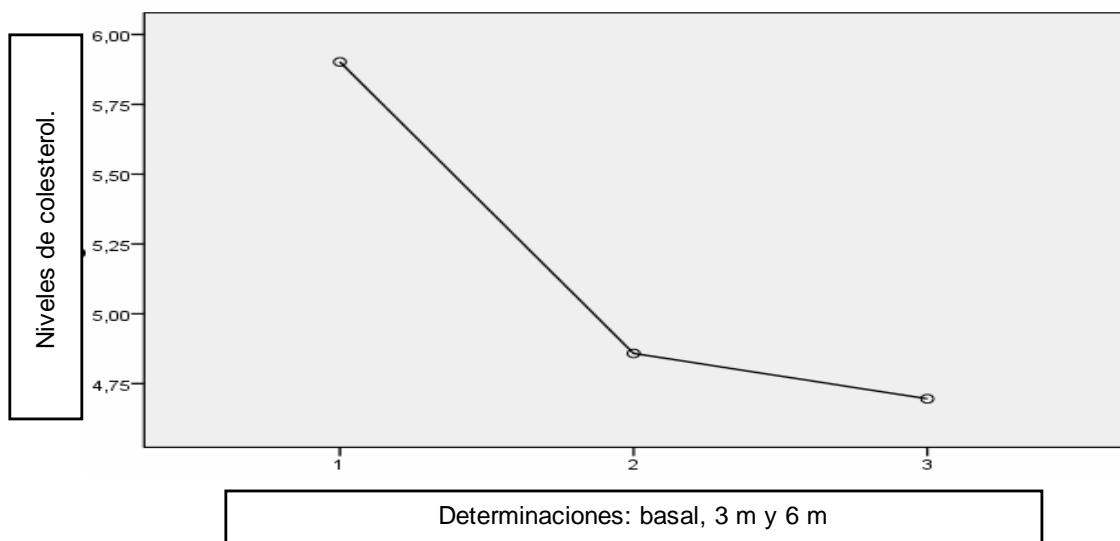
Al analizar las muestras se observa una disminución de los niveles de colesterol total estadísticamente significativa (anova, $p < 0.001$) a lo largo del seguimiento lo que permite suponer que los pacientes estaban tomando correctamente la estatina.

Pruebas de los efectos inter-sujetos: anova

Variable: promedio nivel colesterol

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Intersección	1672,154	1	1672,154	998,127	,000
Error	33,506	20	1,675		

Gráfica progresión niveles de colesterol.



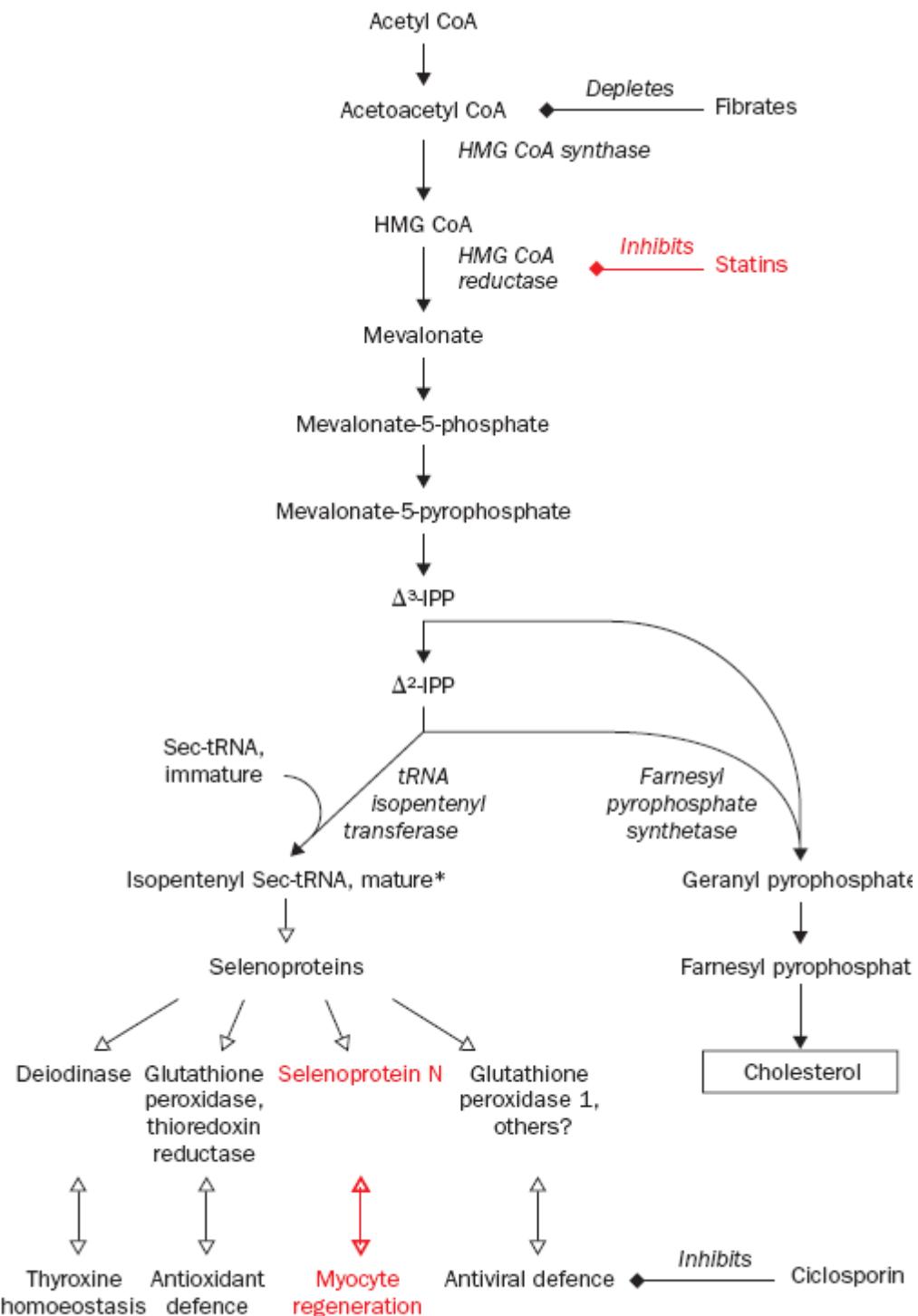
DISCUSIÓN:

Poco se conoce sobre la fisiopatología de la toxicidad muscular observada en relación al tratamiento con estatinas en algunos casos y existen varias teorías al respecto:

- el bloqueo de síntesis de colesterol reduce el colesterol de las membranas de las células musculares y esto hace que sean inestables, pero este supuesto efecto no se ha comprobado *in vitro* (9).
- la estatinas inhiben la síntesis de farnesil pirofosfato que es un intermediario para la síntesis de ubiquinona. La ubiquinona es uno de los isoprenoides que intervienen en el transporte de electrones en la fosforilación oxidativa mitocondrial. La hipótesis es que la disminución de ubiquinona produce alteraciones mitocondriales que serían la causa de la miopatía. Pero en diferentes estudios se ha observado disminución de los niveles de ubiquinona en plasma pero no intramusculares (10).
- el farnesil pirofosfato activa mediante la prenilación las pequeñas proteínas de unión GTP que son las reguladoras del crecimiento celular inhibiendo la apoptosis. La hipótesis es que las estatinas reducen estas proteínas y esto conllevaría un aumento de la apoptosis de las células musculares (11).

Pero en la que nosotros hemos basado nuestro estudio es la siguiente: la isopentenilación de la selectocisteina-tRNA es llevada a cabo por la tRNA isopentenil transferasa, que utiliza isopentenil-pirofosfato (IPP) como sustrato. El IPP es un metabolito directo del mevalonato y la síntesis de éste está bloqueada directamente por las estatinas. Por lo tanto la interferencia que producen las estatinas en la isopentenilación de la selectocisteina-tRNA, evitando su maduración a una molécula tRNA funcional, produce un descenso de la síntesis de selenoproteínas. Las selenoproteínas están implicadas en la regeneración miocitaria, por lo tanto el descenso de las mismas podría producir miopatía (12). Los síntomas por miopatía que presentan pacientes en tratamiento con estatinas son similares a los observados en pacientes con miopatías asociadas a déficits de selenio, como por ejemplo la enfermedad de Keshan, que es un miocardiopatía endémica en zonas rurales de China por déficit de selenio (13), o la observada en pacientes sometidos a dieta parenteral de larga duración (14). Por otro lado, diversas miopatías inflamatorias idiopáticas como la polimiositis, la dermatomiositis y la miositis por cuerpos de inclusión están asociadas a la existencia de auto anticuerpos dirigidos contra antígenos citoplasmáticos y nucleares. Estos se

denominan anticuerpos asociados a miositis (anti-MAAs), la mayoría se observan en muchas enfermedades autoinmunes sin existencia de miositis por lo tanto no son específicos de ésta. Uno de estos anticuerpos no está identificado todavía pero se sabe que se trata de un anticuerpo anti-sintetasa anti tRNA proteína que actúa en la incorporación de selenocisteína (anti-SLA) (15).



Mevalonate pathway of Isoprenoid biosynthesis

*Complete maturation of Sec-tRNA involves additional chemical modifications not shown.¹³ Filled arrowheads indicate biochemical transformations, open arrowheads indicate logical relations.

Por ello hemos analizado los niveles basales de anti-SLA, a los 3 y a los 6 meses tras iniciar el tratamiento con estatinas en estos 26 pacientes siendo en todos los casos el título negativo. También hemos analizado los niveles de ANAs para estudiar un posible aumento del título de los mismos que tampoco se ha encontrado.

Ninguno de los 26 pacientes de nuestra muestra ha presentado síntomas de miopatía de ninguna clase, aunque bien es verdad que el número de casos es pequeño, la incidencia de síntomas leves es menor de la esperada (un 9% en la literatura), no así la de síntomas graves ya que la incidencia de estos es mucho menor (2-3 casos por 10000 tratados).

CONCLUSIONES

- No se ha encontrado en nuestro estudio ningún caso con anticuerpos anti-selenoproteínas (anti-SLA).
- Tampoco se ha demostrado que los títulos de ANAs aumenten a lo largo del tratamiento con estatinas.
- En nuestro estudio no se ha observado aumento significativo de los niveles de CK a lo largo del seguimiento en los pacientes en tratamiento con estatinas.
- En nuestra muestra ninguno de los pacientes en tratamiento con estatinas presentó síntomas de miopatía.
- La principal limitación de nuestro estudio es que tenemos una muestra pequeña, creemos que probablemente es insuficiente para demostrar cambios en los niveles de CK o síntomas de miopatía, pero sí que sería suficiente para observar si existe una tendencia a la positividad en la titulación de anticuerpos anti-SLA y para ver cambios en la titulación de ANAs.

BIBLIOGRAFIA

1. Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary Herat disease and a broad range of inical cholesterol levels. The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischemic Disease (LIPID) Study Group. *N Engl J Med.* 1998;339:1349-57.
2. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet.* 1994;344:1389-9.
3. Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, et al the effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N Engl J Med.* 1996;335:1001-9.
4. Pedersen TR, Tobert JA. Benefits and risks of HMG-CoA reductase inhibitors in the prevention of coronary heart disease: a reappraisal. *Drug Saf.* 1996;14:11-24.
5. Armitage J. The safety os statins in clinical practice. *Lancet.* 2007.
6. Thompson PD, Clarkson P, Karas RH. Statin-Associated Myopathy. *JAMA.* 2003;289:No13:1681-90.
7. Gaist D, Rodríguez LA, huerta C, Hallas J, Sindrup SH. Lipid-lowering drugs and risk of myopathy: a population-based follow-up study. *Epidemiology.* 2001;12(5):565-9.
8. Staffa JA, Chang J, Green L. Cerivastatin and reports of fatal rhabdomyolysis. *N Engl J Med.* 2002;346:539-540.
9. Flint OP, Masters BA, Gregg RE, Durham SK. Inhibition of cholesterol synthesis by squalene synthase inhibitors does not induce myotoxicity in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1997;145:91-98.
10. Laaksonen R, Jokelainen K, Sahi T, Tikkanen MJ, Himberg JJ. Decreases in serum ubiquinone concentration do not result in reduced levels in muscle tissue during short-term simvastatin treatment in humans. *Clin Pharmacol Ther.* 1995;57:62-66.
11. GuijarroC, Blanco-Colio LM, Ortego M, et al. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and isoprenylation inhibitor induce apoptosis of vascular smooth muscle cells to Fas-ligand and cytokine-induced cell death. *Atherosclerosis.* 2000;152:217-227.

12. Moosmann B, Behl C. Selenoprotein synthesis and side-effects of statins. *The Lancet*. 2004; 363:892-894.
13. Cheng YY, Qian PC. The effect of selenium-fortified table salt in the prevention of Keshan disease on a population of 1.05 million. *Biomed Environ Sci*. 1990;3:422-28.
14. Van Rij AM, Thomson CD, McKenzie JM, Robinson MF: selenium deficiency in total parenteral nutrition. *Am J Clin Nutr*. 1979;32:2076-85.
15. Brouwer R, Hengstman GJD, et al. Autoantibody profiles in the sera of European patients with myositis. *Ann Rheum Dis*. 2001;60:116-123.