



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA EXPERIMENTAL EN SALUD
FACULTAD DE QUÍMICA
BIOQUÍMICA CLÍNICA

**“EFECTO DE LA ATORVASTATINA SOBRE BACTERIAS LIPOLÍTICAS DE LA
MICROBIOTA INTESTINAL: REPORTE PRELIMINAR”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA EXPERIMENTAL EN SALUD

PRESENTA:

L.N ALAN OSVALDO DORANTES MORALES

TUTOR

DR. ÓSCAR A. PÉREZ MÉNDEZ
Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES
Facultad de Medicina, UNAM
DR. MARCO ANTONIO JUÁREZ OROPEZA
Facultad de Medicina, UNAM
DR. RICARDO JASSO CHÁVEZ
Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.
DR. JOSÉ DE JESÚS GARCÍA TREJO
Facultad de Química, UNAM.

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX, ABRIL 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Índice

Marco teórico	1
1. Introducción	1
2.1 Estatinas.....	2
2.2 Inhibición de la HMG-CoA reductasa.....	2
2.3 Tipos de estatinas	4
2.4 Diabetes mellitus 2 y estatinas	5
2.5 Tejido adiposo y estatinas	7
2.6 Atorvastatina y absorción de ácidos grasos	8
2.7 Actividad antibiótica de las estatinas y sus efectos sobre la microbiota intestinal	9
2.8 Estatinas y triglicéridos	10
2.9 Ácidos grasos y estatinas	11
3. Justificación	13
4. Hipótesis	14
5. Objetivos	14
5.1 Objetivo general.....	14
5.2 Objetivos específicos.....	14
6. Métodos	15
6.1 Implicaciones éticas	15
6.2 Diseño del estudio	15
6.3 Población de estudio	15
6.4 Estandarización previa	16
6.5 Parámetros de exclusión	17
6.6 Parámetros de inclusión	17
6.7 Hipertrigliceridemia postprandial.....	18
6.8 Toma de muestras biológicas	18
6.8.1 Muestra sanguínea.....	18
6.8.2 Heces	19
6.9 Evaluación antropométrica y composición corporal	19

6.9.1 Composición corporal	19
6.10 Análisis bioquímicos	19
6.10.1 Concentración plasmática de indicadores bioquímicos	19
6.10.2 Perfil lipídico de HDL	19
6.11 Medio de cultivo selectivo para bacterias lipolíticas	20
6.11.1 Estandarización del medio de cultivo selectivo para bacterias lipolíticas	20
6.11.2 Composición del medio de cultivo selectivo	20
6.11.3 Estandarización del medio de cultivo	20
6.11.4 Aislamiento de bacterias lipolíticas usando el medio de cultivo selectivo	21
6.11.5 Identificación de bacterias lipolíticas	22
6.12 Desarrollo del medio de cultivo selectivo para bacterias lipolíticas	22
6.12.1 Aislamiento de bacterias contenidas en heces	22
6.13 Análisis de muestras en medio de cultivo selectivo para bacterias lipolíticas.....	22
6.13.1 Medio de cultivo selectivo.....	22
6.13.2 Inoculación de bacterias en el medio de cultivo selectivo.....	22
6.13.3 Aislamiento de las colonias del medio de cultivo selectivo.....	23
6.14 Medios de cultivo sangre y chocolate.....	23
6.15 Medio selectivo para bacterias lipolíticas adicionado con atorvastatina	23
6.16 Identificación por espectrometría de masas MALDI-TOF	24
7. Análisis estadístico	25
8. Resultados	25
8.1 Parámetros antropométricos	26
8.2 Parámetros bioquímicos	27
8.3 Perfil lipídico en HDL	28
8.4 Triglicéridos totales Atorvastatina	29
8.5 Triglicéridos en HDL Atorvastatina	30
8.6 Prueba de utilidad del medio de cultivo selectivo	30
8.7 Medio de cultivo selectivo para bacterias lipolíticas	32
8.8 Medio selectivo adicionado con atorvastatina	33

9. Discusión	35
10. Conclusiones	38
11. Perspectivas	38
12. Bibliografía	39

Símbolos y abreviaturas

α - (Alfa)

AGL (Ácidos grasos libres)

Apo B48 (Apolipoproteína B48)

ARN (Ácido ribonucleico)

ARNr (Ácido ribonucleico ribosomal)

β - (Beta)

BGN (Bacilos gram negativos)

BGP (Bacilos gram positivos)

CETP (Proteína de transferencia del éster de colesterol)

CGP (Cocos gram positivos)

c-HDL (Colesterol-HDL)

c-LDL (Colesterol-LDL)

CT (colesterol total)

EM (Espectrometría de masas)

g (Gramos)

Glc (Glucosa)

HDL (Lipoproteínas de alta densidad)

HMG-CoA reductasa (3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A)

IMC (Índice de masa corporal)

kg (kilogramos)

LDL (Lipoproteínas de baja densidad)

m (Metros)

MALDI (Desorción láser asistida por matriz)

mg/dL (Miligramos sobre decilitro)

mg (Miligramos)

mL (mililitros)

MTP (Proteína microsómica transferidora de triglicéridos)

OH (Ion OH)

OMS (Organización Mundial de la Salud)

PECAM-1 (Molécula de adhesión de células endoteliales)

Pho-HDL (Fosfolípidos en HDL)

rpm (Revoluciones por minuto)

SREBP (Elementos reguladores de esteroides)

TBE (Tris-borato-EDTA)

Tg (Triglicéridos)

TOF (Tiempo de vuelo)

Índice de tablas

Tabla 1. Tipos de estatinas y sus características	5
Tabla 2. Distribución calórica de la dieta durante la intervención.....	17
Tabla 3. Componentes del medio selectivo para bacterias lipolíticas.....	20
Tabla 4. Emulsión de lípidos para medio selectivo	20
Tabla 5. Mediciones antropométricas placebo y tratamiento	26
Tabla 6. Parámetros bioquímicos tratamiento y placebo	27
Tabla 7. Perfil de colesterol y fosfolípidos en HDL placebo y tratamiento	28
Tabla 8. Muestras de tejido y heces	31
Tabla 9. Presencia de bacterias lipolíticas	31
Tabla 10. Identificación de colonias bacterianas por MALDI-TOF	34

Índice de figuras

Figura 1. Metabolismo del mevalonato	3
Figura 2. Tejido adiposo posterior al tratamiento con atorvastatina	7
Figura 3. Disfunción del adipocito	8
Figura 4. Abundancia relativa y absoluta de la microbiota intestinal posterior al tratamiento con atorvastatina	10
Figura 5. Metabolismo de ácidos grasos	11
Figura 6. Distribución de la población	15
Figura 7. Descripción general del estudio	17
Figura 8. Hipertrigliceridemia inducida mediante un alimento hiperlipídico	18
Figura 9. Estandarización del medio de cultivo selectivo para bacterias lipolíticas	21
Figura 10. Identificación de bacterias en medio de cultivo selectivo	24
Figura 11. Triglicéridos tratamiento	29
Figura 12. Triglicéridos HDL tratamiento	30
Figura 13. Muestras de heces cultivadas en medio de cultivo selectivo para bacterias lipolíticas.....	32
Figura 14. Muestras de heces del tiempo previo al inicio del tratamiento en medio de cultivo adicionado con atorvastatina	33

Marco teórico

1. Introducción

La creciente prevalencia de enfermedades cardiovasculares ha sido un tema de estudio relevante en los últimos años. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) se consideran la primer causa de mortalidad global, y en México se estima que al menos el 70% de la población adulta vive con factores de riesgo (1). Si bien, la predisposición genética es determinante, la dieta también tiene un papel importante en el desarrollo de estas patologías, principalmente cuando el metabolismo lipídico del individuo es modificado. Estas alteraciones definidas como dislipidemias se caracterizan por niveles elevados de triglicéridos y colesterol en plasma, en particular la disminución de los niveles de colesterol-HDL (c-HDL) en paralelo con el aumento de colesterol-LDL (c-LDL) (2). Las dislipidemias son los principales factores de riesgo en el desarrollo de la enfermedad coronaria y lesiones aterosclerosas (3). De acuerdo con esto, el desarrollo de intervenciones farmacológicas para la prevención y tratamiento de estas enfermedades se ha enfocado en la normalización de estos parámetros lipídicos.

Las estatinas son la familia de fármacos más utilizados en terapias de intervención primaria y secundaria. Actúan inhibiendo el mecanismo de acción de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa, bloqueando una etapa clave en la síntesis de colesterol (4,5). Además, se han relacionado con la disminución de triglicéridos plasmáticos y niveles de c-LDL. Sin embargo, recientemente se han reportado efectos adversos posteriores al tratamiento con estos fármacos, entre los más relevantes su relación con la precipitación de diabetes mellitus tipo 2 en personas con riesgos preexistentes (6,7).

En los siguientes capítulos se abordará el mecanismo de acción de estos fármacos, sus características principales y las evidencias recientes que relacionan a las estatinas con modificaciones de la microbiota intestinal y su relación con el metabolismo lipídico.

2.1 Estatinas

Las estatinas son metabolitos fúngicos hipolipemiantes de gran interés ya que además de su actividad sobre el perfil lipídico se les han atribuido múltiples efectos pleiotrópicos (8,9). Estudios epidemiológicos a nivel global reportan que cerca de 30 millones de pacientes son tratados con estatinas como terapia farmacológica como medida de prevención primaria y secundaria, disminuyendo la incidencia de eventos cardiovasculares en ambas poblaciones (10).

Los primeros pasos para definir su mecanismo de acción fueron descritos en 1965 por Akira Endo, en investigaciones que tenían como objetivo la reducción de los niveles plasmáticos de colesterol interviniendo su vía de síntesis. Dentro de estos estudios reportó que determinados hongos, por un mecanismo defensivo producen sustancias inhibidoras de la síntesis bacteriana de esteroides e isoprenoides (11). Posteriormente al evaluar cerca de 6000 cepas de hongos pudo identificar a la mevastatina como producto de *Penicillium citrium*, un inhibidor competitivo de la síntesis del colesterol que actúa a nivel de la HMG-CoA reductasa (12). Esto tuvo como resultado la introducción del primer fármaco en su tipo, la Lovastatina marcando un antes y después en la terapia farmacológica de las enfermedades cardiovasculares (13).

2.2 Inhibición de la HMG-CoA reductasa

La HMG-CoA reductasa es una enzima que regula la velocidad de síntesis lipídica en el hígado, su actividad está mediada por la concentración de colesterol circulante el cual actúa como inhibidor competitivo del sitio activo de esta enzima. El mecanismo de acción de las estatinas es similar, el fármaco se une competitivamente al sitio activo, al verse alterado el proceso, la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A, a través de la reductasa no continúa su conversión hacia ácido mevalónico y detiene la síntesis de colesterol en sus primeras etapas (gráfico 1) (14).

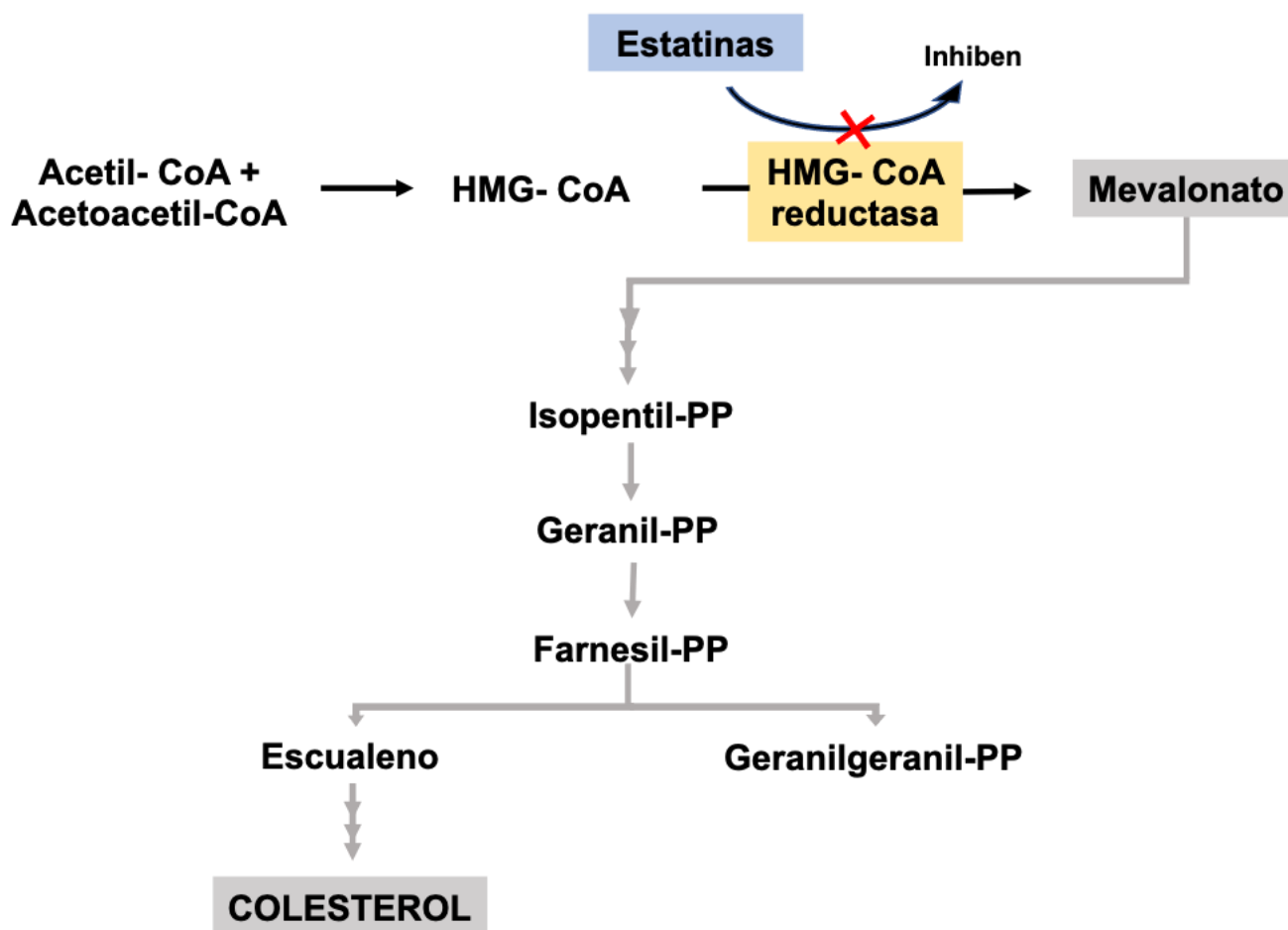


Figura 1. Metabolismo del mevalonato. Se muestra la vía del mevalonato que tiene como producto final la síntesis de colesterol, el sitio de acción de las estatinas y los productos finales de la reacción de la HMG-CoA reductasa, incluidas las moléculas de colesterol e isoprenoides. Figura realizada con Procreate® IOS.

Modificado de: Cesare R. Sirtori et al (4)

Al actuar las estatinas como inhibidor de la vía del mevalonato ocurren afectaciones a distintos niveles celulares dependientes de este ciclo, vías isoprenoides como la de la ubiquinona que interviene en el transporte de electrones mitocondriales, la síntesis de dolicol necesario para la síntesis de glicoproteínas, componentes de ARN de transferencia, isopentenil adenina y demás cambios sobre moléculas de señalización celular (15,16,17). Las estatinas también han mostrado tener efectos sobre la estructura de la HMG-CoA reductasa, modificando su funcionalidad (18).

La disminución del colesterol intracelular promueve la activación de proteínas del retículo endoplásmico que se unen a elementos reguladores de esteroides (SREBP), estas proteínas

tienen una función compensadora a través de la activación de receptores que promueven la captación de lipoproteínas en el tejido adiposo y el hígado (19). Esto podría explicar los efectos consecuentes de las estatinas sobre el perfil lipídico, como la disminución de lipoproteínas de baja densidad (LDL) (20).

2.3 Tipos de estatinas

Dada la eficacia del mecanismo de las estatinas, derivado de la lovastatina se han desarrollado distintos fármacos mejorando su actividad inhibitoria a través de la intervención biotecnológica. La primer modificación de su estructura se dio con la aparición de simvastatina, la cual contaba con la adición de un grupo metilo en 2", esta diferenciación provee mayor afinidad lipolítica para la inhibición de la síntesis del colesterol (21).

Siguiendo la misma línea, investigaciones determinaron que la estructura de lovastatina y simvastatina contenía una lactona de anillo cerrado y que en esta estructura se encontraba gran parte de su actividad inhibitoria. Esto dio paso al desarrollo de fármacos de mayor eficacia a través de modificaciones estructurales (22). Así se llegó al desarrollo de pravastatina, fármaco que sustituía la composición cerrada de anillo con una molécula de estructura abierta. Si bien este fármaco no mostraba diferencias significativas sobre las estatinas, presentaba mayor actividad hepática comparada a su actividad en otros tejidos, estas características la han destacado como una terapia farmacológica relevante para pacientes con dislipidemias congénitas (23).

Derivado de estas modificaciones surge la tercera generación de estatinas que se comercializan actualmente: fluvastatina, rosuvastatina, pitavastatina y atorvastatina. Estos fármacos conservan la modificación estructural de anillo abierto añadiendo nuevas modificaciones que van desde la adición de grupos OH o metilo hasta patrones estereoquímicos más complejos (24). A través de estas modificaciones se ha logrado generar una gran diversidad de estatinas que independientemente de su origen pueden diferenciarse por sus características farmacológicas, teniendo distintos niveles de absorción, biodisponibilidad, solubilidad, y variación en la disminución de parámetros lipídicos (tabla 1).

Tabla 1. Tipos de estatinas y sus características

Estatina	Dosis (mg)	Disminución LDL (%)	Disminución Tg (%)	Absorción (%)	Solubilidad	Vida media (h)
Fluvastatina	20- 80	36	5- 10	98	Liposoluble	< 1
Pravastatina	10- 40	34	5- 10	35	Hidrosoluble	1- 3
Lovastatina	20- 80	48	5- 10	30	Liposoluble	2- 4
Simvastatina	10- 80	46	10- 40	60-85	Liposoluble	2- 3
Atorvastatina	10- 80	54	15- 40	90 *	Liposoluble	11-14

Se muestran las características diferenciales entre los fármacos pertenecientes a este grupo. Resultados posteriores a 4 semanas de tratamiento con las dosis indicadas. h (horas), mg (miligramos), % (porcentaje). Tg (triglicéridos)

Estas observaciones nos permiten comparar la viabilidad que la terapia farmacológica podrá tener en la población. La atorvastatina destaca como una de las estatinas más eficaces por su mayor efecto sobre el perfil lipídico con respecto a otras estatinas y que podría relacionarse con su vida media que es de hasta 3 veces mayor.

2.4 Diabetes mellitus tipo 2 y estatinas

La eficacia de la actividad inhibitoria de las estatinas ha revolucionado el tratamiento farmacológico en las enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, a pesar sus efectos benéficos se ha descrito que las modificaciones sobre la vía del mevalonato afectan la producción de otros metabolitos y la activación de receptores de membrana relacionados con el metabolismo lipídico (25). Si bien las modificaciones son importantes en la disminución de factores de riesgo cardiovascular como los niveles de colesterol total y c-LDL, estudios relativamente recientes han reportado su relación con alteraciones en la homeostasis del metabolismo de la glucosa (26, 27, 28). El proyecto JUPITER, un estudio a gran escala enfocado en la prevención primaria de eventos cardiovasculares con rosuvastatina en pacientes con proteína C reactiva elevada, aportó datos relevantes sobre la relación del tratamiento con estatinas y mayor riesgo de desarrollar diabetes mellitus (29).

A partir de esto, las investigaciones se han enfocado en la identificación de los factores que promueven el aumento de este riesgo. El tipo de estatinas, la frecuencia de la dosis y los riesgos preexistentes para el desarrollo de la enfermedad, como obesidad, sobrepeso y

resistencia a la insulina, pueden ser los determinantes para desencadenar la enfermedad (30). En este sentido, un metaanálisis reciente indica que el tratamiento con estatinas se asocia con el aumento de entre 10-12 % de desarrollar diabetes mellitus (31). Sin embargo, el mecanismo implicado en esta condición no ha sido claramente descrito.

Un estudio por aleatorización mendeliana demostró que el aumento en el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 está relacionado directamente con la inhibición de la HMG-CoA reductasa, y que la dosis y tipo de estatina utilizada es determinante en la evaluación del riesgo (32). Como posible mecanismo, se ha propuesto que el aumento de la resistencia a la insulina se debe al efecto que tienen las estatinas sobre la síntesis de las biomoléculas derivadas de la ruta del mevalonato en las células β -pancreáticas, lo que conduce a un deterioro de su función y disminución de la sensibilidad a la insulina (32,33).

Mita et al. (34) compararon el efecto del tratamiento con dos estatinas de naturaleza distinta: pravastatina (hidrofílica) y atorvastatina (lipofílica) sobre la función de las células β -pancreáticas utilizando el índice insulínogénico; este parámetro derivado de las mediciones de glucosa e insulina durante una prueba oral de tolerancia. Los resultados mostraron niveles más bajos del índice insulínogénico en el grupo tratado con atorvastatina, relacionado a una mayor afectación de las células β . En un estudio de cohorte similar, participantes que recibieron terapia con estatinas por más de 5 años presentaron niveles postprandiales de glucosa más altos en comparación al grupo control. Además, los resultados mostraron la disminución en la sensibilidad de la insulina en un 24% y su secreción hasta en un 12% respectivamente (35). Por otra parte, se ha reportado que el tratamiento con estatinas causa disminución en los niveles plasmáticos de adiponectina y que esto puede estar relacionado con el aumento de la resistencia a la insulina mediado por estos fármacos (36)

Como se mencionó previamente, la inhibición de la HMG-CoA reductasa tiene repercusiones a nivel de los sistemas que requieren colesterol; se ha reportado que la disminución de este lípido en la membrana de adipocitos puede modificar su fluidez y aumentar la captación y almacenamiento interno de colesterol no esterificado y triglicéridos. Esto deriva en la formación de adipocitos hipertrofiados, que por sus características presentan alteraciones biológicas y se han relacionado con el desarrollo de resistencia a la insulina (37).

2.5 Tejido adiposo y estatinas

Un estudio de nuestro grupo de investigación usando un modelo de conejo Nueva Zelanda (38), analizó la acción de la atorvastatina sobre el tejido adiposo. Los resultados demostraron que el tratamiento con atorvastatina induce un aumento de tamaño de los adipocitos en comparación con el grupo control (figura 2).

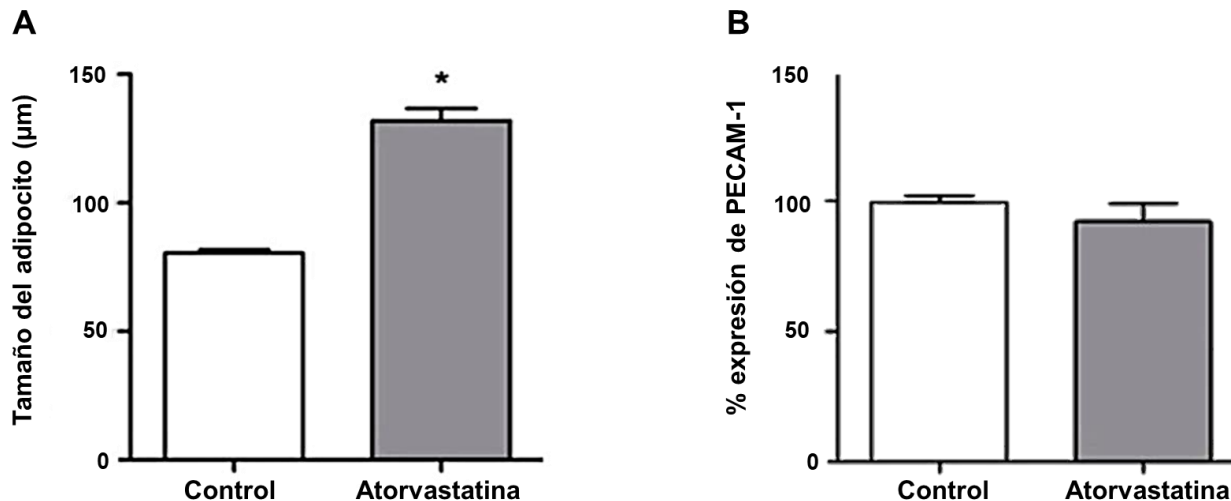


Figura 2. Tejido adiposo posterior al tratamiento con atorvastatina. Los resultados del estudio muestran un incremento en el tamaño de los adipocitos posterior al tratamiento con atorvastatina (A), sin embargo la presencia de vasos sanguíneos puestos de manifiesto por la presencia de PECAM-1 identificado por inmunohistoquímica no se modifica en este tejido después del tratamiento (B). Figura realizada con *Procreate*® IOS.

Modificado de: Mondragón-García et al (38). Graficas añadir

Sin embargo, en este estudio el aumento de tamaño de los adipocitos no está acompañado de un incremento de su vascularización (figura 2). Se ha propuesto que la ausencia de una vascularización suficiente en el tejido adiposo es característica del desarrollo prematuro de resistencia a la insulina. El adipocito hipertrofiado tiene una distribución de oxígeno insuficiente y comienza a presentar hipoxia que lo conduce a inflamación del tejido, un estado disfuncional y muerte celular (figura 3) (40).

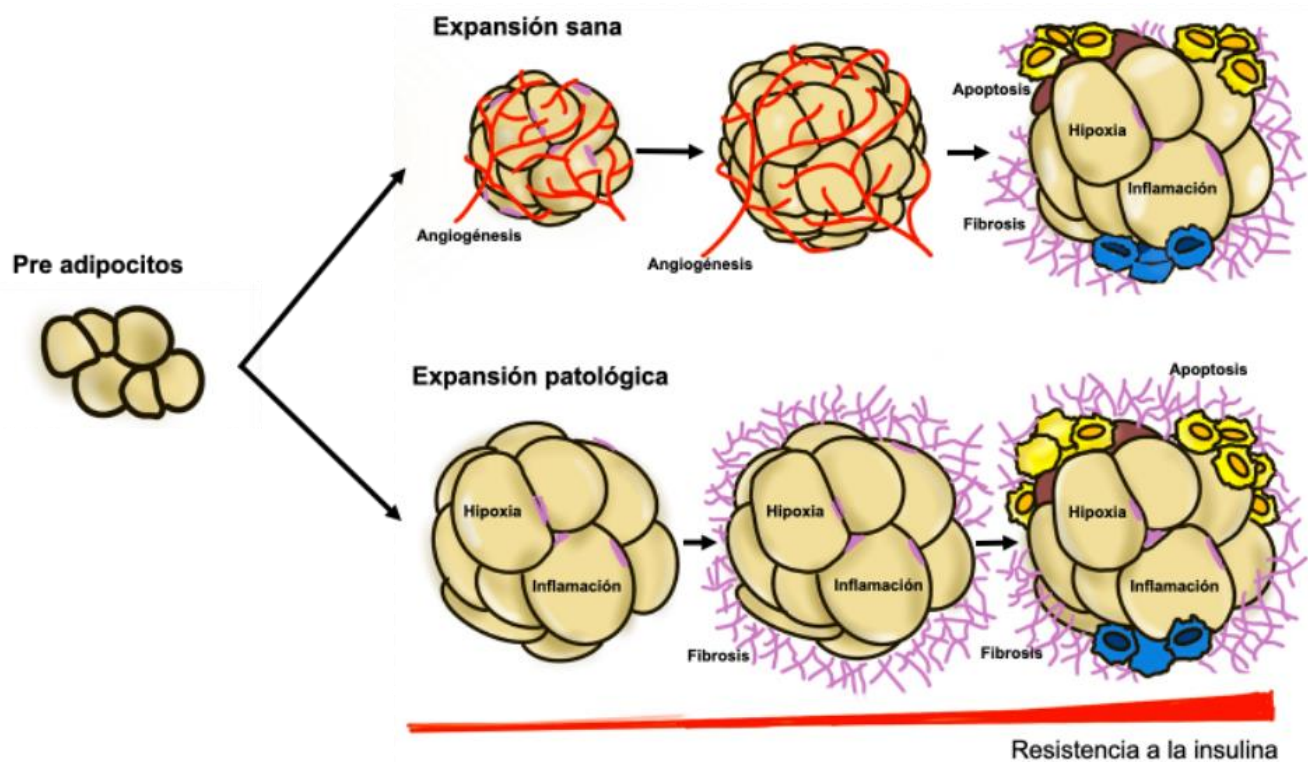


Figura 3. Desarrollo de la disfunción del adipocito. Se muestra la expansión del adipocito en distintas condiciones de vascularización. Expansión y maduración normal de adipocitos (A), y expansión patológica que desencadena la resistencia a la insulina en etapas tempranas (B). Figura realizada con Procreate® IOS.

Modificado de: Kai Sun et al.(40)

2.6 Atorvastatina y absorción de ácidos grasos

En un estudio similar, se determinó el efecto de la atorvastatina sobre el perfil de ácidos grasos de lipoproteínas de alta densidad (HDL) (41). Los resultados demostraron que el tratamiento con atorvastatina induce cambios a nivel del contenido de ácidos grasos de estas lipoproteínas; los niveles de ácidos grasos saturados disminuyen en paralelo del aumento de ácidos grasos poliinsaturados, en específico ácido linoleico y α -linolénico. Es importante enfatizar que estos dos ácidos grasos esenciales no pueden ser sintetizados por los mamíferos de manera que provienen de la ingesta en el conejo. Estos resultados sugieren que el tratamiento con atorvastatina modifica la absorción de ácidos grasos exógenos. De esta manera, el perfil de

lípidos y lipoproteínas postprandiales durante el tratamiento con estatinas podría ser diferente con respecto a la situación basal del individuo. Sin embargo, se conoce muy poco acerca del efecto de estatinas en la lipemia postprandial, particularmente sobre las posibles alteraciones de las HDL en este estado. Por otra parte, dentro de las diferentes posibilidades que pueden explicar una alteración en la absorción de los ácidos grasos, una alteración de la microbiota intestinal es compatible con esta observación.

2.7 Actividad antibiótica de las estatinas y su efecto sobre la microbiota intestinal

Como se mencionó anteriormente, las estatinas se desarrollaron a partir de hongos y su actividad antimicrobiana ha sido reportada por diversos estudios (42).

Masadeh et al. (43) evaluaron la actividad de atorvastatina, simvastatina y rosuvastatina sobre cultivos de bacterias nativas de microbiota humana. Como resultado observaron que el tratamiento con estas estatinas disminuía la proliferación de distintas colonias bacterianas al ser añadidas al medio de manera específica para cada tipo de estatina. Por ejemplo, la atorvastatina mostró actividad antibacterial disminuida ante colonias de *Escherichia coli* y *pseudomona aeruginosa* en comparación con simvastatina y rosuvastatina. Estas observaciones les permitieron concluir que el tratamiento con estatinas puede modificar bacterias específicas de la microbiota intestinal debido a la actividad antimicrobiana que presentan.

En este sentido, *Zimmermann et al.* (44) evaluaron la relación entre la actividad hipolipemiante de la atorvastatina y la composición de la microbiota intestinal en un modelo murino expuesto a una dieta alta en grasas y tratado con este fármaco durante 4 semanas. A partir de la secuenciación del gen 16s rARN observaron modificaciones en la abundancia relativa y abundancia absoluta de la microbiota (figura 4). Estos resultados refuerzan la hipótesis de que la atorvastatina modifica la composición de la microbiota intestinal.

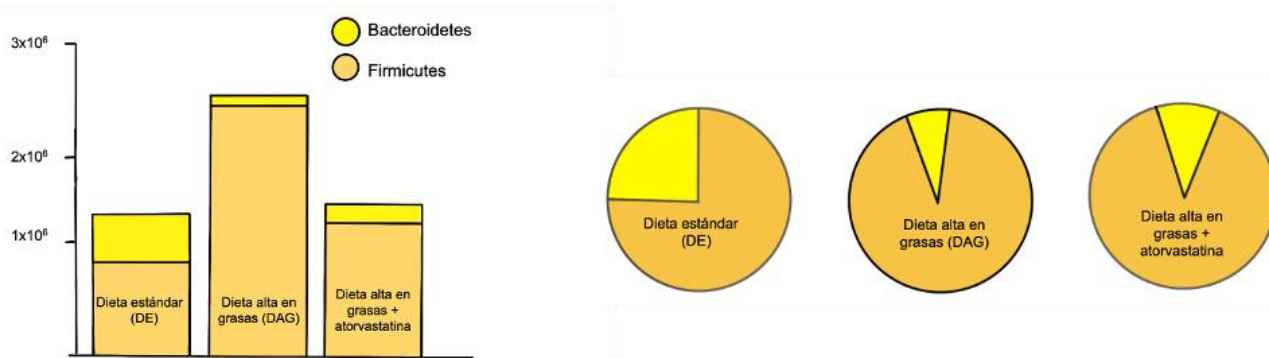


Figura 4. Abundancia relativa y absoluta de la microbiota intestinal posterior al tratamiento con atorvastatina. Se observan los resultados de la secuenciación del gen 16S rARN de un modelo murino bajo distintas condiciones de dieta posterior al tratamiento con atorvastatina. Abundancia absoluta (A), Abundancia relativa (B). Figura realizada con *Procreate*® IOS.

Modificado de: *Zimmermann et al. (44)*

Khan et al. (45) probaron el efecto de distintas dosis de atorvastatina sobre la microbiota intestinal de un modelo murino alimentado con una dieta alta en grasas. La secuenciación del gen 16s rARN les permitió observar cambios a nivel de filos de la diversidad bacteriana en los grupos tratados con dosis medias de atorvastatina. Particularmente un aumento en la abundancia relativa de Proteobacteria y la disminución de la abundancia relativa de Firmicutes. De acuerdo con estos resultados, concluyeron que la composición general de la microbiota intestinal puede modificarse con el tratamiento con atorvastatina. Por lo tanto, surge la necesidad de conocer a detalle que especies bacterianas se modifican particularmente con el uso de estos fármacos.

2.8 Estatinas y triglicéridos

La capacidad hipolipemiente de las estatinas incluye también la disminución de los niveles plasmáticos de triglicéridos como efecto secundario al mecanismo de acción principal (46, 47,48). Si bien esto se relaciona con la disminución del riesgo cardiovascular, el efecto de las estatinas sobre los triglicéridos no ha sido estudiado a detalle.

Las investigaciones que han tratado de esclarecer este mecanismo están enfocadas en el análisis de los parámetros lipídicos posterior a un periodo de ayuno. No obstante, el

metabolismo de triglicéridos tiene mayor actividad durante el posprandio. Se ha reportado que posterior a la ingesta de un alimento hiperlipídico, los triglicéridos en plasma alcanzan su pico más alto entre las dos y cuatro horas posteriores a la digestión (49).

En el intestino delgado los triglicéridos son hidrolizados a ácidos grasos libres y monoacilglicerol. Estos ácidos grasos difunden a través de la membrana del enterocito y son reensamblados nuevamente como triglicéridos en el retículo endoplásmico para integrarse posteriormente a los quilomicrones. La síntesis de estas lipoproteínas depende entre otros de la acción de la proteína microsómica transferidora de triglicéridos (MTP). Esta proteína asocia a los triglicéridos provenientes de la dieta, el colesterol libre y fosfolípidos, con una fracción proteica de Apo B48 sintetizada en el enterocito para la formación del quilomicrón. Antes de salir del enterocito, los quilomicrones pasan por Golgi y son dirigidos a la circulación linfática para ser integrados al torrente sanguíneo (figura 5) (50).

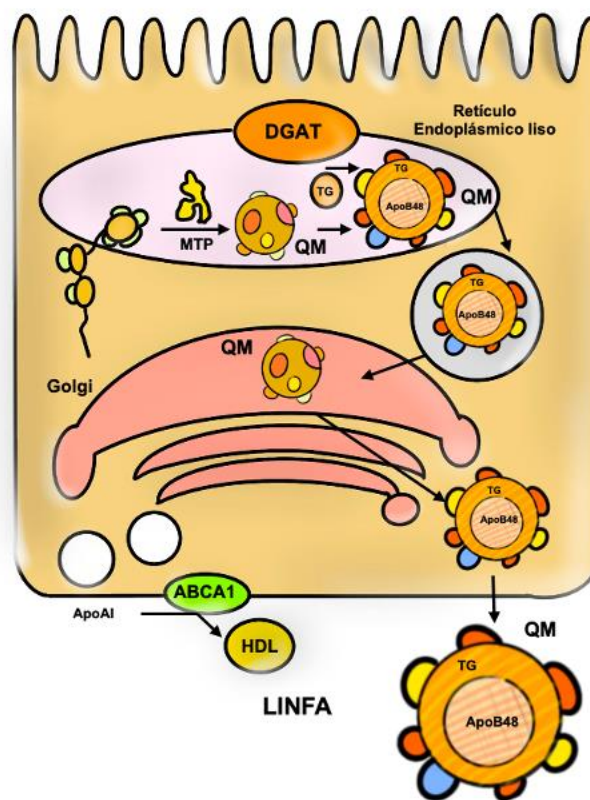


Figura 5. Metabolismo de triglicéridos. Se muestra la formación de quilomicrones en el enterocito, medio por el cual los lípidos exógenos provenientes de la dieta se integran a la circulación sanguínea. El mecanismo inicia con la acción de la MTP ensamblando *de novo* los ácidos grasos en quilomicrones, continuando el proceso en Golgi donde se enriquece con apolipoproteína B 48 característica de estas moléculas, y pasa a la circulación linfática para incorporarse al torrente sanguíneo. Figura realizada con Procreate® IOS.

2.9 Ácidos grasos y estatinas

De acuerdo con los reportes del efecto de las estatinas sobre la composición de la microbiota intestinal y el metabolismo de ácidos grasos, es probable que los cambios inducidos por las estatinas afectan particularmente a bacterias relacionadas con el metabolismo lipídico. De ser así, estas bacterias con actividad lipolítica serían capaces de metabolizar parcialmente los ácidos grasos provenientes de la dieta, formando ácidos grasos de cadena media de entre 6 y 12 carbonos. El tamaño de estos ácidos grasos haría posible su difusión directamente del enterocito hacia el torrente sanguíneo sin necesidad de pasar ensamblados como quilomicrones. Al ser la dieta la fuente principal de estos ácidos grasos es probable que su concentración, al igual que la de los triglicéridos se modifique en una etapa postprandial, posterior a la ingesta de alimentos.

En este sentido, se ha reportado que concentraciones elevadas de ácidos grasos libres (AGL) en plasma se relacionan con el desarrollo de resistencia a la insulina y son un factor de riesgo en el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2. A pesar de que el mecanismo de acción no ha sido del todo explicado existen diversos reportes sobre el papel de los AGL en el metabolismo de la glucosa. *Boden G et al.* (51) demostraron que la elevación aguda de AGL en sangre disminuye la captación de glucosa estimulada por la insulina en los tejidos y esto se normaliza a medida que su concentración disminuye. Por lo tanto, las revisiones concluyen que los niveles elevados de AGL pueden explicar hasta un 50% de la resistencia a la insulina en pacientes con obesidad y diabetes mellitus tipo 2 (52-53).

De esta manera los cambios en la diversidad y abundancia bacteriana, específicamente en bacterias lipolíticas y la síntesis de AGL tomarían importancia en el comportamiento del metabolismo lipídico y los efectos adversos que se dan posterior al tratamiento con estatinas.

3. Justificación

Actualmente las enfermedades cardiovasculares son consideradas un problema de salud a nivel mundial debido a la multicausalidad de su origen. Dentro de los factores a mencionar encontramos a las dislipidemias, principalmente las concentraciones elevadas de c-LDL y triglicéridos en sangre. En este contexto se desarrollaron las estatinas que actúan inhibiendo la acción de la HMG-CoA reductasa, deteniendo la síntesis de colesterol. Así, estos fármacos han mostrado resultados eficientes en el tratamiento y prevención de patologías cardiovasculares. No obstante, estudios recientes han reportado efectos adversos relacionados con el uso de estatinas, particularmente el desarrollo prematuro de diabetes mellitus tipo 2 en sujetos con factores de riesgo preexistentes. En este sentido, estudios de nuestro laboratorio reportaron un aumento a nivel del tejido adiposo con una vascularización insuficiente en conejos Nueva Zelanda tratados con atorvastatina. Estos resultados sugieren que la atorvastatina induce hipertrofia y disfunción de los adipocitos. Lo anterior podría desencadenar el desarrollo de resistencia a la insulina a largo plazo, lo que explicaría por qué las estatinas precipitan la aparición de diabetes en los pacientes susceptibles.

Por otra parte, las HDL de estos conejos tratados con atorvastatina, mostraron disminución del contenido de ácidos grasos saturados y un aumento de ácidos grasos insaturados, en específico el ácido linoleico y α -linolénico, los cuales son de origen exógeno. Estas observaciones permiten sugerir que el tratamiento con atorvastatina podría modificar la absorción de estos ácidos grasos provenientes de la dieta dada a nivel del intestino delgado.

Considerando además estudios que demuestran cambios en los filos de la microbiota intestinal posteriores al tratamiento con estatinas, proponemos en este estudio que la atorvastatina altera especies bacterianas con capacidad lipolítica capaces de metabolizar parcialmente los ácidos grasos provenientes de la dieta, y les permite incorporarse directamente al torrente sanguíneo, alterando el metabolismo lipídico.

Debido a que los reportes existentes están enfocados específicamente en ayuno, y la absorción y tránsito de los ácidos grasos alimentarios ocurre durante el posprandio, resulta relevante evaluar el comportamiento de estos parámetros durante la etapa postprandial y como se relacionan con los cambios a nivel de la microbiota intestinal a nivel de bacterias lipolíticas posterior al tratamiento con atorvastatina.

4. Hipótesis

El tratamiento con atorvastatina modifica la trigliceridemia y perfil lipídico en las HDL durante el periodo postprandial así como la proliferación de bacterias lipolíticas de la microbiota intestinal detectables en heces.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Identificar los cambios en las lipoproteínas postprandiales y la presencia de bacterias lipolíticas a partir de muestras de heces antes y después del tratamiento con atorvastatina.

5.2 Objetivos específicos

- Establecer el efecto del tratamiento con atorvastatina sobre los triglicéridos y composición lipídica de lipoproteínas durante el posprandio.
- Determinar el efecto del tratamiento con atorvastatina sobre la microbiota con actividad lipolítica presente en heces.

6. Métodos

6.1 Implicaciones éticas

Los métodos realizados en este estudio siguen la normativa ética de la declaración de Helsinki. Los parámetros para el reclutamiento, tratamiento e intervención con los participantes fueron revisados y aprobados por el comité de ética e investigación del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” en su Decima sesión ordinaria del 28 de octubre del 2021. Numero de estudio: 316650FOP02-2021-04.

6.2 Diseño del estudio

Se trata de un estudio clínico cruzado de ciego sencillo, con elección de muestra por conveniencia.

6.3 Población de estudio

La población son sujetos sanos, hombres entre 18 y 30 años (n=6) con parámetros normales de colesterol (<200 mg/dL), triglicéridos (<150 mg/dL), glucosa (<100 mg/dL) y c-HDL (>40 mg/dL). Con valores de grasa total, grasa visceral y masa muscular dentro de los intervalos normales al ser determinados por bioimpedancia. Reclutados por el equipo de trabajo del laboratorio de metabolismo de lípidos del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, los sujetos fueron asignados aleatoriamente al inicio del estudio al grupo de tratamiento farmacológico con atorvastatina o al grupo de placebo (figura 7).

La importancia del estado de salud de los pacientes reside en la necesidad de una población homogénea que pueda ser comparada y cuyos parámetros bioquímicos no afecten la confiabilidad de los resultados. Además es importante mencionar que los reportes indican que desórdenes como el síndrome metabólico pueden potenciar los efectos adversos de las estatinas y generar complicaciones prematuras en el individuo. Contrario a lo que sucede en sujetos sanos donde no se han reportado contradicciones al tratamiento en periodos cortos.

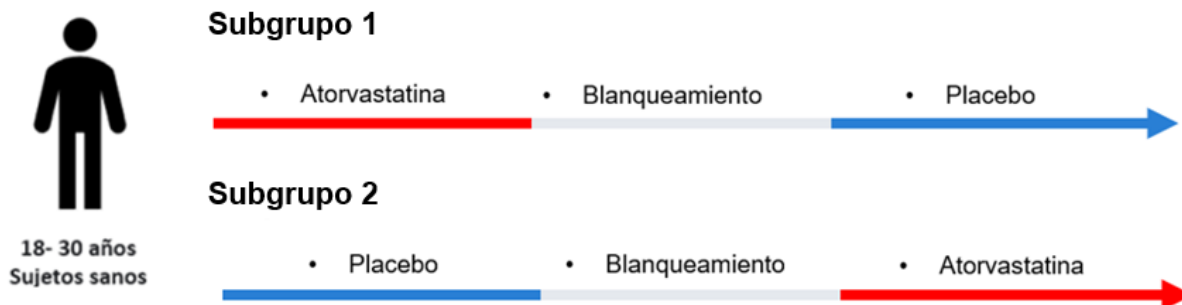


Figura 6. Diseño del estudio. Se muestra la segmentación de la población en dos subgrupos, que determinan la secuencia de la intervención. El subgrupo 1 comienza con el tratamiento con atorvastatina 20 mg/ día durante 30 días, un periodo de cuatro semanas de blanqueamiento y continúa con la administración del placebo durante 30 días. El subgrupo 2 inicia con la administración del placebo durante 30 días, un periodo de cuatro semanas de blanqueamiento y continúa con el tratamiento con atorvastatina 20 mg/ día durante 30 días. Figura realizada con *Procreate*® IOS

6.4 Estandarización previa

Los sujetos que cumplieron con los criterios de inclusión iniciales continuaron con el proceso de estandarización de la dieta, adoptando un régimen normo calórico que siguieron durante el tiempo total de la intervención. El plan alimentario consiste en mantener las calorías totales reportadas en la evaluación nutricional, con modificaciones a la distribución de macronutrientes (tabla 3). La distribución de macronutrientes recomendada para la ingesta por la organización mundial de la salud asigna un 55-60% para carbohidratos, 15-20% proteína y 20-25% para lípidos. Para la elaboración de los planes de alimentación en este estudio se utilizaron parámetros superiores para el porcentaje de lípidos (30%), de acuerdo con los análisis lipídicos realizados.

Tabla 2. Distribución calórica de la dieta durante la intervención

Macronutrientes	Distribución calórica (%)
Hidratos de carbono	55
Lípidos	30
Proteínas	15

El consumo de macronutrientes se ajustó a partir del aumento del porcentaje de lípidos. Distribución normal de la dieta de acuerdo con el sistema mexicano de equivalentes: Hidratos de carbono 55-60%, Lípidos 25-30%, Proteínas 15-20%.

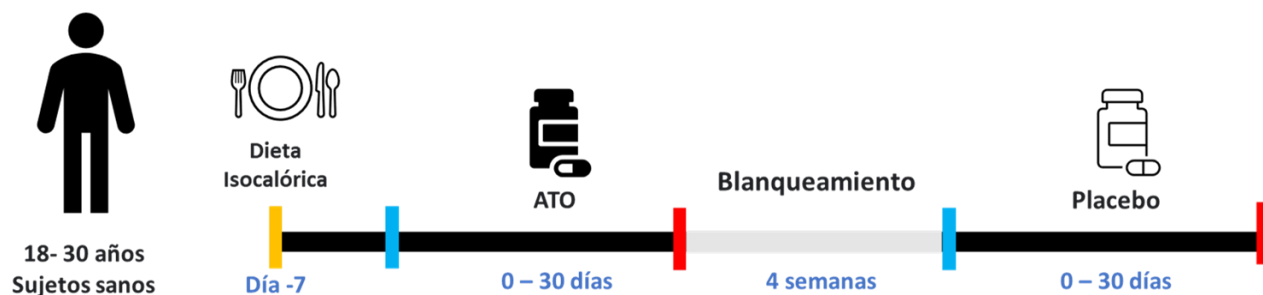


Figura 7. Descripción general del estudio. Se muestra el diagrama de flujo de la intervención total del estudio y su duración. Estandarización de la dieta, inicio del tratamiento farmacológico, periodo de blanqueamiento y suplementación con placebo. Figura realizada con *Procreate*® IOS

6.5 Parámetros de exclusión

Sujetos que no cumplan los criterios de inclusión, que estén bajo tratamiento farmacológico al momento del reclutamiento o que no desearan firmar el consentimiento informado.

6.6 Parámetros de eliminación

Sujetos que no concluyan la etapa de estandarización, que no cumplan con el seguimiento de la dieta, que no tengan un apego de al menos 90% al tratamiento, que hayan sido tratados con antibióticos durante la intervención, que presenten malestares musculares, elevación de creatinina o transaminasas durante el tratamiento con atorvastatina.

6.7 Hipertrigliceridemia postprandial

Como parte de la evaluación del perfil lipídico durante el posprandio, se indujo un incremento de la trigliceridemia postprandial con una carga de lípidos a través de la ingesta de un alimento equivalente a 1000 kcal con la siguiente distribución energética: 67,4% de grasa, 21,0% de proteína y 11,6% de carbohidratos (54) (figura 9).

6.8 Toma de muestras biológicas

Para la evaluación del perfil lipídico durante el posprandio y la identificación de bacterias en medio selectivo fueron recolectadas muestras biológicas de sangre y heces, bajo los parámetros que se describen a continuación.

6.8.1 Muestra sanguínea

La toma de muestra sanguínea fue realizada por el personal de enfermería del banco de sangre del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”. Se colocó a cada paciente un catéter para terapia intravenosa periférica BD Insyte® que permitió realizar las tomas del tiempo basal y durante la etapa postprandial.

Con ayuno previo de 8 horas se recolectaron 20 mL de muestra sanguínea al tiempo basal, y dos tomas adicionales a las 2 y 4 horas posteriores a la ingesta del alimento hiperlipídico (figura 9). El volumen total fue centrifugado a 5,000 rpm/ 15 minutos para la obtención de suero o plasma sanguíneo que fueron diferenciados en alícuotas y almacenados a una temperatura de -70° C hasta su uso.

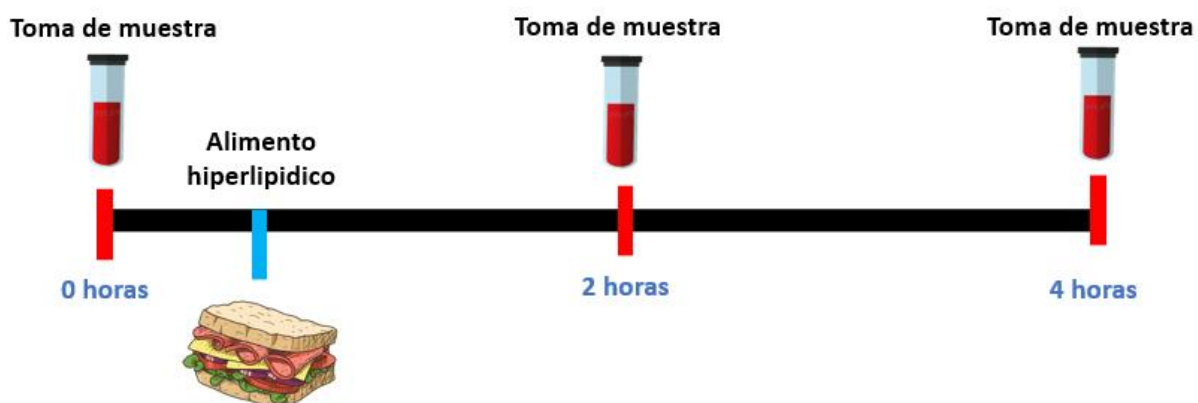


Figura 8. Carga de lípidos. Se muestra el cronograma de tomas de muestra indicando el tiempo de la ingesta del alimento hiperlipídico. Figura realizada con Procreate® IOS

6.8.2 Heces

Las muestras de heces fueron tomadas de forma autónoma por cada paciente siguiendo las indicaciones de inocuidad instruidas previamente. Para la recolección se utilizaron frascos de plástico estériles de 50 mL, de boca ancha y cierre hermético mismos que fueron usados para su almacenamiento a una temperatura de -20 °C hasta su uso.

6.9 Evaluación antropométrica y composición corporal

Se realizó la toma de medidas antropométricas útiles para el diagnóstico del estado de salud nutricional y de relevancia para el estudio. Se evaluó peso, talla, índice de masa corporal (IMC), circunferencia de cintura y presión arterial.

6.9.1 Composición corporal

Los parámetros de la composición corporal: masa muscular, grasa total y grasa visceral fueron medidos por bioimpedancia con una balanza de medición corporal Omron HDF-514 (OMRON HEALTHCARE® Co. Ltd 53, Kyoto, Japón).

6.10 Análisis bioquímicos

6.10.1 Concentración plasmática de indicadores bioquímicos

Utilizando el plasma sanguíneo de cada paciente se determinó la concentración plasmática de colesterol total (CT), triglicéridos (Tg) y glucosa (Glc) en el tiempo basal (día 0) y posterior al tratamiento con atorvastatina (día 30), mediante ensayos enzimáticos colorimétricos (Randox Laboratories LTD; Reino Unido). La absorbancia fue leída a 505 nm en un espectrofotómetro (Beckman Coulter Du® Uv/Vis Spectrophotometer; Alemania).

6.10.2 Perfil lipídico de HDL

En HDL previamente aisladas por ultra centrifugación (41) se determinó la concentración de c-HDL, triglicéridos-HDL (tg-HDL) y fosfolípidos-HDL (pho-HDL) en el tiempo basal, 2 y 4 horas posteriores a la ingesta del alimento hiperlipídico, antes y después del tratamiento con atorvastatina o placebo, mediante ensayos enzimáticos colorimétricos (Randox Laboratories LTD; Reino Unido). La absorbancia se leyó a 505 nm en un espectrofotómetro (BECKMAN COULTER DU® Uv/Vis Spectrophotometer; Alemania).

6.11 Medio de cultivo selectivo para bacterias lipolíticas

6.11.1 Optimización del medio de cultivo selectivo para bacterias lipolíticas

Como parte de la primera etapa de identificación de bacterias lipolíticas presentes en heces, se realizó la optimización de un medio de cultivo selectivo que contiene triglicéridos como única fuente de carbono previamente desarrollado en nuestro laboratorio, con la finalidad de identificar bacterias capaces de metabolizar triglicéridos como única fuente de energía.

6.11.2 Composición del medio de cultivo

El medio de cultivo selectivo se compone por una mezcla de medio comercial FAM+(tabla 3), adicionado de una suspensión estable de triglicéridos (aceite de canola comestible, lecitina, solución de sales) y adicionado con agar BACTO™, (Becton, Dickinson and Company Sparks, MD USA), para dar una consistencia sólida.

Tabla 3. Componentes del medio selectivo para bacterias lipolíticas (30 mL)

NaNO ₃	10 mM
KH ₂ PO ₄	4 mM
Na ₂ HPO ₄	16 mM
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.4 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	9.8 mM
CaCl ₂	60 mM
Agar Bacto™	12 gramos

6.11.3 Emulsión de lípidos

Tabla 4. Emulsión de lípidos para medio selectivo (1.5 mL)

Aceite de canola comestible	900 µL
Lecitina	600 µL

Dicha emulsión se logró utilizando un Sonicador para incorporar las muestras con intervalos de tiempo 1-3-1 minutos, manteniendo la temperatura de la muestra por debajo de 20 °C. pH de 6.54.

6.11.4 Aislamiento de bacterias lipolíticas usando el medio de cultivo selectivo

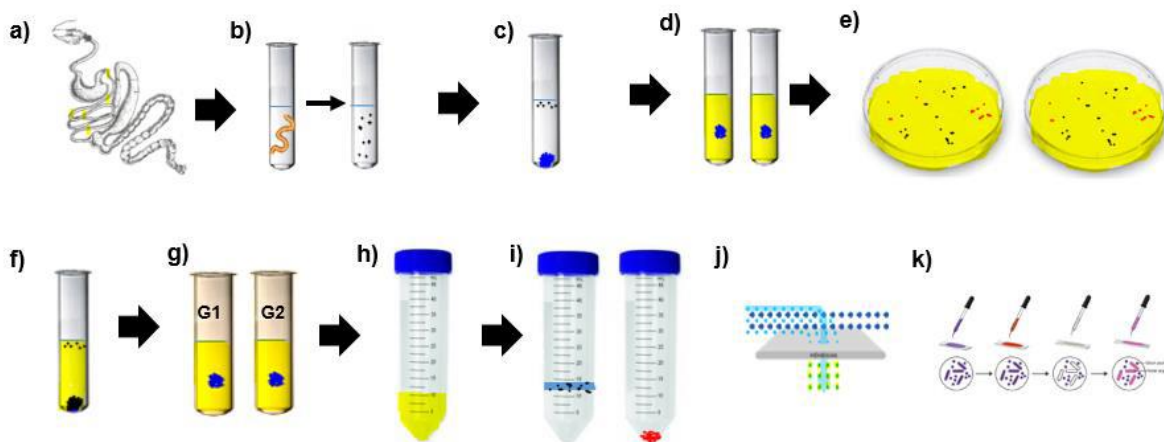


Figura 9. Estandarización del medio de cultivo selectivo para bacterias lipolíticas. Se describe el proceso de prueba de utilidad del medio selectivo utilizando muestras de tejido intestinal y heces de un conejo Nueva Zelanda. Figura realizada con *Procreate*® IOS

- a) Recolección de fracciones de duodeno, yeyuno e íleon de conejos Nueva Zelanda.
- b) Suspensión del tejido en medio acuoso para la obtención de residuos.
- c) Centrifugación de los residuos obtenidos a partir del tejido. Obtención del pellet (precipitado).
- d) Cultivo del pellet en medio líquido BBL TM Brain Heart Infusion- infusión cerebro- corazón (Becton, Dickinson and Company® Le pont de Claix, Francia) en incubación bajo condiciones aerobias y anaerobias/ 24 horas.
- e) Cultivo de colonias resultantes en medio sólido solución control y atorvastatina (200 mg/L) en incubación bajo condiciones aerobias y anaerobias/ 48 horas.
- f) Incubación de colonias bacterianas resultantes del medio sólido en medio BBL TM Brain Heart Infusion durante 72 horas. Posteriormente centrifugar para la obtención del pellet.
- g) Cultivo de pellet en medio líquido y solución control durante 48 horas.
- h) Mezcla de los componentes en tubos falcón.
- i-j) Separación de los componentes mediante centrifugación, para identificación. Pellet: colonias bacterianas, sobrenadante: solución de ácidos grasos para su extracción.
- k) Determinación morfológica de colonias bacterianas mediante tinción de Gram.

6.12 Desarrollo del medio de cultivo selectivo para bacterias lipolíticas

6.12.1 Aislamiento de bacterias contenidas en heces

Como primer paso para el análisis se realizó el aislamiento de colonias bacterianas contenidas en muestras de heces. Las heces fueron descongeladas bajo condiciones controladas en una Campana de seguridad biológica de flujo laminar vertical (Logic+, LABCONCO® Estados Unidos de América). Se realizó una toma de muestra a temperatura ambiente que se vertió en 20 mL de TBE 10x, la solución se homogenizó y fue filtrada usando gasa estéril para eliminar sólidos. El volumen resultante se centrifugó a 15,000 rpm durante 10 minutos. Se recuperó el precipitado que contenía las bacterias con el mínimo de volumen líquido para ser utilizadas en la inoculación del medio de cultivo selectivo.

6.13 Análisis de muestras en medio de cultivo selectivo para bacterias lipolíticas

Una vez establecidas las condiciones óptimas para preparar el medio de cultivo selectivo, se procedió a utilizarlo para aislar las bacterias lipolíticas facultativas de las muestras de heces de los pacientes.

6.13.1 Medio de cultivo selectivo

La mezcla que contenía solución de sales y agar bacto a una concentración de 0.5 mg/mL pasó por un proceso de esterilización en un esterilizador de vapor 430 LS, (STERIS® Moema, Brasil) a una temperatura de 120 °C durante 15 minutos. Posterior a la esterilización, se dio un tiempo de temple de la temperatura, fue añadida la emulsión de lípidos sonicada en intervalos de tiempo de 1-3-1 minutos para lograr una consistencia homogénea, que posteriormente fue esterilizada en una campana de flujo haciéndola pasar por un filtro estéril.

6.13.2 Inoculación de bacterias en el medio de cultivo selectivo

Conservando la temperatura a 40°C, se vertieron 30 mL de solución en una caja de Petri (NEST® 100 mm Petri disl, Estados Unidos de América), simultáneamente se añadieron a la caja 5 mL del volumen de colonias bacterianas recuperadas de las muestras de heces y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su solidificación. Una vez solidificadas se incubaron en una

estufa de cultivo con control digital- Incubadora 9162 (ECOSHEL ® Polk aveu suite 100, USA) durante 8 a 10 días hasta mostrar crecimiento significativo.

6.13.3 Aislamiento de las colonias del medio de cultivo selectivo

Las colonias que tuvieron crecimiento posterior a la incubación fueron recuperadas en condiciones de esterilidad e incubadas nuevamente en un medio líquido BBL TM Brain Heart Infusion- infusión cerebro- corazón (Becton, Dickinson and Company ® Le pont de Claix, Francia) durante 48 horas, para su expansión.

6.14 Medios de cultivo sangre y medio de cultivo chocolate

Posterior a las 48 horas de incubación en el medio líquido, las colonias fueron cultivadas en medios de cultivo sangre y chocolate para ser caracterizadas individualmente por su morfología mediante tinción de Gram.

6.15 Medio selectivo para bacterias lipolíticas adicionado con atorvastatina

Como parámetro de control se realizó la adición de atorvastatina al medio de cultivo selectivo para bacterias lipolíticas que había sido inoculado con muestras de sujetos en etapa previa al tratamiento. Las condiciones se describen a continuación.

En el medio de cultivo selectivo para bacterias lipolíticas que contenía muestras de sujetos en el tiempo previo al tratamiento, se adicionó una mezcla de atorvastatina cálcica al 99.96% (p/V)

Posterior a la adición, las cajas fueron inoculadas con muestras fecales pertenecientes al grupo de participantes sin exposición previa a atorvastatina y se incubaron por 8 a 10 días.

6.16 Identificación de bacterias lipolíticas por espectrometría de masas MALDI- TOF

La identificación de bacterias lipolíticas inició con el cultivo de las muestras de heces de los grupos de tratamiento y placebo en el medio selectivo que contenía lípidos como única fuente de carbono. Posterior a la incubación las colonias que mostraron crecimiento fueron aisladas en medio infusión cerebro-corazón durante 48 horas para estimular su desarrollo. La diferenciación de las colonias bacterianas encontradas se realizó mediante el cultivo en medio agar sangre y agar chocolate. Una vez diferenciadas, las colonias fueron identificadas mediante espectrometría de masas de tiempo de vuelo (MALDI-TOF), un método de análisis que determina la especie y tipo de bacteria a través de su composición proteica utilizando bibliotecas de datos.

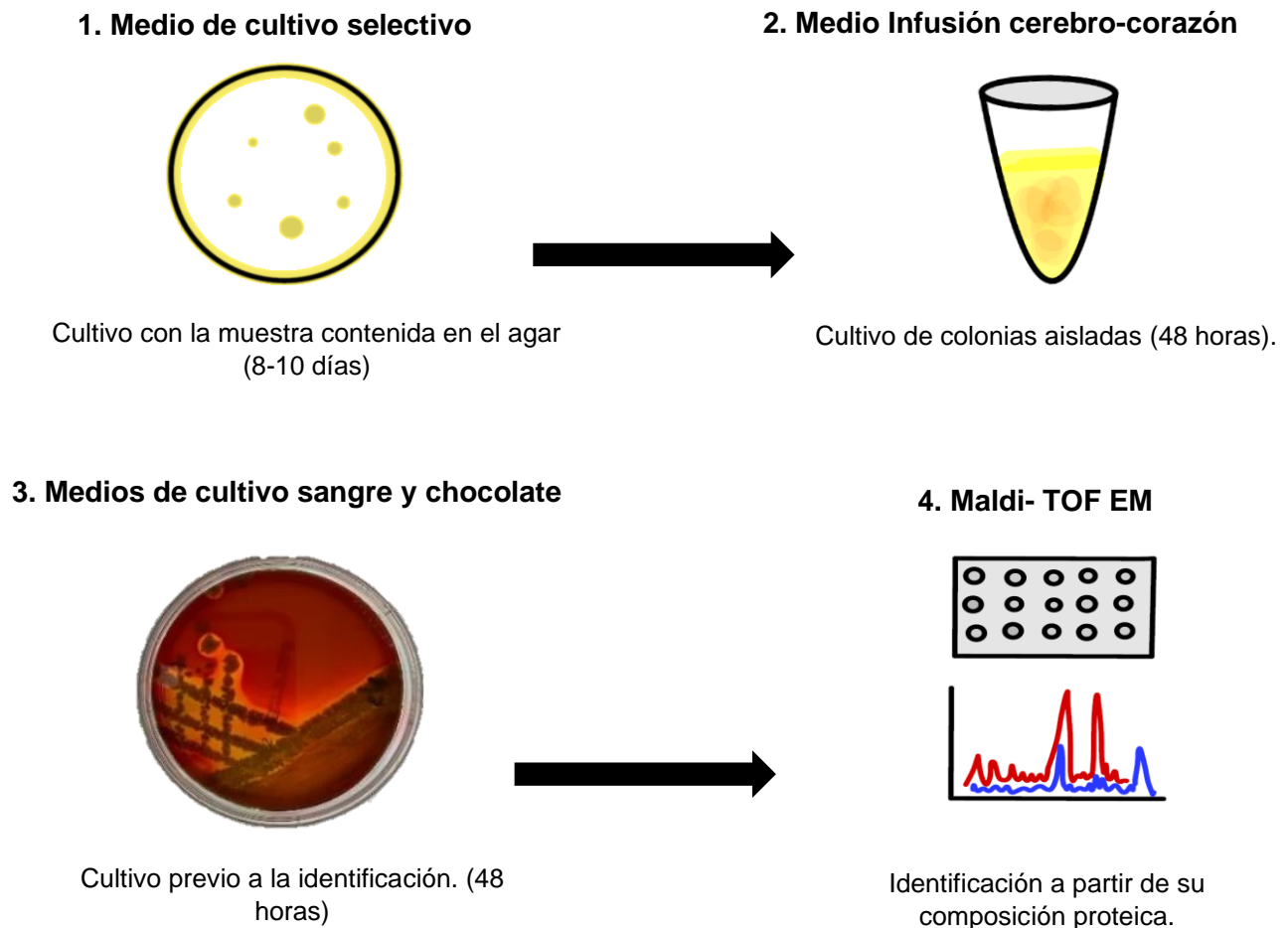


Figura 10. Identificación de bacterias en medio de cultivo selectivo. Se esquematiza el proceso de identificación de colonias bacterianas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF a partir de colonias aisladas de muestras de heces. Figura realizada con Procreate® IOS

7. Análisis estadístico

Los datos se presentas como mediana \pm rango intercuartilar, a menos que se indique de otra forma. El análisis de los resultados se realizó con el software estadístico IBM® SPSS Statistics. Por la naturaleza del estudio se realizaron pruebas no paramétricas; prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas y U-de Mann Whitney para la comparación de muestras no relacionadas. El desarrollo de los gráficos se realizó con el software estadístico GraphPad Prism 5.

8. Resultados

La población de este estudio son sujetos sanos de entre 18 y 30 años con parámetros bioquímicos y de composición corporal dentro de los parámetros normales, y que fueron reclutados por el equipo de trabajo del laboratorio de metabolismo de lípidos del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”. El reclutamiento inicial fue de 12 participantes, posterior a las evaluaciones bioquímicas, se incluyeron a 8 sujetos y continuaron la etapa de intervención. Por criterios de eliminación durante la etapa de tratamiento dos de los participantes fueron omitidos de los resultados finales. Así, la muestra final para este estudio fue de 6 sujetos (n=6).

8.1 Mediciones antropométricas

Los análisis antropométricos muestran una población homogénea, con una mediana de 67 kilogramos (kg) para el peso y 1.7 metros (m) para la talla. El índice de masa corporal fue de 23.4 kg/m² en promedio y la masa muscular tiene un intervalo que va de los 36.8% a 38.3%. De acuerdo con la evaluación por bioimpedancia, el porcentaje de grasa visceral no tuvo variaciones en la intervención. La circunferencia de cintura con una mediana de 84 centímetros (cm), presentó una tendencia de aumento posterior al tratamiento con atorvastatina.

Tabla 5. Mediciones antropométricas placebo y tratamiento

Parámetro	Pre-placebo	Post-placebo	Pre-tratamiento	Post-tratamiento
Edad (años)	27 [26-28]	27 [26-28]	27 [26-28]	27 [26-28]
Peso (kg)	67.6 [64.7-72.8]	67.8 [64-73.1]	67 [64.9-72.6]	67.1 [64.9-72.6]
Talla (m)	1.7 [1.67-1.71]	1.7 [1.67-1.71]	1.7 [1.67-1.71]	1.7 [1.67-1.71]
IMC (kg/m²)	23.4 [22.3-24.9]	23.4 [22-25.1]	23.3 [22-24.83]	23.2 [22.2-24.86]
Músculo (%)	37.3 [35.3-38.7]	37.8 [34.9-38.9]	36.8 [36.3-37.9]	38.3 [37.7-40.7]
Grasa total(%)	23 [21.4-25.3]	23.3 [21.6-25.8]	25.1 [21.7-25.6]	21.3 [19.5-23.6]
Visceral (%)	6 [5-8]	6 [5-8]	6 [5-8]	6 [5-8]
Cintura (cm)	84.5 [81-87]	84.2 [80.8-87.5]	83.5 [81-86]	85 [82-86]

Se muestran Mediana ± [rango intercuartilar] de los parámetros antropométricos antes y después de la administración del placebo y tratamiento con atorvastatina. El % de grasa total, grasa visceral y masa muscular

fueron calculados por bioimpedancia. Wilcoxon $p \leq 0.05^*$, U de Mann Whitney $p \leq 0.05^{**}$ Índice de masa corporal (IMC).

8.2 Parámetros bioquímicos

Se determinó la concentración de colesterol total y glucosa al tiempo basal y a las 2 y 4 horas de la etapa postprandial posterior la carga de lípidos descrita en la sección de métodos. Las observaciones muestran la disminución significativa de la concentración de colesterol total al tiempo basal y esto se mantiene a las 2 y 4 horas del posprandio en el grupo tratado con atorvastatina. Para la glucosa, los niveles plasmáticos no muestran cambios estadísticamente significativos tanto en el tiempo basal como el posprandio de ambos grupos.

Tabla 6. Parámetros bioquímicos en grupos con tratamiento y placebo

Parámetro	Pre-placebo (mg/dL)	Post-placebo (mg/dL)	Pre-tratamiento (mg/dL)	Post-tratamiento (mg/dL)
Colesterol 0h	171.71 [152.08-211.31]	187.42 [166.08-223.60]	202.35 [153.56-227.90]	100.19* [76.93-145.52]
Colesterol 2h	209.61 [178.03-226.85]	219.17 [169.49-240.16]	205.25 [154.2-229.89]	115.20* [85.88-162.22]
Colesterol 4h	235.89 [189.47-270.03]	251.26 [189.23-269.69]	208.15 [166.63-219.93]	112.20* [102.58-153.27]
Glucosa 0h	91.76 [90.64-93.32]	92.95 [90.20-97.49]	91.99 [90.47-107.58]	90.90 [91.40-107.73]
Glucosa 2h	99.64 [95.62-105.66]	97.31 [87.49-101.94]	109.05 [95.78-128.73]	102.07 [95.23-149.57]
Glucosa 4h	98.15 [91.68-101.72]	91.27 [88.75-97.30]	115.10 [109.11-124.59]	99.92 [89.05-106.26]

Se muestran Mediana \pm [rango intercuartilar] de los parámetros bioquímicos en el tiempo basal, 2 y 4 horas del posprandio determinados en plasma sanguíneo, antes y después de la administración del placebo y el tratamiento con atorvastatina. * Wilcoxon $p \leq 0.05$ para muestras relacionadas, **U de Mann Whitney $p \leq 0.05$. para muestras independientes.

8.3 Perfil lipídico en HDL

Por la importancia que tienen las HDL en el metabolismo lipídico y los cambios en estas lipoproteínas relacionados al tratamiento con atorvastatina previamente reportado, se realizó el análisis de su composición mediante la medición de la concentración de c-HDL y fosfolípidos HDL (pho-HDL) en el tiempo basal y a las 2 y 4 horas del posprandio. Como resultado, no se muestran diferencias significativas para ambos parámetros al comparar el tiempo previo (pre) y el tiempo posterior (post). Sin embargo, con la prueba de U de Mann Whitney para muestras no relacionadas podemos observar diferencias entre las muestras de los grupos “pre-placebo” y “pre-tratamiento”.

Tabla 7. Perfil de colesterol y fosfolípidos en HDL de grupos con placebo y tratamiento

Parámetro	Pre-placebo (mg/dL)	Post-placebo (mg/dL)	Pre-tratamiento (mg/dL)	Post-tratamiento (mg/dL)
c- HDL 0h	41.53 [38.38-46.47]	42.32 [40.78-46.32]	41.04 [31.85-47.28]	47.73 [39.54-53.53]
c- HDL 2h	46.73 [42.09-48.12]	46.53 [43.29-49.46]	40.59 [29.44-42.82]	44.61 [32.09-46.84]
c- HDL 4h	41.23 [38.79-50.51]	41.92 [39.85-45.41]	38.81 [29.92-45.50]	39.70 [25.58-42.82]
Pho-HDL 0h	83.01 [67.00-95.62]	78.28 [74.77-97.94]	104.64** [80.92-108.98]	108.95 [84.72-120.75]
Pho-HDL 2h	61.98 [59.80-89.74]	63.49 [57.90-81.88]	85.45** [68.97-88.16]	90.52 [78.03-112.24]
Pho-HDL 4h	78.47 [69.08-90.69]	80.74 [72.12-90.79]	90.52** [76.76-98.12]	91.24 [77.30-116.77]

Se muestran Mediana \pm [rango intercuartilar] de los parámetros del perfil lipídico en el tiempo basal, 2 y 4 horas del posprandio determinados en plasma sanguíneo, antes y después de la administración del placebo y el tratamiento con atorvastatina. * Wilcoxon $p \leq 0.05$ para muestras relacionadas, **U de Mann Whitney $p \leq 0.05$. para muestras independientes. Colesterol-HDL (c-HDL), fosfolípidos-HDL (Pho-HDL), horas (h).

8.4 Triglicéridos totales con Atorvastatina

La capacidad hipolipemiente que tienen las estatinas sobre la concentración plasmática de triglicéridos ha sido reportada anteriormente, sin embargo, no existen investigaciones que analicen qué pasa con los triglicéridos en la etapa postprandial después del tratamiento con estos fármacos. La propuesta metodológica de este estudio fue dar un alimento hiperlipídico a los participantes, con una composición de 67.4% de grasa, 21.0% de proteína y 11,6% de carbohidratos, y realizar tomas de muestra de sangre a las 2 y 4 horas del posprandio. Los resultados del análisis de triglicéridos en plasma y HDL se muestran a continuación.

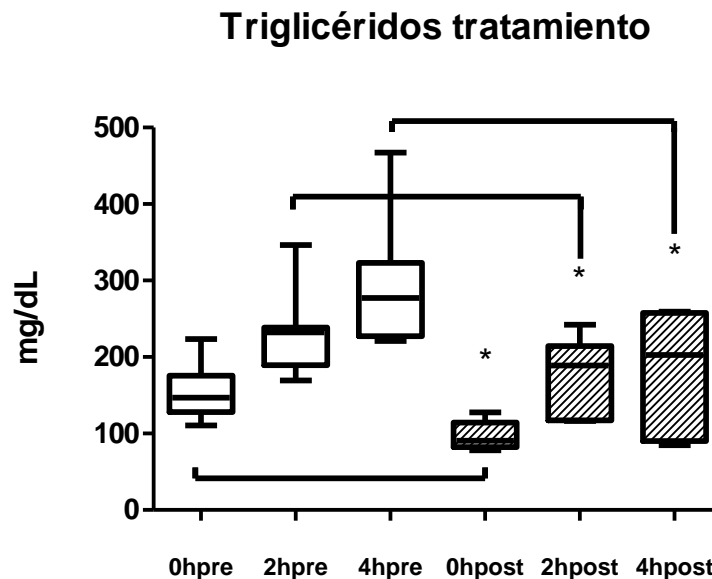


Figura 11. Triglicéridos antes y después del tratamiento con atorvastatina. Se observa la concentración plasmática de triglicéridos pre y post al tiempo 0, 2 y 4 horas posteriores a la ingesta de un alimento hiperlipídico. Wilcoxon para muestras relacionadas. Mediana ± [rango intercuartilar]. $p \leq 0.05$ *

Los resultados muestran que la concentración plasmática de triglicéridos es significativamente menor en el grupo tratado con atorvastatina, desde el tiempo basal y mantiene esta tendencia hacia las 2 y 4 horas del posprandio, en contraste con el grupo placebo.

8.5 Triglicéridos en HDL con Atorvastatina

Posterior al tratamiento con atorvastatina la concentración de tg-HDL muestra un aumento significativo al tiempo basal, 2 y 4 horas del posprandio. Contrario a lo que se observa en la concentración plasmática, esto podría explicar un efecto amortiguador por parte de las HDL ante la disminución de la concentración plasmática de triglicéridos.

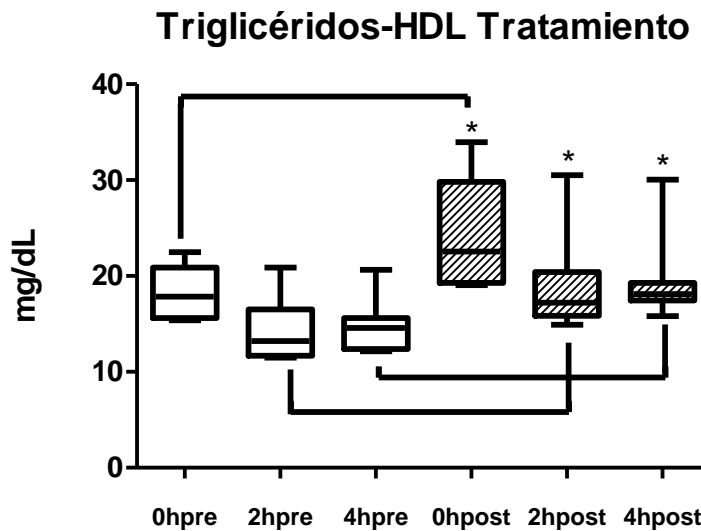


Figura 12. Triglicéridos en HDL antes y después del tratamiento con atorvastatina. Se observa la concentración de triglicéridos en HDL pre y post al tiempo 0, 2 y 4 horas posteriores a la ingesta de un alimento hiperlipídico. Mediana \pm [rango intercuartil]. $p \leq 0.05$ *

8.6 Prueba de utilidad del medio de cultivo selectivo

Como primera etapa del proyecto realizamos la estandarización de un medio selectivo para bacterias lipolíticas. Este medio está compuesto por una mezcla de lípidos añadida a un medio comercial que le da la característica de tener triglicéridos como única fuente de carbono. Las pruebas de funcionalidad del medio se realizaron con muestras de contenido intestinal y segmentos de intestino delgado de conejos nueva Zelanda (tabla 8). Los resultados muestran cambios en el crecimiento de bacterias lipolíticas en el segmento de yeyuno y la muestra de heces en condiciones aerobias, en comparación con el medio adicionado con estatinas y el medio control (tabla 9). Estas observaciones podrían dar indicios de que la microbiota

identificada en heces puede ser un reflejo de las modificaciones que suceden a nivel de intestino delgado.

Tabla 8. Muestras de tejido y heces

Muestras de tejido (Conejos Nueva Zelanda)	
1	Duodeno 10 cm. +/- 5 g de contenido intestinal
2	Ileon 10 cm +/- 5 g de contenido intestinal
3	Yeyuno 10 cm +/- 5 g de contenido intestinal
4	Heces fecales +/- 3 g

Se muestran los segmentos de intestino delgado y heces que fueron cultivadas en medio de cultivo selectivo para bacterias lipolíticas adicionado con atorvastatina.

Tabla 9. Presencia de bacterias lipolíticas

Se muestran los resultados del análisis de segmentos de intestino delgado y heces de un conejo nueva Zelanda en medio de cultivo selectivo para bacterias lipolíticas, grupo control y adicionado con atorvastatina.

Segmento	Bacterias lipolíticas
Heces aerobiosis (control)	-
Heces aerobiosis + atorvastatina	+
Yeyuno aerobiosis (control)	-
Yeyuno aerobiosis + atorvastatina	++

8.7 Medio de cultivo selectivo para bacterias lipolíticas

El medio selectivo para bacterias lipolíticas que fue previamente estandarizado se utilizó para evaluar el crecimiento bacteriano en muestras de heces de los sujetos participantes, antes y después del tratamiento con atorvastatina. Con la particularidad de que las muestras se añadían inmersas dentro del medio de cultivo y eran incubadas bajo condiciones aerobias en un periodo de 8 a 10 días. De acuerdo con los resultados, se observó crecimiento únicamente en las cajas que contenían muestras obtenidas después del tratamiento con atorvastatina. Las colonias bacterianas observadas mostraban el halo de hidrolisis lipídica característico de bacterias lipolíticas (figura 15), entre las especies predominantes se encuentran *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* y *enterobacter clocae* (tabla 9), y su crecimiento y distribución fueron distintos entre las muestras de cada individuo.

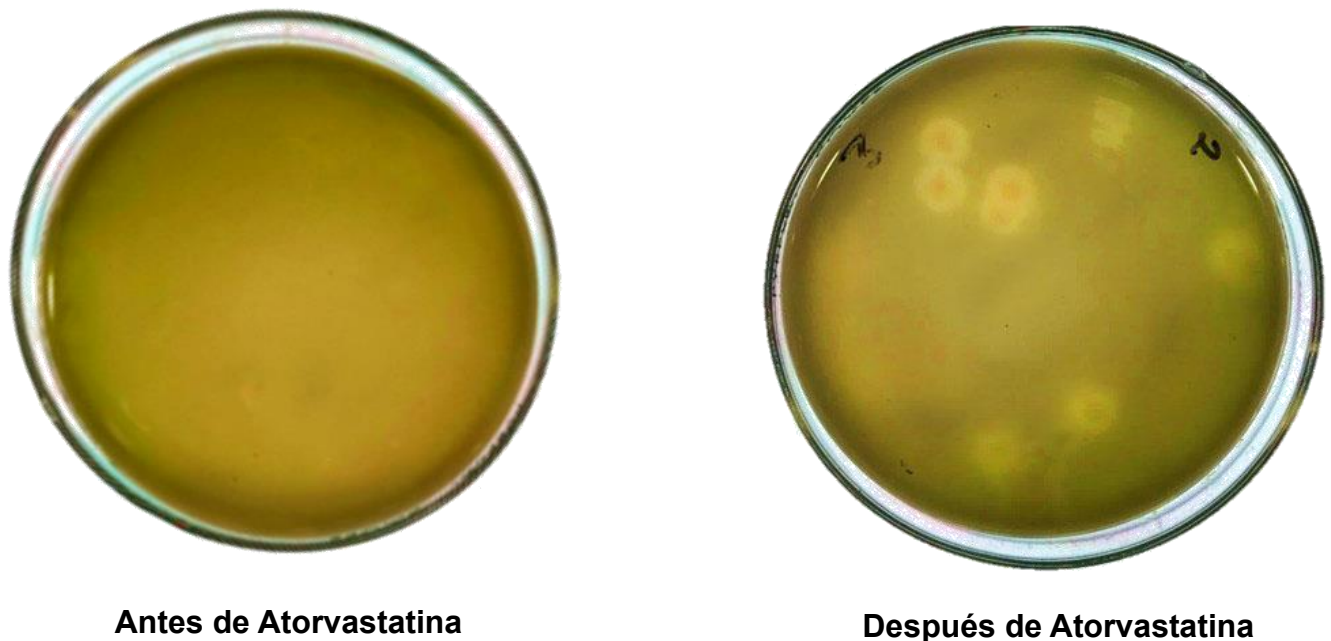


Figura 13. Muestras de heces cultivadas en medio de cultivo selectivo para bacterias lipolíticas. Se muestran las cajas que contiene muestras antes y después del tratamiento con Atorvastatina. Después del

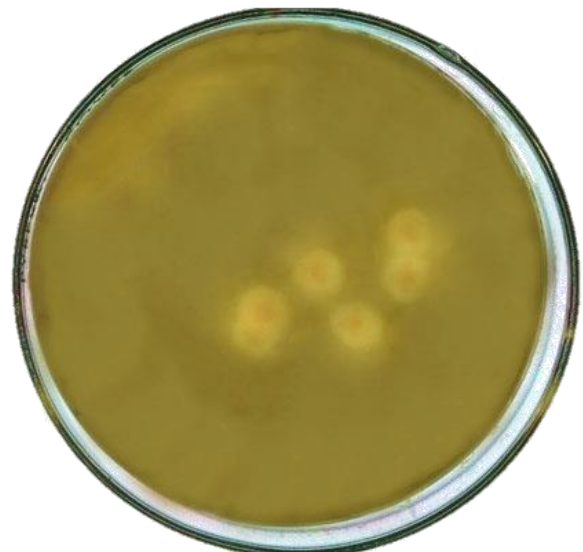
tratamiento con atorvastatina se muestra el crecimiento de colonias bacterianas que forman el halo de hidrólisis lipídica.

8.8 Medio selectivo adicionado con atorvastatina

Como método de control se realizó la adición de atorvastatina a una concentración de 2 mg/dL a la mezcla del medio de cultivo selectivo. Esta vez utilizando muestras obtenidas antes del tratamiento con atorvastatina que no mostraron crecimiento en los análisis anteriores. Siguiendo las mismas condiciones de cultivo los resultados muestran crecimiento específicamente en las cajas en las que se adicionó atorvastatina al medio de cultivo. Estos resultados podrían sugerir la interacción directa del fármaco sobre la capacidad de las bacterias para metabolizar ácidos grasos como fuente de energía.



Antes de Atorvastatina



**Antes de atorvastatina +
atorvastatina añadida al
medio de cultivo**

Figura 14. Muestras de heces del tiempo previo al inicio del tratamiento con atorvastatina en medio de cultivo adicionado con atorvastatina. Se muestra el cultivo en dos condiciones distintas: 1. Medio de cultivo selectivo para bacterias lipolíticas. 2. Medio de cultivo selectivo para bacterias lipolíticas adicionado con

atorvastatina a una concentración final de 2 mg/dL. Los resultados muestran crecimiento de colonias bacterianas que forman el halo de hidrólisis lipídica en el medio adicionado con atorvastatina.

Tabla 10. Identificación de colonias bacterianas por MALDI-TOF

La siguiente tabla muestra los resultados del análisis de crecimiento bacteriano con el medio de cultivo selectivo para bacterias lipolíticas específicos de cada participante. En la primer columna se indican las colonias con crecimiento en el tiempo posterior del grupo tratado con atorvastatina y a continuación en la segunda columna se indican los resultados del crecimiento en muestras del tiempo previo al tratamiento con el medio adicionado con atorvastatina. La comparación entre estos grupos demuestra que si bien las especies bacterianas no son exactamente las mismas con respecto a las muestras obtenidas después del tratamiento, algunas especies como *Escherichia coli* y *Klebsiella oxytoca* coinciden.

Sujeto	Bacterias (Post-Tratamiento Atorvastatina)	Morfología	Bacterias (Pre-tratamiento + Atorvastatina añadida al medio)	Morfología
1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Enterococcus gallinarum</i>	BGN BGN CGP	<i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas mendocinas</i>	BGN BGN
2	<i>Escherichia coli</i> <i>Enterococcus faecium</i>	BGN CGP	<i>Escherichia coli</i>	BGN
3	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Paeniclostridium sordellii</i>	BGN BGP	<i>Pseudomonas composti</i> <i>Klebsiella oxytoca</i>	BGN CGP
4	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Escherichia coli</i>	BGN BGN	<i>Pseudomonas composti</i> <i>Escherichia coli</i>	BGN BGN
5	<i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Enterobacter cloacae</i>	BGN BGN	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella oxytoca</i>	BGN CGP
6	<i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter cloacae</i>	BGN BGN	<i>Escherichia coli</i>	BGN

Se muestra el crecimiento bacteriano en medio de cultivo selectivo para bacterias lipolíticas con muestras posteriores al tratamiento con atorvastatina (columna 1) y muestras previas al tratamiento con adición de

atorvastatina directamente en el medio (columna 2). BGN (Bacilos gram negativos), BGP (Bacilos gram positivos), CGP (Cocos gram positivos), PONER EN ITALICAS

9. Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio son de importancia para abordar nuevas perspectivas acerca de los efectos secundarios de las estatinas. Uno de los objetivos de este proyecto fue determinar el efecto de las estatinas sobre la lipemia postprandial. Observamos que la atorvastatina altera la cinética de lípidos en la etapa postprandial. Para esta evaluación utilizamos un alimento hiperlipídico que ha sido utilizado previamente en estudios en estado de posprandio. De acuerdo con *Estrada-Luna et al.* (49) las tomas de muestra sanguínea se realizaron a las 2 y 4 horas posteriores a la ingesta de alimento. El desorden metabólico causado por la hipertrigliceridemia postprandial se relaciona directamente con la retención de partículas remanentes en la pared arterial y es la causa del desarrollo de la placa de ateroma (54). Por lo tanto, menores concentraciones en los niveles plasmáticos de triglicéridos durante el posprandio podrían favorecer la disminución del riesgo cardiometabólico, atenuando los efectos sobre el endotelio vascular. En este sentido, *Quintanilla Cantú et al.* (55) demostraron que la trigliceridemia postprandial inducida por la ingesta de un alimento alto en grasas disminuye el contenido de colesterol en las HDL. Sus resultados demuestran que las modificaciones en la composición de estas lipoproteínas podrían modificar su efecto benéfico sobre el endotelio vascular.

En esta misma línea, en nuestro estudio evaluamos el perfil lipídico de HDL; los resultados muestran que los triglicéridos contenidos en estas lipoproteínas aumentan en el ayuno por el tratamiento con atorvastatina y luego disminuyen ligeramente en el periodo postprandial, en contraste con la disminución de la concentración plasmática de triglicéridos en ayuno y una menor lipemia postprandial posterior al tratamiento con atorvastatina. Estos reportes sugieren que las HDL realizan una función amortiguadora del exceso de triglicéridos en plasma. Este efecto puede relacionarse al aumento de la actividad de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP) inducida por las estatinas (56) que promueve el intercambio de ésteres de colesterol y triglicéridos entre las lipoproteínas. La determinación de la actividad CETP puede ser un parámetro importante en próximos estudios.

Por otra parte, para los análisis bacterianos de las especies lipolíticas, desarrollamos un medio de cultivo con triglicéridos como única fuente de carbono. Este medio permitió seleccionar a las bacterias capaces de hidrolizar y utilizar los triglicéridos como fuente de energía. Durante la estandarización se realizaron pruebas con muestras de contenido intestinal y heces de conejo Nueva Zelanda. Estos mamíferos hidrolizan y modifican la longitud y dobles ligaduras de los ácidos grasos que ingieren a través de las bacterias presentes en el ciego (57). Dichos metabolitos, así como las bacterias lipolíticas presentes en los cecotrofos que excreta el conejo, son reingeridos para absorber los nutrientes derivados de la fermentación bacteriana. De esta forma, el conejo es un modelo adecuado para aislar bacterias lipolíticas de intestino delgado para la validación del medio de cultivo selectivo. Los resultados obtenidos al analizar la viabilidad del medio selectivo demostraron que los cultivos de muestras de heces y segmentos de yeyuno con exposición a atorvastatina mostraban crecimiento de colonias bacterianas similares en ambas muestras. Esto podría sugerir que los cambios que acontecen a nivel de intestino delgado pueden reflejarse también en el contenido de excreción intestinal.

La propuesta de que las estatinas podrían alterar la microbiota relacionada con el metabolismo intestinal de lípidos surgió de dos estudios previos de nuestro grupo de investigación. Por una parte, *Mondragón et al*, 2019 (35) evaluaron el efecto de atorvastatina sobre el tejido adiposo en un modelo similar de conejos nueva Zelanda. Observaron que posterior al tratamiento, los adipocitos mostraban un aumento de tamaño en comparación con el grupo control, sin aumento en la ingesta ni la presencia de cambios significativos en el peso corporal con respecto al grupo control. El aumento de los adipocitos en este estudio se podría explicar por la generación en el intestino delgado de ácidos grasos de cadena media, los cuales pueden ser absorbidos y llegar directamente a la circulación sanguínea sin necesidad de integrarse a los quilomicrones. De esta forma, podrían fungir como fuente de energía sin contribuir a la trigliceridemia postprandial detectable por los métodos convencionales. Por otra parte, *Flores-Castillo et al*. evaluaron el perfil de ácidos grasos contenidos en HDL, también en conejos tratados con atorvastatina (42). En este último estudio, los ácidos grasos saturados de las HDL disminuyeron, mientras que los ácidos linoleico (AL) y α -linolénico (ALA) incrementaron. Es importante enfatizar que estos últimos ácidos grasos poliinsaturados son esenciales y los mamíferos los adquieren exclusivamente de la ingesta de aceites vegetales. Considerando que tanto AL como ALA son de origen exógeno, y que la ingesta calórica no cambió a lo largo del estudio, los autores sugieren que hay modificaciones a nivel intestinal que favorecen la

absorción de ciertos ácidos grasos (35). Tomando en cuenta todo lo anterior, nuestra hipótesis fue que el tratamiento con atorvastatina induce cambios en la absorción de ácidos grasos y esos cambios podrían estar relacionados con modificaciones de la microbiota intestinal.

En este sentido, *Zimmermann et al.* (44) evaluaron la actividad de atorvastatina sobre la microbiota intestinal de ratones bajo distintos regímenes de alimentación. Compararon 3 grupos: dieta estándar, dieta alta en grasas, y dieta alta en grasas tratados con atorvastatina. Sus resultados muestran modificaciones en la abundancia relativa y la abundancia absoluta del microbioma en el grupo con dieta alta en grasas. Sin embargo, estos cambios fueron menores en el grupo en el cual se había añadido atorvastatina, donde el microbioma era similar a lo mostrado en el grupo con una dieta estándar.

En un estudio bajo condiciones alimentarias similares, *Khan et al.* secuenciaron el gen 16s ARNr de ratones posterior al tratamiento con dosis distintas de atorvastatina (45). Tras la evaluación de la composición de la microbiota intestinal a nivel de filos, sus observaciones reportan que el grupo tratado con atorvastatina de 20 mg/d y que tenían una dieta alta en grasas aumentó la diversidad de su microbioma, específicamente el filo Proteobacteria y a su vez disminuyó la abundancia de Firmicutes, comparado con dos grupos más tratados con dosis de atorvastatina de 5 y 10 mg/d.

Con base en todo lo anterior, uno de los objetivos principales de nuestro estudio fue evaluar si la atorvastatina influye en el crecimiento de bacterias lipolíticas. Nuestros resultados apoyan esta idea, ya que observamos el desarrollo de bacterias lipolíticas en muestras de heces obtenidas posterior al tratamiento con atorvastatina, sin embargo estas bacterias no se encuentran en muestras previas al tratamiento. Interesantemente, hubo desarrollo bacteriano en medios de cultivo selectivo que contenían muestras previas al tratamiento adicionados con atorvastatina. Respecto a las especies bacterianas con actividad lipolítica en las muestras obtenidas después del tratamiento, identificamos *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterococcus gallinarum*, entre otras. Las dos primeras desarrollaron también a partir de muestras obtenidas antes del tratamiento cuando se suplementó el medio con atorvastatina. Tomando en cuenta todos estos resultados, es probable que la atorvastatina favorezca que las bacterias adapten su metabolismo para poder utilizar los triglicéridos como fuente de carbono. No obstante, no se puede descartar la posibilidad de que el efecto antibiótico de las estatinas

previamente demostrado (44) condicione los cambios de la microbiota intestinal. Los estudios de los mecanismos involucrados en tal switch metabólico están garantizados en el futuro.

10. Conclusiones

Nuestros resultados demostraron que el tratamiento con atorvastatina:

- Favorece la proliferación de bacterias lipolíticas de diferentes especies en cada sujeto, y este crecimiento es similar en muestras previas al tratamiento al añadir atorvastatina directamente al cultivo.
- Aumenta la concentración de triglicéridos en HDL durante el tiempo basal y la etapa postprandial posterior a la ingesta de un alimento hiperlipídico.

11. Perspectivas

La siguiente etapa del proyecto se centra en el análisis de ácidos grasos de cadena media en las muestras de plasma sanguíneo obtenidas durante el estado postprandial. Conocer el comportamiento de estos ácidos grasos posterior a la ingesta del alimento puede dar más información acerca de la relación entre el mecanismo de acción de la atorvastatina y la hipertrofia del tejido adiposo.

12. Bibliografía

1. Al-Makki, A., DiPette, D., Whelton, P. K., Murad, M. H., Mustafa, R. A., Acharya, S., Beheiry, H. M., Champagne, B., Connell, K., Cooney, M. T., Ezeigwe, N., Gaziano, T. A., Gidio, A., Lopez-Jaramillo, P., Khan, U. I., Kumarapeli, V., Moran, A. E., Silwimba, M. M., Rayner, B., Sukonthasan, A., Khan, T. (2022). **Hypertension Pharmacological Treatment in Adults: A World Health Organization Guideline Executive Summary**. *Hypertension* (Dallas, Tex. 1979), 79(1), 293–301. 7
2. Lucchi T. (2021). **Dyslipidemia and prevention of atherosclerotic cardiovascular disease in the elderly**. *Minerva médica*, 112(6), 804–816.
3. Pirillo, A., Casula, M., Olmastroni, E., Norata, G. D., & Catapano, A. L. (2021). **Global epidemiology of dyslipidaemias**. *Nature reviews. Cardiology*, 18(10), 689–700.
4. Sirtori C. R. (2014). **The pharmacology of statins**. *Pharmacological research*, 88, 3–11.
5. Egom, E. E., & Hafeez, H. (2016). **Biochemistry of Statins**. *Advances in clinical chemistry*, 73, 127–168.
6. Yandrapalli, S., Malik, A., Guber, K., Rochlani, Y., Pemmasani, G., Jasti, M., & Aronow, W. S. (2019). **Statins and the potential for higher diabetes mellitus risk**. *Expert review of clinical pharmacology*, 12(9), 825–830.
7. Carmena, R., & Betteridge, D. J. (2019). **Diabetogenic Action of Statins: Mechanisms**. *Current atherosclerosis reports*, 21(6), 23.

8. Oesterle, A., Laufs, U., & Liao, J. K. (2017). **Pleiotropic Effects of Statins on the Cardiovascular System**. *Circulation research*, 120(1), 229–243.
9. Wasim, R., Ansari, T. M., Ahsan, F., Siddiqui, M. H., Singh, A., Shariq, M., & Parveen, S. (2022). **Pleiotropic Benefits of Statins in Cardiovascular Diseases**. *Drug research*, 72(9), 477–486.
10. Tramacere, I., Boncoraglio, G. B., Banzi, R., Del Giovane, C., Kwag, K. H., Squizzato, A., & Moja, L. (2019). **Comparison of statins for secondary prevention in patients with ischemic stroke or transient ischemic attack: a systematic review and network meta-analysis**. *BMC medicine*, 17(1), 67.
11. Endo A. (2010). **A historical perspective on the discovery of statins**. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*, 86(5), 484–493.
12. Stossel T. P. (2008). **The discovery of statins**. *Cell*, 134(6), 903–905.
13. Zeller, F. P., & Uvodich, K. C. (1988). **Lovastatin for hypercholesterolemia**. *Drug intelligence & clinical pharmacy*, 22(7-8), 542–545.
14. Istvan, E. S., & Deisenhofer, J. (2001). **Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase**. *Science (New York, N.Y.)*, 292(5519), 1160–1164.
15. Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (1990). **Regulation of the mevalonate pathway**. *Nature*, 343(6257), 425–430.
16. Straka, M. S., & Panini, S. R. (1995). **Post-transcriptional regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by mevalonate**. *Archives of biochemistry and biophysics*, 317(1), 235–243.

17. Ermini, L., Post, M., & Caniggia, I. (2017). **Statins, Mevalonate Pathway and its Intermediate Products in Placental Development and Preeclampsia**. *Current molecular pharmacology*, 10(2), 152–160.
18. Istvan E. S. (2002). **Structural mechanism for statin inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase**. *American heart journal*, 144(6 Suppl), S27–S32.
19. Chen, L., Ma, M. Y., Sun, M., Jiang, L. Y., Zhao, X. T., Fang, X. X., Man Lam, S., Shui, G. H., Luo, J., Shi, X. J., & Song, B. L. (2019). **Endogenous sterol intermediates of the mevalonate pathway regulate HMGCR degradation SREBP-2 processing**. *Journal of lipid research*, 60(10), 1765–1775.
20. Adhyaru, B. B., & Jacobson, T. A. (2018). **Safety and efficacy of statin therapy**. *Nature reviews. Cardiology*, 15(12), 757–769.
21. Pedersen, T. R., & Tobert, J. A. (2004). **Simvastatin: a review**. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 5(12), 2583–2596.
22. Stancu, C., & Sima, A. (2001). **Statins: mechanism of action and effects**. *Journal of cellular and molecular medicine*, 5(4), 378–387.
23. Spitalewitz, S., Porush, J. G., Cattran, D., & Wright, N. (1993). **Treatment of hyperlipidemia in the nephrotic syndrome: the effects of pravastatin therapy**. *American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation*, 22(1), 143–150.
24. Mohamed, M. F., Coppola, S., Feng, T., Camp, H. S., Kim, E., & Othman, A. A. (2021). **Effect of Upadacitinib on the Pharmacokinetics of Rosuvastatin or Atorvastatin in Healthy Subjects**. *Clinical pharmacology in drug development*, 10(11), 1335–1344.

25. Pinal-Fernandez, I., Casal-Dominguez, M., & Mammen, A. L. (2018). **Statins: pros and cons**. *Medicina clinica*, 150(10), 398–402.
26. Park, Z. H., Juska, A., Dyakov, D., & Patel, R. V. (2014). **Statin-associated incident diabetes: a literature review**. *The Consultant pharmacist: the journal of the American Society of Consultant Pharmacists*, 29(5), 317–334.
27. Rajpathak, S. N., Kumbhani, D. J., Crandall, J., Barzilai, N., Alderman, M., & Ridker, P. M. (2009). **Statin therapy and risk of developing type 2 diabetes: a meta-analysis**. *Diabetes care*, 32(10), 1924–1929.
28. Backes, J. M., Kostoff, M. D., Gibson, C. A., & Ruisinger, J. F. (2016). **Statin-Associated Diabetes Mellitus: Review and Clinical Guide**. *Southern medical journal*, 109(3), 167–173.
29. Ridker, P. M., Pradhan, A., MacFadyen, J. G., Libby, P., & Glynn, R. J. (2012). **Cardiovascular benefits and diabetes risks of statin therapy in primary prevention: an analysis from the JUPITER trial**. *Lancet (London, England)*, 380(9841), 565–571.
30. Cybulska, B., & Kłosiewicz-Latoszek, L. (2018). **How do we know that statins are diabetogenic, and why? Is it an important issue in the clinical practice?** *Kardiologia polska*, 76(8), 1217–1223.
31. Agouridis, A. P., Kostapanos, M. S., & Elisaf, M. S. (2015). **Statins and their increased risk of inducing diabetes**. *Expert opinion on drug safety*, 14(12), 1835–1844.
32. Sarsenbayeva, A., Jui, B. N., Fanni, G., Barbosa, P., Ahmed, F., Kristófi, R., Cen, J., Chowdhury, A., Skrtic, S., Bergsten, P., Fall, T., Eriksson, J. W., & Pereira, M. J. (2021). **Impaired HMG-CoA Reductase Activity Caused by Genetic Variants or Statin Exposure: Impact on Human Adipose Tissue, β -Cells and Metabolome**. *Metabolites*, 11(9), 574.

33. Swerdlow, D. I., Preiss, D., Kuchenbaecker, K. B., Holmes, M. V., Engmann, J. E., Shah, T., Sofat, R., Stender, S., Johnson, P. C., Scott, R. A., Leusink, M., Verweij, N., Sharp, S. J., Guo, Y., Giambartolomei, C., Chung, C., Peasey, A., Amuzu, A., Li, K., Palmen, J. Sattar, N. (2015). **HMG-coenzyme A reductase inhibition, type 2 diabetes, and bodyweight: evidence from genetic analysis and randomised trials.** *Lancet (London, England)*, 385(9965), 351–361.
34. Mita, T., Nakayama, S., Abe, H., Gosho, M., Iida, H., Hirose, T., Kawamori, R., & Watada, H. (2013). **Comparison of effects of pitavastatin and atorvastatin on glucose metabolism in type 2 diabetic patients with hypercholesterolemia.** *Journal of diabetes investigation*, 4(3), 297–303.
35. Abbasi, F., Lamendola, C., Harris, C. S., Harris, V., Tsai, M. S., Tripathi, P., Abbas, F., Reaven, G. M., Reaven, P. D., Snyder, M. P., Kim, S. H., & Knowles, J. W. (2021). **Statins Are Associated with Increased Insulin Resistance and Secretion.** *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 41(11), 2786–2797.
36. Sahebkar A. (2013). **Head-to-head comparison of fibrates versus statins for elevation of circulating adiponectin concentrations: a systematic review and meta-analysis.** *Metabolism: clinical and experimental*, 62(12), 1876–1885.
37. Singh, P., Zhang, Y., Sharma, P., Covassin, N., Soucek, F., Friedman, P. A., & Somers, V.K. (2018). **Statins decrease leptin expression in human white adipocytes.** *Physiological reports*, 6(2), e13566.
38. Mondragón-García, A., Luna-Luna, M., Flores-Castillo, C., Aranda-Fraustro, A., Carreón-Torres, E., López-Olmos, V., Fragoso, J. M., Vargas-Alarcón, G., & Pérez-Méndez, Ó. (2019). **Atorvastatin and Fenofibrate Exert Opposite Effects on the Vascularization and Characteristics of Visceral Adipose Tissue in New Zealand White Rabbits.** *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics*, 24(6), 559–566.

39. Kogawa, A. C., Pires, A. E. D. T., & Salgado, H. R. N. (2019). **Atorvastatin: A Review of Analytical Methods for Pharmaceutical Quality Control and Monitoring.** *Journal of AOAC International*, 102(3), 801–809
40. Koenen, M., Hill, M. A., Cohen, P., & Sowers, J. R. (2021). **Obesity, Adipose Tissue and Vascular Dysfunction.** *Circulation research*, 128(7), 951–968.
41. Flores-Castillo, C., Luna-Luna, M., Carreón-Torres, E., López-Olmos, V., Frías, S., Juárez-Oropeza, M. A., Franco, M., Fragoso, J. M., Vargas-Alarcón, G., & Pérez-Méndez, Ó. (2019). **Atorvastatin and Fenofibrate Increase the Content of Unsaturated Acyl Chains in HDL and Modify In Vivo Kinetics of HDL-Cholesteryl Esters in New Zealand White Rabbits.** *International journal of molecular sciences*, 20(10), 2521.
42. Tavakkoli, A., Johnston, T. P., & Sahebkar, A. (2020). **Antifungal effects of statins.** *Pharmacology & therapeutics*, 208, 107483.
43. **Antibacterial activity of statins: a comparative study of atorvastatin, simvastatin, and rosuvastatin.** *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 11, 13.
44. Zimmermann, F., Roessler, J., Schmidt, D., Jasina, A., Schumann, P., Gast, M., Poller, W., Leistner, D., Giral, H., Kränkel, N., Kratzer, A., Schuchardt, S., Heimesaat, M. M., Landmesser, U., & Haghighi, A. (2020). **Impact of the Gut Microbiota on Atorvastatin Mediated Effects on Blood Lipids.** *Journal of clinical medicine*, 9(5), 1596. Masadeh, M., Mhaidat, N., Alzoubi, K., Al-Azzam, S., & Alnasser, Z. (2012).

45. Khan, T. J., Ahmed, Y. M., Zamzami, M. A., Siddiqui, A. M., Khan, I., Baothman, O. A. S., Mehanna, M. G., Kuerban, A., Kaleemuddin, M., & Yasir, M. (2018). **Atorvastatin Treatment Modulates the Gut Microbiota of the Hypercholesterolemic Patients**. *Omics: a journal of integrative biology*, 22(2), 154–163.
46. Watts, G. F., & Karpe, F. (2011). **Triglycerides and atherogenic dyslipidaemia: extending treatment beyond statins in the high-risk cardiovascular patient**. *Heart (British Cardiac Society)*, 97(5), 350–356.
47. Awad, K., Serban, M. C., Penson, P., Mikhailidis, D. P., Toth, P. P., Jones, S. R., Rizzo, M., Howard, G., Lip, G. Y. H., Banach, M., & Lipid and Blood Pressure Metaanalysis Collaboration (LBPMC) Group (2017). **Effects of morning vs evening statin administration on lipid profile: A systematic review and meta-analysis**. *Journal of clinical lipidology*, 11(4), 972–985.e9.
48. Estrada-Luna, D., Carreón-Torres, E., Bautista-Pérez, R., Betanzos-Cabrera, G., Dorantes-Morales, A., Luna-Luna, M., Vargas-Barrón, J., Mejía, A. M., Fragoso, J. M., Carvajal-Aguilera, K., García-Trejo, J. J., Vargas-Alarcón, G., & Pérez-Méndez, Ó. (2019). **Microencapsulated Pomegranate Reverts High-Density Lipoprotein (HDL)-Induced Endothelial Dysfunction and Reduces Postprandial Triglyceridemia in Women with Acute Coronary Syndrome**. *Nutrients*, 11(8), 1710.
49. Redgrave T. G. (2004). **Chylomicron metabolism**. *Biochemical Society transactions*, 32(Pt 1), 79–82.
50. Boden G. (2011). **Obesity, insulin resistance and free fatty acids**. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*, 18(2), 139–143.
51. Ghosh, A., Gao, L., Thakur, A., Siu, P. M., & Lai, C. W. K. (2017). **Role of free fatty acids in endothelial dysfunction**. *Journal of biomedical science*, 24(1), 50.

52. Tripathy, D., Aljada, A., & Dandona, P. (2003). **Free fatty acids (FFA) and endothelial dysfunction; role of increased oxidative stress and inflammation.** --to: Steinberg et al. (2002) Vascular function, insulin resistance and fatty acids. *Diabetologia*, 46(2), 300–301.
53. Borén, J., Taskinen, M. R., Björnson, E., & Packard, C. J. (2022). **Metabolism of triglyceride-rich lipoproteins in health and dyslipidaemia.** *Nature reviews. Cardiology*, 19(9), 577–592.
54. Quintanilla-Cantú, A., Peña-de-la-Sancha, P., Flores-Castillo, C., Mejía-Domínguez, A. M., Posadas-Sánchez, R., Pérez-Hernández, N., Bautista-Pérez, R., Enriquez-Calderón, R. E., Juárez-Oropeza, M. A., Fragoso, J. M., Vargas-Alarcón, G., & Pérez-Méndez, O. (2017). **Small HDL subclasses become cholesterol-poor during postprandial period after a fat diet intake in subjects with high triglyceridemia increases.** *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 464, 98–105.
55. Barter, P. J., Cochran, B. J., & Rye, K. A. (2018). **CETP inhibition, statins and diabetes.** *Atherosclerosis*, 278, 143–146.
56. Betancourt López, C. A., Bernal Santos, M. G., Vázquez Landaverde, P. A., Bauman, D. E., Harvatine, K. J., Srigley, C. T., & Becerra, J. (2018). **Both Dietary Fatty Acids and Those Present in the Cecotrophs Contribute to the Distinctive Chemical Characteristics of New Zealand Rabbit Milk Fat.** *Lipids*, 53(11-12), 1085–1096.