

EFFECTES DELS INHIBIDORS DE PCSK9 EN EL PERFIL LIPÍDIC I EN LA COMPOSICIÓ DE LES LIPOPROTEÏNES

Marta Pinyol i Pinel

TREBALL FINAL DE GRAU BIOTECNOLOGIA

Tutors acadèmics i supervisors: Montserrat Guardiola Guionnet, professora agregada i investigadora, Departament de Medicina i Cirurgia, montse.guardiola@urv.cat. Josep Ribalta Vives, professor agregat i investigador, Departament de Medicina i Cirurgia, josep.ribalta@urv.cat.

En cooperació amb: Institut d'Investigació sanitària Pere Virgili (IISPV).

7 de Juny de 2021

Jo, Marta Pinyol i Pinel, amb DNI 39925436N, soc coneixedora de la guia de prevenció del plagi a la URV *Prevenció, detecció i tractament del plagi en la docència: guia per a estudiants (aprovada el juliol 2017)* (<http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) i afirmo que aquest TFG no constitueix cap de les conductes considerades com a plagi per la URV.

Tarragona, 7 de Juny de 2021

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Marta', with a large, sweeping flourish underneath.

Marta Pinyol i Pinel

AGRAÏMENTS

En primer lloc, m'agradaria agrair a la Unitat de Recerca en Lípids i Arterioesclerosi (URLA) per donar-me l'oportunitat de realitzar les pràctiques externes i el treball de fi de grau al seu grup i deixar-me formar part de l'equip durant l'estada.

També voldria agrair als meus tutors acadèmics i supervisors, Montse Guardiola i Josep Ribalta, per confiar en mi i donar-me la possibilitat de treballar en la seva línia de recerca, per aportar-me nous coneixements, i per guiar-me i aconsellar-me durant l'elaboració del treball.

M'agradaria donar les gràcies a l'estudiant de doctorat Pere Rehues per resoldre tots els meus dubtes i ajudar-me tant en el desenvolupament del treball com en la part experimental.

Per últim, gràcies a les tècniques de laboratori Roser Rosales i Yaiza Esteban per mostrar-me el funcionament dels equips del laboratori així com ensenyar-me noves tècniques, i ajudar-me sempre que ho he necessitat.

ABREVIACIONS

apoA1	Apolipoproteïna A1
apoAII	Apolipoproteïna AII
apoB	Apolipoproteïna B
apoCII	Apolipoproteïna CII
apoCIII	Apolipoproteïna CIII
apoE	Apolipoproteïna E
Dab2	<i>DAB adaptor protein 2</i>
ECs	Cèl·lules endotelials
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
HDL	<i>High-density lipoprotein</i>
HDL-C	Colesterol de les <i>high-density lipoprotein</i>
HFH	Hipercolesterolèmia familiar heterozigota
IDL	<i>Intermediate-density lipoprotein</i>
IDL-C	Colesterol de les <i>intermediate-density lipoprotein</i>
IMC	Índex de massa corporal
iPCSK9	Inhibidors de la proproteïna convertasa subtilisina/kexina tipus 9
LCAT	<i>Lecithin cholesterol acyltransferase</i>
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i>
LDL-C	Colesterol de les <i>low-density lipoprotein</i>
LDL-P	Partícules de <i>low-density lipoprotein</i>
LDLR	Receptor de les <i>low-density lipoprotein</i>
LPL	Lipoproteïna lipasa
MFI	Mitjana d'intensitat de fluorescència
NaBr	Bromur de sodi
OMS	Organització Mundial de la Salut
OM3-CA	<i>Omega-3 carboxylic acids</i>
oxLDL	<i>Low-density lipoprotein oxidades</i>
PBS	Solució tampó salina amb fosfat
PCSK9	Proproteïna convertasa subtilisina/kexina tipus 9
PPAR α	<i>Proliferator activated receptor alfa</i>
ROS	Espècies reactives de l'oxigen
sdLDL	<i>Low-density lipoprotein</i> petites i denses
SMCs	Cèl·lules del múscul llis
SREBP	<i>Sterol-regulatory element-binding protein</i>
TRLs	Lipoproteïnes riques en triglicèrids

VLDL	<i>Very low-density lipoprotein</i>
VLDL-C	<i>Colesterol de les very low-density lipoprotein</i>

ÍNDIX

1.	Dades del centre.....	1
2.	Resum.....	2
3.	Introducció.....	3
3.1.	Les malalties cardiovasculars.....	3
3.2.	El colesterol i les lipoproteïnes.....	3
3.3.	L'arterioesclerosi.....	6
3.4.	Metabolisme de les LDL.....	8
3.5.	Rol de PCSK9.....	8
3.5.1.	Inhibidors de PCSK9.....	9
3.6.	L'apolipoproteïna CIII.....	11
4.	Interès, hipòtesi i objectius.....	14
4.1.	Interès del treball.....	14
4.2.	Hipòtesi.....	14
4.3.	Objectius.....	14
5.	Metodologia.....	15
5.1.	Selecció dels participants.....	15
5.2.	Obtenció de les mostres de plasma.....	15
5.3.	Ultracentrifugació seqüencial.....	15
5.4.	Anàlisi de lípids i apolipoproteïnes.....	17
5.5.	Diàlisi.....	17
5.6.	Assaig ELISA multiplex.....	18
6.	Resultats.....	21
6.1.	Característiques basals.....	21
6.2.	Anàlisi dels canvis en el perfil lipídic.....	22
6.3.	Anàlisi dels canvis en les concentracions de les apolipoproteïnes.....	23
6.4.	Anàlisi dels canvis en les concentracions de les apolipoproteïnes per partícula lipoproteica.....	27
7.	Discussió.....	28
8.	Conclusions.....	32
9.	Autoavaluació.....	33
10.	Bibliografia.....	34
11.	ANNEXOS.....	38
ANNEX 1:	Composició de les solucions.....	38
ANNEX 2:	Figures de l'anàlisi individual dels canvis en les concentracions de les apolipoproteïnes de les fraccions lipoproteiques.....	39

1. DADES DEL CENTRE

L'Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV) és una institució dedicada a la recerca biomèdica i de la qual en formen part l'Hospital Universitari Joan XXIII de Tarragona, l'Hospital Verge de la Cinta de Tortosa, l'Hospital Universitari Sant Joan de Reus, l'Institut Pere Mata i la Universitat Rovira i Virgili (URV). S'organitza en 4 àrees d'investigació entre les quals es troba l'àrea de Nutrició i metabolisme que inclou la Unitat de Recerca en Lípids i Arterioesclerosi (URLA).

Aquest treball es basa en les pràctiques curriculars realitzades a la URLA que es troba a la Facultat de Medicina de la URV. La URLA està acreditada com a grup d'investigació consolidat per la Generalitat de Catalunya (SGR), i també forma part del CIBER de Diabetis i Malalties Metabòliques Associades (CIBERDEM) i de la URV.

La URLA és una unitat d'investigació clínica i bàsica que té com a principal objectiu la investigació de les alteracions del metabolisme lipídic i les conseqüències que produeixen en l'organisme, principalment les malalties cardiovasculars. La seva recerca es coordina amb la Unitat de Medicina Vasculat i Metabolisme (UVMASMET).

Les pràctiques i l'estudi que engloba aquest treball s'han dut a terme en la línia d'investigació de característiques aterogèniques de les lipoproteïnes. Aquesta línia es centra en l'estudi de noves propietats aterogèniques de les lipoproteïnes com són el diàmetre, el nombre de partícules, la càrrega elèctrica neta, les proteoformes d'apolipoproteïna CIII o el contingut en lipopolisacàrid i els seus components.

2. RESUM

L'elevada concentració de colesterol en sang és el principal factor de risc de patir malalties cardiovasculars. Les *low-density lipoproteins* (LDL) són les principals transportadores de colesterol. Els inhibidors de PCSK9 (iPCSK9) són anticossos monoclonals anti-PCSK9 capaços de reduir un 60% els nivells de colesterol en sang. La hipòtesi que es planteja és que els iPCSK9 provoquen canvis en el perfil lipídic i en la composició de les lipoproteïnes a més de reduir el colesterol LDL (LDL-C). S'han estudiat 16 pacients hipercolesterolèmics que han sigut tractats amb iPCSK9 i s'han obtingut mostres de sang abans i 4 setmanes després del tractament. La metodologia ha consistit en separar les fraccions lipoproteiques per ultracentrifugació seqüencial, obtenir el perfil lipídic, i mesurar la concentració de 6 apolipoproteïnes mitjançant assajos ELISA multiplex. Després del tractament, la concentració de colesterol total disminueix degut a un descens del 61,8% en les LDL ($p < 0,001$); 40,5% en les VLDL ($p = 0,005$); i 51,8% en les IDL ($p < 0,001$). Els triglicèrids no varien, i el colesterol HDL mostra una tendència a augmentar. L'apoB també disminueix globalment amb un descens del 62,9% en les LDL ($p < 0,001$); 39,4% en les VLDL ($p = 0,004$); i 28,7% en les IDL ($p = 0,017$). L'apoCIII disminueix un 58,2% en les LDL ($p < 0,001$). I l'apoAI tendeix a augmentar en les HDL. En conclusió, els iPCSK9 a més de reduir el LDL-C, redueixen la concentració de les apolipoproteïnes de les VLDL, IDL i LDL indicant una disminució del nombre de partícules lipoproteiques, i tenen una tendència a augmentar les partícules HDL.

Paraules clau: Risc cardiovascular, hipercolesterolèmia, inhibidors de PCSK9, *low-density lipoproteins*, apolipoproteïna.

3. INTRODUCCIÓ

3.1. LES MALALTIES CARDIOVASCULARS

Les malalties cardiovasculars són la principal causa de mortalitat al món i representen 1 de cada 3 morts cada any (1). Segons l'Organització Mundial de la Salut (OMS) la majoria de les morts causades per aquest tipus de desordres es podrien evitar aplicant les estratègies de prevenció adequades.

Els factors de risc que augmenten la probabilitat de patir malalties cardiovasculars, poden ser no modificables com són l'edat, el gènere i l'història familiar, o modificables que inclouen la hipertensió, el tabac, la hipercolesterolèmia, la diabetis, l'obesitat, els hàbits sedentaris, el consum d'alcohol i la dieta. D'entre aquests, s'ha demostrat que la hipercolesterolèmia, que consisteix en una alta quantitat de colesterol en sang, és un dels principals factors de risc en la progressió de l'arterioesclerosi i consegüentment, en el desenvolupament de malalties cardiovasculars com són la malaltia arterial coronària, la malaltia arterial perifèrica i la malaltia cerebrovascular (1,2).

Seguir un estil de vida saludable i l'ús de teràpies farmacològiques poden contribuir a la disminució dels factors de risc. S'ha demostrat que un dels tractaments farmacològics més eficients en prevenir les malalties cardiovasculars està dirigit a reduir els nivells de colesterol (1).

3.2. EL COLESTEROL I LES LIPOPROTEÏNES

El colesterol és un dels principals lípids que trobem a la sang juntament amb els triglicèrids i els fosfolípids, i pot ser transportat de forma lliure o esterificat, en unes associacions de lípids i proteïnes anomenades lipoproteïnes (3). Aquestes es poden trobar tant en la sang com en els teixits extravasculars (4).

L'estructura de la lipoproteïna està organitzada de tal manera que els lípids no solubles que la componen, que són el colesterol esterificat i els triglicèrids, es troben a l'interior de la partícula, i els fosfolípids i el colesterol lliure, que són lípids solubles, es troben formant una membrana hidrofílica. Les proteïnes polars que la formen s'anomenen apolipoproteïnes i es localitzen a la superfície de la partícula (3).

Hi ha cinc tipus de lipoproteïnes que es diferencien segons la seva densitat, que és resultat de la quantitat relativa de lípids i apolipoproteïnes que contenen, i la seva mida. Aquests són els quilomicrons, les *very low-density lipoproteins* (VLDL), les *intermediate density-lipoproteins* (IDL), les *low-density lipoproteins* (LDL) i les *high-density lipoproteins* (HDL) (Taula 1). Un altre tipus de lipoproteïna és la lipoproteïna (a) que

consisteix en una LDL amb una apoB100 unida covalentment a una apolipoproteïna (a), i està associada al risc cardiovascular. Els diversos tipus de lipoproteïnes també es poden dividir en subclasses (grans, mitjanes i petites) segons la seva mida i densitat. Les VLDL, IDL i LDL són pro-aterogèniques, mentre que les HDL són anti-aterogèniques (3). La diferència en la densitat ha estat el que tradicionalment ha permès separar les diverses lipoproteïnes de la sang per ultracentrifugació (4).

Cada lipoproteïna conté unes apolipoproteïnes específiques que a banda de la funció estructural, tenen un paper important en el metabolisme lipídic (3).

L'apolipoproteïna (apo) AI té un rol estructural en les HDL com a principal proteïna de la seva composició. Aquesta apolipoproteïna promou la sortida de colesterol des de l'interior cel·lular. A més, també promou l'esterificació del colesterol activant l'enzim *lecithin cholesterol acyltransferase* (LCAT). Les HDL tenen propietats anti-aterogèniques, així doncs, una alta concentració d'apoAI es poden correlacionar amb alts nivells d'HDL i a un menor risc cardiovascular (3).

L'apoAII és la segona proteïna principal de les HDL. A diferència de l'apoAI, no es coneix bé la seva funció en el metabolisme lipídic i la relació que té amb l'arterioesclerosi, però sí que s'ha vist que pot ser un bon indicador del risc cardiovascular (3).

Les VLDL, les IDL, i les LDL contenen una molècula d'apoB100 en la seva estructura. La funció principal d'aquesta apolipoproteïna és reconèixer i unir-se al receptor de les LDL (LDLR) permetent la internalització de les lipoproteïnes (3). Mutacions en el gen que codifica per aquesta apolipoproteïna causen hipercolesterolèmia familiar (5). Al haver-hi una única molècula d'apoB100 per partícula lipoproteica, serveix com a marcador del número de lipoproteïnes circulants, de manera que una alta concentració d'apoB100 al plasma està correlacionada amb alts nivells de partícules lipoproteiques aterogèniques (3).

L' apoCII es troba en els quilomicrons, les VLDL i les HDL. El seu rol principal és l'activació de l'enzim lipoproteïna lipasa (LPL) encarregat de degradar els triglicèrids del plasma. S'ha vist que mutacions de pèrdua de funció del gen que codifica per l'apoCII són causants de la hipertrigliceridèmia, i conseqüentment, del risc de patir malalties cardiovasculars (3). La etiologia de la hipertrigliceridèmia més comuna és la poligènica, mentre que les variants genètiques rares són característiques del síndrome de la quilomicronèmia familiar que té menys prevalença (6).

L'apoCIII, de la mateixa forma que l'apoCII, està associada als quilomicrons, les VLDL i les HDL. Alts nivells d'apoCIII contribueixen a la hipertrigliceridèmia (3). A més, també

poden contribuir al desenvolupament de l'arterioesclerosi i a la diabetis, i consegüentment estar associats amb el risc cardiovascular (7).

Les lipoproteïnes que contenen l'apoE en la seva composició són els quilomicrons, VLDL, IDL i HDL. Té tres variants genètiques anomenades ApoE2, ApoE3 i ApoE4. L'ApoE4 té un rol com a lligand de les lipoproteïnes per LDLR que s'uneix amb afinitat a l'apoE. Tot i que l'isoforma E4 té més afinitat pel LDLR, s'associa a nivells alts de LDL al plasma sent un risc per l'arterioesclerosi. L'ApoE4 també s'ha vist associada amb l'Alzheimer, i és un indicador de risc cardiovascular en pacients amb diabetis. L'ApoE2 és una altra variant genètica que té poca afinitat per LDLR, i la seva homozigosi pot produir disbetalipoproteinèmia familiar degut a l'acumulació de VLDL aterogèniques al plasma, i per tant, augmenta el risc cardiovascular (3,8).

Taula 1. Densitat, mida, lípids i apolipoproteïnes principals dels diferents tipus de lipoproteïnes. Taula adaptada de (3).

Lipoproteïna	Densitat (g/mL)	Mida (nm)	Lípids principals	Apolipoproteïnes principals
Quilomicrons	< 0,930	75 – 1200	Triglicèrids	ApoB48, ApoC, ApoE, ApoAI, ApoAII, ApoAIV
VLDL	0,930 – 1,006	30 – 80	Triglicèrids	ApoB100, ApoE, ApoC
IDL	1,006 – 1,019	25 – 35	Triglicèrids i colesterol	ApoB100, ApoE, Apo C
LDL	1,019 – 1,063	18 – 25	Colesterol	ApoB100
HDL	1,063 – 1,210	5 – 12	Colesterol i fosfolípids	ApoAI, ApoAII, ApoC, ApoE

Els quilomicrons transporten els triglicèrids exògens de la dieta des de l'intestí fins al fetge. Les VLDL també transporten triglicèrids, però sintetitzats de manera endògena, des del fetge fins a la sang on la seva lipòlisi dona lloc a les IDL. Aquestes poden o bé transportar el seu contingut al fetge, o que la seva degradació juntament amb l'aportació d'esters de colesterol de les HDL, generi les LDL que són les principals responsables del transport de colesterol fins als teixits perifèrics. Les LDL romanents es dirigeixen al fetge i són internalitzades mitjançant el receptor LDLR. Les HDL estan involucrades en el transport revers del colesterol, des dels teixits perifèrics cap al fetge. (4)

3.3. L'ARTERIOESCLEROSI

L'arterioesclerosi és una malaltia inflamatòria crònica i progressiva que afecta a les artèries. Implica diversos processos com són la disfunció endotelial, la retenció i oxidació de les LDL i la seva captació pels macròfags, la proliferació de les cèl·lules musculars, i la diferenciació dels fibroblasts (Figura 1) (9). Tots els mecanismes implicats porten a la formació d'una placa d'ateroma que acaba obstruint i endurent les artèries.

El primer pas en la patogènesi de l'arterioesclerosi és la disfunció de l'endoteli. Aquest procés engloba la producció d'espècies reactives de l'oxigen (ROS) i de citocines inflamatòries, la retenció de les lipoproteïnes degut a un augment de la permeabilitat dels vasos, i la infiltració de leucòcits (1,9).

En aquestes circumstàncies, les LDL són capaces d'acumular-se i quedar retingudes a l'espai subendotelial. Les citocines inflamatòries generades indueixen l'expressió de quimiocines que provoquen la migració dels monòcits a la capa íntima on es diferencien a macròfags. Les LDL retingudes pateixen modificacions oxidatives que fan que aquestes lipoproteïnes siguin captades pels receptors scavenger dels macròfags, produint l'acumulació d'oxLDL a l'interior d'aquestes cèl·lules. Els macròfags es converteixen en cèl·lules escumoses i consegüentment es forma la placa d'ateroma, que és considerada la lesió primerenca arterioescleròtica (1,9). Durant la progressió i agreujament de l'arterioesclerosi, els macròfags moren. La seva insuficient eferocitosi dona lloc a la formació d'un nucli necròtic a la placa d'ateroma, en part degut a l'acumulació de cristalls de colesterol (1).

Les cèl·lules del múscul llis (SMCs) poden passar de fenotip contràctil a proliferatiu i contribuir a la progressió de la malaltia migrant de la túnica mitjana a la capa íntima on proliferen. Allí, tenen una alta capacitat per sintetitzar components de la matriu extracel·lular promovent la formació de la placa fibrosa (9).

Les cèl·lules adventícies també tenen un rol en el desenvolupament de l'arterioesclerosi. La diferenciació dels fibroblasts que formen aquesta capa de teixit connectiu a miofibroblasts, causa l'increment de la producció de factors de creixement i de citocines inflamatòries (9).

En estadis avançats de la malaltia es pot produir la ruptura de la placa d'ateroma i causar trombosi (1,9).

Les LDL són lipoproteïnes aterogèniques i la seva acumulació a l'espai subendotelial permet que es dipositi el colesterol que transporten. Així doncs, alts nivells de colesterol

de les LDL (LDL-C) en el plasma és un factor de risc cardiovascular, i la reducció de LDL-C és l'estratègia més utilitzada per a disminuir aquest risc (1).

Com ja s'ha comentat, a banda de la concentració de LDL-C, hi ha altres propietats de les lipoproteïnes que contribueixen al risc cardiovascular. S'ha vist que el diàmetre de les partícules lipoproteïques pot facilitar el desenvolupament de la lesió arterioescleròtica, concretament, les LDL petites i denses (sdLDL) tenen més facilitat per quedar retingudes a l'endoteli de l'artèria, de manera que estan associades a un augment del risc vascular. Per altra banda, les VLDL grans tenen propietats aterogèniques degut a que a partir d'aquestes es formen les sdLDL. A més, la subclasse d'HDL grans són més protectores per l'arterioesclerosi respecte a les HDL petites (10). Una altra propietat és el nombre de partícules lipoproteïques. En els casos en que hi ha discordança entre els nivells de LDL-C i el nombre de partícules LDL (LDL-P), LDL-P és un millor predictor del risc cardiovascular (11). El nombre de partícules HDL també es un bon indicador de risc, i està inversament correlacionat amb el desenvolupament de l'arterioesclerosi (10).

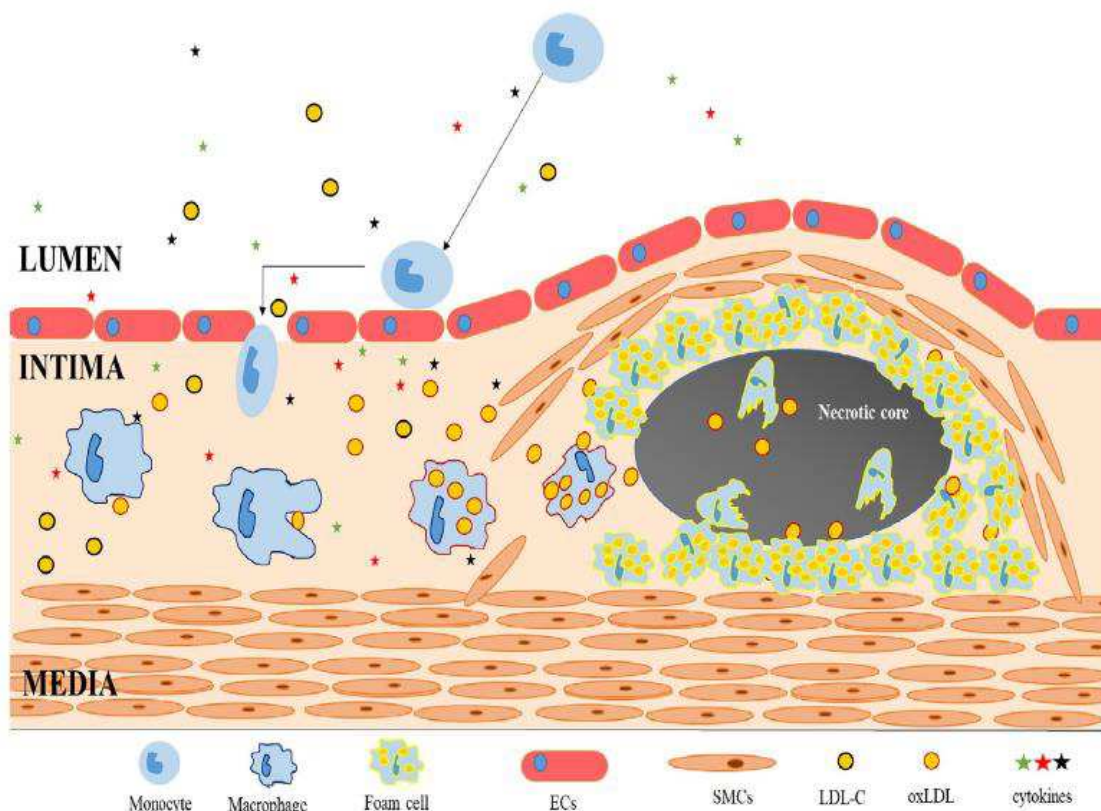


Figura 1. Cèl·lules que contribueixen en al desenvolupament de l'arterioesclerosi i a la progressió de la malaltia amb la formació del nucli necròtic (14).

3.4. METABOLISME DE LES LDL

Les LDL són lipoproteïnes riques en colesterol que contenen una única molècula d'apoB100 rodejant la monocapa fosfolipídica de la partícula (12).

El 1982, Goldstein i Brown van ser els primers en identificar el receptor de les LDL (LDLR). Aquest receptor forma part d'una família de receptors que estan compostos per un domini transmembranal, un domini extracel·lular amb llocs d'unió al lligand, i una cua citoplasmàtica. El receptor LDLR permet mantenir els nivells adequats d'aquestes lipoproteïnes en circulació (4,12,13).

Les LDL s'uneixen al receptor LDLR de la superfície cel·lular mitjançant l'apoB100 (13), i el complex LDL-LDLR format és endocitat a través de vesícules recobertes de clatrina gràcies a la seqüència NPxY situada a la cua citoplasmàtica del receptor. A aquesta seqüència es poden unir les proteïnes adaptadores *DAB adaptor protein 2* (Dab2) i ARH que tenen una funció en la internalització de LDLR en alguns tipus cel·lulars. En els hepatòcits, el complex de proteïnes adaptadors (AP-2) és imprescindible per a l'endocitosi de LDLR ja que permet la internalització d'aquest a través de la unió amb ARH (4,12).

Posteriorment, la vesícula es fusiona amb els endosomes primerencs. El pH àcid dels endosomes provoca que el receptor LDLR es dissociï de les LDL, i que aquestes siguin dirigides cap als endosomes tardans i finalment als lisosomes, per a que les cèl·lules obtinguin el colesterol. Per altra banda, el LDLR pot ser o bé reciclat fins a 100 vegades a la membrana cel·lular, o dirigit als lisosomes, juntament amb les LDL, per a la seva degradació (4,12).

Quan els nivells de colesterol cel·lular són baixos, el factor de transcripció SREBP2 regula l'expressió de LDLR, augmentant la síntesi i la sortida de colesterol, i mantenint així els nivells adequats de colesterol a la cèl·lula (4).

3.5. ROL DE PCSK9

La proproteïna convertasa subtilisina/kexina tipus 9 (PCSK9) forma part de la família proproteïna convertasa, composta per proteases serines que degraden els enllaços peptídics dels seus substrats activant-los. Es sintetitza principalment al fetge però també a l'intestí prim, als ronyons, a les cèl·lules inflammatòries com són els macròfags, a les cèl·lules endotelials dels vasos sanguinis (ECs) i a les SMCs. La proteïna és sintetitzada com a zimogen soluble que està formada per 692 aminoàcids i té una mida de 75 kDa. Al reticle endoplasmàtic, aquesta proteïna pateix un processament autocatalític donant lloc a una proteïna madura de 60kDa que es dirigeix a l'aparell de Golgi on serà

secretada a la sang. L'estructura d'aquest heterodímer està formada per 3 dominis que són un prodomini, un domini catalític i un domini C-terminal. El gen que codifica per la PCSK9 es troba al cromosoma 1 i la seva expressió està regulada per *sterol-regulatory element-binding protein 1* (SREBP1) i SREBP2 entre altres factors de transcripció. Les mutacions de guany de funció del gen PCSK9 estan associades amb la hipercolesterolèmia familiar, augmentant els nivells de LDL-C en plasma, i amb un alt risc de patir malalties cardiovasculars. Per altra banda, les mutacions de pèrdua de funció de PCSK9 són protectores contra les malalties cardiovasculars (14–16).

Aquesta proteïna és un regulador del metabolisme de les LDL ja que té la capacitat d'unir-se al receptor LDLR, localitzat a la superfície de la cèl·lula hepàtica, pel domini catalític. Quan el receptor LDLR és endocitat, el pH àcid de l'endosoma fa que l'afinitat entre aquestes dues proteïnes incrementi. Aquesta interacció evita el reciclatge normal del receptor cap a la superfície cel·lular, i el complex PCSK9-LDLR format es dirigeix cap al lisosoma per a la seva degradació (Figura 2A). D'aquesta manera, es redueix el nombre de LDLR a la superfície de la cèl·lula, s'evita la captació de LDL, i augmenten els nivells de LDL-C en plasma contribuint a la severitat de la hipercolesterolèmia. (14–16).

La PCSK9 del plasma la podem trobar o bé com a *furin-cleaved heterodimer* o com a heterodímer intacte que és la forma més activa. Les LDL són capaces d'unir-se principalment a la segona forma i regular la seva funció fent que tingui més afinitat pel receptor LDLR (15).

La unió entre PCSK9 i LDLR no només causa la degradació del receptor regulant els nivells de LDL-C en circulació, sinó que també permet la internalització de PCSK9 per tal de regular la seva concentració al plasma (15).

A banda d'aquesta via exògena, la PCSK9 pot degradar el receptor LDLR per una via endògena un cop sintetitzades. Aquesta via depèn del transport de vesícules cobertes de cadena lleugera de clatrina entre la part trans de l'aparell de Golgi i el lisosoma (14).

3.5.1. INHIBIDORS DE PCSK9

S'ha vist que reduint els nivells de LDL-C es redueix el risc de patir malalties cardiovasculars i la mortalitat (15). Els principals fàrmacs que redueixen el colesterol són les estatines, que inhibeixen la síntesi de colesterol, i l'ezetimibe que evita l'absorció de colesterol a l'intestí. Degut al rol de PCSK9 en l'augment de colesterol en el plasma, recentment s'han desenvolupat inhibidors de PCSK9 (iPCSK9), capaços d'augmentar el

reciclatge de LDLR a la membrana de les cèl·lules hepàtiques permetent una major internalització de LDL-C i així reduir la concentració en sang (5).

Hi ha diverses maneres d'inhibir la proteïna PCSK9, i per tant reduir la seva activitat. D'aquestes, la única estratègia farmacològica que ha estat aprovada són els anticossos monoclonals anti-PCSK9, però hi ha altres inhibidors que es troben en procés de desenvolupament com són els siRNA, com inclisiran, que interfereixen en la producció intracel·lular de PCSK9 (Figura 2B1), les adnectines, les vacunes i els inhibidors orals (17).

S'han desenvolupat tres anticossos monoclonals que són l'evolocumab, l'alirocumab i el bococizumab, dels quals només els dos primers es troben actualment disponibles en el mercat ja que bococizumab induïa la producció d'anticossos en contra del fàrmac i es va abandonar el seu desenvolupament. L'alirocumab i l'evolocumab són anticossos totalment humanitzats que s'administren de forma subcutània com a monoteràpia o combinats amb fàrmacs que també redueixen el colesterol com són les estatines i l'ezetimibe (5,15,17). Aquests anticossos mostren una alta eficàcia en la reducció de LDL-C i en la disminució del risc cardiovascular (18).

Els avantatges d'aquest tractament és que permet una disminució major de LDL-C (fins al 60%) respecte als fàrmacs existents, en tots els pacients i no té efectes secundaris. La limitació que té és el seu cost fent que l'accés estigui molt restringit (15). És per això que per ara només s'administren en casos severos d'hipercolesterolèmia que són els pacients amb hipercolesterolèmia familiar.

El mecanisme d'acció dels anticossos monoclonals anti-PCSK9 consisteix en unir-se amb una alta afinitat i neutralitzar la proteïna PCSK9 extracel·lular, disminuint la concentració de PCSK9 capaç d'interaccionar amb el receptor LDLR. Així doncs, el receptor pot reciclar-se a la membrana cel·lular i augmentar la captació de LDL, reduint els nivells de LDL-C en sang (Figura 2B2) (5).

Tenen efectes protectors per l'arterioesclerosi ja que a més de reduir els nivells de LDL-C, redueixen els nivells d'apoB, de triglicèrids, i de colesterol no HDL. A més, poden incrementar el colesterol de les HDL i poden reduir la concentració de lipoproteïna (a) que és també un factor de risc cardiovascular (5,19).

Els anticossos monoclonals anti-PCSK9 són capaços de reduir la concentració de LDL-C, per tant poden ser una alternativa per als pacients intolerants a les estatines. També són utilitzats per al tractament de la hipercolesterolèmia familiar i per al tractament de

l'arterioesclerosi. Aquest tipus de teràpia pot evitar la necessitat d'afèresi en molts pacients. A més, s'està suggerint com a tractament en pacients amb diabetis (5,19).

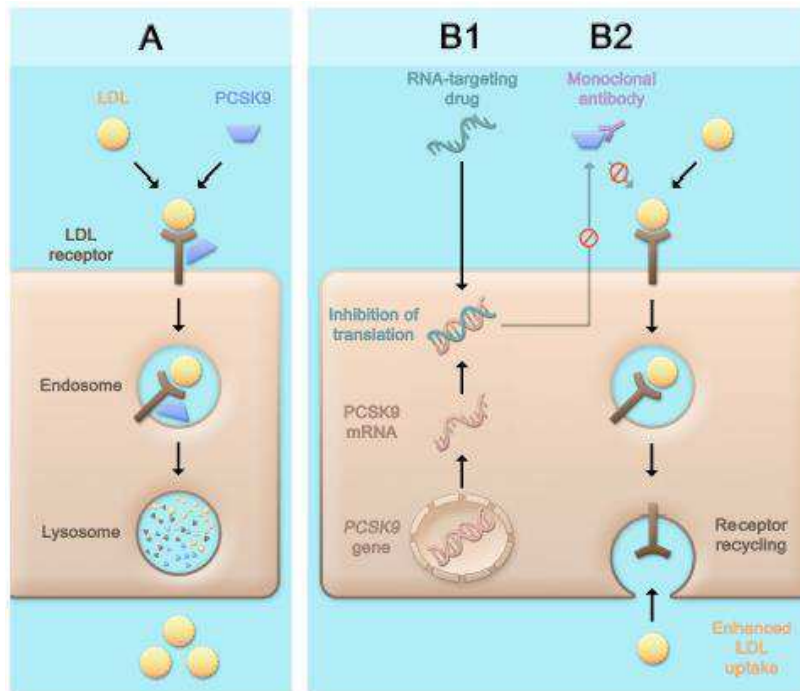


Figura 2. La unió de PCSK9 a LDLR produeix la degradació del receptor al lisosoma (A). Els fàrmacs que tenen com a diana el mRNA de PCSK9 interfereixen en la seva producció (B1). Els anticòssos monoclonals anti-PCSK9 neutralitzen la PCSK9.(B2) (5)

3.6. L'APOLIPOPROTEÏNA CIII

En relació a les malalties cardiovasculars, l'apolipoproteïna CIII (apoCIII) està guanyant cada cop més interès. El 1969, Brown et al. van descobrir l'apoCIII regulant les lipoproteïnes riques en triglicèrids (TRLs) a la sang. És una proteïna formada per 79 aminoàcids amb dues hèlix amfipàtiques en la seva estructura, i que es sintetitza principalment al fetge i en menor proporció a l'intestí. Pot patir modificacions post-traduccionalment a la treonina 74 generant diverses glicofomes. Es troba unida a les TRLs (quilomicrons i VLDL) i a les HDL, i en menor quantitat a les LDL. Aquesta apolipoproteïna participa en diversos processos i té una importància fisiològica (7,20,21).

S'ha vist que mutacions de pèrdua de funció en el gen que codifica per l'apoCIII estan relacionades amb la reducció dels nivells de triglicèrids i són cardioprotectors (22). Alts nivells d'apoCIII estan associats amb la hipertriglicèridèmia i amb el risc cardiovascular, per aquesta raó és considerada una diana terapèutica per a la prevenció de malalties cardiovasculars (7).

L'apoCIII és capaç d'augmentar la concentració de triglicèrids a la sang de les següents maneres:

- **Inhibició de la lipòlisi de les TRLs:** L'enzim lipoproteïna lipasa (LPL) hidrolitza els triglicèrids continguts en les TRLs. L'apoCIII és capaç d'inhibir aquest procés de dues formes diferents: una consisteix en dificultar la unió entre les TRL i la cèl·lula on es troba l'enzim, i l'altra en desplaçar l'apoCII, que activa l'acció de l'enzim LPL, de la membrana de les TRL (7,20,21).
- **Alteració de la internalització de lipoproteïnes romanents:** L'apoCIII evita la captació de TRL romanents al fetge interferint en la funció de l'apoE que actua com a lligand d'unió pels receptors de les cèl·lules hepàtiques. Així doncs, si aquestes lipoproteïnes contenen alts nivells d'apoCIII respecte d'apoE, són eliminades de la circulació de forma menys eficient (7,20,21).
- **Secreció de les VLDL:** L'augment de la concentració d'apoCIII incrementa la secreció de les VLDL del fetge i per tant la quantitat de triglicèrids en circulació (7,20).

L'apoCIII té un rol en el desenvolupament de l'arterioesclerosi ja que augmenta la retenció de les LDL riques en apoCIII a la paret dels vasos degut a que són més afins pels proteoglicans, i l'agregació d'aquestes per les esfingomielinases. La composició de les HDL riques en apoCIII també varia afectant al seu paper cardioprotector. L'apoCIII té un paper en la resposta inflamatòria ja que promou l'expressió de les molècules d'adhesió en les cèl·lules endotelials i en els monòcits, i també promou la unió entre aquests dos tipus cel·lulars permetent la migració dels monòcits a la capa íntima (7,20,21,23).

A banda del paper conegut d'aquesta apolipoproteïna sobre el risc cardiovascular, l'apoCIII també té un paper important en la diabetis de tipus 1 i tipus 2. En condicions normals, la transcripció d'ApoCIII està regulada segons l'estat metabòlic de la cèl·lula: nivells alts de glucosa augmenten la transcripció d'ApoCIII, en canvi la insulina disminueix l'expressió de l'ApoCIII al fetge. En condicions de deficiència d'insulina o de resistència a la insulina, la transcripció d'ApoCIII es veu augmentada (24). En la diabetis tipus 1 té un rol en relació amb l'apoptosi de les cèl·lules beta: nivells alts d'apoCIII produeixen la hiperactivació dels canals de Ca^{2+} activats per voltatge, incrementant els nivells de Ca^{2+} al citoplasma i desencadenant mecanismes que provoquen l'apoptosi de la cèl·lula beta. En la diabetis tipus 2, porta a la disfunció de les cèl·lules beta: L'augment de la producció d'apoCIII degut a la resistència a la insulina en l'illot pancreàtic provoca un increment dels nivells de Ca^{2+} i promou la inflamació (25). Altres mecanismes

inclouen l'augment de la resistència a la insulina, la disfuncionalitat de les HDL i la disminució de les seves propietats antiglicèmiques, i la inhibició de la LPL a l'hipotàlem que pot arribar a causar obesitat (24).

Actualment, hi ha diverses teràpies disponibles per a reduir els nivells d'apoC-III al plasma. Aquestes són agonistes del *proliferator activated receptor alfa* (PPAR α), fibrats, niacina, estatines, *omega-3 carboxylic acids* (OM3-CA), i teràpies emergents com són els oligonucleòtids antisentit com volanesorsen (7,20).

4. INTERÈS, HIPÒTESI I OBJECTIUS

4.1. INTERÈS DEL TREBALL

Els iPCSK9 són una estratègia farmacològica emergent que redueix els nivells de colesterol en sang, i per tant el risc cardiovascular, de forma molt eficient respecte a les estatines, ja que redueixen un 60% els nivells de LDL-C a tots els pacients i no causa efectes secundaris. Aquest treball es centra en estudiar quins altres efectes poden tenir els anticossos monoclonals anti-PCSK9 en el perfil lipídic i en les diferents lipoproteïnes, concretament en les apolipoproteïnes, en 16 pacients hipercolesterolèmics, a banda de l'efecte principal ja conegut que és la reducció de LDL-C. Específicament, es vol conèixer l'efecte en l'apolipoproteïna CIII degut al seu rol en diversos processos responsables de la hipertrigliceridèmia, la diabetis i l'arterioesclerosi, i conseqüentment, en el risc de patir malalties cardiovasculars.

4.2. HIPÒTESI

La hipòtesi que es planteja en aquest estudi és que els anticossos monoclonals anti-PCSK9 provoquen canvis en el perfil lipídic i en la composició de les lipoproteïnes a més de reduir els nivells de colesterol de les LDL.

4.3. OBJECTIUS

Els objectius d'aquest treball inclouen:

- Obtenir el perfil lipídic de les mostres de plasma i de les diferents fraccions lipoproteiques.
- Mesurar la concentració de 6 apolipoproteïnes en les fraccions lipoproteiques.
- Comparar el perfil lipídic, la concentració de les apolipoproteïnes, i la concentració de les apolipoproteïnes per partícula lipoproteica, abans i després del tractament amb iPCSK9.

5. METODOLOGIA

5.1. SELECCIÓ DELS PARTICIPANTS

La població d'interès per a aquest estudi són persones amb dislipèmia que tenen nivells de colesterol molt alts, i que tenen diagnòstic d'hipercolesterolèmia familiar (26). S'han reclutat en total 16 pacients que compleixen amb aquest perfil, d'aquests, 13 van ser seleccionats a Reus i 3 a la Coruña. Tots ells van rebre el tractament amb iPCSK9. Els participants van ser citats dues vegades, la primera abans de l'administració del fàrmac, i la segona 4 setmanes després de l'inici del tractament. En ambdues ocasions es va obtenir una mostra de sang del pacient.

5.2. OBTENCIÓ DE LES MOSTRES DE PLASMA

Les mostres de sang es van prendre en dejú, en tubs d'EDTA-Na₂. Aquestes mostres s'han centrifugat a 4 °C i 1500 rpm durant 15 minuts. S'ha separat el plasma de les mostres i s'han realitzat alíquotes que han estat emmagatzemades a -80 °C.

5.3. ULTRACENTRIFUGACIÓ SEQÜENCIAL

La ultracentrifugació seqüencial és el mètode tradicional de separació de lipoproteïnes, i es basa en separar-les segons la seva densitat (4). S'ha utilitzat aquesta tècnica per a aïllar les diferents fraccions de lipoproteïnes (VLDL, IDL, LDL i HDL) de les 38 mostres de plasma, fent ús d'una ultracentrífuga KONTRON amb un rotor d'angle fixe Kontron 45.6.

En primer lloc, es preparen les solucions de densitat necessàries per a separar les lipoproteïnes d'acord amb la composició que es mostra a l'Annex 1, i s'ajusta el seu pH a 7,4.

Per a la ultracentrifugació seqüencial, es descongelen 2,5 mL de cada mostra. D'aquests, s'introdueixen 2 mL en un tub poliallomer de 6,5 mL. La quantitat restant s'utilitzarà per al posterior anàlisi de lípids i apolipoproteïnes del plasma.

Després de cada ultracentrifugació, el protocol a seguir per a la recuperació de la fracció lipoproteica separada és el mateix. Es prenen 2 mL de la superfície de cada tub amb una pipeta Pasteur de vidre i s'introdueixen en un matràs aforat de 2 mL. Aquests 2 mL contindran la fracció en qüestió de la mostra i part de la solució salina. Els 2 mL es guarden en dues alíquotes d'1 mL que es congelen a -80 °C per a posteriors anàlisis. Un cop extreta la fracció, es neteja la part de dalt dels tubs de poliallomer i els taps per tal d'evitar possibles contaminacions en les següents ultracentrifugacions, es mesclen

amb una pipeta els 3 mL restants dels tubs, i es guarden a 4°C fins a la realització de la següent ultracentrifugació.

En primer lloc, per a la separació de la fracció de VLDL, s'afegeixen 3 mL de solució salina de densitat 1,006 g/mL en capa sobre els 2 mL de plasma de cada tub poliallomer, de manera que la solució quedi a la part superior del tub i no es barregi amb el plasma. Aquesta solució permetrà separar les VLDL ja que tenen una densitat d'entre 0,960 i 1,006 g/mL. Així doncs, quan es centrifugui, la solució salina es trobarà entre el plasma i la fracció de VLDL. Posteriorment, s'equilibren els tubs poliallomer dos a dos en una balança fent ús de la solució de densitat 1,006 g/mL i amb una pipeta Pasteur de plàstic. A continuació, es tapen els tubs, s'introdueixen al rotor i s'ultracentrifuguen a 37.000 rpm durant 16 hores i 8°C. Un cop finalitzada la ultracentrifugació, s'obtenen els tubs, es recupera la fracció de VLDL de cada tub i s'emmagatzema seguint els passos descrits anteriorment.

En el cas de les IDL, com presenten una densitat d'entre 1,006 g/mL i 1,019 g/mL, s'introdueix 1 mL de solució de densitat 1,006 g/mL i 1 mL de solució de densitat 1,071 g/mL sobre els 3 mL que van quedar en els tubs després de l'extracció de les VLDL, per tal que la densitat resultant de la mostra sigui de 1,019 g/mL. Posteriorment, s'equilibren els tubs amb la solució de densitat més baixa que és la de 1,006 g/mL. Seguidament, es barregen els tubs per inversió, i s'ultracentrifuguen a 37000 rpm, 20 hores i a 8°C. A l'acabar la ultracentrifugació, s'obté la fracció de les IDL de les mostres.

Les LDL tenen una densitat d'entre 1,019 i 1,063 g/mL, per tant s'afegeix 1 mL de solució de densitat 1,019 g/mL i 1 mL de solució de densitat 1,239 g/mL als tubs de poliallomer per tal d'obtenir una densitat resultant de 1,063 g/mL. A continuació, s'equilibren els tubs, es mesclen, i s'introdueixen a la ultracentrífuga a 37000 rpm, 20 hores i 8°C. Finalment, es recull la fracció LDL dels tubs.

Les HDL tenen una densitat molt alta, entre 1,063 g/mL i 1,2010 g/mL, és per això que la solució de densitat es prepara al moment degut a que conté una alta quantitat de sal que podria precipitar i variar la densitat. Per a preparar-la, es pesen 1,1 g de NaBr a la balança analítica i s'introdueixen en els tubs de poliallomer que s'enrasen fins a 5 mL amb la solució de densitat de 1,063 g/mL. A continuació, es mesclen bé els tubs per a que es dissolgui la sal, i s'ultracentrifuguen a 37000 rpm, 40 hores i 8°C. Al finalitzar el procés, es recupera la fracció HDL de cada mostra.

5.4. ANÀLISI DE LÍPIDS I APOLIPOPROTEÏNES

Prèviament a les ultracentrifugacions, es quantifiquen el colesterol i els triglicèrids de les mostres de plasma mitjançant un mètode enzimàtic colorimètric, i es mesura la concentració d'apolipoproteïna A i apolipoproteïna B per immunoturbidimetria. Un cop aïllades les fraccions lipoproteiques de les mostres de plasma, es quantifiquen el colesterol i els triglicèrids de cada fracció de la mateixa forma que s'ha fet amb el plasma.

Les mesures s'han dut a terme en l'auto-analitzador Cobas Mira-Plus (Roche Diagnosis, Espanya), fent ús de kits comercials (SPINREACT, Espanya) específics per a cada tipus d'anàlisi. Per a cada un dels dos mètodes s'ha utilitzat un control diferent, i s'han analitzat 160 µL de mostra de plasma o de fracció lipoproteica.

5.5. DIÀLISI

És imprescindible dialitzar totes les mostres de fraccions lipoproteiques per a que l'alta quantitat de sal que s'ha recuperat juntament amb les fraccions no interfereixi en l'anàlisi multiplex.

Per cada mL de mostra a dialitzar es preparen, aproximadament, 300 mL de PBS, excepte per les HDL que es necessiten 400 mL de PBS per mL de mostra degut a l'alta quantitat de sal que contenen. La composició necessària per a la preparació d'1L de PBS es mostra a l'Annex 1. El pH de la solució ha de ser de 7,4.

Per al procés de diàlisi, es descongela una de les alíquotes d'1 mL de cada fracció de totes les mostres a temperatura ambient. Posteriorment, es talla un fragment de membrana de diàlisi semipermeable (Medicell, United Kingdom) per a cada mostra. Les membranes s'introdueixen en un vas de precipitats amb aigua destil·lada i es deixa que bulli per tal d'eliminar el glicerol. A continuació, s'extreuen les membranes del vas de precipitats, es tanquen per un extrem amb una pinça, i s'introdueix 1 mL de mostra a l'interior de la membrana. Posteriorment, es tanquen les membranes per l'altre extrem i s'introdueixen al matràs aforat que conté el PBS, i es deixa en agitació a 4°C tota la nit. La diàlisi de les HDL es fa per separat respecte les demés fraccions per tal que la solució de PBS no es satura, i es deixa el matràs aforat en agitació durant 24 hores. Transcorregut aquest temps, s'extreuen les membranes del matràs i s'aboca el seu contingut en eppendorfs que es guarden a 4°C.

5.6. ASSAIG ELISA MULTIPLEX

En aquest estudi es vol determinar la concentració de 6 apolipoproteïnes que són l'apoAI, apoAII, apoB, apoCII, apoCIII i apoE, de les mostres de fracció lipoproteica aïllada. Aquest experiment es realitza mitjançant la tècnica ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) multiplex ja que permet quantificar molts analits a la vegada de forma ràpida i sensible utilitzant un format automatitzat de placa de 96 pous. S'utilitzen els kits comercials "MILLIPLEX MAP Human Apolipoprotein MAGNETIC BEAD PANEL" (Merck Millipore, Estats units) que permeten la mesura d'aquestes 6 apolipoproteïnes utilitzant microesferes magnètiques, i que es basen en la tecnologia Luminex xMAP. Aquests kits són compatibles amb l'aparell de mesura Luminex analyzer MAGPIX (Luminex corporation, Estats Units), i els resultats s'analitzen amb el software Luminex xPONENT (Luminex corporation, Estats Units). Els kits es guarden a 4°C fins al seu ús.

A les plaques s'inclouen les mostres, un blanc, dos controls de qualitat de concentració coneguda, i els 7 estàndards, sent l'estàndard 1 l'estàndard original i l'estàndard 7 el més diluït. Tots els pous es fan per replicat.

En primer lloc, es preparen les dilucions de les mostres de fraccions dialitzades, i els reactius tal i com es mostra a continuació:

- Les mostres es dilueixen amb una solució tampó a una dilució que permeti detectar adequadament totes les apolipoproteïnes que contenen. D'aquesta manera, les mostres d'HDL i LDL es dilueixen a 1:4000, i les fraccions de VLDL i IDL a 1:400.
- Els sis vials de microesferes magnètiques es mesclen al vòrtex durant 1 minut i s'introdueixen 150 µL de cada un en una ampolla habituada per a fer la barreja juntament amb 2,1 mL de diluent de les microesferes.
- Els estàndards han de tenir una dilució de 1:5, 1:25, 1:125, 1:625, 1:3.125 i 1:15.625, respectivament, a banda de l'estàndard original, a partir del qual es preparen les diverses dilucions.

Cada rentat de la placa, des que s'introdueixen les microesferes, es realitzarà de la mateixa manera. Primer de tot, es deixa reposar la placa en un imant durant 60 segons per a l'assentament complet de les microesferes. Seguidament, s'elimina el contingut de la placa decantant-la en un recipient habituat per a això, i colpejant-la amb cura en paper absorbent. A continuació, es treu la placa de l'imant, es renta afegint 200 µL de solució de rentat a cada pou, i es deixa en agitació durant 30 segons. Finalment, es torna a unir la placa a l'imant i s'elimina el contingut dels pous de la mateixa forma que abans.

En primer lloc, es renta la placa prèviament al seu ús, afegint 200 µL de solució tampó de rentat a cada pou, sellant la placa i mesclant-la en un agitador per a plaques durant 10 minuts a temperatura ambient. Posteriorment, s'elimina el contingut decantant la placa.

A continuació, s'addicionen 65 µL solució tampó d'assaig a tots els pous i 10 µL de solució tampó d'assaig als pous dels blancs. Seguidament, s'afegeixen 10 µL dels estàndards, 10 µL dels dos controls i 10 µL de les mostres diluïdes als pous corresponents (als pous del blanc s'hi afegeix solució tampó d'assaig). Per a l'addició de les microesferes, es mescla l'ampolla que conté la barreja al vòrtex, i s'afegeixen 25 µL a cada pou. La placa es sella i es cobreix amb paper d'alumini, i s'incuba en agitació durant 1 hora a temperatura ambient. Transcorregut aquest temps, s'elimina el contingut dels pous i es renta la placa tres vegades seguint el protocol descrit anteriorment.

Un cop finalitzats els rentats, s'introdueixen 50 µL d'anticòs de detecció als pous, es sella la placa i es cobreix amb paper d'alumini, i s'incuba en agitació durant 30 minuts a temperatura ambient. Després de la incubació, s'elimina el contingut de la placa i es renta la placa tres vegades seguint el protocol explicat.

A continuació, s'afegeixen 50 µL de streptavidina-ficoeritrina a cada pou i es torna a incubar la placa 30 minuts a temperatura ambient com al pas anterior. Seguidament, s'elimina el contingut dels pous i es renta la placa tres vegades d'acord amb el procés descrit.

Per a la lectura de la placa, s'addicionen 100 µL de *drive fluid* a tots els pous, i es resuspenen les microesferes en agitació durant 5 minuts. L'instrument Luminex analyzer MAGPIX llegeix la placa prenent 50 µL de cada pou i fent ús del software Luminex xPONENT que prèviament s'ha programat per a que analitzi les plaques d'aquest experiment.

L'anàlisi de les lectures obtingudes del software es realitza mitjançant una corba logística de 5 paràmetres per a calcular les concentracions dels analits en les mostres. Els valors de la mitjana d'intensitat de fluorescència (MFI) que surten extrapolats per dalt de la corba estàndard, es substitueixen pel valor de l'estàndard 1, i els valors extrapolats per sota de la corba estàndard es substitueixen per la meitat del valor de l'estàndard 7.

5.7. ANÀLISI ESTADÍSTIC

L'anàlisi estadístic de les dades s'ha realitzat amb el programa SPSS Statistics de l'empresa IBM. Al tenir una N molt petita de 16 pacients, s'han dut a terme tests estadístics no paramètrics.

Hi ha alguns valors de concentració d'apolipoproteïnes que s'han suprimit: La concentració d'apoE en les VLDL del pacient R110 s'ha omès degut a que el valor a temps 0 era molt elevat respecte als demés pacients, i totes les concentracions de les apolipoproteïnes de les HDL del pacient R104 també s'han suprimit perquè els valors a temps 0 també eren molt alts, fet que pot haver estat causat per un error experimental. Per aquesta raó, alguns anàlisis estadístics s'han fet per una $n=15$ o $n=14$.

6. RESULTATS

6.1. CARACTERÍSTIQUES BASALS

Els pacients reclutats en aquest estudi tenen tots dislipèmia. El 37,5% de la població seleccionada són dones, la mediana (rang interquartil) de l'edat és de 58 anys (51-65) i la mediana de l'índex de massa corporal (IMC) és de 26,6 kg/m². L'anàlisi del perfil lipídic indica una mediana de 206,69 mg/dL de colesterol total i de 143,04 mg/dL de triglicèrids. La majoria dels pacients prenen fàrmacs hipolipemiants al començament de l'estudi, un 68,8% rep estatines i un 6,3% fibrats (Taula 2).

Taula 2. Característiques basals dels pacients.

Variable		
Edat (anys)		58 (51-65)
Gènere	Home	10 (62,5%)
	Dona	6 (37,5%)
IMC (kg/m ²)		26,6 (25,45-31,20)
Colesterol total (mg/dL)		206,69 (183,68-244,78)
Triglicèrids (mg/dL)		143,04 (105,40-263,94)
HTA		4 (25%)
DM2		4 (25%)
Dislipèmia		16 (100%)
Tipus de dislipèmia	HFH amb diagnòstic genètic	9 (56,3%)
	HFH sense diagnòstic genètic	7 (43,7%)
Estatines		11 (68,8%)
Fibrats		1 (6,3%)

Les variables contínues s'expressen amb la mediana (rang interquartil), i les variables categòriques es presenten amb el número (percentatge).

Abreviacions: IMC, Índex de massa corporal; HTA, Hipertensió arterial; DM2, Diabetis Mellitus tipus 2; HFH, Hipercolesterolèmia familiar heterozigòtica.

6.2. ANÀLISI DELS CANVIS EN EL PERFIL LIPÍDIC

En primer lloc, es vol veure si el tractament amb iPCSK9 modifica les concentracions de colesterol i de triglicèrids en el plasma i en les lipoproteïnes dels 16 pacients tractats. Aquests valors de concentració s'han obtingut amb l'auto-analitzador Cobas Mira-Plus. S'ha calculat la diferència de mitjanes de les concentracions d'aquests lípids abans (temps 0) i després del tractament (temps 1), per a cada fracció i per al plasma.

Al plasma, s'observa que la concentració de colesterol total disminueix significativament un 38% ($p < 0,001$) amb el fàrmac iPCSK9. En canvi, no es mostren diferències en la concentració de triglicèrids (Figura 3).

De la mateixa manera que en el plasma, la quantitat de colesterol present en les VLDL varia de forma significativa, disminuint un 40,5% ($p = 0,005$) després del tractament, però no s'aprecien canvis en els triglicèrids d'aquestes lipoproteïnes.

Les IDL presenten una reducció significativa tant de la concentració de colesterol com de la concentració de triglicèrids degut a l'efecte dels iPCSK9. La reducció de colesterol és del 51,8% ($p < 0,001$), i és major respecte als triglicèrids que disminueixen un 20,7% ($p = 0,01$).

La concentració de colesterol i la concentració de triglicèrids varien també significativament en les LDL amb el fàrmac iPCSK9. Concretament, s'observa una reducció del colesterol del 61,8% ($p < 0,001$), i un descens en la quantitat de triglicèrids del 46,6% ($p < 0,001$). La reducció de colesterol de les LDL representa el 77,9% de la reducció total de colesterol del plasma.

En el cas de les HDL, no es mostra cap efecte en el perfil lipídic dels pacients entre abans i després del tractament.

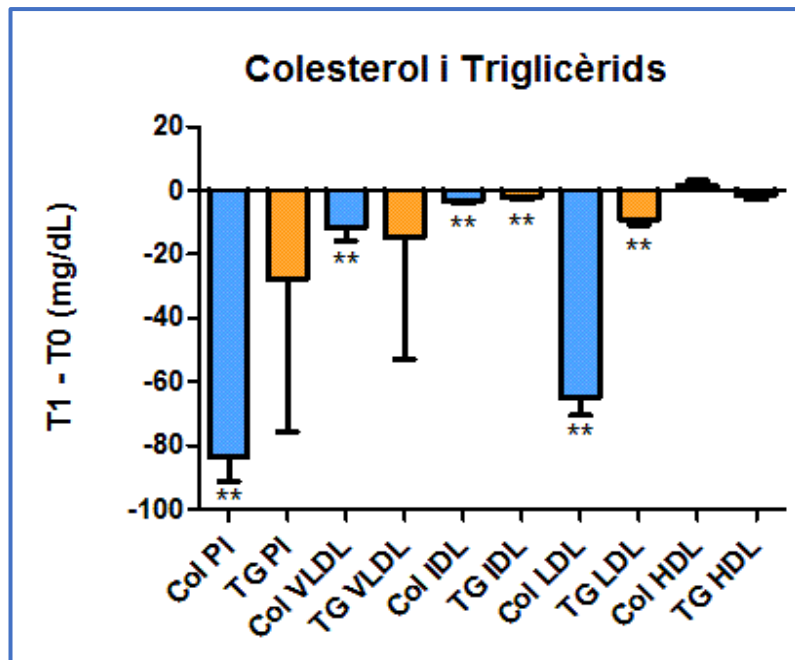


Figura 3. Canvis en les concentracions de colesterol i de triglicèrids en el plasma, les VLDL, les IDL, les LDL i les HDL després del tractament amb iPCSK9. Les concentracions s'expressen en mg/dL i els resultats es mostren amb la mitjana \pm SEM. El valor p s'ha calculat amb el test de Wilcoxon (** $p < 0,01$).

Abreviacions: Col, Colesterol; TG, triglicèrids; PI, Plasma; T0, temps 0; T1, temps 1.

6.3. ANÀLISI DELS CANVIS EN LES CONCENTRACIONS DE LES APOLIPOPROTEÏNES

Un cop analitzat l'efecte que tenen els iPCSK9 en el colesterol i els triglicèrids que transporten les lipoproteïnes, es vol observar com varien les concentracions de les apolipoproteïnes en les fraccions lipoproteiques després del tractament a partir de les mesures obtingudes amb l'assaig ELISA multiplex. Els gràfics de la figura 4 representen la diferència de concentracions de cada apolipoproteïna en cada tipus de lipoproteïna i en la suma de fraccions, entre abans i després del tractament amb iPCSK9.

Amb la finalitat de demostrar que aquest tractament no afecta de la mateixa manera a tots els pacients, també s'ha analitzat individualment l'efecte dels iPCSK9 en la concentració de les apolipoproteïnes en les diferents fraccions lipoproteiques. S'ha avaluat la variació de les apolipoproteïnes CIII, E, B i CII en les VLDL, en les LDL i en les IDL, ja que són les apolipoproteïnes que es troben presents en aquestes fraccions. En les HDL, es mostren els canvis en les concentracions d'apoAI i apoAII, que són les 2 proteïnes que abunden en aquestes lipoproteïnes, i d'apoE, apoCIII i apoCII. Els gràfics per a l'anàlisi individual es mostren a l'Annex 2.

En la fracció de les VLDL, s'observen diferències significatives en l'apoB amb una reducció del 39,4% ($p=0,004$) de la concentració d'aquesta apolipoproteïna després de l'administració d'iPCSK9. Pel que fa a l'apoCIII, l'apoE, l'apoAII i l'apoCII, no es mostren canvis significatius, però hi ha una tendència a reduir la seva concentració (Figura 4A).

En l'anàlisi individual de cada pacient, la concentració d'apoB de les VLDL disminueix en quasi tots els pacients, de manera que la majoria dels individus responen de la mateixa forma al tractament pel que fa a aquesta apolipoproteïna (Figura 6C). Tot i no ser significatiu, s'observa una disminució de la concentració d'apoCIII (Figura 6A), així com d'apoE (Figura 6B) i d'apoCII (Figura 6D) en gran part dels pacients, exceptuant alguns individus que presenten un augment de les concentracions d'aquestes apolipoproteïnes o no mostren canvis.

La figura 4B mostra canvis significatius en l'apoE i l'apoB de les IDL. La concentració d'apoE disminueix un 28,8% ($p=0,036$), i l'apoB un 28,7% ($p=0,017$), per tant ambdues varien en una proporció gairebé idèntica. En canvi, no s'observen diferències significatives en l'apoAI, l'apoCIII, l'apoAII i l'apoCII, tot i que tendeixen a disminuir la concentració amb el tractament.

Si s'analitza pacient per pacient, tant la quantitat d'apoCIII (Figura 7A) com d'apoCII (Figura 7D) a les IDL disminueix en la majoria dels individus però globalment no és significatiu. Per altra banda, s'observa que gairebé tots els pacients mostren el mateix comportament dels iPCSK9 en la concentració d'apoE (Figura 7B) i apoB (Figura 7C).

Les LDL són les lipoproteïnes que mostren més canvis significatius en la quantitat d'apolipoproteïnes. Com es pot observar a la figura 4C, les concentracions d'apoCIII, apoE, apoB i apoCII disminueixen significativament un 58,2% ($p<0,001$), 34,3% ($p=0,004$), 62,9% ($p<0,001$) i 51,7% ($p=0,001$) respectivament després del tractament, sent l'apoB la que disminueix en major proporció. En canvi, les concentracions d'apoAI i apoAII no varien amb els iPCSK9.

A la figura 8A i la figura 8D, s'observa una reducció de l'apoCIII i de l'apoCII de les LDL en gairebé tots els pacients respectivament, destacant en ambdós casos alguns individus que tenen una concentració molt alta a temps 0 i mostren una reducció considerable de la concentració d'aquestes apolipoproteïnes, i altres pacients que presenten una variació mínima. En la majoria dels individus també s'observa una reducció de l'apoE en una proporció molt semblant (Figura 8B), i una reducció considerable de l'apoB que es troba en concentracions molt altes en les LDL (Figura 8C).

En quant a les HDL, la mitjana de la concentració d'apoB disminueix significativament un 21,1% ($p=0,017$) amb els iPCSK9. També s'observa una reducció significativa del 36,9% ($p=0,015$) de la concentració d'apoE en aquesta fracció. Per contra, les apolipoproteïnes AII, CIII, i CII no mostren canvis amb l'administració del fàrmac tot i que tendeixen a augmentar, i l'apoAI mostra una tendència gairebé significativa a incrementar la concentració amb el tractament (Figura 4D).

En l'anàlisi individual, la concentració d'apoAI augmenta en quasi tots els pacients però disminueix en algun cas com és l'individu que mostra una concentració molt alta a temps 0 (Figura 9A). Pel que fa a l'apoE, en la gran majoria dels individus disminueix en una proporció molt semblant amb el tractament (Figura 9C). En canvi, la concentració d'apoCIII (Figura 9B), apoAII (Figura 9D) i apoCII (Figura 9E) no varien de la mateixa forma entre els individus, de manera que no s'observa cap efecte comú d'aquest fàrmac.

Per tal de tenir una aproximació de com varien les concentracions de les apolipoproteïnes al plasma, s'ha calculat la diferència del sumatori de les concentracions de cada apolipoproteïna en les fraccions a temps 0 i a temps 1. La figura 4E mostra una reducció significativa del 60,1% ($p=0,048$) de l'apoE i del 58,8% ($p<0,001$) de l'apoB en el sumatori de les fraccions. Aquestes apolipoproteïnes són les úniques que mostren diferències amb el tractament en totes les fraccions per separat. Per altra banda, les apolipoproteïnes AI i AII tenen tendència a augmentar, i l'apoCIII i l'apoCII a disminuir, tot i així aquests canvis no són significatius.

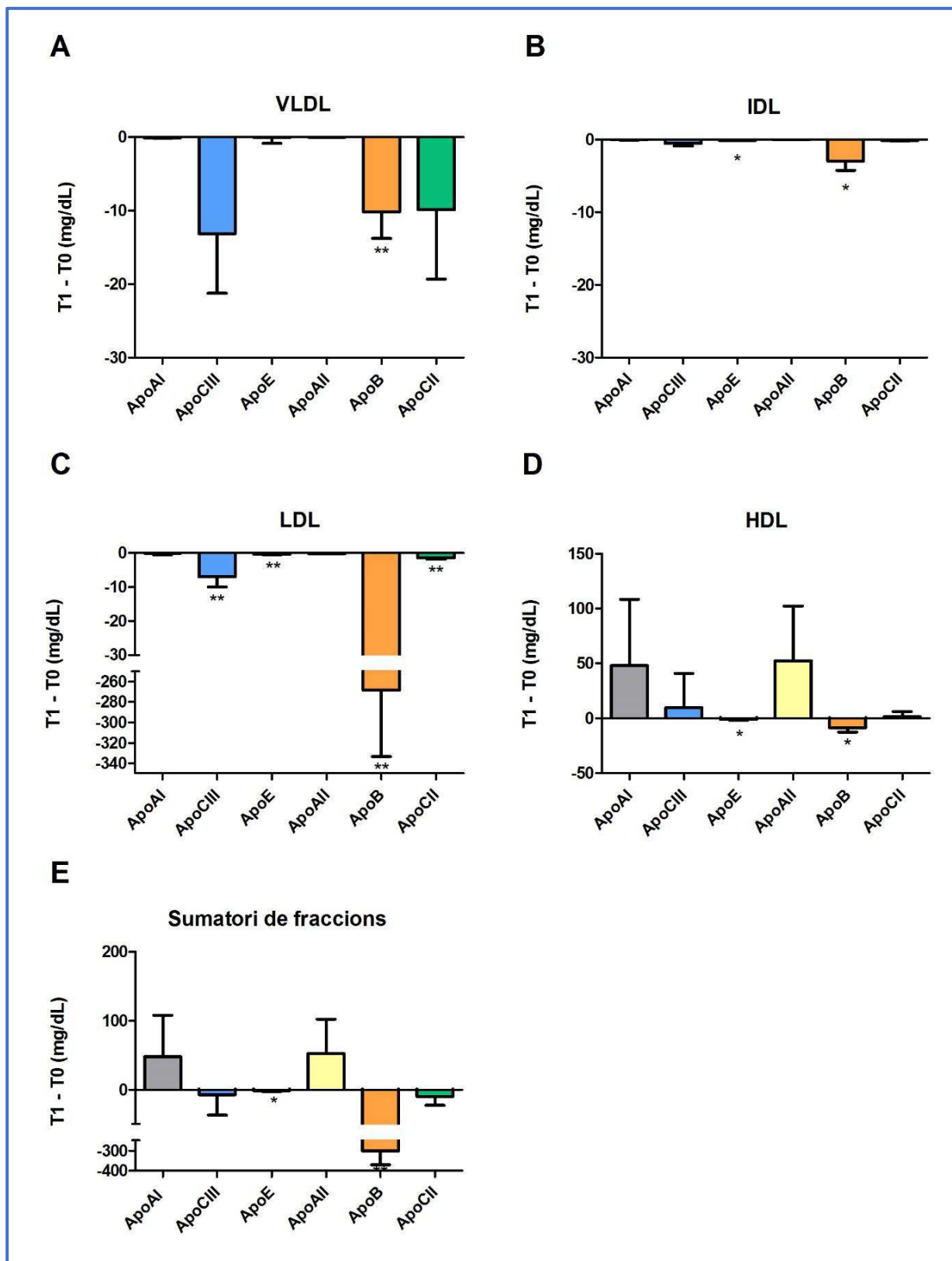


Figura 4. Diferències en les concentracions d' apoAI, apoCIII, apoE, apoAII, apoB i apoCII entre abans i després del tractament amb iPCSK9 en les fraccions (A) VLDL, (B) IDL, (C) LDL i (D) HDL i en (E) la suma de les fraccions de lipoproteïnes. Les concentracions s'expressen en mg/dL. Els resultats es presenten amb la mitjana \pm SEM. El valor p s'ha calculat amb el test de Wilcoxon (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). Els resultats es mostren per $n=16$ excepte l'apoE d'(A) ($n=15$), (D) ($n=15$), (E) ($n=15$) i apoE d'(E) ($n=14$). Abreviacions: T0, temps 0; T1, temps 1.

6.4. ANÀLISI DELS CANVIS EN LES CONCENTRACIONS DE LES APOLIPOPROTEÏNES PER PARTÍCULA LIPOPROTEICA

A continuació, es vol conèixer si hi ha variacions en les concentracions de les apolipoproteïnes que transporta cada partícula lipoproteica després del tractament. Les fraccions VLDL, IDL i LDL contenen una única molècula d'apoB en la seva estructura de forma que es pot normalitzar la quantitat d'apolipoproteïna per partícula calculant el quocient entre la concentració d'apolipoproteïna X mesurada en l'assaig ELISA multiplex, i la concentració d'apoB. Aquesta normalització s'ha fet per a l'apoCIII, l'apoE i l'apoCII que són les demés apolipoproteïnes que es troben presents en les partícules d'aquestes fraccions.

En les VLDL, no s'observen canvis significatius en les concentracions de les apolipoproteïnes per partícula, però l'apoE i l'apoCII tenen una tendència gairebé significativa a incrementar després de l'administració d'iPCSK9 (Figura 5A).

En el cas de les IDL no es mostra cap efecte del fàrmac en la concentració de les apolipoproteïnes per partícula lipoproteica (Figura 5B).

L'apoE de les LDL és la única apolipoproteïna de les analitzades que canvia significativament amb els iPCSK9, augmentant un 67,8% ($p=0,002$) la seva concentració en la partícula. Per altra banda, la concentració d'apoCIII i apoCII tendeix a augmentar per partícula però no és significatiu (Figura 5C).

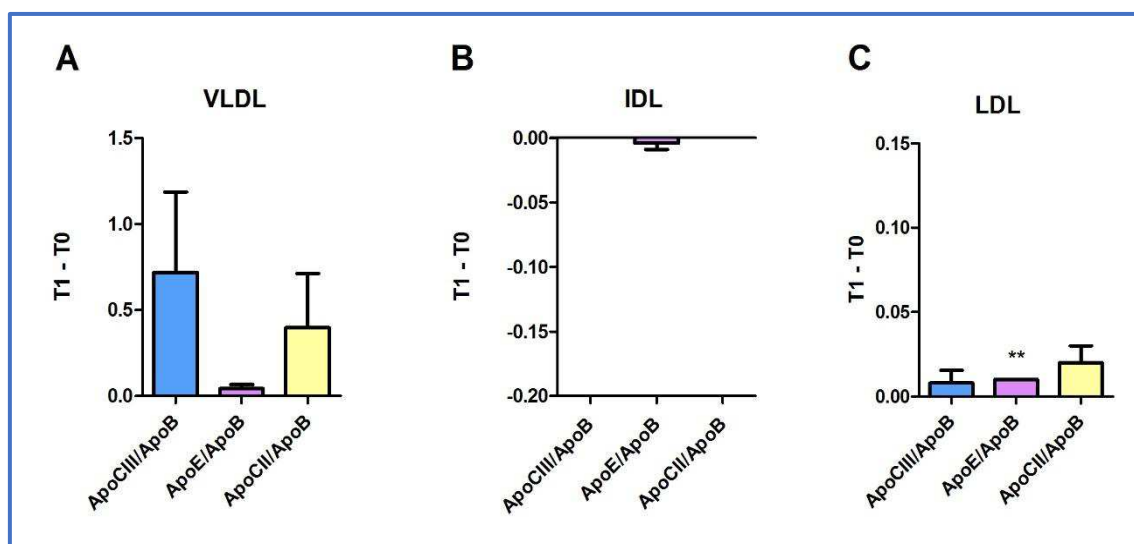


Figura 5. Canvis en les concentracions de les apolipoproteïnes apoCIII, apoE i apoCII respecte d'apoB en les fraccions lipoproteiques (A) VLDL, (B) IDL, i (C) LDL després de l'administració d'iPCSK9. Les dades s'expressen amb la mitjana \pm SEM, i el nivell de significació s'ha obtingut mitjançant el test de Wilcoxon ($**p<0,01$). Tots els resultats es mostren per $n=16$, excepte l'apoE/apoB d'(A) per $n=15$.
Abreviacions: T0, temps 0; T1, temps 1.

7. DISCUSSIÓ

La teràpia amb iPCSK9 s'utilitza per disminuir les concentracions de LDL-C en pacients amb hipercolesterolèmia severa. L'objectiu d'aquest treball ha estat fer un estudi pilot per conèixer si es donen altres canvis en el perfil lipídic com a conseqüència d'aquest tractament i quins són.

Els resultats obtinguts en l'anàlisi dels canvis en el perfil lipídic mostren una reducció significativa de la concentració de colesterol en el plasma, concretament en les VLDL, en les IDL i en les LDL després del tractament amb iPCSK9. Com ja s'ha comentat, el principal efecte d'aquest fàrmac és augmentar el reciclatge de LDLR a la membrana dels hepatòcits i conseqüentment, disminuir els nivells de LDL-C al plasma. En aquest estudi, la disminució mitjana de la concentració de LDL-C dels 16 pacients tractats amb iPCSK9 és del 61,8%. Aquest resultat coincideix amb el que van suggerir dos assajos clínics en fase III molt rellevants (18,27), que van demostrar una disminució mitjana dels nivells de LDL-C del 54,7% i 59% respectivament, en pacients amb nivells molt alts de colesterol en sang i amb un alt risc cardiovascular.

A més de la reducció evident de LDL-C, Hollstein et al. (28) també demostren una disminució del colesterol VLDL (VLDL-C). I un altre estudi, descriu una disminució del colesterol IDL (IDL-C) en humans sans (29), en una proporció molt semblant a la que s'observa en el present treball. En ambdós casos, associen aquesta disminució a un augment de la internalització d'aquestes lipoproteïnes. Recentment, s'ha descrit que els nivells de VLDL-C estan associats al risc de patir un infart de miocardi, així doncs, la seva reducció podria ser un efecte beneficiós addicional dels iPCSK9 (30).

Per altra banda, les HDL són les úniques lipoproteïnes en les que no s'observen variacions en la concentració de colesterol. En canvi, alguns estudis previs suggereixen un augment moderat d'HDL-C, i per tant, tenint en compte el rol cardioprotector de les HDL, un efecte beneficiós del fàrmac (28,31,32). Aquesta diferència en els resultats pot ser deguda al fet de tenir una cohort petita, ja que sí que s'observa una tendència a que augmentin els nivells d'HDL-C, i que és probable que estudiant més pacients fos estadísticament significativa. Tot i així, existeixen algunes discrepàncies i no es coneixen els mecanismes amb els quals els iPCSK9 produeixen aquest augment.

No s'observa cap efecte dels iPCSK9 sobre la concentració de triglicèrids del plasma. Aquests resultats coincideixen amb els observats en un grup de voluntaris normolipidèmics (29), però en canvi altres estudis fets amb cohorts més grans descriuen una reducció de la quantitat de triglicèrids en circulació d'aproximadament un 20%

(28,31). Així doncs, el fet de tenir una població de només 16 pacients pot haver dificultat l'observació d'aquests resultats.

Per a l'anàlisi de les variacions en les concentracions de les apolipoproteïnes, s'ha mesurat la concentració d'apoAI, apoCIII, apoE, apoAII, apoB i apoCII ja que són les principals apolipoproteïnes que tenen un paper important (funcional i/o estructural) en les diferents fraccions lipoproteïques.

En les VLDL, s'observa una reducció de la concentració d'apoB amb l'administració d'iPCSK9. Aquestes lipoproteïnes contenen una única molècula d'apoB en la seva composició de manera que aquesta variació s'associa a una disminució del nombre de partícules VLDL al plasma. Les VLDL són lipoproteïnes riques en triglicèrids, i com s'ha vist anteriorment, els triglicèrids del plasma no varien amb els iPCSK9 en aquest estudi cosa que suggereix, que a més de la disminució en el nombre de partícules, aquest fàrmac produeix un augment de la mida d'aquestes. Per altra banda, no es descriuen variacions en l'apoCIII i l'apoCII amb el tractament. Aquestes apolipoproteïnes regulen el catabolisme dels triglicèrids, l'apoCIII inhibint l'enzim LPL i l'apoCII activant-lo, de forma que no sembla que hi hagi un augment de la degradació de triglicèrids tal i com ja s'havia intuït amb l'anàlisi del perfil lipídic. Un estudi anterior, a més de la disminució d'apoB, també descriu una reducció de la concentració d'apoCIII, apoCII i apoE, que l'atribueixen a una major internalització de les VLDL (28).

Després de l'administració d'iPCSK9, la mitjana de la concentració d'apoE i apoB disminueix en les IDL. L'apoB és la principal apolipoproteïna de les IDL, i igual que en les VLDL, contenen una única molècula per partícula. Així doncs, una disminució de la concentració d'apoB està relacionada amb un descens en el nombre de partícules IDL, cosa que també explicaria la disminució d'apoE. Un estudi previ, observa una reducció de l'apoB de les IDL del 29,9% en voluntaris sans (29), una proporció gairebé idèntica al 28,7% descrit en el present estudi. Aquest efecte pot ser beneficiós per als pacients amb alts nivells de colesterol, ja que aquestes lipoproteïnes són molt aterogèniques i les persones sanes amb un metabolisme normal tenen una quantitat molt baixa d'aquestes lipoproteïnes romanents. Estudis anteriors realitzats en individus sans, observen una disminució de l'apoB de les IDL en una proporció gairebé idèntica a la observada en el present estudi (29,33).

Les dades obtingudes en l'anàlisi dels canvis en les concentracions de les apolipoproteïnes de les LDL, descriuen una reducció de totes les apolipoproteïnes que contenen que són l'apoCIII, apoE, apoB i apoCII. D'entre aquestes, les apolipoproteïnes B i CIII són les més rellevants pel que fa al risc aterogènic. Una disminució de la

concentració d'apoB, es correlaciona amb un descens en el nombre de partícules LDL amb el tractament amb iPCSK9 fet que explica la disminució de les demás apolipoproteïnes. Aquest resultat, s'ha demostrat en nombrosos estudis ja que el principal efecte d'aquest fàrmac és la disminució de partícules LDL en circulació (28,33). Pel que fa a l'apoCIII, aquesta apolipoproteïna augmenta l'afinitat de les LDL pels proteoglicans de la paret dels vasos causant la seva acumulació a l'espai subendotelial (23), de manera que la disminució d'apoCIII podria contribuir a una major reducció del risc cardiovascular.

En quant a les HDL, les apolipoproteïnes més rellevants en la seva composició són l'apoAI i l'apoAII, i algunes subespècies contenen també apoCIII i/o apoE. Aquestes lipoproteïnes no contenen apoB, de manera que la disminució significativa de la concentració d'apoB observada, pot ser que correspongui a partícules LDL molt denses que s'han separat juntament amb la fracció de les HDL durant la ultracentrifugació. Les subpoblacions que contenen apoE però no apoCIII, tenen un paper cardioprotector degut al rol de l'apoE en el transport revers del colesterol, en canvi, les subpoblacions que contenen també apoCIII, aquesta atenua la funció protectora de les HDL (34,35). En el grup de pacients analitzats en el present estudi s'observa també una disminució d'apoE de les HDL. Així doncs, segons aquests resultats, l'efecte dels iPCSK9 en l'apoE podria ser perjudicial ja que la funció cardioprotectora en les HDL que la contenen es veuria afectada. Els resultats obtinguts mostren una tendència gairebé significativa a augmentar l'apoAI, coherent amb la tendència observada en augment d'HDL-C. Estudis com els de Hollstein et al (28) , Koren et al (36), i Toth et al. (32), descriuen un augment moderat d'aquesta apolipoproteïna en les HDL, suggerint un augment de partícules HDL en circulació, i per tant un increment de lipoproteïnes arterioprotectors. Així doncs, és probable que amb una cohort més gran s'hagués pogut observar aquest augment significatiu, tot i que de la mateixa forma que l'augment d'HDL-C descrit en alguns estudis, no hi ha prou evidències que confirmin aquest efecte.

L'anàlisi dels canvis en les concentracions de les apolipoproteïnes normalitzades pel número de partícules lipoproteïques en les VLDL, IDL i LDL, mostra una variació significativa de l'apoE per partícula LDL, on aquesta apolipoproteïna és minoritària. Per tant, aquests resultats suggereixen que els efectes observats en les concentracions de les apolipoproteïnes per fracció amb el tractament, podrien ser deguts a una disminució del nombre total de partícules lipoproteïques, i no a una disminució de la concentració de les apolipoproteïnes per partícula.

En l'anàlisi individual de les variacions en les concentracions de les apolipoproteïnes amb el tractament, s'observa que només en els casos en que la diferència de concentracions és molt significativa, com és el cas de les apolipoproteïnes que formen part de les LDL, hi ha una tendència gairebé homogènia en tots els pacients a disminuir o a augmentar la concentració d'apolipoproteïna amb els iPCSK9. En canvi, en la majoria de les apolipoproteïnes analitzades, no tots els pacients responen de la mateixa forma al tractament, demostrant que els iPCSK9 no produeixen el mateix efecte sobre la resta d'apolipoproteïnes en tots els individus hipercolesterolèmics.

Aquest estudi és una prova pilot per a comprovar si el tractament amb iPCSK9 provoca efectes i quins poden ser sobre les apolipoproteïnes i en les propietats de les lipoproteïnes en una població de 16 pacients, per en un futur, poder realitzar l'experiment a major escala. L'estudi té una sèrie de limitacions, com per exemple la cohort petita amb la que s'ha treballat ja que pot haver dificultat l'observació de canvis significatius en alguns resultats. Aquesta limitació en la mostra va lligada al fet que sigui un estudi pilot però val a dir que, malgrat no haver assolit significació estadística en alguns casos, ha permès veure amb claredat les tendències dels canvis. En la vessant més tècnica, l'ELISA multiplex, tot i que permet obtenir resultats de vàries proteïnes en un únic assaig, no és fiable per a comparar valors absoluts de concentració amb els valors estàndards ja que no és un mètode per a diagnòstic. Per tant, és útil per comparar les diferències entre abans i després del tractament però no permet comparar els resultats amb els d'altres estudis. Una altra limitació que tenen les tècniques multiplex és que la dilució realitzada en la mostra de fracció lipoproteica ha de permetre quantificar totes les apolipoproteïnes a analitzar, de manera que pot dificultar la detecció d'alguna apolipoproteïna com ha estat el cas de l'apoCIII, que es trobava molt saturada en la majoria de fraccions lipoproteiques.

8. CONCLUSIONS

Amb la realització d'aquest estudi, s'han pogut observar els efectes que produeixen els inhibidors de PCSK9 en el perfil lipídic i en la composició de les lipoproteïnes a més de la reducció dels nivells de LDL-C.

- Els iPCSK9 no només redueixen significativament un 61,8% els nivells de LDL-C en circulació sinó que també redueixen un 40,5% la concentració de VLDL-C i un 51,8% la concentració d'IDL-C.
- No s'observen variacions significatives en els nivells de triglicèrids al plasma després del tractament.
- No s'observen variacions significatives en els nivells d'HDL-C tot i que hi ha una tendència a augmentar després del tractament.
- Els iPCSK9 disminueixen el número de lipoproteïnes circulants ja que les concentracions d'apoB disminueixen un 62,9% en les LDL, un 39,4% en les VLDL, i un 28,7% en les IDL.
- L'apoCIII de les LDL disminueix significativament un 58,2% amb el tractament amb iPCSK9.
- En les HDL s'observa una disminució de l'apoE del 36,9% i una tendència de l'apoAI a augmentar amb els iPCSK9 coherent amb la tendència en augment dels nivells d'HDL-C.
- Tot i que l'efecte dels iPCSK9 sobre la concentració de colesterol és bastant homogènia, hi ha una variabilitat interindividual en l'efecte que produeixen els iPCSK9 en la majoria de les apolipoproteïnes mesurades, indicant que no tots els pacients responen de la mateixa forma al tractament.

9. AUTOAVALUACIÓ

Realitzar el treball de fi de grau relacionat amb les pràctiques a la URLA ha estat una experiència positiva i enriquidora que m'ha permès participar en un projecte de recerca i plasmar els resultats obtinguts.

Durant el desenvolupament del treball, he pogut adquirir nous coneixements relacionats amb el metabolisme lipídic i el risc cardiovascular, i aplicar els ja apresos durant els estudis de grau.

La part experimental m'ha permès familiaritzar-me amb noves tècniques de laboratori com són la separació de fraccions lipoproteiques del plasma, la determinació del perfil lipídic, i l'assaig ELISA multiplex, així com el funcionament dels equips disponibles. A més, he après a tractar les dades obtingudes en els experiments i a analitzar-les mitjançant softwares estadístics.

Una altre aspecte imprescindible en el desenvolupament del projecte ha estat la necessitat de prendre decisions en diferents moments del procés. L'aparició de problemes tècnics i experimentals m'ha permès millorar l'habilitat per reaccionar de manera àgil i saber buscar una solució.

El treball en equip m'ha mostrat lo essencial que és la coordinació i la confiança en els companys.

A més, he pogut entendre la importància que tenen la recerca bibliogràfica i la realització d'un correcte anàlisi i interpretació dels resultats, a banda de la part metodològica.

En definitiva, l'elaboració d'aquest treball ha estat un repte que m'ha permès créixer tant a nivell personal com a nivell professional.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Soppert J, Lehrke M, Marx N, Jankowski J, Noels H. Lipoproteins and lipids in cardiovascular disease: from mechanistic insights to therapeutic targeting. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2020;159:4–33.
2. Joseph P, Leong D, McKee M, Anand SS, Schwalm JD, Teo K, et al. Reducing the global burden of cardiovascular disease, part 1: The epidemiology and risk factors. *Circulation Research*. 2017;121(6):677–94.
3. Feingold KR, Grunfeld C. Introduction to Lipids and Lipoproteins. Endotext. MDTText.com, Inc.; 2000.
4. Zanoni P, Velagapudi S, Yalcinkaya M, Rohrer L, von Eckardstein A. Endocytosis of lipoproteins. *Atherosclerosis*. 2018;275:273–95.
5. Katzmann JL, Gouni-Berthold I, Laufs U. PCSK9 Inhibition: Insights From Clinical Trials and Future Prospects. *Frontiers in Physiology*. 2020;11:1–18.
6. Wolska A, Dunbar RL, Freeman LA, Ueda M, Amar MJ, Sviridov DO, et al. Apolipoprotein C-II: New findings related to genetics, biochemistry, and role in triglyceride metabolism. *Atherosclerosis*. 2017;267:49–60.
7. Taskinen MR, Borén J. Why Is Apolipoprotein CIII Emerging as a Novel Therapeutic Target to Reduce the Burden of Cardiovascular Disease? *Current Atherosclerosis Reports*. 2016;18(10):1–8.
8. Marais AD. Apolipoprotein E in lipoprotein metabolism, health and cardiovascular disease. *Pathology*. 2019;51(2):165–76.
9. Wang D, Wang Z, Zhang L, Wang Y. Roles of Cells from the Arterial Vessel Wall in Atherosclerosis. *Mediators of Inflammation*. 2017;2017.
10. Linton MF, Yancey PG, Davies SS, Jerome WG, Linton EF, Song WL, et al. The Role of Lipids and Lipoproteins in Atherosclerosis. *Science*. MDTText.com, Inc.; 1950.
11. Cromwell WC, Otvos JD, Keyes MJ, Pencina MJ, Sullivan L, Vasani RS, et al. LDL particle number and risk of future cardiovascular disease in the Framingham Offspring Study-Implications for LDL management. *Journal of Clinical Lipidology*. 2007;1(6):583–92.

12. Wijers M, Kuivenhoven JA, van de Sluis B. The life cycle of the low-density lipoprotein receptor: Insights from cellular and in-vivo studies. *Current Opinion in Lipidology*. 2015;26(2):82–7.
13. van de Sluis B, Wijers M, Herz J. News on the molecular regulation and function of hepatic low-density lipoprotein receptor and LDLR-related protein 1. *Current Opinion in Lipidology*. 2017;28(3):241–7.
14. Ragusa R, Basta G, Neglia D, de Caterina R, del Turco S, Caselli C. PCSK9 and atherosclerosis: Looking beyond LDL regulation. *European Journal of Clinical Investigation*. 2021;51(4):1–13.
15. Shapiro MD, Tavori H, Fazio S. PCSK9 from basic science discoveries to clinical trials. *Circulation Research*. 2018;122(10):1420–38.
16. Melendez QM, Krishnaji ST, Wooten CJ, Lopez D. Hypercholesterolemia: The role of PCSK9. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2017;625–626:39–53.
17. Catapano AL, Pirillo A, Norata GD. New Pharmacological Approaches to Target PCSK9. *Current Atherosclerosis Reports*. 2020;22(7).
18. Sabatine MS, Giugliano RP, Keech AC, Honarpour N, Wiviott SD, Murphy SA, et al. Evolocumab and Clinical Outcomes in Patients with Cardiovascular Disease. *New England Journal of Medicine*. 2017;376(18):1713–22.
19. Brandts J, Müller-Wieland D. PCSK9 Inhibition: New Treatment Options and Perspectives to Lower Atherogenic Lipoprotein Particles and Cardiovascular Risk. *Current Atherosclerosis Reports*. 2019;21(10):1–7.
20. Taskinen MR, Packard CJ, Borén J. Emerging Evidence that ApoC-III Inhibitors Provide Novel Options to Reduce the Residual CVD. *Current Atherosclerosis Reports*. 2019;21(8).
21. Borén J, Packard CJ, Taskinen MR. The Roles of ApoC-III on the Metabolism of Triglyceride-Rich Lipoproteins in Humans. *Frontiers in Endocrinology*. 2020;11:1–10.
22. Jørgensen AB, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. Loss-of-Function Mutations in APOC3 and Risk of Ischemic Vascular Disease . *New England Journal of Medicine*. 2014;371(1):32–41.

23. Hiukka A, Ståhlman M, Pettersson C, Levin M, Adiels M, Teneberg S, et al. ApoCIII-enriched LDL in type 2 diabetes displays altered lipid composition, increased susceptibility for sphingomyelinase, and increased binding to biglycan. *Diabetes*. 2009;58(9):2018–26.
24. Christopoulou E, Tsimihodimos V, Filippatos T, Elisaf M. Apolipoprotein CIII and diabetes. Is there a link? *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. 2019;35(3):1–8.
25. Juntti-Berggren L, Berggren PO. Apolipoprotein CIII is a new player in diabetes. *Current Opinion in Lipidology*. 2017;28(1):27–31.
26. Henderson R, O’Kane M, McGilligan V, Watterson S. The genetics and screening of familial hypercholesterolaemia. *Journal of Biomedical Science*. 2016;23(1):1–12.
27. Schwartz GG, Steg PG, Szarek M, Bhatt DL, Bittner VA, Diaz R, et al. Alirocumab and Cardiovascular Outcomes after Acute Coronary Syndrome. *New England Journal of Medicine*. 2018;379(22):2097–107.
28. Hollstein T, Vogt A, Grenkowitz T, Stojakovic T, März W, Laufs U, et al. Treatment with PCSK9 inhibitors reduces atherogenic VLDL remnants in a real-world study. *Vascular Pharmacology*. 2019;116:8–15.
29. Reyes-Soffer G, Pavlyha M, Ngai C, Thomas T, Holleran S, Ramakrishnan R, et al. Effects of PCSK9 inhibition with alirocumab on lipoprotein metabolism in healthy humans. *Circulation*. 2017;135(4):352–62.
30. Balling M, Afzal S, Varbo A, Langsted A, Davey Smith G, Nordestgaard BG. VLDL Cholesterol Accounts for One-Half of the Risk of Myocardial Infarction Associated With apoB-Containing Lipoproteins. *Journal of the American College of Cardiology*. 2020;76(23):2725–35.
31. Ingueneau C, Hollstein T, Grenkowitz T, Ruidavets JB, Kassner U, Duparc T, et al. Treatment with PCSK9 inhibitors induces a more anti-atherogenic HDL lipid profile in patients at high cardiovascular risk. *Vascular Pharmacology*. 2020;135.
32. Toth PP, Sattar N, Blom DJ, Martin SS, Jones SR, Monsalvo ML, et al. Effect of Evolocumab on Lipoprotein Particles. *American Journal of Cardiology*. 2018;121(3):308–14.

33. Watts GF, Chan DC, Dent R, Somaratne R, Wasserman SM, Scott R, et al. Factorial effects of evolocumab and atorvastatin on lipoprotein metabolism. *Circulation*. 2017;135(4):338–51.
34. Jensen MK, Rimm EB, Furtado JD, Sacks FM. Apolipoprotein C-III as a Potential Modulator of the Association Between HDL-Cholesterol and Incident Coronary Heart Disease. *Journal of the American Heart Association*. 2012;1(2).
35. Morton AM, Koch M, Mendivil CO, Furtado JD, Tjønneland A, Overvad K, et al. Apolipoproteins E and CIII interact to regulate HDL metabolism and coronary heart disease risk. *JCI insight*. 2018;3(4):1–20.
36. Koren MJ, Kereiakes D, Pourfarzib R, Winegar D, Banerjee P, Hamon S, et al. Effect of PCSK9 inhibition by alirocumab on lipoprotein particle concentrations determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of the American Heart Association*. 2015;4(11):1–8.

11. ANNEXOS

ANNEX 1: COMPOSICIÓ DE LES SOLUCIONS

Taula 3. Composició de les solucions de densitat utilitzades per a la ultracentrifugació seqüencial i del PBS utilitzat per a la diàlisi.

SOLUCIÓ	COMPOSICIÓ
Solució de densitat 1,006 g/mL	11,4 g NaCl 0,1 g EDTA-Na ₂ 0,5 g d'àcida sòdica 50 mg cloroamfenicol Aigua destil·lada fins a un volum d'1 L
Solució de densitat 1,019 g/mL	800 mL de solució de densitat 1,006 200 mL de solució de densitat 1,071
Solució de densitat 1,063 g/mL	800 mL de solució de densitat 1,019 200 mL de solució de densitat 1,239
Solució de densitat 1,071 g/mL	700,94 mL de solució de densitat 1,006 279,06 mL de solució de densitat 1,239
Solució de densitat 1,239 g/mL	328 g NaBr 1 L de solució de densitat 1,006 g/mL
PBS	9,4 g de NaCl 1,56 g de H ₂ NaPO ₄ +2H ₂ O 1,8 g de fosfat de sodi dibàsic Na ₂ PO ₄ ·2H ₂ O Aigua destil·lada fins a un volum d'1L

ANNEX 2: FIGURES DE L'ANÀLISI INDIVIDUAL DELS CANVIS EN LES CONCENTRACIONS DE LES APOLIPOPROTEÏNES DE LES FRACCIONS LIPOPROTEIQUES

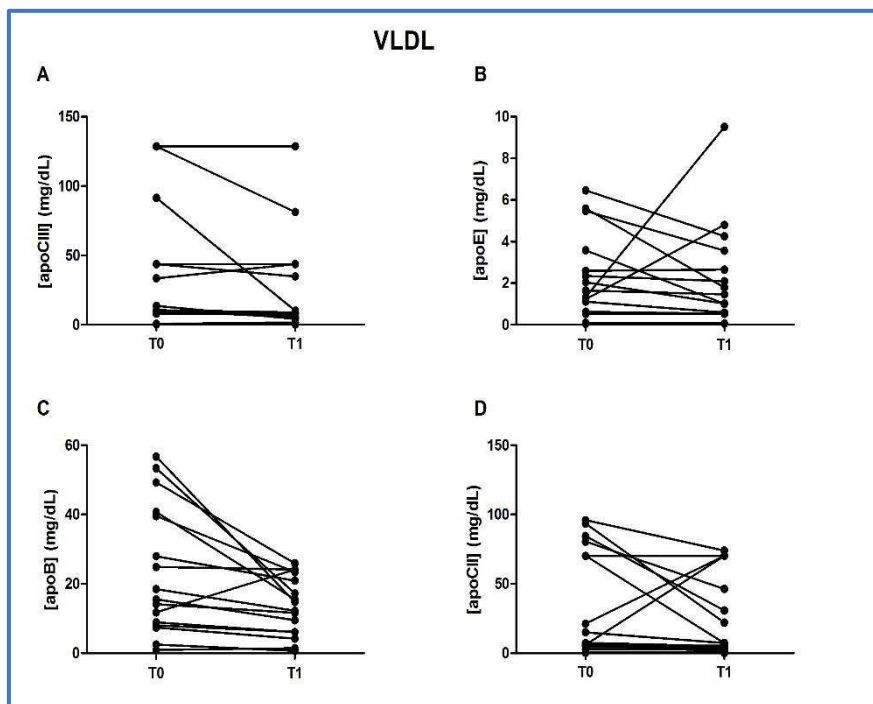


Figura 6. Concentracions (A) d'apoCIII, (B) apoE, (C) apoB i (D) apoCII en la fracció VLDL abans (temps 0) i després del tractament amb iPCSK9 (temps 1) en els 16 pacients. Les concentracions es presenten en mg/dL. Abreviacions: T0, temps 0; T1, temps 1.

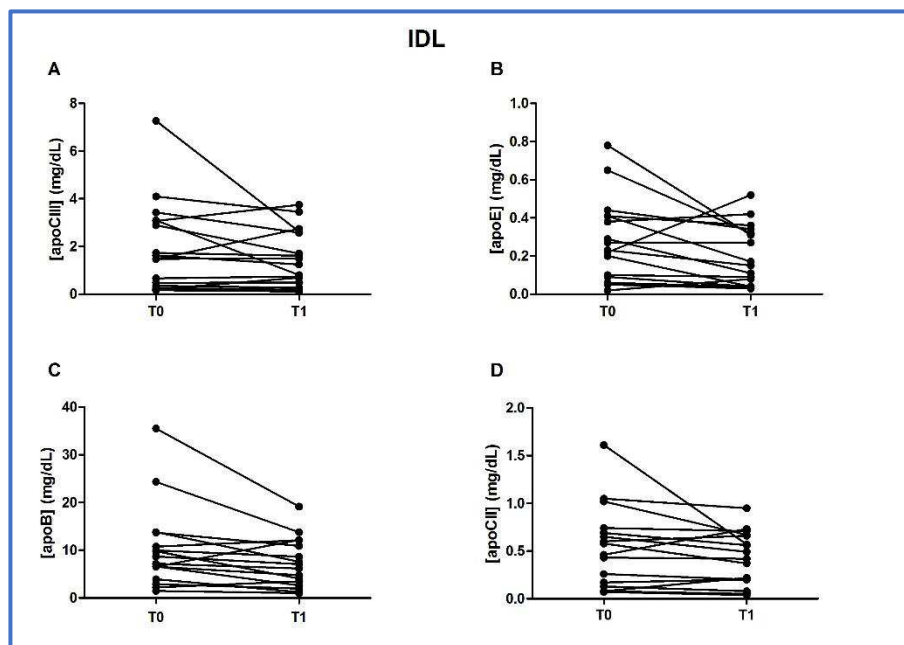


Figura 7. Concentracions (A) d'apoCIII, (B) apoE, (C) apoB i (D) apoCII en les lipoproteïnes IDL abans i després de l'administració d'iPCSK9 de cada individu tractat. Les concentracions s'expressen en mg/dL. Abreviacions: T0, temps 0; T1, temps 1.

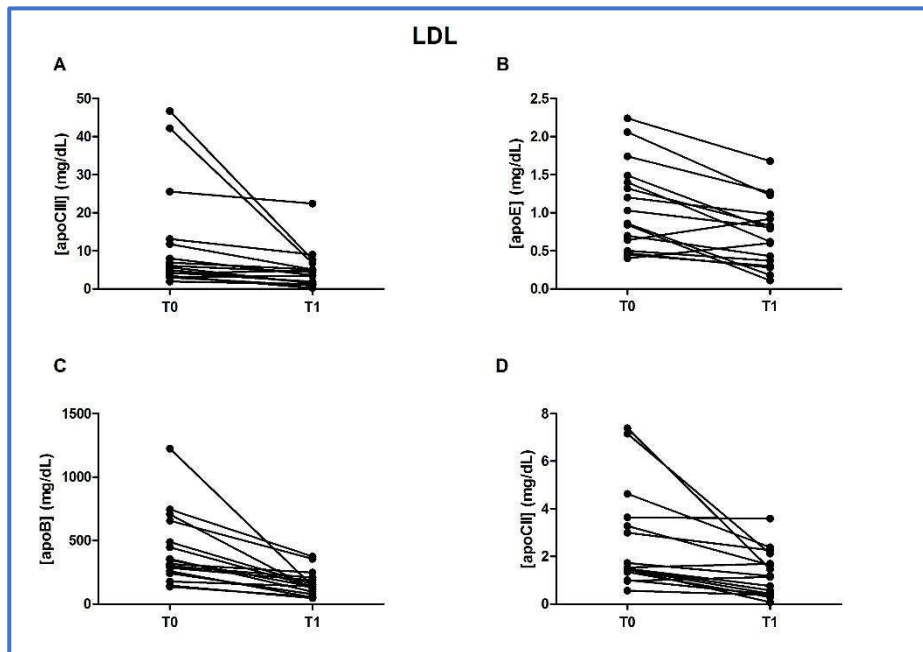


Figura 8. Concentracions a temps 0 i a temps 1 (A) d'apoCIII, (B) apoE, (C) apoB i (D) apoCII en la fracció LDL de cada pacient tractat amb iPCSK9. Les dades representades s'expressen en mg/dL i s'han obtingut amb l'anàlisi multiplex.

Abreviacions: T0, temps 0; T1, temps 1.

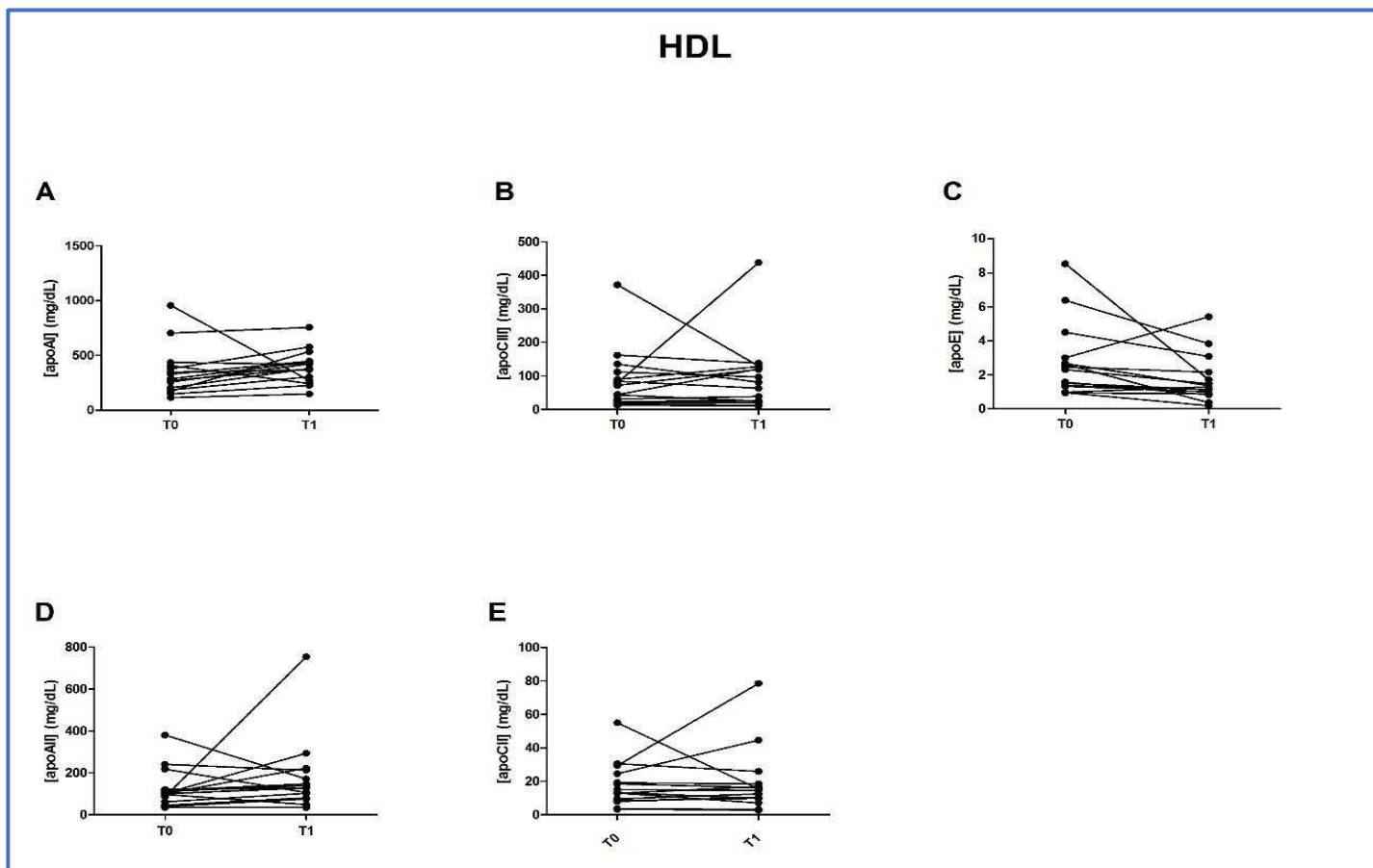


Figura 9. Concentracions (A) d'apoAI, (B) apoCIII, (C) apoE i (D) apoAII i (E) apoCII en les HDL dels 16 pacients tractats amb iPCSK9. Els valors de concentració s'expressen en mg/dL.

Abreviacions: T0, temps 0; T1, temps 1.

ANNEX 2

FITXA DE SEGUIMENT DEL TUTOR/A del TFG

Nom i Cognoms de l'Alumne/a: MARTA PINYOL PINEL

Nom i Cognoms del Tutor/a: JOSEP RIBALTA VIVES-MONTSE GUARDIOLA GUIONNET

També ha participat en la supervisió tant de la feina de laboratori com del desenvolupament del treball en PERE REHUES MASIP (investigador FPU)

Data de la entrevista amb l'alumne: 16/05/2021

Recomanacions durant el seguiment: Val a dir que les reunions de seguiment amb la Marta han estat gairebé diàries, o de diversos cops a la setmana. Els comentaris/recomanacions que hem anat fent durant el seguiment s'han centrat en dos aspectes:

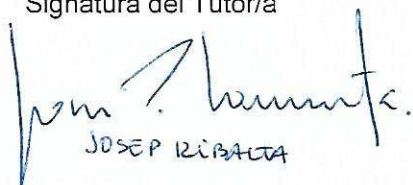
1. Les proves necessàries per a la posta a punt dels ELISA múltiplex. Ha calgut optimitzar dilucions.
2. La introducció i els mètodes del treball.

Observacions: L'actitud de la Marta durant aquesta temps ha estat de total implicació, cosa que valorem molt donat que hem hagut d'afrontar diversos imprevistos tècnics.

Observacions Darrera revisió:

1. Respecte als aspectes tècnics: estem acabant les mesures fetes per ELISA. Volem destacar la iniciativa mostrada per la Marta i el Pere en solventar complicacions derivades d'un funcionament anòmal del lector. Paral·lelament, el COS està mesurant el perfil de lipoproteïnes i glicoproteïnes per NMR que completarà les mesures fetes als pacients tractats amb inhibidors de PCSK9. Estem a punt de poder començar l'anàlisi estadística.
2. Hem fet correccions a la introducció i als mètodes i estem centrats en l'anàlisi estadística per a completar Resultats i Discussió.

Signatura del Tutor/a


JOSEP RIBALTA

Signatura del Alumne/a


MARTA PINYOL


MONTSE GUARDIOLA


PERE REHUES

Reus a 19 de maig 2021