

ALBERT PÉREZ PARETS

TREBALL DE FI DE GRAU
**PCSK9: TRACTAMENT DE LA
HIPERCOLESTEROLÈMIA FAMILIAR I ALTRES
POSSIBLES FUNCIONS**

Dirigit pel Dr. Josep Ribalta Vives i la Dra. Montserrat Guardiola Guionnet

Grau en Medicina



**UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI**

REUS
2024

ÍNDEX

1. ABSTRACT (català i anglès)	3
2. INTRODUCCIÓ.....	5
MALALTIA CARDIOVASCULAR.....	5
ARTERIOESCLEROSI	5
LÍPIDS I LIPOPROTEÏNES. METABOLISME I RMN.....	5
TRANSPORT DE LÍPIDS.....	6
INFLAMACIÓ I ETIOPATOGÈNIA DE L'ARTERIOESCLEROSI	7
HIPERCOLESTEROLÈMIA FAMILIAR COM A MODEL D'ESTUDI DE cLDL I RISC CARDIOVASCULAR	8
3. HIPÒTESI I OBJECTIUS.....	11
4. MATERIALS I MÈTODES	12
4.1. Disseny i objectius de l'estudi	12
4.2. Anàlisi bioquímic clínic i estàndard	12
4.3. Anàlisi de partícules de lipoproteïnes amb 1H-NMR	13
4.4. Anàlisi de glicoproteïnes amb 1H-NMR	13
4.5. Aïllament de lipoproteïnes per ultracentrifugació i anàlisi d'apolipoproteïnes.....	13
4.6. Anàlisi estadístic.....	14
5. RESULTATS.....	14
5.1. Població d'estudi - fase clínic.....	14
5.2. Resultats - fase clínic.....	14
5.3. Població d'estudi - fase genètica	17
5.4. Resultats - fase genètica	17
6. DISCUSSIÓ.	20
6. 1. Canvis als marcadors d'inflamació.....	20
6.2. Canvis als lípids, lipoproteïnes i apolipoproteïnes.....	22
6.3. Concentracions plasmàtiques de PCSK9	23
6.4. Canvis a la inflamació per mutacions puntuals a la PCSK9	23
6.5 Conclusions finals	23
7. BIBLIOGRAFIA.	24
8. ANNEXES.	26

1. ABSTRACT

INTRODUCCIÓ:

L'arterioesclerosi és una malaltia inflamatòria crònica causada per l'acumulació de colesterol a les artèries. Els iPCSK9 són uns anticossos monoclonals que serveixen per inhibir la PCSK9, proteïna que s'ancora als receptors de LDL i impedeix que aquests es puguin reciclar i com a conseqüència augmenten els nivells de colesterol LDL. A més d'aquesta funció, la PCSK9 interacciona amb altres receptors lipídics i pre això hipotetitzem que a banda de regular els nivells de colesterol plasmàtic també pot regular altres paràmetres lipídics i lipoproteïcs així com influir en la inflamació sistèmica.

OBJECTIUS:

Demostrar que el tractament amb iPCSK9 modifica altres lipoproteïnes a banda de les LDL i redueix la inflamació (estudi clínic) i demostrar que l'efecte de PCSK9 sobre la inflamació té una base genètica (estudi genètic).

MÈTODES:

-Estudi clínic: S'han estudiat 47 pacients de cinc hospitals diferents als que s'ha administrat la teràpia amb iPCSK9. S'ha recollit una mostra de sang abans i després de 6 mesos de tractament, i se'ls ha fet un anàlisi dels lípids de rutina i del perfil lipoproteic i glicoproteic mitjançant ressonància magnètica nuclear (RMN) per identificar canvis més enllà dels propis del colesterol.

-Estudi genètic: hem estudiat la variabilitat genètica de PCSK9 genotipant 14 tagSNPs en 1100 individus de població general que formen part de l'estudi Hortega. D'aquests participants també disposàvem de perfil lipoproteic i glicoproteic determinat per RMN.

RESULTATS:

-Estudi clínic: El tractament amb l'inhibidor de PCSK9 va reduir el colesterol total (36,27%, $p < 0,001$), colesterol LDL (55,05%, $p < 0,001$) i lipoproteïnes d'alta densitat (HDL) (45,11%, $p < 0,001$), apolipoproteïna (apo) C-III (10%, $p < 0,001$), triglicèrids (9,92%, $p < 0,001$). També va augmentar apoA-I (2,05%, $p = 0,043$) i nivells de colesterol HDL (11,58%, $p < 0,001$). Vam poder identificar per primer cop el poder anti-inflamatori del tractament mitjançant la disminució dels senyals de glicoproteïna GlycA (11,97%, $p < 0,001$), GlycB (3,83%, $p = 0,017$) i GlycF (7,26%, $p < 0,001$).

-Estudi genètic: En detall, els portadors de la variant rs7552841 en el gen de PCSK9 presenten 2.5% més nivells de GlycB ($p = 0.04$) i 5% més nivells de GlycA ($p = 0.03$). En el cas dels portadors de les variants rs4927193 i rs11206514, presenten un 6.5% ($p = 0.01$) i un 1.6%, més nivells de GlycB (0.03) respectivament. I finalment, els portadors de les variants rs2495477 ($p = 0.02$) i rs499718 ($p = 0.01$) presenten un 2.5% i un 6.5% menys nivells de GlycB respectivament.

CONCLUSIÓ:

A aquest estudi hem demostrat com les glicoproteïnes revelen una activitat antiinflamatòria significativa dels iPCSK9, que sembla estar relacionada amb els triglicèrids i l'ApoC-III. A més, hem demostrat que certes mutacions a la PCSK9 poden influir també en la inflamació de l'organisme.

PARAULES CLAU: PCSK9, arterioesclerosi, inflamació, glicoproteïnes, 1 H-NMR.

INTRODUCTION:

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease caused by the accumulation of cholesterol in the arteries. iPCSK9 are monoclonal antibodies that are used to inhibit PCSK9, a proprotein that attaches to LDL receptors and prevents them from being recycled and as a result increases LDL cholesterol levels. In addition to this function, PCSK9 interacts with other lipid receptors and we hypothesize that apart from regulating plasma cholesterol levels it can also regulate other lipid and lipoprotein parameters as well as influence systemic inflammation.

TARGETS:

Demonstrate that the treatment with iPCSK9 modifies other lipoproteins besides LDL and reduces inflammation (clinical study) and show that the effect of PCSK9 on inflammation has a genetic basis (genetic study).

METHODS:

-Clinical study: 47 patients from five different hospitals who received iPCSK9 therapy were studied. A blood sample was collected before and after 6 months of treatment, and analyzed for routine lipids and lipoprotein and glycoprotein profile by nuclear magnetic resonance (NMR) to identify changes beyond those of cholesterol

-Genetic study: we studied the genetic variability of PCSK9 by genotyping 14 tagSNPs in 1100 individuals from the general population that are part of the Horteiga study. For these participants, we also had a lipoprotein and glycoprotein profile determined by NMR.

RESULTS:

-Clinical study: PCSK9 inhibitor treatment reduced total cholesterol (36.27%, $p < 0.001$), LDL cholesterol (55.05%, $p < 0.001$) and high-density lipoprotein (HDL) (45.11%, $p < 0.001$), apolipoprotein (apo) C-III (10%, $p < 0.001$), triglycerides (9.92%, $p < 0.001$). It also increased apoA-I (2.05%, $p = 0.043$) and HDL cholesterol levels (11.58%, $p < 0.001$). We were able to identify for the first time the anti-inflammatory power of the treatment through the decrease in glycoprotein signals GlycA (11.97%, $p < 0.001$), GlycB (3.83%, $p = 0.017$) and GlycF (7.26%, $p < 0.001$).

-Genetic study: In detail, carriers of the rs7552841 variant in the PCSK9 gene have 2.5% more GlycB levels ($p = 0.04$) and 5% more GlycA levels ($p = 0.03$). In the case of carriers of the rs4927193 and rs11206514 variants, they present 6.5% ($p = 0.01$) and 1.6%, plus GlycB levels (0.03) respectively. And finally, carriers of the rs2495477 ($p = 0.02$) and rs499718 ($p = 0.01$) variants have 2.5% and 6.5% less GlycB levels respectively.

CONCLUSION:

In this study we have shown how glycoproteins reveal a significant anti-inflammatory activity of iPCSK9, which appears to be related to triglycerides and ApoC-III. In addition, we have shown that certain mutations in PCSK9 can also influence inflammation in the body.

KEY WORDS: PCSK9, atherosclerosis, inflammation, glycoproteins, 1 H-NMR.

2. INTRODUCCIÓ.

MALALTIA CARDIOVASCULAR

Malaltia cardiovascular és un terme molt ampli que engloba el conjunt d'afeccions del cor i les artèries que afecten al correcte funcionament d'aquests. Aquests problemes sovint es deuen a l'arterioesclerosi, entitat la qual anem a desenvolupar en aquest escrit, centrant-nos en la etiopatogènia d'aquesta malaltia i una de les dianes terapèutiques més recents per reduir el colesterol i així la gravetat i desenvolupament de l'arterioesclerosi: els iPCSK9.

ARTERIOESCLEROSI

L'arterioesclerosi ("artèria i rigidesa") és un terme format per dos conceptes que serveix per definir la malaltia crònica de les artèries, sobretot les de tamany mitjà, que causa al nostre país unes 124.000 morts anuals^[1] i es considerada la primera causa de mortalitat mundial^[2]. Els factors de risc principals del desenvolupament de malaltia cardiovascular es poden dividir en quatre graus de risc (*I a IV*). Els *factors de risc I* son aquells les intervencions dels quals han demostrat reduir el risc, i inclouen fumar tabac, elevats nivells de cLDL, dietes riques en greixos saturats, hipertensió i hipertròfia del ventricle esquerre. Els *factors de risc II* són aquells les intervencions dels quals és probable que redueixen el risc, inclouen la diabetis mellitus, baixes concentracions de cHDL, hipertrigliceridèmia, partícules de LDL petites i denses i sedentarisme. Els *factors de risc III* són aquells que suposen un risc per desenvolupar malaltia cardiovascular i que si es modifiquen possiblement podrien baixar el risc, formen part d'aquest grup els factors psicosocials, les concentracions elevades de Lp(a), hiperhomocisteïnèmia i estrès oxidatiu. Per últim al grup de *factors de risc IV* s'inclouen els factors de risc no modificables com l'edat (quant més vell més risc), el sexe masculí, la història familiar d'esdeveniment cardiovascular temprà (<55 anys en homes i <65 anys en dones) i baix nivell socioeconòmic (*taula 1*).

Per entendre la etiopatogènia de l'arterioesclerosi creiem que és oportú tenir primer uns fonaments bàsics del metabolisme lipídic per poder així comprendre la cascada de successions metabòliques que s'hi donen pel desenvolupament de la malaltia.

LÍPIDS I LIPOPROTEÏNES. METABOLISME I RMN.

Les lipoproteïnes (LP) són complexos de gran tamany, de forma esfèrica, que transporten lípids (principalment triglicèrids, èsters de colesterol i fosfolípids). Les lipoproteïnes del plasma es diferencien en 5 classes principals, basades en les seves densitats relatives: QM (quilomicrons), VLDL (very low density lipoprotein), IDL (intermediate density lipoprotein), LDL (low density lipoprotein) i HDL (high density lipoprotein). La major part dels triglicèrids és transportada en QM o VLDL i la major part del colesterol és transportada en forma d'èsters de colesterol a les LDL i les HDL.

Les *apolipoproteïnes* es requereixen tant per l'assemblatge com per l'estructura de les lipoproteïnes i serveixen per activar els enzims importants al metabolisme de les lipoproteïnes i per mediar la seva fixació als receptors de superfície. S'adjunta una taula (*taula 2*) en la que es resumeixen les principals apolipoproteïnes del metabolisme lipídic.

TRANSPORT DE LÍPIDS

Al transport dels lípids al nostre organisme hi ha descrites dues vies, depenent de si la procedència del lípid és d'origen exogen (aliments) o endogen (mobilització hepàtica de lípids).

·Transport de lípids de la dieta - via exògena:

Els triglicèrids són hidrolitzats per lipases pancreàtiques dins de la llum intestinal i són emulsionats amb àcids biliars per formar micel·les. El colesterol i el retinol dels aliments són esterificats a l'enteròcit per formar els èsters de colesterol o èsters de retinol respectivament. Els àcids grassos de cadena més llarga (>12 carbonis) són incorporats als triglicèrids i empaquetats amb Apo B-48, èsters de colesterol, èsters de retinil, fosfolípids i colesterol per formar els quilomicrons. Els quilomicrons es van secretant cap a la limfa intestinal i després són descarregats a la circulació sistèmica, on experimenten múltiples canvis als teixits perifèrics per arribar fins al fetge.

La *lipoproteïna lipasa* (LPL) present a l'endoteli capil·lar del teixit adipós, els músculs i el cor hidrolitza els triglicèrids dels quilomicrons alliberant àcids grassos lliures, els quals són captats pels miòcits o adipòcits adjacents i oxidats o reesterificats i emmagatzemats en forma de triglicèrids. Els àcids grassos lliures que no són captats per aquests són mobilitzats cap altres teixits, principalment el fetge. Els quilomicrons van disminuint de tamany de manera progressiva degut a la cessió dels lípids hidròfils (colesterol i fosfolípids) de la superfície transferits a HDL i la hidrolització del nucli hidròfob. Les partícules resultants, menors de tamany i més riques en èsters de colesterol, són els *quilomicrons remanents*; aquests són retirats de la circulació sistèmica pel fetge mitjançant un procediment que requereix Apo E. Aquest metabolisme provoca que a les 12 hores de dejú els nivells de quilomicrons a la sang siguin molt baixos.

Les tres apolipoproteïnes de la sèrie C (apo C-I, II i III) també participen al metabolisme de les lipoproteïnes riques en triglicèrids modulant l'activitat de la lipoproteïna lipasa.

·Transport de lípids - via endògena:

Aquesta via representa la secreció hepàtica del metabolisme de VLDL a IDL i LDL. Les partícules de VLDL són similars als quilomicrons, però amb major proporció de Apo B-100 i amb un major índex de colesterol/triglicèrid (fins 1mg de colesterol per cada 5mg de triglicèrids). Els triglicèrids de les VLDL deriven predominantment de l'esterificació dels àcids grassos de cadena llarga. La proteïna de transport microsòmic (MTP) és l'enzim que permet l'empaquetament dels triglicèrids amb els altres components de les VLDL tant al fetge com a l'intestí. Els triglicèrids de VLDL són hidrolitzats per LPL, sobretot als teixits muscular i adipós. Conforme els VLDL es van hidrolitzant van esdevenint els IDL, que tenen una proporció semblant entre colesterol i triglicèrids. El fetge retira entre el 40 i el 60% dels remanents de VLDL i IDL mitjançant endocitosi mediada pel receptor a LDL a través de la unió a la Apo E. La IDL restant és remodelada per la lipasa hepàtica (HL) per formar LDL. El colesterol de les LDL constitueix el 70% del colesterol sistèmic dels individus. Aproximadament el 70% dels LDL de la circulació són aclarits mitjançant endocitosi mediada pel receptor a LDL al fetge. La lipoproteïna (a) (Lp[a]) és una lipoproteïna similar a les LDL quant a composició de lípid i proteïna, però conté una proteïna addicional denominada apolipoproteïna a (apo[a]), que és sintetitzada al fetge i adherida a la apo B-100.

Metabolisme de les HDL i transport revers del colesterol:

Totes les cèl·lules nucleades sintetitzen colesterol, però sols els hepatòcits poden metabolitzar de manera eficient i excretar el colesterol de l'organisme. La via predominant de l'eliminació de colesterol és mitjançant l'excreció a la bilis, sigui de forma directa o en forma de sals biliars. El colesterol és transportat de les cèl·lules perifèriques fins als hepatòcits per un procés mediat per HDL i denominat el transport invers de colesterol. Les partícules de HDL adquireixen ràpidament colesterol i fosfolípids addicionals després d'haver-se sintetitzat gràcies a la ABCA1. Un cop incorporat a la partícula de HDL, el colesterol s'esterifica per la *aciltransferasa de lecitina i colesterol* (LCAT), enzim plasmàtic vinculat a les HDL. El colesterol de les HDL és transportat als hepatòcits per una via directa i una via indirecta. Els èsters de colesterol de les HDL es transfereixen a lipoproteïnes que contenen apoB en intercanvi per un triglicèrid, per acció de la *proteïna de transport d'èsters de colesterol* (CETP). Els èsters de colesterol després són retirats de la circulació mitjançant endocitosis mediada per receptors LDL. El colesterol de les HDL també pot ser captat directament pels hepatòcits a través dels *receptors scavenger BI* (SR-BI), un receptor de la superfície cel·lular que media el transport selectiu de lípids cap a les cèl·lules.^[4] Tradicionalment s'ha mesurat la concentració de colesterol i/o triglicèrids de les diferents lipoproteïnes per avaluar el risc cardiovascular, però en els últims anys s'han acumulat múltiples evidències que mostren que hi ha propietats de les lipoproteïnes com el número o el tamany que són molt informatius.^[5] Aquestes dades es poden obtenir mitjançant ressonància magnètica nuclear (RMN). Aquesta metodologia proporciona la concentració dels lípids, el tamany de la lipoproteïna i el nombre tant de les lipoproteïnes principals com de les subclasses de lipoproteïnes. Aquesta eina és essencial a l'estudi del perfil lipídic ja que a banda de la concentració de lipoproteïnes és molt rellevant el tamany d'aquestes ja que, com s'explica a l'apartat següent, les LDL es poden comportar de diferent manera pel que fa a l'etiologia d'arterioesclerosi depenent no només de la concentració sinó també del tamany de les partícules

INFLAMACIÓ I ETIOPATOGÈNIA DE L'ARTERIOESCLEROSI

A continuació, un cop comprès el metabolisme lipídic i els diferents factors que intervenen en aquest, es desenvolupa la etiopatogènia de la placa d'ateroma, procés en el que influeix tant l'acumulació de lípids com els nivells de inflamació del cos.

A diferents models animals d'investigació de l'arterioesclerosi, els signes d'acumulació incipient de lípids a la paret arterial i d'inflamació semblen evolucionar conjuntament. En general, l'endoteli normal no admet la unió dels glòbuls blancs, no obstant, certs factors com una dieta aterogènica promouen que les cèl·lules endotelials comencin a expressar a la seva superfície molècules d'adhesió selectiva (VCAM-1) que s'uneixen a diverses classes de leucòcits, precisament a aquells que es troben a l'ateroma humà primerenc, el monòcit i el limfòcit T. En el procés de formació de la placa d'ateroma també hi participa la pèrdua del patró de flux laminar de la sang, havent més malaltia en les zones de bifurcació de les artèries de calibre mitjà. En absència de flux laminar es perd la síntesi de productes vasodilatadors endògens com l'òxid nítric, considerat un antiinflamatori que pot limitar l'expressió de VCAM-1. A més de disminuir alguns antiinflamatoris endògens, la pèrdua del flux laminar també pot beneficiar l'adhesió de leucòcits a la paret arterial i l'augment de l'estrès a les parets també pot promoure la producció de cèl·lules musculars llises de proteoglicans que poden formar enllaços per retenir lipoproteïnes,

facilitant la modificació oxidativa i promovent la resposta inflamatòria als llocs de formació de lesió^[3]. Un cop els leucòcits s'han adherit a l'endoteli, penetren a la íntima arterial. Hi ha diferents molècules quimioattractives responsables d'aquesta migració, com la *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), encarregada de la migració dels monòcits a la íntima. Un cop a la paret arterial, les cèl·lules inflamatòries sanguínies participen en la perpetuació de la resposta inflamatòria local. Els macròfags expressen receptors de scavenger per a lipoproteïnes modificades, permetent la ingesta de lípids i esdevenint les cèl·lules escumoses. A banda del MCP-1, el *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) contribueix a la diferenciació dels monòcits de la sang en les cèl·lules escumoses dels macròfags. Els leucòcits T també reben senyals que causen que elaborin citoquines inflamatòries com el interferó-gamma o el factor de necrosi tumoral (TNF) que poden estimular tant macròfags, com cèl·lules vasculares endotelials com cèl·lules musculars llises.

Pel que fa a les característiques de les LDL que tenen un paper clau en aquesta formació de la placa d'ateroma, un dels factors de risc principals que han mostrat la seva rellevància al desenvolupament de la malaltia és el tamany de les LDL, ja que aquelles que tenen un tamany més petit i són més denses mostren més potencial de desenvolupament de malaltia arterioescleròtica.^[6] Pel que fa als processos inflamatoris, aquests no només promouen la iniciació i evolució de l'ateroma, sinó que també contribueixen de manera decisiva en el desenvolupament de les complicacions trombòtiques agudes de l'ateroma. Tenint en compte el paper clau del colesterol i de la inflamació en el desenvolupament de la placa d'ateroma i a la complicació trombòtica d'aquesta, les teràpies de reducció de LDL i els antiinflamatoris han demostrat ser efectius per reduir el risc de malaltia ateromatosa^[7].

Tenint en compte açò, si s'aconsegueix reduir el cLDL s'esdevé una disminució de la morbimortalitat cardiovascular. A més, s'ha demostrat que no hi ha un valor mínim de cLDL a partir del qual la disminució d'aquest deixi de ser beneficiosa i tampoc s'ha observat una major incidència en efectes secundaris associats amb menors concentracions de cLDL, per tant és una diana terapèutica amb molt d'interès i pes dintre d'aquesta malaltia.^[8] No obstant, a pesar de que la dieta i els hàbits de les persones influeixen en les concentracions cLDL, també s'ha de tenir en compte que hi ha malalties que li confereixen a l'individu una tendència a l'augment dels nivells de colesterol en plasma. La malaltia més coneguda d'aquestes característiques és la hipercolesterolèmia familiar.

HIPERCOLESTEROLÈMIA FAMILIAR COM A MODEL D'ESTUDI DE cLDL I RISC CARDIOVASCULAR

La **hipercolesterolèmia familiar** és una malaltia genètica causada per la mutació d'un o més gens relacionats amb el metabolisme del colesterol caracteritzada per nivells plasmàtics anormalment elevats de cLDL. La forma més habitual és la heterozigòtica (hi ha la meitat de la capacitat de captació de LDL, i per tant el doble de colesterol en sang), la forma homozigòtica té una prevalença molt més baixa (relació 1/10⁶ persones) però és molt greu ja que els alts nivells de lípids al torrent sanguini poden provocar infarts a edats molt tempranes, als 14-15 anys d'edat. L'excés de colesterol que tenen les persones afectades es pot arribar a distingir de manera visual quan les quantitats són molt elevades, esdevenint quadres clínics com els xantelasmes

(creixement de plaques groguenques a les parpelles) o arcs senils (per depòsits de colesterol al voltant de la còrnia).[9]

Els alts nivells de colesterol, sigui per malaltia genètica o per excés d'ingesta, suposen un factor de risc molt rellevant en el desenvolupament de malaltia arterioescleròtica com s'ha explicat a l'apartat anterior. Per reduir aquest risc d'esdeveniment arterioescleròtic es pot intervenir sobre el colesterol LDL disminuint les concentracions plasmàtiques d'aquest i millorant així el pronòstic d'aquesta malaltia, no obstant s'ha de tenir en compte que igual que hi ha una gran varietat interindividual al metabolisme dels lípids aquesta diferència també es troba amb la resposta als tractaments farmacològics hipolipemiants.[10] Els objectius de cLDL plasmàtic varien segons l'estat de salut del pacient (*taula 3*), aleshores, depenent del pacient i l'objectiu terapèutic es poden emprar els diferents tractaments que hi ha.

Per aconseguir la disminució del cLDL plasmàtic hi ha diferents eines terapèutiques entre les que destaquen dos grans grups, les mesures no farmacològiques (com els hàbits de vida, aliments funcionals o les plantes medicinals) i el tractament farmacològic, el qual desenvolupem a continuació per entendre els diferents mecanismes d'acció dels tractaments reductors de colesterol. No obstant, en aquest treball ens centrarem amb l'activitat dels inhibidors de PCSK9, fàrmacs descrits a la guia de pràctica clínica de cardiologia com a tractament d'elecció per als pacients amb nivells elevats de colesterol, encara que primer introduïrem els tractaments que estan vigents avui en dia pel tractament de la hipercolesterolèmia com ho són les estatines, els inhibidors de l'absorció de colesterol, els quelants d'àcids biliars i els inhibidors de la propteïna convertasa subtilisina/kexina 9 (iPCSK9). [12]

Estatines:

Les estatines redueixen la síntesi de colesterol al fetge per un mecanisme de inhibició competitiva de la HMG-CoA reductasa. La disminució de la concentració de colesterol intracel·lular induïx un augment de l'expressió dels LDLR a la superfície dels hepatòcits, el que produeix un augment de la captació del cLDL desde la sang i una disminució concomitant de la concentració de cLDL circulant i altres lipoproteïnes que contenen apoB, entre elles les partícules riques en TG.

A l'efecte de les estatines s'ha de tenir en compte el regim terapèutic, entenent aquest com la capacitat de disminució de colesterol LDL que té el tractament. El regim d'alta intensitat és aquella dosi d'estatina dintre dels marges terapèutics amb la que s'assoleix una disminució d'un 50% promig del cLDL; amb un regim d'intensitat moderada s'arriben a resultats del 30%-50% de disminució; s'ha de tenir en compte la gran variabilitat interindividual que hi ha amb aquest tipus de tractament.[10]

Inhibidors de l'absorció de colesterol:

L'ezetimibe inhibeix l'absorció intestinal del colesterol biliar o de la dieta sense efectes en l'absorció dels nutrients solubles en greix. Al inhibir l'absorció de colesterol a les vellositats intestinals, l'ezetimibe redueix la quantitat de colesterol que arriba al fetge. En resposta al menor aport de colesterol, el fetge reacciona augmentant l'expressió dels LDLR, el que produeix un augment de l'eliminació de LDL a la sang.

Als estudis clínics s'ha demostrat que com únic tractament a una dosi de 10 mg/dia l'ezetimibe redueix el cLDL dels pacients hipercolesterolèmics en un 15-22% (amb bastanta variabilitat interindividual). [13]

Quelants d'àcids biliars:

Els quelants d'àcids biliars no passen a la circulació sistèmica ni s'alteren pels enzims digestius, pel que els efectes terapèutics són indirectes. Al unir-se als àcids biliars impedeixen que passen a la sang i circulen pel sistema enterohepàtic. El fetge, al no tenir bilis, es veu forçat a sintetitzar més àcids biliars a partir de les reserves hepàtiques de colesterol. L'augment del catabolisme del colesterol per produir àcids biliars condueix a un augment compensatori de l'activitat hepàtica dels LDLR, que atrapen el cLDL de la circulació i amb això redueixen la seva concentració. A dosis màximes s'ha observat una disminució del cLDL d'un 18-25%.

iPCSK9 (proteïna convertasa subtilisina/kexina tipus 9):

La PCSK9 és una proteïna que es produeix al nucli dels hepatòcits i es secreta a l'exterior cel·lular on s'uneix als receptors de LDL (rLDL). [14] Aquest complex format pel rLDL i la PCSK9 sofreix el procés d'endocitosi de manera conjunta a l'interior dels lisosomes, on es degraden tant la proteïna com el receptor de LDL. Podem considerar la PCSK9, per tant, un mediador de la degradació dels rLDL. La major o menor expressió de PCSK9 està determinada genèticament, de manera que quan hi ha un excés d'aquesta hi ha una disminució excessiva dels rLDL i per tant un augment del colesterol LDL al plasma.

La PCSK9, a més, és reconeguda per múltiples receptors com ho són els receptors de LDL (LDLR), el receptor 2 de l'apolipoproteïna E (ApoE2R) i els receptors de VLDL (VLDLR). És per aquesta activitat en diferents receptors pel que aquesta proproteïna participa en la regulació de diversos processos que inclouen la hipercolesterolèmia i l'arterioesclerosi associada, la inflamació vascular, les infeccions virals i la regulació del punt de control de diversos processos oncològics. [15] Degut a la seva intervenció al metabolisme del colesterol el tractament amb inhibidors de la PCSK9 ha mostrat reduir fins un 60% els nivells de cLDL plasmàtic [16] i la reducció d'esdeveniments cardiovasculars tant primaris [17] com secundaris [18].

A un metanàlisi de 20 estudis inicials que incloïa 10159 pacients tractats amb anticossos contra PCSK9 (alirocumab i evolocumab) o placebo/tractament convencional i amb seguiment a curt i mig plaç, es va observar de manera constant una reducció del cLDL del 50% amb els dos fàrmacs analitzats (*taula 4*). [19] També es va observar una reducció uniforme de les xifres de colesterol total (31%) i de lipoproteïna(a) (26%) i un petit augment estadísticament significatiu del colesterol unit a lipoproteïnes d'alta densitat (cHDL) (6%).

A pesar dels beneficis clínics dels iPCSK9 a la reducció de risc d'esdeveniment cardiovascular, en estudis clínics randomitzats no ha demostrat activitat antiinflamatòria i ha fallat a reduir la proteïna C reactiva d'alta sensibilitat (*highsensitivity C-reactive protein* [hsCRP]), un marcador de la inflamació circulant correlacionat amb els esdeveniments cardiovasculars i utilitzat a la pràctica clínica.

Encara que habitualment a la pràctica clínica es solen utilitzar marcadors de fase aguda com ho son la ferritina, la proteïna C reactiva o la procalcitonina; hi ha altres marcadors que ens poden servir per la detecció d'inflamació al nostre organisme, com les glicoproteïnes.

Els senyals de glicoproteïnes ¹H-RMN són una resposta composta a la ressonància magnètica originada per les estructures N-acetilmetil de les glicoproteïnes, principalment glicoproteïnes plasmàtiques de fase aguda amb N-glicans antenaris^[20] que són proporcionals al nombre d'enllaços plasmàtics de glicoproteïnes. Tal com s'ha avaluat amb la ressonància magnètica, es poden diferenciar tres glicoproteïnes (Glyc), la GlycA, la GlycB i la GlycF, que són diferents senyals per al mateix procés.

Al contrari dels biomarcadors comuns de inflamació, GlycA i GlycB són biomarcadors que integren els nivells de proteïnes i l'estat d'agregació d'enllaços de diverses proteïnes de fase aguda més abundants al sèrum (α 1-glicoproteïna àcida, haptoglobina, α 1-antitripsina, α 1-antiquimiotripsina, transferrina) i tenen un paper clau als processos inflamatoris^[21, 22, 23]. Alguns estudis han demostrat que les glicoproteïnes són uns biomarcadors molt sensibles de la inflamació de baix grau en desordres metabòlics i risc cardiovascular amb es descriu als estudis JUPITER i al Women's Health Study, on la GlycA es va associar a diferents esdeveniments cardiovasculars.^[24, 25]

En aquest estudi observacional hem volgut caracteritzar en detall el paper dels iPCSK9 sobre el metabolisme lipídic i també avaluar la capacitat antiinflamatòria dels inhibidors de PCSK9 amb els perfils glicoproteïcs analitzats amb la ressonància magnètica amb una cohort de subjectes amb un risc alt o molt alt d'esdeveniment cardiovascular.

3. HIPÒTESI I OBJECTIUS

Com la PCSK9 està implicada amb diversos receptors lipídics, a banda de reduir els nivells de colesterol plasmàtic pot induir la disminució d'altres lipoproteïnes. A més, el tractament amb iPCSK9 ha fallat a demostrar una disminució de la inflamació calculada amb PCR d'alta sensibilitat (hsCRP); no obstant, al influir sobre els nivells de colesterol al plasma i per tant a la malaltia arterioescleròtica, pensem que el tractament amb iPCSK9 sí que redueix la inflamació sistèmica, només que potser la PCR no sigui la millor forma de calcular la inflamació crònica (que és la que influeix a la malaltia arterioescleròtica) ja que la hsCRP és un marcador d'inflamació aguda.

El nostre estudi s'ha dividit en dues fases amb dos objectius ben delimitats per tal de demostrar la nostra hipòtesi.

-Objectiu clínic: Demostrar que el tractament amb iPCSK9 modifica altres lipoproteïnes i redueix la inflamació.

-Objectiu genètic: Demostrar que l'efecte de PCSK9 sobre la inflamació té una base genètica.

4. MATERIALS I MÈTODES

4.1. Disseny i objectius de l'estudi

L'estudi s'ha dividit en dues fases: la fase clínica i la fase genètica.

4.1.1. Disseny i objectius de la fase clínica de l'estudi

S'han estudiat a un total de 39 pacients de 5 centres diferents: Hospital Universitari Sant Joan de Reus (Reus), Hospital Abente Y Lago (A Coruña), Hospital Virgen del Rocío (Sevilla), Hospital del Mar (Barcelona) i el centre de lípids del Hospital Garibaldi/Universitat de Catània (Sicília, Itàlia).

Tots els subjectes varen començar el tractament amb iPCSK9 en acord a les guies de pràctica clínica del tractament de dislipèmia de la European Atherosclerosis Society i la European Society of Cardiology. Es varen prendre totes les dades considerades com a necessàries per tal de poder fer un bon estudi dels pacients, mitjançant anamnesi dels pacients, incloent la història mèdica i el tractament, dades antropomètriques i la pressió arterial. Es va obtenir també una mostra de sang de cada pacient després de dejú nocturn abans de iniciar el tractament amb la teràpia amb iPCSK9 amb *Alirocumab* i després d'1 a 6 mesos de tractament. Es varen preparar els alíquotes de plasma i es varen emmagatzemar immediatament a -80 °C al biobanc de cada centre. Els anàlisis bioquímics estàndards, concentracions en plasma de PCSK9 i els perfils lipoproteics i glicoproteics complets mitjançant ressonància magnètica nuclear de protons (1H-NMR) es varen fer abans i després del tractament inhibidor de PCSK9. A més, en un subgrup de pacients es varen aïllar les lipoproteïnes per centrifugació. Els pacients varen rebre les seves dosis de 75mg o 150mg (depenent del seu règim de tractament) d'Alirocumab via subcutània cada dues setmanes. Aquest estudi va ser aprovat pel Comitè d'Ètica i d'Investigació Clínica de l'Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV) i complia els principis de la Declaració de Helsinki.

4.1.2. Disseny i objectius de la fase genètica de l'estudi

Per poder completar la fase genètica s'ha emprat la població de l'estudi Horteiga, amb 1504 participants (n=1504). Aquest és un estudi que inclou adults de l'àrea de captació sanitària de el Hospital Universitario Rio Horteiga (UHRH) de Valladolid. És un estudi seccional i prospectiu d'associació genètica, metabòlica (inclou lipidòmica i metabòlits de l'estrés oxidatiu) i riscos ambientals en condicions cròniques concretes, parant especial atenció amb les malalties cardiovasculars.

Per veure si les mutacions genètiques a la PCSK9 tenen importància clínica, s'ha fet l'estudi genètic d'aquesta proteïna determinant els 14 TagSNPs (*figura 1*) que permeten veure les alteracions genètiques representatives de tot el gen i estudiar si hi ha un augment o una disminució significativa de la inflamació als individus que tenen algun d'aquests polimorfismes mutats.

4.2. Anàlisi bioquímic clínic i estàndard

Es varen obtenir les dades antropomètriques dels pacients; incloent sexe, edat, història clínica i medicació. L'índex de massa corporal (IMC) va ser calculat amb les mesures de pes i alçada

(kg/m²). Els paràmetres bioquímics estàndard, incloent lípids, apolipoproteïnes, Lp(a), glucosa en sang i hsCRP, varen ser mesurats utilitzant assaigs colorimètrics, enzimàtics i immunoturbidimètrics (Spinreact, SA, Espanya; Horiba, SA, Espanya), els quals varen ser adaptats per automatització pel clínic químic Cobas Mira Plus Autoanalyzer (Roche Diagnostics, Espanya). Les concentracions estàndard de colesterol LDL varen ser calculades utilitzant la fórmula de Friedewald $[(\text{Colesterol LDL} = \text{colesterol total} - (\text{colesterol HDL} + \text{colesterol VLDL}))]$ i la concentració de remanents de colesterol va ser calculada restant el colesterol LDL i HDL al colesterol total. La PCSK9 circulant va ser mesurada pels preparats de tècnica d'assaig immunoabsorbent lligat a enzims - *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) seguint les instruccions del fabricant.

4.3. Anàlisi de partícules de lipoproteïnes amb 1H-NMR

El tamany i nombre de les partícules de lipoproteïnes va ser definit utilitzant el test de Liposcale® dels laboratoris Teslab SL, el qual és un test de 2D-1H-NMR de nova generació desenvolupat en col·laboració amb el nostre grup d'investigació. En resum, es varen diluir 200 µl de sèrum amb 50 µl d'aigua deuterada i 300 µl de solució tampó fosfat (PBS) a pH 7,4. Els espectres de 1H-NMR es van registrar a 310K en un espectròmetre Bruker Avance III 600 operant a una freqüència de protons de 600,20 MHz (14.1 T). El tamany i nombre de partícules de VLDL, LDL i HDL (incloent els subtipus totals, grans, mitjans i petits de cada tipus de lipoproteïna) varen ser analitzats. Les concentracions de les partícules i els coeficients de difusió varen ser obtinguts a partir dels diferents grups metil mesurats dels espectres 2D-1H-NMR després de l'anàlisi de desconvolució dels senyals del pols 1H-NMR. La variació dels coeficients pels nombres de partícules varen ser entre 2% i 4%. La variació dels coeficients pels tamanys de les partícules fou menor del 0,3%.

4.4. Anàlisi de glicoproteïnes amb 1H-NMR

El perfil de glicoproteïna a les mostres de plasma va ser analitzat amb 1H-NMR conforme al procediment descrit a l'apartat anterior. La regió de l'espectre 1H-NMR on les glicoproteïnes han ressonat (2.15-1.90 ppm) ha sigut analitzada mitjançant diverses funcions en segons el desplaçament químic: GlycA, GlycB i GlycF. Per a cada funció, hem determinat l'àrea total i transformat l'àrea total en concentració segons el nombre d'enllaços sucre-proteïna. L'àrea, l'alçada, la posició i l'ample de banda també foren calculades. L'àrea de GlycA proporciona les concentracions de grups acetil de N-acetilglucosamina i N-acetilgalactosamina, l'àrea de GlycB proporciona les concentracions dels grups acetil d'àcid N-acetilneuramínic a les proteïnes en plasma, i l'àrea de GlycF proporciona la concentració de grups lliures de N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina i àcid N-acetilneuramínic a la mostra.^[26]

4.5. Aïllament de lipoproteïnes per ultracentrifugació i anàlisi d'apolipoproteïnes

Per determinar la concentració d'apoC-III, les lipoproteïnes (VLDL, IDL, LDL i HDL) s'aïllaren utilitzant ultracentrifugació preparativa seqüencial al subgrup de pacients (n=16). La ultracentrifugació es va realitzar en un rotor d'angle fix Beckmann Type 50.4 Ti en una ultracentrífuga Optima XPN100 (Beckman Coulter) a 37.000 rpm durant 20 h a 4°C. El contingut d'apoC-III de cada subfracció de lipoproteïnes es va determinar mitjançant un kit APOMAG-62K (Millipore).

4.6. Anàlisi estadístic

El tamany de la mostra va ser calculat basat en la diferència esperada als marcadors inflamatoris. Les dades disponibles mostren que no hi ha efecte dels iPCSK9 als nivells de Proteïna C Reactiva (PCR), així que no esperàriem grans diferències amb els nivells de GlycA. No obstant, per detectar un 10% de diferència amb els nivells de GlycA després del tractament amb iPCSK9 es requeria el tractament d'un mínim de 25 participants.

L'anàlisi estadístic es va realitzar amb IBM SPSS Statistics® per a Windows, versió 28 (IBM Corp., Armonk, N.Y., USA). La normalitat de les variables va ser avaluada pel test estadístic Shapiro-Wilk; les comparacions de les dades pre-tractament i post-tractament varen ser avaluades utilitzant T-tests aparellats si les dues variables tenien distribució normal i amb el test de Wilcoxon si no. Els coeficients de correlació es varen calcular utilitzant els rangs de correlació de Pearson (per a les variables amb distribució normal) o Spearman (per variables amb una distribució no-normal) i ajustats per sexe, edat, IMC, dosis d'estatines, hipertensió i dosi d'inhibidors de PCSK9.

5. RESULTATS

5.1. Població d'estudi - fase clínica

Pel que fa a la població d'estudi, aquests presentaven una edat mitja de 58 anys (51-65). L'índex de massa corporal mitjà, calculat com la divisió de la massa en kg de la persona entre l'alçada d'aquesta al quadrat, va ser de 28,8 kg/m² (24,54-33,06). Hi van participar 25 homes (64,1%) i 14 dones (35,9%). El colesterol mitjà de la mostra fou de 188,42 mg/dL (171,52-248,65) i els triglicèrids mitjans de 115,94 mg/dL (97,13-171,91). De les 39 persones estudiades, 25 presentaven hipertensió arterial (64,1%) i 12 diabetis mellitus tipus II (30,8%). Pel que fa al tipus de dislipèmia 19 persones tenien hipercolesterolèmia familiar heterozigòtica [HFH] (48,7%), 3 tenien hipercolesterolèmia familiar poligènica [HF poligènica] (7,7%), 2 hiperlipèmia familiar combinada [FCH] (5,13%) i 14 persones més presentaven altres tipus de dislipèmia (*taula 5*).

5.2. Resultats - fase clínica

En aquest apartat es presenten els resultats obtinguts de l'estudi del plasma dels subjectes d'estudi intervinguts, corresponent T0 a les dades analítiques abans de la intervenció amb el tractament i T1 a l'estudi d'aquestes dades després del tractament.

5.2.1. Anàlisi dels canvis al perfil lipídic

A la *figura 2* es representa la mitjana +/- la desviació estàndard de la diferència dels nivells de colesterol i triglicèrids en plasma i cada lipoproteïna, abans i després del tractament amb iPCSK9. El valor p absolut s'ha calculat amb el test de Wilcoxon (** p<0,01). Es presenta una disminució estadísticament significativa del colesterol plasmàtic, el colesterol VLDL, el colesterol IDL, els triglicèrids IDL, el colesterol IDL i els triglicèrids LDL. No ha hagut canvis significatius als triglicèrids plasmàtics ni als triglicèrids de les VLDL.

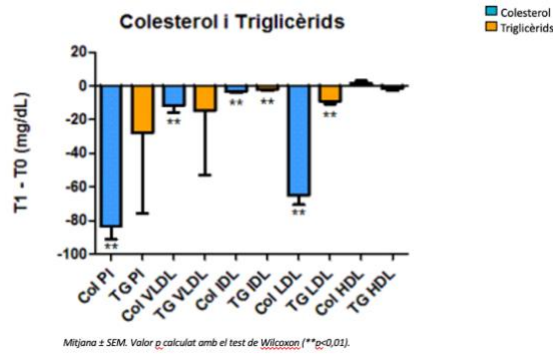


Figura 2: Diferència dels nivells de colesterol i triglicèrids al plasma i a cada lipoproteïna

5.2.2. Anàlisi dels canvis a les concentracions de les apolipoproteïnes - VLDL

Pel que fa als canvis a les apolipoproteïnes de VLDL, només s'observen diferències significatives amb la reducció de la concentració de l'ApoB. No obstant, també es pot apreciar una reducció de l'ApoC-III, la qual encara que no és significativa pot ser d'interès degut a l'associació que té aquesta apolipoproteïna amb la inflamació (figura 3).

ANÀLISI DELS CANVIS A LES CONCENTRACIONS DE LES APOLIPOPROTEÏNES

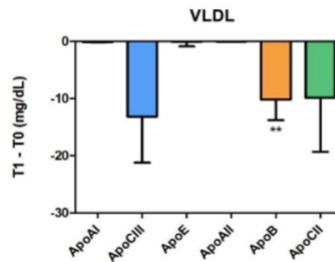


Figura 3: Anàlisi dels canvis a les concentracions de les apolipoproteïnes - VLDL

5.2.3. Anàlisi dels canvis a les concentracions de les apolipoproteïnes - IDL

A les apolipoproteïnes d'IDL s'observa una disminució significativa d'ApoE i d'ApoB (figura 4).

ANÀLISI DELS CANVIS A LES CONCENTRACIONS DE LES APOLIPOPROTEÏNES

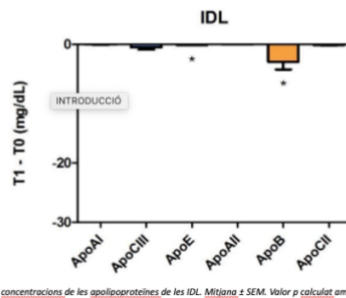
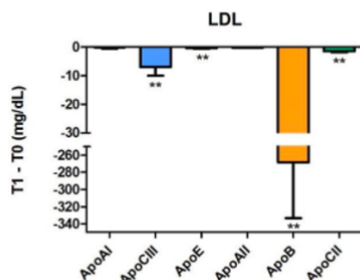


Figura 4: Anàlisi dels canvis a les concentracions de les apolipoproteïnes - IDL.

5.2.4. Anàlisi dels canvis a les concentracions de les apolipoproteïnes - LDL

L'ApoB de les LDL mostra una gran reducció a la concentració plasmàtica després del tractament (figura 5), resultat esperat ja que aquesta és la diana terapèutica dels iPCSK9. Les concentracions de l'ApoE, l'ApoC-II i l'ApoC-III també han patit una disminució plasmàtica significativa.

ANÀLISI DELS CANVIS A LES CONCENTRACIONS DE LES APOLIPOPROTEÏNES:



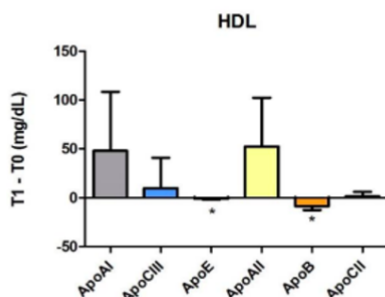
Canvis en les concentracions de les apolipoproteïnes de les LDL. Mitjana \pm SEM. Valor p calculat amb el test de Wilcoxon (**p<0,01).

Figura 5: Anàlisi dels canvis a les concentracions de les apolipoproteïnes - LDL.

5.2.5. Anàlisi dels canvis a les concentracions de les apolipoproteïnes - HDL

El tractament amb iPCSK9 no ha demostrat un augment significatiu dels nivells d'HDL, però sí que s'observa una disminució significativa de l'ApoE i l'ApoB (figura 6).

ANÀLISI DELS CANVIS A LES CONCENTRACIONS DE LES APOLIPOPROTEÏNES:



Canvis en les concentracions de les apolipoproteïnes de les HDL. Mitjana \pm SEM. Valor p calculat amb el test de Wilcoxon (*p<0,05).

Figura 6: Anàlisi dels canvis de les concentracions de les apolipoproteïnes - HDL.

5.2.6. Anàlisi de marcadors d'inflamació: hsCRP i glicoproteïnes

Fins al moment els tractaments amb iPCSK9 no han demostrat reduir els nivells de hsCRP, i al nostre estudi s'ha confirmat aquesta afirmació. No obstant, sí que em pogut apreciar una disminució de la inflamació utilitzant les glicoproteïnes com a marcador inflamatori. A la figura adjunta es pot apreciar com no hi ha diferències significatives amb la concentració de hsCRP però sí que hi ha una disminució amb una $p < 0,01$ per a les tres glicoproteïnes estudiades: GlycA, GlycB i GlycF (figura 7).

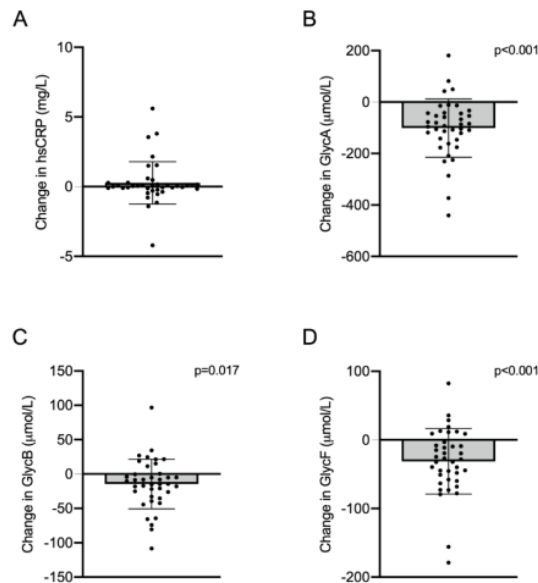


Figura 7: Canvis als marcadors d'inflamació: hsCRP, GlycA, GlycB i GlycF.

5.3. Població d'estudi - fase genètica

Com s'ha explicat a l'apartat corresponent de materials i mètodes, a la fase genètica del nostre assaig hem estudiat una població $n=1504$ pertanyent a l'estudi Hortega (Hospital Universitario Hortega del Río, Valladolid). L'edat mitjana d'aquesta mostra és de 54,44 anys (19,34) i hi ha un total de 754 homes (50,2%) i 748 dones (49,8%). L'índex de massa corporal mitjà, resultat de dividir la massa entre l'alçada al quadrat, és de $26,4 \text{ kg/m}^2$ (4,21). Pel que fa a la tensió arterial, la mitjana de la sistòlica és de 130,74 mmHg (21,63) i la mitjana de la diastòlica de 79,14 mmHg (10,69). S'han calculat 356 pacients amb obesitat (23,7%), 545 amb sobrepès (36,2%) i 114 amb diabetis mellitus tipus II (7,6%) (taula 6).

5.4. Resultats - fase genètica

Dels 14 TagSNPs descrits per a la PCSK9, s'ha pogut observar 5 d'aquests en els quals existeix una mutació significativa que provoca que augmenti o disminueixi la inflamació crònica calculada amb les glicoproteïnes.

5.4.1. Concentracions de glicoproteïnes al SNP rs7552841

Els portadors de la variant al SNP *rs7552841* presenten un 5% més nivells de GlycA ($p=0.03$) (figura 8) i un 2.5% més nivells de GlycB ($p=0.04$) (figura 9) que els individus no portadors de la variant.

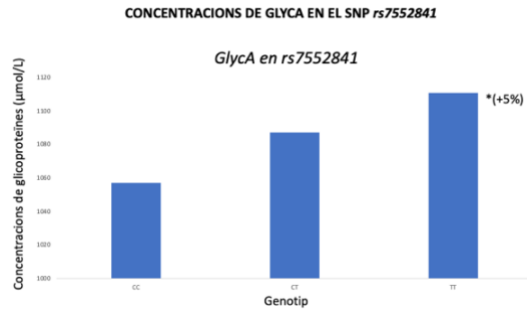


Figura 8: Canvis a la concentració de GlycA en portadors de la variant al SNP rs7552841

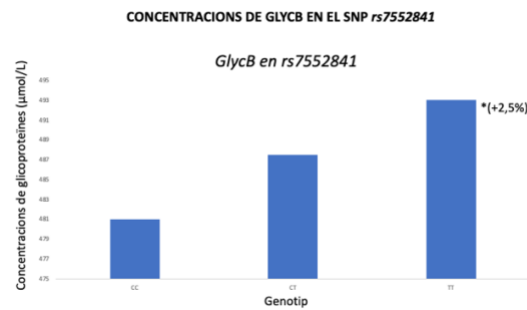


Figura 9: Canvis a la concentració de GlycB en portadors de la variant al SNP rs7552841

5.4.2. Concentracions de glicoproteïnes al SNP rs4927193

Els homozigots per la variant rs4927193 presenten un 6.5% ($p=0.01$) més nivells de GlycB comparat amb els individus no portadors de les variants. Per tant podem suposar que aquesta variant provoca que hi hagi un augment d'inflamació a l'organisme d'aquesta persona (figura 10).

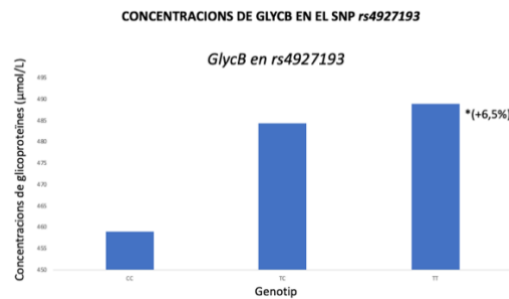


Figura 10: Canvis a la concentració de GlycB en portadors de la variant al SNP rs4927193

5.4.3. Concentracions de glicoproteïnes al SNP rs11206514

En el cas dels homozigots per la variant de rs11206514 s'hi presenta una elevació significativa d'un 1.6% de GlycB respecte els individus no portadors de la variant (figura 11).

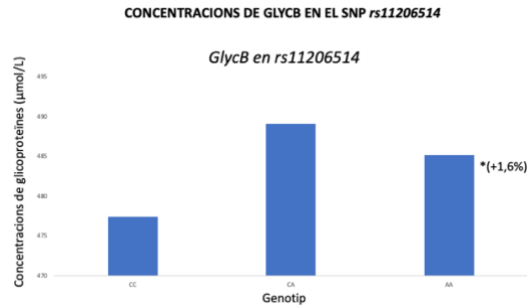


Figura 11: Canvis a la concentració de GlycB en portadors de la variant al SNP rs11206514

5.4.4. Concentracions de glicoproteïnes al SNP rs2495477

Els homozigots per la variant del SNP rs2495477 ($p=0,02$) presenten un 2.5% de disminució dels nivells de GlycB comparat amb els individus que no en són portadors (figura 12).

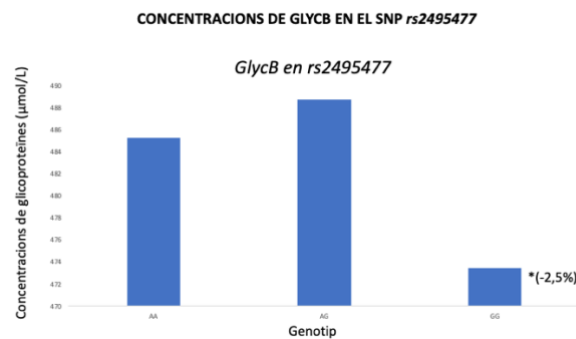


Figura 12: Canvis a la concentració de GlycB en portadors de la variant al SNP rs2495477.

5.4.5. Concentracions de glicoproteïnes al SNP rs499718

Els homozigots per la variant del SNP rs499718 ($p=0,01$) presenten un 6,5% de disminució dels nivells de GlycB comparat amb els individus que no en són portadors (figura 13).

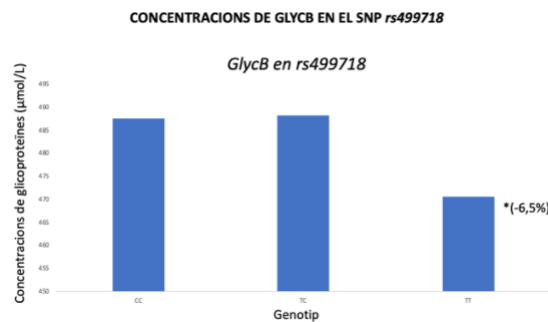


Figura 13: Canvis a la concentració de GlycB en portadors de la variant al SNP rs499718.

5.4.6 Resum dels resultats dels TagSNPs de PCSK9

TagSNPs	GLICOPROTEÏNA	DIFERÈNCIA EN INFLAMACIÓ
<i>rs7552841</i>	GlycA	+5%
<i>rs7552841</i>	GlycB	+2,5%
<i>rs4927193</i>	GlycB	+6,5%
<i>rs11206514</i>	GlycB	+1,6%
<i>rs2495477</i>	GlycB	-2,5%
<i>rs499718</i>	GlycB	-6,5%

Taula 7: Resum dels resultats de TagSNPs de PCSK9.

6. DISCUSSIÓ

En aquest estudi observacional prospectiu, hem explorat els canvis en els biomarcadors inflamatoris després de la teràpia amb iPCSK9 i la seva relació amb els canvis de lipoproteïnes i apolipoproteïnes i hem demostrat que les glicoproteïnes han patit una disminució significativa després de la teràpia d'inhibició de PCSK9 i aquests efectes s'associen amb els canvis dels triglicèrids totals i de l'apoC-III, suggerint així que l'activitat antiinflamatòria d'iPCSK9 està modulada pel metabolisme dels triglicèrids.

En estudis preclínic s'ha trobat associació entre la PCSK9 i la inflamació, independentment dels nivells de colesterol. Més concretament, als macròfags THP1 s'ha demostrat que la sobreexpressió de PCSK9 regula la via proinflamatòria del receptor toll-like 4 (TLR4)/factor nuclear kappa B (NF-kB), un conegut contribuïdor de la inflamació arterioescleròtica^[27], i l'estimulació amb PCSK9 millora l'expressió d'un conjunt de quimiocines i citocines proinflamatòries^[28]. A més, en estudis amb ratolins, la inhibició de PCSK9 ha demostrat millorar la inflamació vascular i reduir la infiltració de cèl·lules immunològiques a la placa^[29], la immunització front a iPCSK9 incrementà els limfòcits Th2 i els nivells de IL-4^[30] i s'ha suggerit que els iPCSK9 podrien suprimir l'estat inflamatori crònic present a l'arterioesclerosi^[31].

Diferents biomarcadors inflamatoris circulats, com IL-6, IL-1b i el factor de necrosis tumoral-a s'han associat amb el risc d'esdeveniment cardiovascular^[32, 33, 34] i alguns mediadors de la inflamació estan estretament associats amb el metabolisme lipoproteic com la HDL o l'apo C-III, aquesta última implicada directament en l'adhesió i activació dels monòcits^[35]. Destacar nous biomarcadors, com les glicoproteïnes plasmàtiques de fase aguda, que es poden detectar mitjançant l'espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear (1H-NMR) que han sorgit com eines prometedores per detectar patrons inflamatoris a l'inici i la progressió dels esdeveniments cardiovasculars.^[36]

6. 1. Canvis als marcadors d'inflamació

L'estudi de CANTOS identifica clarament que la inflamació és una de les claus per prevenir l'arterioesclerosi a més de disminuir els nivells de LDL.^[37] A més, entendre si la teràpia amb

iPCSK9 pot exhibir un benefici antiinflamatori a banda de la seva activitat reductora de nivell de lípids en sang és un aspecte de clar interès clínic. En aquest context, hem testat un set de biomarcadors que inclouen hsCRP, GlycA, GlycB i GlycF i hem observat una reducció de totes les glicoproteïnes; en particular, GlycA i GlycF han mostrat una reducció significativa d'un 7% i 12% respectivament. Els nostres resultats confirmen les dades d'altres resultats publicats que indiquen que la reducció de colesterol LDL pel tractament amb iPCSK9 no s'acompanya d'una reducció de hsCRP.

La glicosilació juga un paper clau a la inflamació, i els nivells reduïts d'aquests paràmetres indiquen una disminució de l'estat inflamatori sistèmic al grup de tractament. GlycA i GlycF s'associen amb la presència de N-acetilgalactosamina i N-acetilglucosamina enllaçats (Glyc A) o no enllaçats (GlycF) a les proteïnes. La majoria de les aproximacions metodològiques no distingeixen entre aquestes dues senyals amb 1H-NMR, ja que apareixen a la mateixa regió d'espectre i són determinades de manera simultània contribuint a l'àrea de GlycA total.^[38]

Els estudis previs mostraven una associació entre GlycA i un major risc de tenir un esdeveniment cardiovascular (CVD) independentment dels nivells de lípids^[39, 26], implicant un major nombre de residus de N-acetilglucosamina presents a les proteïnes plasmàtiques en diverses condicions relacionades amb la inflamació.^[21, 41, 42]

Fins on sabem, aquest és el primer estudi que parla de les reduccions significatives de glicoproteïnes després del tractament amb iPCSK9. A diferència de l'estudi per Sliz et al. que no va trobar diferències significatives i una reducció molt modesta de GlycA als portadors del polimorfisme rs11591147 de PCSK9 que van determinar per imitar la inhibició terapèutica de PCSK9, els nostres resultats mostren que els inhibidors de PCSK9 disposen d'una capacitat antiinflamatòria més elevada. Encara que les glicoproteïnes reflexen l'activitat antiinflamatòria de iPCSK9, la hsCRP no ho fa. Aquesta troballa es relaciona amb les característiques intrínseques de les glicoproteïnes com a marcadors inflamatoris; mentre que la proteïna C reactiva és una proteïna única amb una alta variabilitat interindividual, GlycA és un biomarcador compost que integra els nivells de proteïnes i els estats de glicosilació de diverses de les proteïnes de fase aguda més abundants a la circulació i que mostra una variabilitat interindividual menor que la hsCRP.

Nombrosos estudis han demostrat la utilitat de GlycA com un biomarcador per al risc cardiometabòlic. Curiosament, a la majoria dels casos les associacions no es relacionen amb la PCR, suggerint que la PCR i la GlycA reflexen diferents aspectes de l'estat inflamatori^[42] i s'associen amb diferents esdeveniments cardiovasculars.^[43] Com hem observat reduccions a diversos lípids i apolipoproteïnes diferents al colesterol LDL amb el tractament amb iPCSK9, vam explorar si els canvis en les proteïnes glicades es podrien relacionar amb canvis en altres lipoproteïnes o apolipoproteïnes. Hem trobat una alta correlació significativa entre la disminució de les tres glicoproteïnes i la disminució de les lipoproteïnes riques en triglicèrids, remanents de colesterol i apoC-III. Les lipoproteïnes riques en triglicèrids i els remanents de colesterol són claus a l'acumulació de colesterol als infarts de miocardi i a les malalties per esdeveniment

cardiovascular,^[44, 45] i la reducció tant genètica com terapèutica d'apoC-III redueix de manera significativa la incidència de malaltia cardiovascular.^[46, 47]

En particular, s'ha observat una reducció significativa d'apoC-III en les LDL després del tractament, ja que les LDL riques en apoC-III mostren una capacitat incrementada per esdevenir un lligam amb la matriu extracel·lular.^[48] En conjunt, els nostres resultats mostren un efecte antiaterogènic global per part dels iPCSK9, mes enllà de la disminució dels nivells de LDL.

6.2. Canvis als lípids, lipoproteïnes i apolipoproteïnes

El tractament amb alirocumab ha resultat en un efecte global sobre el perfil lipídic definit per una reducció del 55% de colesterol LDL, un 10% de reducció dels triglicèrids al plasma i un augment del 12% del colesterol HDL. A més, apoB, apoC-III i Lp(a) s'han reduït un 43, 10 i 22% respectivament. Aquests canvis coincideixen amb els resultats d'un anàlisi de 10 estudis fase III amb alirocumab amb un total de 4983 participants.^[49] Més enllà dels resultats de reducció del colesterol LDL, les disminucions dels remanents de colesterol i d'apoC-III, que trobem com a conseqüència de la disminució dels triglicèrids a plasma, són resultats importants des d'un punt de vista tan metabòlic com antiaterogènic. Mentre que els remanents de colesterol s'han identificat com un factor més determinant que el colesterol LDL per causar malaltia cardiovascular^[44] i infart de miocardi,^[45] apoC-III és una proteïna funcional involucrada en diversos processos aterogènics, com l'eliminació retardada de lipoproteïnes, la hidròlisi deteriorada de triglicèrids i l'augment de l'adhesió a la matriu extracel·lular.

En aquest context, la reducció del 46% d'apoC-III en les LDL detectats després del tractament és destacable ja que apoC-III està també associada a les disfuncions pancreàtiques que acaben donant diabetis.^[50]

La reducció del 10% dels triglicèrids plasmàtics no resulta significat a la concentració de les partícules de VLDL de cap mida, suggerint un augment de la hidròlisi dels triglicèrids en lloc de la disminució de la secreció o l'augment de l'eliminació de les partícules VLDL. Encara que estudis previs han mostrat reduccions en la concentració de partícules VLDL després del tractament amb iPCSK9,^[51, 52] un punt de vista més centrat en la nostra població revela una alta variabilitat interindividual, el que probablement explica l'absència d'un canvi mitjà.

En canvi, la reducció del 55% del colesterol LDL ha resultat en una disminució significativa de totes les partícules LDL, incloent les de tamany gran (-34%), mitjà (-59%) i petit (-26%), confirmant dades publicades en estudis previs.^[51, 52]

A l'estudi de Koren et al.,^[52] el tractament amb alirocumab va canviar el perfil de HDL-P de petit a gran. Malgrat això, els nostres resultats indiquen la tendència oposada amb una elevació del 7% del total de partícules HDL, principalment a expenses de les partícules petites. Tot i que alguns estudis informen que partícules petites de HDL són efectives pel transport invers de colesterol, aquest és un tema controvertit i cal fer més investigacions per caracteritzar d'una forma més específica les subespècies HDL, tant pel que fa al tamany com al contingut proteic, en relació a la seva funcionalitat.^[53]

6.3. Concentracions plasmàtiques de PCSK9

La concentració total de PCSK9 després del tractament va augmentar una mitjana de 6 cops, i aquest augment es va correlacionar molt amb la concentració de colesterol LDL i les partícules de LDL. Aquests efectes de l'alirocumab observats sobre les partícules de les lipoproteïnes es comparen amb anàlisis previs de RMN que mostren que els nivells circulants de PCSK9 lliure es correlacionen amb les concentracions de les partícules de LDL_[54] i confirmen que l'increment de concentració de PCSK9 és compatible amb una millora global des marcadors aterogènics.

A més, altres estudis proposen que el canvi a les concentracions de PCSK9 es podria utilitzar per confirmar l'adherència al tractament amb iPCSK9._[55] Increments de la concentració de PCSK9 no es correlacionaren amb els canvis en les glicoproteïnes, suggerint que ambdós canvis no estan correlacionats. Una limitació d'aquest estudi pot ser la diferència entre la dosi de PCSK9 i estatines i el temps de seguiment. La dosi de iPCSK9 i la dosi d'estatines s'ha considerat una variable confusora i no s'observaren diferències significatives entre els grups de pacients amb diferent temps de seguiment; no obstant, serien d'interès futurs estudis amb més homogeneïtat pel que fa a grup de pacients i intervenció per tal de confirmar aquestes troballes. Un cop s'han demostrat els efectes beneficiosos dels iPCSK9 amb la inflamació sistèmica diferents d'aquells associats a la hsCRP, serien necessaris nous estudis per entendre els beneficis d'aquesta acció antiinflamatòria en la progressió de l'arterioesclerosi i en els esdeveniments cardiovasculars i altres condicions inflamatòries com la diabetis, el lupus eritematós sistèmic o l'artritis reumatoide.

6.4. Canvis a la inflamació per mutacions puntuals a la PCSK9

Al igual que al inhibir la PCSK9 amb la teràpia farmacològica hi ha un canvi significatiu del perfil lipídic i de la inflamació dels pacients, s'ha demostrat que mutacions genètiques puntuals de la proteïna en qüestió provoquen un augment o disminució significatiu de la inflamació als individus, depenent de la mutació genètica implicada. Dels 14 TagSNPs que presenta la PCSK9 al nostre estudi s'ha evidenciat el canvi en 5 d'ells, obrint així les portes d'una nova interpretació de la influència d'aquesta proteïna a la fisiologia dels lípids i la inflamació al cos dels éssers humans.

6.5 Conclusions finals

Resumint, a l'estudi present hem demostrat que, més enllà de disminuir el colesterol LDL, l'ApoB i la Lp(a), els iPCSK9 també disminueixen l'ApoC-III, triglicèrids i biomarcadors de inflamació com ho són la GlycA, GlycB i GlycF. En canvi, no s'han observat reduccions en la hsCRP. El colesterol HDL i l'Apo-I augmenten lleugerament després del tractament i també s'ha observat que augmenten fins 6 cops els nivells circulants de PCSK9. En conclusió, mostrem com les glicoproteïnes revelen una activitat antiinflamatòria significativa dels iPCSK9, que sembla estar relacionada amb els triglicèrids i l'ApoC-III. A més, hem demostrat que certes mutacions a la PCSK9 poden influir també en la inflamació de l'organisme, augmentant o disminuint així una de les claus del desenvolupament de malaltia arterioescleròtica.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Lahoz C. i Mostaza J.M. *La arterioesclerosis como enfermedad sistémica*. Revista Española de Cardiología. (2007).
2. Libby P. et al. *Atherosclerosis*. Nat Rev Dis Primers (2019).
3. Maciejko J.J. et al. *Atherosclerosis risk factors*. AACCPress. (2004).
4. Larry J. et al. *Endocrinology*. Harrison. (2007).
5. Guardiola M, Rehues P, Amigó N, Arrieta F, Botana M, Gimeno-Orna JA, Girona J, Martínez-Montoro JI, Ortega E, Pérez-Pérez A, Sánchez-Margalet V, Pedro-Botet J, Ribalta J. *Cardiovascular Disease Group of the Spanish Society of Diabetes. Increasing the complexity of lipoprotein characterization for cardiovascular risk in type 2 diabetes*. European Journal of Clinical Investigation. (2024).
6. Vekic, J.; Zeljkovic, A.; Cicero, AFG.; Janez, A.; Pantea Stoian, A.; Sonmez, A.; Rizzo, M. *Atherosclerosis Development and Progression: The Role of Atherogenic Small, Dense LDL*. Medicina (Kaunas). (2022).
7. Grundy S. et al. *Guideline on the Management of Blood Cholesterol: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines*. Circulation (2018)
8. Pedro-Botet, J.; et al. *LDL-cholesterol: The lower the better*. Clinica e Investigación en arterioesclerosis. (2019).
9. Enchia, V.; et al. *Familial hypercholesterolemia*. Cardiol clin. (2015).
10. Boekholdt, SM.; et al. *Very low levels of atherogenic lipoproteins and the risk for cardiovascular events: A meta-analysis of Statin Trials*. Journal of the American College of Cardiology. (2014).
11. Mach, F.; et al. *Guía ESC/EAS 2019 sobre el tratamiento de las dislipemias: Modificación de los Lípidos Para reducir El Riesgo Cardiovascular*. Revista Española de Cardiología (taula 7). (2020).
12. Grupo de trabajo de la Guía de Práctica Clínica sobre el manejo de los lípidos como factor de riesgo cardiovascular. *Guía de Práctica Clínica sobre el manejo de los lípidos como factor de riesgo cardiovascular*. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. OSTEBA. (2017)
13. Phan, BA.; et al. *Ezetimibe therapy: mechanism of action and clinical update*. Vascular Health Risk Management. (2012).
14. Abifadel, M.; et al. *Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia*. Nature Genetics. (2003)
15. Seidah Nabil, G.; et al. *The PCSK9 discovery, an inactive protease with varied functions in hypercholesterolemia, viral infections, and cancer*. Journal of lipid research. (2021)
16. Rosenson, RS.; et al. *The evolving future of PCSK9 inhibitors*. Journal of the American College of Cardiology. (2018).
17. Oesterle, A.; Laufs, U.; Liao, JK.; *Pleiotropic Effects of Statins on the Cardiovascular System*. Circulation research. (2017)
18. Robinson, JG.; Farnier, M.; Krempf, M.; Bergeron, J.; Luc, G.; Averna, M.; Stroes, ES.; Langslet, G.; Raal, FJ.; El Shahawy, M.; et al. *Efficacy and Safety of Alirocumab in Reducing Lipids and Cardiovascular Events*. The New England Journal of Medicine.(2015).
19. Navarese, E.: et al. *Effects of Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 Antibodies in Adults With Hypercholesterolemia: A Systematic Review and Meta-analysis*. Annals of internal medicine. (2015)
20. Otvos, JD.; Shalaurova, I.; Wolak-Dinsmore, J.; Connelly, MA.; Mackey, RH.; Stein, JH.; Tracy, RP.; *GlycA: A composite nuclear magnetic resonance biomarker of systemic inflammation*. Clinical Chemistry. (2015)
21. Fuertes-Martín, R.; Correig, X.; Vallvé, J.; Amigó, N.; *Human Serum / Plasma Glycoprotein Analysis by 1 H-NMR, an Emerging Method of Inflammatory Assessment*. (2020)
22. Lorenzo, C.; Festa, A.; Hanley, AJ.; Rewers, MJ.; Escalante, A.; Haffner, SM.; *Novel protein glycan-derived markers of systemic inflammation and c-reactive protein in relation to glycemia, insulin resistance, and insulin secretion*. Diabetes Care. (2017).
23. Fuertes-Martín, R.; Taverner, D.; Vallvé, JC.; Paredes, S.; Masana, L.; Correig-Blanchar, X.; Amigó-Grau, N.; *Characterization of 1 H-NMR Plasma Glycoproteins as a New Strategy to Identify Inflammatory Patterns in Rheumatoid Arthritis*. Journal of Proteome Research. (2018).
24. Akinkuolie, A.O.; Buring, J.E.; Ridker, P.M.; Mora, S. *A novel protein glycan biomarker and future cardiovascular disease events*. Journal of the American Heart Association. (2014)

25. Akinkuolie, A.O.; Glynn, R.J.; Padmanabhan, L.; Ridker, P.M.; Mora, S. Circulating NLinked Glycoprotein Side-Chain Biomarker, Rosuvastatin Therapy, and Incident Cardiovascular Disease: An Analysis From the JUPITER Trial. *Jouarnal of the American Heart Association*. (2016).
26. Amigó, N.; Fuertes-Martín, R.; Malo, A.I.; Plana, N.; Ibarretxe, D.; Girona, J.; Correig, X.; Masana, L. *Glycoprotein Profile Measured by a1 H-Nuclear Magnetic Resonance Based on Approach in Patients with Diabetes: A New Robust Method to Assess Inflammation*. *Life*. (2021).
27. Tang, Z.; Jiang, L.; Peng, J.; Ren, Z.; Wei, D.; Wu, C.; Pan, L.; Jiang, Z.; Liu, L. *PCSK9 siRNA suppresses the inflamattory response induced by ocLDL through inhibition of NF-kB activation in THP-1-derived macrophages*. *International Journal of Molecular Medicine*. (2012).
28. Ricci, C.; Ruscica, M.; Camera, M.; Rossetti, L.; MacChi, C.; Colciago, A.; Zanotti, I.; Lupo, M.G.; Adorni, M.P.; Cicero, A.F.G.; et al. *PCSK9 induces a pro-inflammatory response in macrophages*. *Scientific Reports*. (2018).
29. Ricci, C.; Ruscica, M.; Camera, M.; Rossetti, L.; MacChi, C.; Colciago, A.; Zanotti, I.; Lupo, M.G.; Adorni, M.P.; Cicero, A.F.G.; et al. *Alirocumab inhibits atherosclerosis, improves the plaque morphology, and enhances the effects of a statin*. *Journal of Lipid Research*. (2014).
30. Momtazi-Borojeni, A.A.; Jaafari, M.R.; Afshar, M.; Banach, M.; Sahebkar, A. *PCSK9 immunization using nanoliposomes: Preventive efficacy against hypercholesterolemia and atherosclerosis*. *Archives of Medical Science*. (2021).
31. Punch, E.; Klein, J.; Diaba-Nuhoho, P.; Morawietz, H.; Garelnabi, M.. *Effects of PCSK9 Targeting: Alleviating Oxidation, Inflammation, and Atherosclerosis*. *Journal of American Heart Association*. (2022).
32. Abbate, A.; Toldo, S.; Marchetti, C.; Kron, J.; Tassell, B.W. Van; Dinarello, C.A. *Interleukin1 and the Inflammasome as Therapeutic Targets in Cardiovascular Disease*. *Circulation Research*. (2020).
33. Balogh, E.; Pusztai, A.; Hamar, A.; Végh, E.; Szamosi, S.; Kerekes, G.; McCormick, J.; Biniiecka, M.; Szántó, S.; Szűcs, G.; et al. *Autoimmune and angiogenic biomarkers in autoimmune atherosclerosis*. *Clinical Immunology*. (2019).
34. Joung, K.H.; Kim, J.M.; Choung, S.; Lee, J.H.; Kim, H.J.; Ku, B.J. *Association between IL1beta and cardiovascular disease risk in patients with newly diagnosed, drug-naïve type 2 diabetes mellitus: a cross-sectional study*. *Annals of Translational Medicine*. (2020)
35. Kawakami, A.; Aikawa, M.; Libby, P.; Alcaide, P.; Lusinskas, F.W.; Sacks, F.M. *Apolipoprotein CIII in apolipoprotein B lipoproteins enhances the adhesion of human monocytic cells to endothelial cells*. *Circulation*. (2006)
36. Ballout, RA.; Remaley, AT. *GlycA: a new biomarker for systemic inflammation and cardiovascular disease (CVD) risk assessment*. *Journal of Laboratory and Precision Medicine*. (2020).
37. Ridker, P.M.; Everett, B.M.; Thuren, T.; MacFadyen, J.G.; Chang, W.H.; Ballantyne, C.; Fonseca, F.; Nicolau, J.; Koenig, W.; Anker, S.D.; et al. *Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease*. *The New England Journal of Medicine*. (2017).
38. Fuertes-Martín, R.; Moncayo, S.; Insenser, M.; Martínez-García, M.Á.; Luque-Ramírez, M.; Grau, N.A.; Blanchar, X.C.; Escobar-Morreale, H.F. *Glycoprotein A and B Height-toWidth Ratios as Obesity-Independent Novel Biomarkers of Low-Grade Chronic Inflammation in Women with Polycystic Ovary Syndrome (PCOS)*. *Journal of Proteome Research*. (2019).
39. Malo, A.I.; Girona, J.; Ibarretxe, D.; Rodríguez-Borjabad, C.; Amigó, N.; Plana, N.; Masana, L. *Serum glycoproteins A and B assessed by 1H-NMR in familial hypercholesterolemia. Atherosclerosis*. (2021).
40. Rodríguez-Carrio, J.; Alperi-López, M.; López, P.; Pérez-álvarez, Á.I.; Gil-Serret, M.; Amigó, N.; Ulloa, C.; Benavente, L.; Ballina-García, F.J.; Suárez, A. *Glyca levels during the earliest stages of rheumatoid arthritis: Potential use as a biomarker of subclinical cardiovascular disease*. *Journal of Clinical Medicine*. (2020).
41. Keser, T.; Gornik, I.; Vučković, F.; Selak, N.; Pavić, T.; Lukić, E.; Gudelj, I.; Gašparović, H.; Biočina, B.; Tilin, T.; et al. *Increased plasma N-glycome complexity is associated with higher risk of type 2 diabetes*. *Diabetologia*. (2017).
42. Connelly, M.A.; Otvos, J.D.; Shalurova, I.; Playford, M.P.; Mehta, N.N. *GlycA, a novel biomarker of systemic inflammation and cardiovascular disease risk*. *Journal of Translational Medicine*. (2017).
43. Riggs, K.A.; Joshi, P.H.; Khera, A.; Otvos, J.D.; Greenland, P.; Ayers, C.R.; Rohatgi, A. *GlycA, hsCRP differentially associated with MI, ischemic stroke: In the Dallas Heart Study and Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis*. *American Journal of Preventive Cardiology*. (2022)

44. Castañer, O.; Pintó, X.; Subirana, I.; Amor, A.J.; Ros, E.; Hernáez, Á.; Martínez-González, M.Á.; Corella, D.; Salas-Salvadó, J.; Estruch, R.; et al. *Remnant Cholesterol, Not LDL Cholesterol, Is Associated With Incident Cardiovascular Disease*. Journal of the American College of Cardiology. (2020).
45. Balling, M.; Afzal, S.; Varbo, A.; Langsted, A.; Davey Smith, G.; Nordestgaard, B.G. *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).
46. Jørgensen, A.B.; Frikke-Schmidt, R.; Nordestgaard, B.G.; Tybjaerg-Hansen, A. *Loss-of Function Mutations in APOC3 and Risk of Ischemic Vascular Disease*. The New England Journal of Medicine. (2014).
47. Crosby, J.; Peloso, G.M.; Auer, P.L.; Crosslin, D.R.; Stitzel, N.O.; Lange, L.A.; Lu, Y.; Tang, Z.; Zhang, H.; Hindy, G.; et al. *Loss-of-Function Mutations in APOC3, Triglycerides, and Coronary Disease*. The New England Journal of Medicine. (2014).
48. Hiukka, A.; Ståhlman, M.; Pettersson, C.; Levin, M.; Adiels, M.; Teneberg, S.; Leinonen, E.S.; Hultén, L.M.; Wiklund, O.; Orešič, M.; et al. *ApoCIII-enriched LDL in type 2 diabetes displays altered lipid composition, increased susceptibility for sphingomyelinase, and increased binding to biglycan*. Diabetes. (2009).
49. Henry, R.R.; Müller-Wieland, D.; Taub, P.R.; Bujas-Bobanovic, M.; Louie, M.J.; Letierce, A.; Ginsberg, H.N. *Effect of alirocumab on lipids and lipoproteins in individuals with metabolic syndrome without diabetes: Pooled data from 10 phase 3 trials*. Journal of Diabetes, Obesity and Metabolism. (2018).
50. Juntti-Berggren, L.; Berggren, P.O. *Apolipoprotein CIII is a new player in diabetes*. Current Opinion in Lipidology. (2017).
51. Toth, P.P.; Sattar, N.; Blom, D.J.; Martin, S.S.; Jones, S.R.; Monsalvo, M.L.; Elliott, M.; Davis, M.; Somaratne, R.; Preiss, D. *Effect of Evolocumab on Lipoprotein Particles*. American Journal of Cardiology. (2018).
52. Koren, M.J.; Kereiakes, D.; Pourfarzib, R.; Winegar, D.; Banerjee, P.; Hamon, S.; Hanotin, C.; McKenney, J.M. *Effect of PCSK9 inhibition by alirocumab on lipoprotein particle concentrations determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy*. Journal of the American Heart Association. (2015).
53. Sliz, E.; Kettunen, J.; Holmes, M. V.; Williams, C.O.; Boachie, C.; Wang, Q.; Männikkö, M.; Sebert, S.; Walters, R.; Lin, K.; et al. *Metabolomic Consequences of Genetic Inhibition of PCSK9 Compared with Statin Treatment*. Circulation. (2018).
54. Kwakernaak, A.J.; Lambert, G.; Dullaart, R.P.F. *Plasma proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 is predominantly related to intermediate density lipoproteins*. Clinical Biochemistry. (2014).
55. Shapiro, M.D.; Tavori, H.; Fazio, S. *PCSK9 from basic science discoveries to clinical trials*. Circulation Research. (2018).

8. ANNEXES

Categoria I	<i>Fumar tabac, elevats nivells de cLDL, dietes riques en greixos saturats, hipertensió i hipertròfia del ventricle esquerre</i>
Categoria II	<i>Diabetis mellitus, baixes concentracions de cHDL, hipertrigliceridèmia, partícules de LDL petites i denses i sedentarisme</i>
Categoria III	<i>Factors psicosocials, concentracions elevades de Lp(a), hiperhomocisteïnèmia i estrès oxidatiu</i>
Categoria IV	<i>Edat (quant més vell més risc), sexe masculí, la història familiar d'esdeveniment cardiovascular temprà (<55 anys en homes i <65 anys en dones) i baix nivell socioeconòmic</i>

Taula 1. Classificació de factors de risc de desenvolupament de malaltia cardiovascular arterioescleròtica^[3]

APOLIPOPROTEÏNA	FONT PRIMÀRIA	VINCULACIÓ A LIPOPROTEÏNES	FUNCIÓ
Apo A-I	Intestí, fetge	HDL, quilomicrons	Proteïna estructural HDL; activitat LCAT
Apo A-II	Fetge	HDL, quilomicrons	Proteïna estructural HDL
Apo A-IV	Intestí	HDL, quilomicrons	Desconeguda
Apo A-V	Fetge	VLDL	Desconeguda
Apo B-48	Intestí	quilomicrons	Proteïna estructural de quilomicrons
Apo B-100	Fetge	VLDL, IDL, LDL, LP(a)	Proteïna estructural per VLDL, LDL, IDL, Lp(a); Lligand per fixar el receptor de LDL
Apo C-I	Fetge	quilomicrons, VLDL, HDL	Desconeguda Modula l'activitat de LPL
Apo C-II	Fetge	quilomicrons, VLDL, HDL	Cofactor LPL Modula l'activitat de LPL
Apo C-III	Fetge	quilomicrons, VLDL, HDL	Inhibeix la fixació de lipoproteïnes a receptors Modula l'activitat de LPL
Apo D	Melsa, cervell, testicles, suprarenals	HDL	Desconeguda
Apo E	Fetge	Remanents de quilomicro, IDL, HDL	Lligand per fixació a receptor de LDL
Apo H	Fetge	quilomicrons, VLDL, LDL, HDL	Glucoproteïna I B ₂
Apo J	Fetge	HDL	Desconeguda
Apo L	Desconegut	HDL	Desconeguda
Apo (a)	Fetge	Lp(a)	Desconeguda

Taula 2. Apolipoproteïnes majors.

Risc molt alt en prevenció primària o secundària^a	Regim terapèutic per reduir un 50% del <u>valor basal^b</u> i objectiu d'una concentració de cLDL <1,4 mmol/L (<55 mg/dL)
Risc alt	Regim terapèutic per reduir un 50% del <u>valor basal^b</u> i objectiu d'una concentració de cLDL <1,8 mmol/L (<70 mg/dL)
Risc moderat	Regim terapèutic per assolir l'objectiu d'una concentració de cLDL <2,6 mmol/L (<100 mg/dL)
Risc baix	Regim terapèutic per assolir l'objectiu d'una concentració de cLDL <3 mmol/L (<116 mg/dL)

Taula 3: Diances terapèutiques i objectius a assolir a la prevenció de la malaltia cardiovascular. [11]

a: Els riscos fan referència al risc cardiovascular calculat amb l'escala SCORE

b: cLDL basal: concentració de cLDL d'una persona que no pren medicació hipolipèmica alguna o al corresponent valor basal extrapolat en cas de prendre medicació.

Metanàlisi	Reducció de cLDL, % (95%)	p valor
iPCSK9 vs no iPCSK9	-47,5 (69,6-25,3)	<0,001
iPCSK9 vs placebo	-58,8 (61,0-56,5)	<0,001
iPCSK9 vs ezetimibe	-36,17(39,3-33,1)	<0,001

Taula 4: Reducció de cLDL amb el tractament amb iPCSK9 vs altres tractaments i placebo.

EDAT (anys)		58 (51-65)
IMC (kg/m ²)		28,8 (24,54-33,06)
SEXE	HOME	25 (64,1%)
	DONA	14 (35,9%)
COLESTEROL (mg/dL)		188,42 (171,52-248,65)
TAG (mg/dL)		115,94 (97,13-171,91)
HTA		25 (64,1%)
DM tipus II		12 (30,8%)
TIPUS DE DISLIPÈMIA	HFH	19 (48,7%)
	HF poligènica	3 (7,7%)
	FCH	2 (5,13%)
	Altres	14 (35,9%)

Taula 5: Característiques dels objectes d'estudi - fase clínica.

Entre parèntesis estan els rangs interquartílics (Q1 i Q3).

EDAT		54,44 (19,34)
SEXE	HOME	754 (50,2%)
	DONA	748 (49,8%)
IMG (kg/m ²)		26,4 (4,21)
PAS (mmHg)		130,74 (21,63)
PAD (mmHg)		79,14 (10,69)
OBESITAT		356 (23,7%)
SOBREPÈS		545 (36,2%)
DM tipus II		114 (7,6%)

Taula 6: Característiques dels objectes d'estudi - fase genètica.
*Entre parèntesi es presenten les desviacions estàndard dels valors.

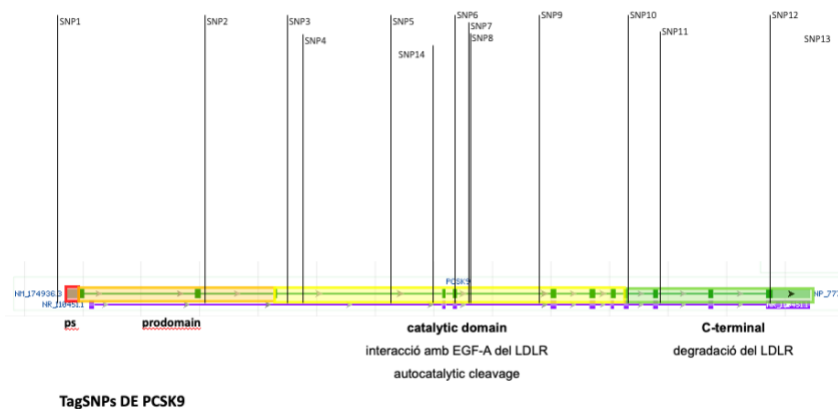


Figura 1: Esquema del gen PCSK9 i localització dels 14 tagSNPs determinats.



DICTAMEN COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS

DOÑA ELISABET GALVE AIXA, Secretaria del COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS DEL INSTITUT D'INVESTIGACIÓ SANITÀRIA PERE VIRGILI. CEIm-IISPV

HACE CONSTAR QUE:

Este Comité, en su reunión de fecha 31/10/2019 acta número 09/2019 se ha evaluado y decidido emitir Informe Favorable para que se realice el estudio titulado:

"EFFECT OF IPCSK9 ON LIPOPROTEIN FEATURES CONFERRING CARDIOVASCULAR RISK TO TYPE 2 DIABETIC PATIENTS"

Código: ALLIED

Ref. CEIM: 039/2019

Este comité **accepta** que dicho estudio sea realizado en la Universidad Rovira y Virgili por el Dr. Josep Ribalta Vives y en el Hospital Universitari Sant Joan de Reus por la Daiana Ibarretxe del Servicio de Medicina Interna.

Firma

78582502N
ELISABET
GALVE (R:
G43814045)

Firmado digitalmente
por 78582502N
ELISABET GALVE (R:
G43814045)
Fecha: 2019.11.14
17:48:38 +01'00'

Sra. Elisabet Galve Aixà
Secretaria CEIm IISPV

Certificat del comitè ètic.

TREBALL DE FI DE GRAU. FMCS. FITXA D'AVALUACIÓ DEL TUTOR



L'avaluació del treball pràctic tindrà en compte la nota referida pel tutor respecte a la memòria impresa i el seguiment del treball. El resultat de l'avaluació del tutor ha de ser favorable per tal que l'alumne pugui presentar i defensar el treball i representa el 25 % nota total del TFG.

ENSENYAMENT: **MEDICINA**

NOM DE L'ALUMNE: **ALBERT PEREZ PARETS**

TÍTOL DEL TREBALL: **PCSK9: TRACTAMENT DE LA HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR I ALTRES FUNCIONS**

SEGUIMENT I AVALUACIÓ DEL TREBALL PER PART DEL TUTOR DEL TREBALL PRÀCTIC (0-10)	
Ha mostrat capacitats d'anàlisi i síntesi i raonament al llarg del treball	8
Ha mostrat iniciativa durant tot el procés d'elaboració del Treball	8
El procés d'elaboració del Treball ha estat continuat	9
Ha mostrat habilitat de cerca i gestió de la informació	9
Ha mostrat capacitat d'organització i planificació	9
Ha seguit la normativa pròpia del Centre en quan a la presentació escrita del treball	10
El treball és ordenat i redactat amb cura, expressant-se correctament amb la llengua escollida	8
Els resultats del treball són originals	9
El treball presentat supera les expectatives del tutor	9
Comentaris del tutor si s'escau	
MITJANA DE LA NOTA DEL TUTOR (0-10)	
	8.8

AVALUACIÓ: FAVORABLE NO FAVORABLE

AUTORITZA a que el treball sigui públic i visible al repositori institucional de la URV*?

SI NO

* Desaconsellat en casos de treballs amb dades de pacients i amb treballs potencialment publicables

NOM I SIGNATURA DEL TUTOR**:

Montserrat
Montserrat Guadalupe



Josep Ribalta Vives - DNI
35086161Y (TCAT)
2024.05.31 18:33:45
+02'00'

Torregombr, a 30 de maig de 2024

Fitxa d'avaluació per part dels tutors.