

***APROXIMACIÓ METODOLÒGICA
PER A LA IDENTIFICACIÓ DE
BIOMARCADORS PROTEICS EN
PACIENTS D'ALT RISC
CARDIOVASCULAR***

PREÀMBUL

Abans d'entrar en matèria vull disculpar la meva expressió escrita. Sóc una estudiant d'origen asiàtic i malgrat els sis anys que porto a Catalunya, sóc conscient que cal millorar-la.

Moltes gràcies per la seva comprensió amb el compromís ferm de continuar treballant en aquesta línia d'esforç i superació.

ABSTRACT

Segons la OMS les malalties cardiovasculars constitueixen la principal causa de mort en tot el món. Cada any moren més persones per malalties cardiovasculars (MCV) que per qualsevol altra causa.

Aquest treball té com a objectiu principal el desenvolupament d'una aproximació metodològica per a la recerca de biomarcadors com ara proteïnes, basant-se en un model d'estudi constituït per pacients d'hipercolesterolèmia familiar. Es tracta d'identificar aquelles proteïnes que podran ser utilitzades posteriorment pel pronòstic de la patologia cardiovascular.

S'han estudiat 92 proteïnes, les quals mitjançant un abordatge de rastreig, han mostrat una expressió diferencial en pacients d'alt risc de MCV amb o sense presència clínica de la malaltia. Amb el programa IPA (*ingenuity pathway analysis*) també s'han trobat diverses funcions relacionades amb el desenvolupament de les patologies.

Els resultats obtinguts han permès constatar que les proteïnes 20, 21, 23, 31, 32, 33, 34, i 35 són condicionants de la manifestació clínica de les MCV i han revelat igualment, que les funcions del moviment /migració /infiltració cel·lular, proliferació /desenvolupament cel·lular, síntesi /producció /alliberament /concentració molecular i la construcció dels vasos sanguinis nous, estan alterades en els pacients amb una possible manifestació clínica de MCV.

La part pràctica d'aquest treball ha estat desenvolupada a l'institut Català de Ciències Cardiovasculars (ICCC).

AGRAÏMENTS

El meu agraïment a totes aquelles persones que han col·laborat d'alguna manera o altra en el desenvolupament d'aquest treball.

Primer de tot, vull donar les gràcies al meu tutor, per haver confiat en mi i haver-me introduït en el món de la investigació i la recerca satisfent, així, les meves il·lusions. Sense aquesta confiança i els seus ànims no hauria pogut tirar endavant.

Un agraïment a la directora de l'Institut Català de Ciències Cardiovasculars (ICCC), que m'ha donat l'oportunitat de treballar al costat dels millors investigadors del centre. També als investigadors de l'ICCC pel seu suport.

Un agraïment molt especial als meus pares, que m'han donat ànims i suport incondicional en tot moment. També a aquells amics que sempre han estat al meu costat per ajudar-me en els moments difícils.

*“Science, like art, is not a copy of nature but a re-creation of her.”
– Jacob Bronowski, Science & Human Values*

ÍNDEX GENERAL

ABREVIATURES	11
0. INTRODUCCIÓ	14
1. FONAMENTS DEL TREBALL	19
2. INTRODUCCIÓ TEÒRICA	22
2.1. LA HIPERCOLESTEROLÈMIA	23
2.1.1. EL COLESTEROL	23
2.1.2. LA HIPERCOLESTEROLÈMIA	24
2.1.3. LA HIPERCOLESTEROLÈMIA FAMILIAR	25
2.2. ARTERIOSCLEROSI	28
2.2.1. LESIONS ARTERIOSCLERÒTIQUES	28
2.2.2. L'ENDOTELI DISFUNCIONAL	29
2.2.3. PROCÉS DE L'ARTERIOSCLEROSI (Figura 8.).....	30
2.3. LES MALALTIES CARDIOVASCULARS (CVDs).....	31
2.3.1. ELS FACTORS DE RISC CARDIOVASCULAR.....	33
2.4. TÈCNiques PROTEÒMIQUES.....	36
2.4.1. TÈCNiques PER A LA IDENTIFICACIÓ DELS PATRONS PROTEICS	37
2.4.2. TÈCNiques PER VALIDAR EL BIOMARCADOR PROTEIC	41
3. HIPÒTESIS I OBJECTIUS DE L'ESTUDI.....	46
3.1. HIPÒTESIS.....	47
3.2. OBJECTIUS.....	47
3.2.1. OBJECTIUS NO INCLOSOS EN AQUEST TREBALL.....	47
3.2.2. OBJECTIUS PROPIS DE L'ESTUDI	48
4. MATERIALS.....	49
4.1. SOFTWARE PER ANÀLISIS DE DADES	50
4.1.1. STATVIEW.....	50
4.1.2. PARTEK GENOMICS SUITE	50
4.1.3. MICROSOFT OFFICE EXCEL.....	50
4.2. SOFTWARE PER ANÀLISIS DE VIES DE SENYALITZACIÓ Y FUNCIONS BIOLÒGIQUES.....	51
4.2.1. INGENUITY PATHWAY ANALYSIS (IPA).....	51
5. MÈTODE	52
5.1. CARACTERITZACIÓ DELS PACIENTS	53
5.2. ANÀLISI ESTADÍSTICA	55
5.2.1. ANÀLISI ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA	55
5.2.2. ANÀLISI ESTADÍSTICA INFERENCIAL	56
5.3. DESCRIPCIÓ DE LES PROTEÏNES IMPLICADES A CVD.....	57
5.4. ANÀLISI DE PROTEÏNES DIFERENCIALS ENTRE PACIENTS	57
5.5. CARACTERITZACIÓ DE LES PROTEÏNES DIFERENCIALS	58
6. RESULTATS I DISCUSSIÓ	59
6.1. CARACTERITZACIÓ DELS PACIENTS	60
6.1.1. EDAT D'EXTRACCIÓ DE LA MOSTRA O DE LA INCLUSIÓ	60
6.1.2. EDATS DE LA MANIFESTACIÓ CLÍNICA	61
6.1.3. ANYS EN L'ESTUDI O ANYS QUE HAN PASSAT DES DE LA INCLUSIÓ FINS A L'ESDEVENIMENT CLÍNIC	61

6.1.4.	TRACTAMENT D'ESTATINES ABANS I DESPRÉS DE LA INCLUSIÓ	62
6.1.5.	TABAQUISME	63
6.1.6.	BMI	64
6.1.7.	ÍNDEX CINTURA – TALLA.....	65
6.1.8.	FREQÜÈNCIA CARDÍACA, PRESSIÓ SISTÒLICA I DIASTÒLICA	66
6.2.	ANÀLISI ESTADÍSTICA	66
6.2.1.	T- TEST	66
6.2.2.	CHI QUADRAT	70
6.3.	CARACTERITZACIÓ DE LES PROTEÏNES IMPLICADES A CVDs	71
6.4.	ANÀLISI DE PROTEÏNES DIFERENCIALS SIGNIFICATIVES ENTRE DIFERENTS GRUPS DE PACIENTS.....	75
6.5.	CARACTERITZACIÓ DE LES PROTEÏNES DIFERENCIALS	79
7.	CONCLUSIONS	88
7.1.	CONCLUSIONS (PART ESTADÍSTICA).....	89
7.2.	CONCLUSIONS (PART BIOLÒGICA)	90
8.	PERSPECTIVES FUTURES	91
8.1.	VALIDACIÓ.....	92
8.2.	APROFUNDIMENT	92
	FONTS D'INFORMACIÓ	93
	ANNEXOS	98

ÍNDEX D'IL·LUSTRACIONS

Figura 1: Gràfic comparatiu de l'edat dels controls HF quan va finalitzar el seguiment de l'estudi amb l'edat d'esdeveniment clínic dels pacients HF.....	17
Figura 2: Classificació de les mostres estudiades.....	20
Figura 3: Esquema de transmissió d'HF als descendents.....	26
Figura 4: Xantomes en un nen amb amb HF homozigot.....	26
Figura 5: Xantomes al tendó d'Aquilles.....	26
Figura 6: Arc corneal.....	26
Figura 7: Esquema d'una artèria.....	29
Figura 8: Procés d'arteriosclerosi.....	31
Figura 9: Comparació de les causes principals de defunció mundial, 2012.....	32
Figura 10: Classificació dels factors de risc cardiovascular.....	33
Figura 11: Isoelectroenfortament amb la cuberta d'hidratació.....	37
Figura 12: Ettan Dalt amb gel de poliacrilamida.....	37
Figura 13: Escaneig del gel.....	37
Figura 14: Equip de la cromatografia líquida.....	39
Figura 15: Espectròmetre de masses.....	39
Figura 16: Programació de l'Ettan Spot Picker.....	40
Figura 17: Ettan Spot Picker.....	40
Figura 18: Placa Anchor Chip.....	40
Figura 19: Kit d'ELISA.....	42
Figura 20: Placa d'ELISA preparada per llegir.....	42
Figura 21: Resultat de lectura de la membrana.....	43
Figura 22: Esquema de la microplaca amb microesferes.....	44
Figura 23: Esquema del funcionament de l'analitzador Luminex.....	44
Figura 24: Esquema de la tècnica PEA.....	45
Figura 25: Gràfic de la distribució del nombre de les mostres segons l'edat d'extracció de la mostra.....	60
Figura 26: Gràfic de la distribució del nombre de pacients HF segons l'edat de la manifestació clínica.....	61
Figura 27: Gràfic del percentatge del nombre dels controls HF que prenen estatines abans de la inclusió.....	62
Figura 28: Gràfic del percentatge del nombre dels pacients HF que prenen estatines abans de la inclusió.....	62
Figura 29: Gràfic del percentatge del nombre dels controls HF que prenen estatines durant la inclusió.....	62
Figura 30: Gràfic del percentatge del nombre dels pacients HF que prenen estatines durant la inclusió.....	62
Figura 31: Gràfic del tabaquisme dels controls HF en percentatge del nombre d'individus... ..	63
Figura 32: Gràfic del tabaquisme dels pacients HF en percentatge del nombre d'individus ..	63
Figura 33: Gràfic del tabaquisme dels controls sans en percentatge del nombre d'individus.	64
Figura 34: Gràfic de la distribució del percentatge d'individus segons el BMI.....	64
Figura 35: Gràfic de la distribució del percentatge d'individus segons l'ICT.....	65
Figura 36: Gràfic de la distribució de les proteïnes associades a CVDs segons les funcions .	74
Figura 37: Gràfic de la distribució de les proteïnes associades a CVDs segons les funcions generals.....	75

Figura 38: Diagrama de Venn que relaciona les proteïnes diferencials obtingudes amb les diferents comparacions que s'ha fet.....	76
Figura 39: Gràfic de la distribució de les proteïnes diferencials trobades en la comparació pacients HF vs controls HF segons les funcions.....	80
Figura 40: Gràfic de la distribució de les proteïnes diferencials trobades en la comparació pacients HF vs controls HF segons les funcions generals	81
Figura 41: Gràfic de la distribució de les proteïnes diferencials trobades en la comparació controls HF vs controls sans segons les funcions	82
Figura 42: Gràfic de la distribució de les proteïnes diferencials trobades en la comparació controls HF vs controls sans segons les funcions generals.....	83
Figura 43: Gràfic de la distribució de les proteïnes diferencials trobades en la comparació pacients HF vs controls sans segons les funcions.....	84
Figura 44: Gràfic de la distribució de les proteïnes diferencials trobades en la comparació pacients HF vs controls sans segons les funcions generals.....	85
Figura 45: Gràfic de la distribució de les proteïnes diferencials trobades en la comparació pacients HF que han mort vs pacients HF que han tingut un IAM segons les funcions.....	86
Figura 46: Gràfic de la distribució de les proteïnes diferencials trobades en la comparació pacients HF que han mort vs pacients HF que han tingut un IAM segons les funcions generals	87

ABREVIATURES

A

ANOVA: anàlisi de variància

APO B: *apolipoprotein B* (apolipoproteïna B)

ARH: *autosomal recessive hypercholesterolemia* (hipercolesterolèmia autosòmica recessiva)

B

BMI: *body mass index* (índex de massa corporal)

BSA: *bovine serum albumin* (albúmina de sèrum boví)

C

C-EX: controls dels pacients de la hipercolesterolèmia familiar morts

C-HF/C: controls de la hipercolesterolèmia familiar

C-IAM: controls dels pacients de la hipercolesterolèmia familiar amb infart agut de miocardi

CC-FHF: centre coordinador amb la supervisió de la fundació hipercolesterolèmia familiar

CHCA: *α-cyano-4-hidroxiacianamida*

cHDL: *high density lipoprotein cholesterol* (colesterol d'alta densitat)

cLDL: *low density lipoprotein cholesterol* (colesterol de baixa densitat)

CONT-SM/S: controls sans sense mutació

CVDs: *cardiovascular diseases* (malalties cardiovasculars)

E

ELISA: *enzyme linked immunosorbent assay*

F

FC: freqüència cardíaca

FDB: *familial defective apolipoprotein B-100*

H

H₀: hipòtesi nul·la

H₁: hipòtesi alternativa

HDL: *high density lipoprotein* (lipoproteïna d'alta densitat)

HF: hipercolesterolèmia familiar

HTA: hipertensió arterial

I

IAM: infart agut de miocardi

ICCC: institut català de ciències cardiovasculars

ICT: índex cintura – talla

IDL: *intermediate density lipoprotein* (lipoproteïna de densitat intermèdia)

IPA: *ingenuity pathway analysis*

L

LDL RAP1: *low density lipoprotein receptor adaptor protein 1*

LDL: *low density lipoprotein* (lipoproteïna de baixa densitat)

M

MALDI-TOF: *matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight*

N

NO: òxid nítric

P

P-EX/E: pacients de la hipercolesterolèmia familiar morts

P-HF/P: pacients de la hipercolesterolèmia familiar

P-IAM/I: pacients de la hipercolesterolèmia familiar amb infart agut de miocardi

PCHD: *premature coronary heart disease* (cardiopatia coronària prematura)

PCR: *polymerase chain reaction* (reacció en cadena de polimerasa)

PCSK9: *protein convertase subtilisin/kexin type 9*

Pdia: pressió diastòlica

PEA: *proximity extension assay*

PGS: *partek genomics suite*

Psis: pressió sistòlica

R

rLDL: *low density lipoprotein receptor* (receptor de la lipoproteïna de baixa densitat)

S

SAFEHEART: *Spanish familial hypercholesterolemia cohort study* (estudi de cohort de la hipercolesterolèmia familiar espanyola)

SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

SORT 1: *sortilin 1*

T

TIG: triglicèrids

V

VLDL: *very low density lipoprotein* (lipoproteïna de molt baixa densitat)

0. INTRODUCCIÓ

La medicina, des de l'antropologia¹ mèdica de la prehistòria fins a l'estudi genètic i les cèl·lules mare del segle XXI, ha evolucionat molt ràpidament i continua evolucionant. Ha estat sempre una ciència interessant i important present a la vida quotidiana. Sens dubte, el seu desenvolupament està íntimament relacionat amb l'avenç de la humanitat.

Actualment, les investigacions mèdiques segueixen dos camins. El de la medicina curativa ja està molt avançat, tot i que encara resten aspectes per descobrir, i és la base i l'objectiu fonamental de les ciències mèdiques – curar i salvar vides –. Gràcies a aquesta línia d'investigació s'ha incrementat considerablement l'esperança de la vida de l'ésser humà. Per altra banda, hi ha la medicina preventiva que s'ha començat a treballar durant aquests últims anys, per tal de prevenir les possibles patologies clíniques que es podrien desenvolupar al llarg de la vida d'una persona. Aquest darrer camp mèdic inclou la medicina predictiva o personalitzada i es basa en un test genètic per predir les possibles malalties que patirà una persona al llarg de la seva vida. Amb la preventiva en general, es podria evitar els possibles patiments dels pacients i, per tant, millorar la qualitat de la vida de les persones, fent possible que l'augment de l'esperança de la vida tingui sentit i pugui ser aprofitable.

Un dels aspectes molt estudiats de la medicina és el de les malalties cardíques, ja que el cor és el gran motor del cos humà, el seu bon funcionament és decisiu per la resta dels òrgans i, a més, és la causa que provoca més defuncions i afectacions de la qualitat de la vida. Molts estudis demostren que 30 de cada 100 homes moren per afectacions cardíques, i aquesta taxa encara augmenta més en la població femenina que és de 38 de cada 100 dones. Vistes aquestes dades, és clara la importància d'investigar en aquest camp per tal de trobar cures o bé mesures preventives.

Quan parlem de les malalties cardíques ens referim a un conjunt molt ampli d'afectacions del cor degudes a molts processos, com una mala formació del cor des del naixement (cardiopatia congènita); una inflamació dels teixits cardíacs a causa dels agents infecciosos o tòxics (cardiopatia inflamatòria); o deguda a la febre reumàtica causada pels bacteris estreptococs (cardiopatia reumàtica); altres causes són alteracions de l'activitat elèctrica o mecànica del cor i malalties valvulars. Però la causa més important i més comuna

¹ Antropologia: disciplina que estudia l'ésser humà des de diverses perspectives.

² Epigenètica: branca de la genètica que estudia com l'ambient i la història de l'individu influeixen en l'expressió

és el procés arterioscleròtic causant de les malalties cardiovasculars (CVDs) que comporta una afectació del cor com ara l'infart agut de miocardi (IAM).

Tot i que l'arteriosclerosi pot comportar manifestacions clíniques com la malaltia perifèrica o un infart cerebral, l'IAM és la forma més comuna de manifestar-se i es troba en molts pacients arterioscleròtics. Actualment, gràcies als avenços mèdics, un percentatge important dels afectats d'IAM ja no moren després d'haver patit la isquèmia. Malgrat la supervivència, la qualitat de la vida d'aquests pacients es veu molt condicionada, ja que molts d'ells pateixen la insuficiència cardíaca i això representa tant un impacte personal com un impacte social.

Patològicament, el procés arterioscleròtic es dona de forma natural amb l'envelliment. Però degut a molts avenços, l'esperança de la vida s'allarga i per tant, s'espera que hi haurà més pacients amb malalties cardiovasculars. No obstant això, determinades dietes i estils de vida provoquen factors com la dislipèmia i l'obesitat que acceleren el desenvolupament d'arteriosclerosi, i fan que comenci en una edat més prematura, és a dir, dona més possibilitat a desenvolupar una cardiopatia coronària prematura (PCHD).

La dislipèmia és la causa més rellevant de l'arteriosclerosi, que pot ser genètica o adquirida a través d'uns factors com la dieta, l'obesitat, o el sedentarisme; una forma de dislipèmia més comuna és la hipercolesterolèmia. El present treball utilitza un tipus de dislipèmia genètica, la hipercolesterolèmia familiar (HF), com el model d'aquest estudi.

Durant molts anys, s'ha observat que molts malalts de HF arriben a desenvolupar un IAM, alguns han mort, i també hi ha un grup que, malgrat l'alteració genètica, viuen tota la vida sense cap manifestació com una persona sana. Dit d'una altra manera, hi ha uns factors epigenètics² desconeguts que influeixen sobre l'expressió del genoma d'aquest darrer grup de pacients, que els fan diferents dels malalts d'HF normals. Es pot comprovar aquesta circumstància en el gràfic que s'indica a continuació elaborat amb els pacients a partir dels quals es fonamenta aquest estudi (Figura 1.).

² Epigenètica: branca de la genètica que estudia com l'ambient i la història de l'individu influeixen en l'expressió dels gens.

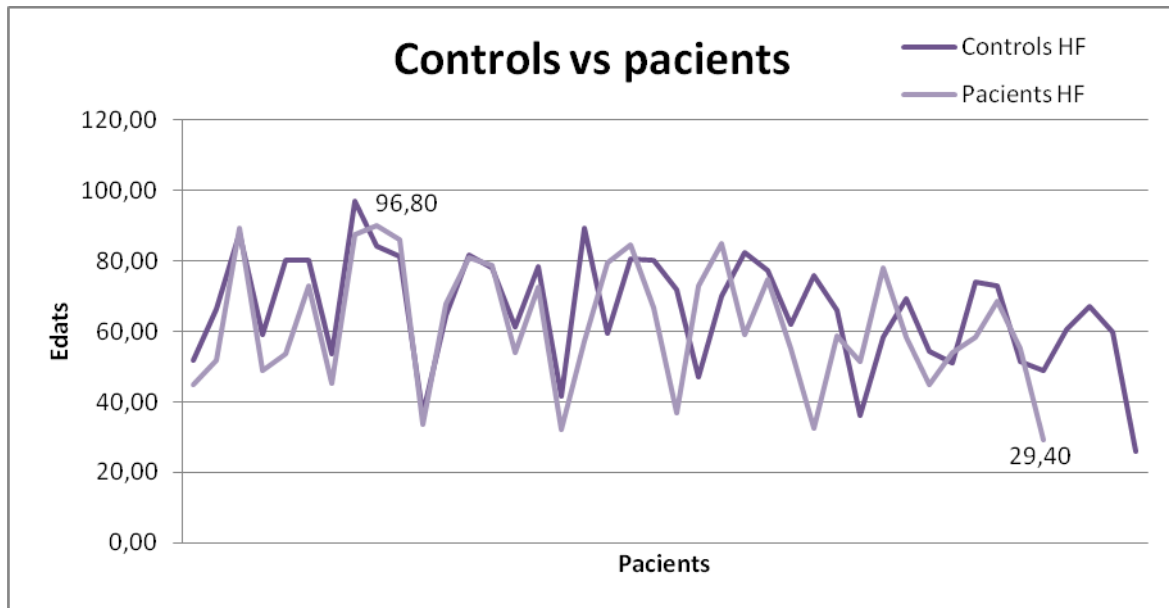


Figura 1: Gràfic comparatiu de l'edat dels controls HF quan va finalitzar el seguiment de l'estudi amb l'edat d'esdeveniment clínic dels pacients HF

Aquest gràfic de línia compara l'edat dels controls HF quan va finalitzar el seguiment de l'estudi amb l'edat dels pacients HF, quan es va desenvolupar una manifestació clínica. Es pot observar que hi ha dos pics assenyalats amb números. Un pic pertany a l'individu més vell dels controls HF que correspon a una edat de 97 anys, l'edat màxima dels pacients estudiats sense arribar a tenir una manifestació cardiovascular. L'altre pic, de 29 anys, correspon a la persona més jove dels pacients HF que és l'edat mínima de les mostres estudiades en què es va desenvolupar un esdeveniment clínic.

Per tant, la pregunta que ens hauríem de fer és "quins factors influeixen perquè els pacients amb el mateix factor de risc, un arriba a desenvolupar una CVD, i l'altre no". Per arribar a descobrir aquests factors es necessita un procés llarg i complicat, i a causa de les limitacions del temps, en aquest treball només s'hi reflecteix una aproximació metodològica per buscar els biomarcadors com ara proteïnes, basant-nos en un model d'estudi constituït pels pacients d'HF.

La finalitat d'aquesta recerca és trobar aquelles proteïnes que podran ser utilitzades posteriorment per pronòstic de la patologia cardiovascular. S'ha d'aclarir que el fet de triar biomarcadors proteics com a objectiu de l'estudi és per la seva naturalesa biològica, és el mitjà pel qual s'expressa el genoma i, per tant, responsable d'expressió de les malalties. També s'ha de justificar que es tracta dels pacients HF perquè és un model de pacients amb

factor d'alt risc, i que desenvolupa una manifestació clínica a curt termini. Així, facilita la recerca a nivell del temps i també ajuda que els resultats siguin més significatius.

He decidit dur a terme aquest treball per diversos motius. Primer de tot, he triat un estudi de l'àmbit biomèdic ja que és un tema que m'apassiona des de ben petita, sempre penso que tota la naturalesa, inclòs els cos humà és una gran màquina, i la feina dels científics és descobrir amb el màxim de detall possible el funcionament d'aquesta màquina i treballar per resoldre els problemes que puguin sorgir.

En primer lloc el treball descriu els antecedents teòrics per situar l'estudi, i després tota la part pràctica fins arribar als resultats de la recerca.

1. FONAMENTS DEL TREBALL

L'estudi que s'ha desenvolupat al llarg d'aquest treball forma part del projecte *Spanish Familial Hypercholesterolemia Cohort Study* (SAFEHEART), i es basa en un grup dels pacients voluntaris implicats en aquest.

SAFEHEART és un estudi a nivell de tot Espanya de caràcter obert i multicèntric. Hi participen diferents doctors i clíniques arreu de l'estat espanyol i implica el seguiment a llarg termini d'una cohort³ sota el control del Centre Coordinador amb la supervisió de la Fundació Hipercolesterolèmia Familiar (CC-FHF). Inclou estudis epidemiològics⁴ observacionals amb una comparació de freqüència d'una malaltia entre dos grups d'una població, en la qual un grup està exposat a un determinat factor i l'altre grup és exclòs del mateix factor. Tractant-se d'estudis observacionals, significa que a tots els membres de l'estudi no se'ls aplica cap tipus de tractament. En el cas del SAFEHEART, es compara la freqüència de patir una malaltia cardiovascular en dues poblacions, una amb uns factors desconeguts que els condiciona més probabilitat de patir CVDs, i l'altra en què aquests factors són absents. Posteriorment basant-nos en l'evidència de la comparació, la recerca dels factors desconeguts és la finalitat d'aquest projecte.

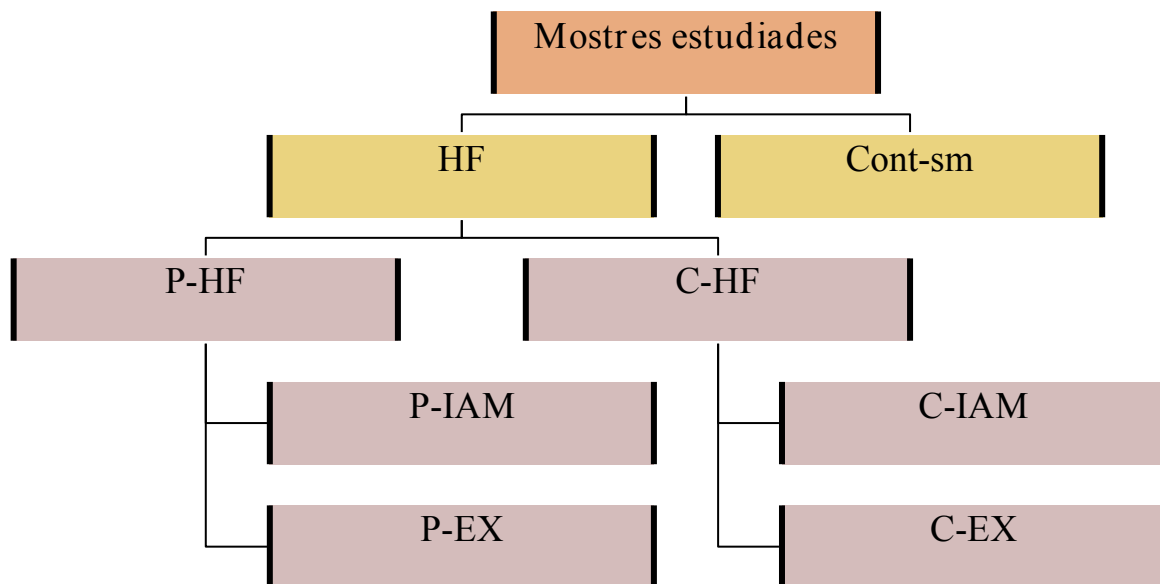


Figura 2: Classificació de les mostres estudiades

³ Cohort: en estadística, és un grup d'individus, habitualment persones, d'una determinada població, definida per compartir un mateix esdeveniment.

⁴ Epidemiologia: branca de la medicina que estudia la relació entre les malalties i els factors ambientals o socials que les poden afavorir o provocar.

Com es pot veure a l'esquema anterior (Figura 2.), els individus seleccionats per l'estudi estan classificats en dos grups, un correspon als pacients amb hipercolesterolèmia familiar (HF), i l'altre grup està format per individus totalment sans sense la mutació genètica (Cont – sm). Dins del primer grup, hi ha una subclassificació que permet distingir els pacients HF que han desenvolupat una manifestació cardiovascular (P-HF) dels que no han tingut mai cap esdeveniment clínic (C-HF). Els P-HF són diferenciats segons si han tingut un infart (P-IAM), o si han mort sobtadament (P-Ex). L'altre subgrup inclou els pacients controls que se'ls hi assigna a cada P-Ex o P-IAM (C-Ex o C-IAM), malgrat la mutació genètica que els implica un nivell de colesterol alt, aquests controls no han desenvolupat cap patologia cardiovascular ni han mort durant el mateix període que la seva parella ho va patir. Els pacients amb la hipercolesterolèmia familiar (HF) estan seleccionats de tal manera que els dos grups (P-HF - C-HF) tinguin la màxima semblança entre ells perquè la comparació sigui totalment significativa (sexe, factors de risc, edat, etc.).

A través dels formularis omplerts pels individus de la mostra, s'han recollit diverses dades sobre aquests. En la informació bàsica i imprescindible hi ha la dada del naixement, l'edat en què van desenvolupar la malaltia, anys que han estat a l'estudi, l'altura, el pes i la cintura. També hi ha una part de la informació que correspon als antecedents clínics, on s'indica si han tingut un esdeveniment anterior i el seu tipus, els tractaments que havien pres, el nivell de colesterol més alt i els factors de risc com els anys que havien fumats. En relació a la informació suplementària sobre el sèrum, cal dir que el mateix dia de l'extracció del sèrum s'ha determinat la freqüència cardíaca, la pressió sistòlica, la pressió diastòlica, el nivell de colesterol total, el nivell de triglicèrids i el nivell dels dos tipus de lipoproteïnes transportadores de colesterol (cLDL i cHDL). També s'han recollit altres informacions de diagnòstic com ara si els pacients presenten xantomes o arc corneal.

Per altra banda, aquest treball s'ha fonamentat en l'estudi de les proteïnes, ja que són les biomolècules directament implicades en l'expressió de les malalties. Actualment, es coneixen un alt nombre de proteïnes, i estan classificades segons les vies que hi estan implicades. Com que aquest estudi es basa en CVDs, només centrarem en les 92 proteïnes associades per fer l'estudi. (Vegeu l'annex 1.)

2. INTRODUCCIÓ TEÒRICA

Amb el desenvolupament de la societat, molts aspectes de la vida quotidiana han millorat, tant l'alimentació diària com les eines que substitueixen les forces humanes. No obstant això també hi ha aspectes negatius d'aquesta prosperitat, com per exemple les malalties d'opulència. Són malalties que inclouen la diabetis, dislipèmia, obesitat, arteriosclerosi i la hipertensió.

En aquest treball es tractarà un tipus concret de dislipèmia - la hipercolesterolèmia - que provoca l'arteriosclerosi, i moltes vegades, aquest procés arterioscleròtic comporta malalties cardiovasculars.

2.1. LA HIPERCOLESTEROLÈMIA

Per parlar de la hipercolesterolèmia, primer s'ha de conèixer la substància protagonista d'aquesta malaltia, el colesterol.

2.1.1. EL COLESTEROL

El colesterol és una substància lipídica natural produïda normalment pel fetge, que està present en totes les cèl·lules humanes i és necessari pel funcionament normal de la cèl·lula com a lípid de membrana.

Les principals funcions del colesterol són:

- Intervenir en la formació dels àcids biliars, que són vitals per la digestió de les grasses.
- Per exposició dels rajos solars UVA es transforma en vitamina D que ajuda a l'absorció de calci a nivell intestinal.
- Algunes hormones com les sexuals i d'altres fabricades per la tiroides es formen a partir del colesterol.
- És un lípid present a les membranes biològiques amb un paper molt important de cara a la regulació de la fluïdesa d'aquestes membranes.

El colesterol és transportat des del fetge o intestí cap al lloc de l'organisme que en tingui necessitat mitjançant les lipoproteïnes, que segons la seva densitat es poden classificar de la manera següent:

- Quilomicrons: lipoproteïnes de molt baixa densitat i de gran diàmetre, transporten els triglicèrids, el colesterol i els fosfolípids als diferents teixits del cos a través del sistema limfàtic.
- VLDL: lipoproteïnes de molt baixa densitat, més alta que els quilomicrons, però amb un diàmetre més petit. Transporta els triglicèrids, el colesterol i els fosfolípids.
- IDL: lipoproteïnes de densitat intermèdia.
- LDL: lipoproteïnes de baixa densitat. Transporten el colesterol secretat de nou del fetge a totes les cèl·lules del nostre organisme.
- HDL: lipoproteïnes d'alta densitat. Recullen el colesterol no utilitzat i el tornen al fetge pel seu emmagatzematge o bé per a la seva excreció a l'exterior a través de la bilis.

Segons la interacció amb lipoproteïnes es pot parlar de dos tipus de colesterol:

- Colesterol dolent: és el colesterol que a l'unir-se a l'LDL es diposita a la paret de les artèries formant plaques d'ateroma, i com a conseqüència es produeix un arteriosclerosi.
- Colesterol bo: és el colesterol que a l'unir-se a l'HDL transporta l'excés de colesterol de nou al fetge per ser destruït.

2.1.2. LA HIPERCOLESTEROLÈMIA

Un excés de colesterol en sang es coneix com la hipercolesterolèmia, que és un factor que contribueix considerablement el risc de patir una CVD. Normalment es tracta amb una dieta equilibrada i exercici físic constant, també es pot tractar amb alguns fàrmacs.

Les causes de la hipercolesterolèmia són diverses, però la causa genètica és la més freqüent i més important. Alguns exemples de les mutacions genètiques que condueixen a la

hipercolesterolèmia són les mutacions que es produeixen en el gen PCSK9, que regula l'expressió del receptor LDL al fetge; una altra mutació produïda en el gen APO B, provoca la substitució de la glutamina per l'arginina a la posició 3500 en APO B-100 que es coneix amb el nom d'Apolipoproteïna B-100 defectuosa familiar (FDB); una tercera mutació produïda en el gen LDL RAP1, responsable de la hipercolesterolèmia hereditària autosòmica recessiva (ARH); i una darrera mutació en el cromosoma 1P13, que està lligat amb l'expressió de proteïna SORT-1, que regula el nivell de VLDL i LDL.

Malgrat aquesta diversitat de mutacions, les que es produeixen en el gen del receptor de les LDLs són les més comunes. Aquesta malaltia es coneix amb el nom de la hipercolesterolèmia familiar (HF) descrita a continuació.

2.1.3. LA HIPERCOLESTEROLÈMIA FAMILIAR

La hipercolesterolèmia familiar és una malaltia hereditària que consisteix en un augment de les concentracions de colesterol en el plasma sanguini, principalment del colesterol transportat per les lipoproteïnes de baixa densitat (cLDL). És causada per mutacions en el gen que codifica el receptor de les LDL (rLDL), que s'encarrega d'eliminar el colesterol de la sang del fetge. Aquestes mutacions fan que la quantitat d'aquests receptors siguin menors, i per tant afavoreix el dipòsit del colesterol a les parets de les artèries. També és la causa més comuna de la PCHD. Actualment, ja s'han identificat al voltant de 1000 mutacions a nivell mundial, i a Espanya s'han detectat 200 mutacions diferents en tot el país.

La taxa d'afectació del HF és d'una de cada 400-500 persones en la població general. Un individu heterozigot té un 50% dels receptors LDL que funcionen normalment i el 50 % d'aquests són no funcionals o defectuosos. En canvi, si un individu és homozigot té una absència total dels receptors LDL. Aquesta malaltia es transmet als descendents, de manera que si una persona heterozigota està afectada d'HF, té un 50% de probabilitat de transmetre el gen anormal als descendents, i si fos homozigota, el seu descendent haurà rebut 100% el gen anormal (Figura 3.). Malgrat aquestes probabilitats, es dona el cas que una persona portadora del gen anormal tingui el nivell de colesterol normal, i s'ha demostrat a través d'alguns estudis que aquest cas es dona en 8 persones de cada 100.

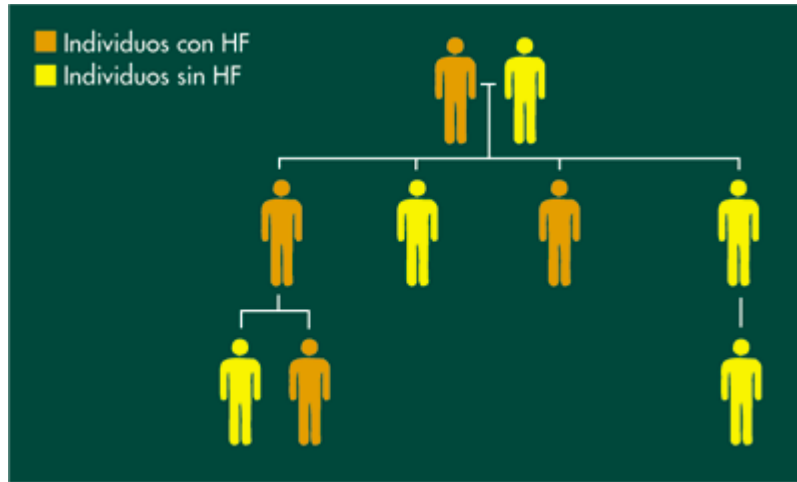


Figura 3: Esquema de transmissió d'HF als descendents.
Font: Fundación Hipercolesterolemia Familiar

2.1.3.1. DIAGNÒSTIC DE LA HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR

Per diagnosticar la hipercolesterolemia familiar en una persona hem de basar-nos en les concentracions del colesterol i dels triglicèrids en el seu plasma sanguini. Si el seu nivell de colesterol és > 300 mg/dl i presenta els triglicèrids amb una concentració normal (< 200 mg/dl), li podem diagnosticar la hipercolesterolemia. Per saber si és d'origen genètic, s'estudien els seus familiars, especialment els parents de primer grau.

A més, amb pacients de menys de 45 anys, el diagnòstic també es podria basar en una altra evidència, que són els xantomes (Figures 4. i 5.). Aquests són la manifestació del dipòsit del colesterol als teixits extrahepàtics i la seva forma física és com una tumoració, irregularitat, engruiximent dels tendons. Normalment es localitzen en les parts de les articulacions com genolls, colzes, dits, o també en els contorns dels ulls. Algunes vegades també s'observa en la perifèria de l'iris un anell blanc parcial o complet que es coneix amb el nom d'arc corneal (Figura 6.). Són evidències clares, visibles i exactes.



Figura 4: Xantomes en un nen amb HF homozigot



Figura 5: Xantomes al tendó d'Aquil·les



Figura 6: Arc corneal

Font: Fundación Hipercolesterolemia Familiar

2.1.3.2. TRACTAMENTS

Normalment els pacients de la HF necessiten una medicació habitual i de llarg termini. La iniciació d'aquests tractaments ha de tenir en compte l'edat, el sexe i la presència o l'absència d'altres factors com el tabaquisme o diabetis. Actualment els medicaments habituals que s'utilitzen a Espanya són les Estatines, l'Ezetimiba, les Resines segrestadores d'àcids biliars, els Fibrats i altres tractaments combinats.

➤ ESTATINES

Un dels tractaments que els metges acostumen a donar als pacients de la hipercolesterolèmia familiar són les estatines. Són fàrmacs que actuen sobre el metabolisme dels lípids i, per tant, disminueixen el risc de patir malalties cardiovasculars letals com ara els infarts de miocardi.

Les estatines són uns fàrmacs no curatius, però sí que en una minoria de pacients es produeix una regressió de l'arteriosclerosi. Actuen disminuint el colesterol LDL circulant, evitant que aquest s'acumuli en les artèries, i també disminueixen els triglicèrids i augmenten el colesterol bo (HDL). També produeixen efectes antiinflamatoris en les artèries i disminueixen el risc de la formació dels trombes i, per tant, el risc de patir infarts de miocardi.

Podem dir que les estatines no són medicaments curatius en el cas que les plaques d'ateroma ja estiguin molt avançades, però sí que ho són quan les plaques encara estan en una fase primerenca. Les estatines poden arribar a fer desaparèixer les ateromes.

Malgrat la utilització de les estatines, encara hi ha un alt risc de patir una malaltia cardiovascular en una edat primerenca en la població dels portadors de la hipercolesterolèmia familiar i, per tant, és important diagnosticar i tractar com més aviat possible aquests pacients per assegurar la seva qualitat de la vida.

2.2. ARTERIOSCLEROSI

La sang surt del cor a través de les artèries, aquestes es ramifiquen en arterioles i després en capil·lars, que són els responsables de subministrar oxigen i nutrients a les cèl·lules, i de recollir diòxid de carboni i substàncies de rebuig. Posteriorment, la sang és conduïda a vènules i aquestes s'uneixen formant venes que tornen la sang al cor.

L'arteriosclerosi és una malaltia crònica inflamatòria de la paret de les artèries grans i/o mitjanes com en artèries coronàries, caròtides, vertebrals, cerebrals, aorta, femorals i ilíaqües. És deguda al dipòsit de la placa arterioscleròtica d'ateroma formada per un cúmul dels lípids, proteoglicans, teixit fibrós, calci i restes cel·lulars formades principalment per cèl·lules musculars llises i macròfags. El desenvolupament d'aquest procés de formació d'ateroma desencadena l'engruiximent i l'enduriment de les artèries, que comporten una reducció de la llum vascular que pot arribar a limitar el flux sanguini i produir isquèmies.

El procés d'arteriosclerosi és un procés totalment silenciós fins a la tercera o quarta dècada. Aleshores ja comença a manifestar-se clínicament. Depenent de la zona afectada, pot ser una malaltia perifèrica, un infart cerebral o ictus, o bé un infart de miocardi.

2.2.1. LESIONS ARTERIOSCLERÒTIQUES

Segons l'evolució de la placa d'ateroma, podem tenir diferents tipus de lesions arterioscleròtiques:

- Tipus I: dipòsit microscòpic de lípids
- Tipus II: dipòsit macroscòpic de lípids com punts grassos, o estries presents en la llum de les artèries.
- Tipus III: estria de grassa avançada formada per cúmuls múltiples de lípids.
- Tipus IV: formació d'ateroma amb un nucli lipídic de colesterol lliure.
- Tipus V: formació del fibroateroma⁵ amb un nucli lipídic de gran dimensió.

⁵ Fibroateroma: format pel núcli lipídic i una capa fibrosa.

- Tipus VI: dipòsits trombòtics de col·lagen i lípids visibles, amb o sense hemorràgia, coneguts com plaques fibroateromatoses complicades.
- Tipus VII: lesions calcificades formades per plaques avançades i mineralitzades.
- Tipus VIII: lesions arterioscleròtiques que consisteix en quasi totalment en col·lagen fibril·lar.

2.2.2. L'ENDOTELI DISFUNCIONAL

L'artèria és un vas sanguini que conté 3 capes (Figura 7.). La capa més externa és l'adventícia formada per cèl·lules anomenades fibroblasts, la mitjana és la capa mitja formada per cèl·lules musculars llises, i la capa més interna és la capa íntima formada per cèl·lules endotelials que recobreixen la llum dels vasos de tot l'arbre vascular.

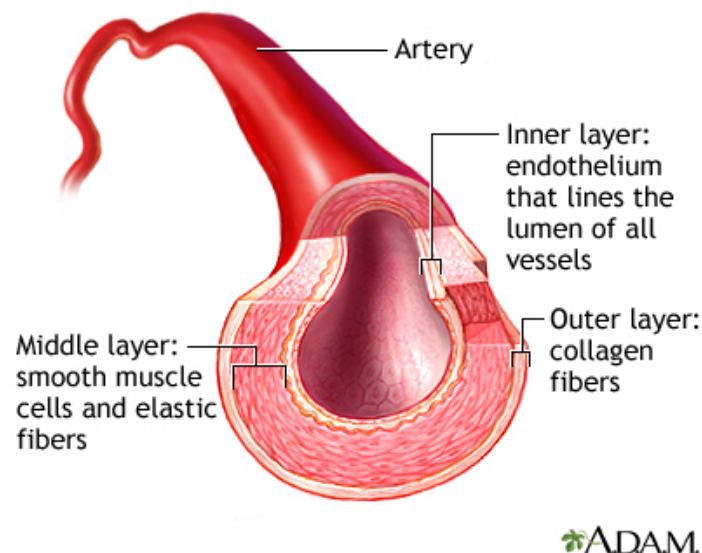


Figura 7: Esquema d'una artèria
Font: A.D.A.MHealth illustrated Encyclopedia

El procés d'arteriosclerosi comença amb les alteracions de l'endoteli, és a dir, alteracions produïdes en la capa més interna de l'artèria.

L'endoteli és l'òrgan més gran i multifuncional del nostre cos, i controla diversos processos com la coagulació del sang; la fibrinòlisis; la regulació del to vascular gràcies a la producció de l'òxid nítric (NO); la proliferació de les cèl·lules musculars pels factors de creixement; l'adhesió i la migració dels leucòcit; i també l'adhesió i l'agregació de les

plaquetes. També és una barrera amb una permeabilitat selectiva que permet l'intercanvi de substàncies entre el teixit i la sang.

Degut als factors com la pressió sanguínia, turbulència en el flux sanguini, estrès oxidatiu, tabaquisme, diabetis, etc, l'endoteli pot patir alteracions i esdevenir disfuncional. Aquesta disfunció comporta una reducció de la disponibilitat de NO, important per la dilatació vascular; una major permeabilitat, la qual cosa vol dir més entrades de substàncies com el colesterol LDL o nutrients que afavoreixen la divisió cel·lular; la secreció de les molècules adhesives, com les integrines i selectines que faciliten l'adhesió de les molècules com leucòcits o LDL. I a més, quan els LDL ja siguin infiltrats i retinguts en el subendoteli, interaccionen amb proteoglicans i glicosaminoglicans per incrementar la seva aterogènicitat.

2.2.3. PROCÉS DE L'ARTERIOSCLEROSI (Figura 8.)

Com a resposta de la inflamació produïda per la disfunció de l'endoteli, es dona una senyal als monòcits, que posteriorment es diferencien en macròfags, per intentar de fagocitar el colesterol LDL. Una internalització molt elevada del colesterol en aquests monòcits fa que es produeixi una lisi en aquestes cèl·lules i que es transformin en les anomenades cèl·lules espumoses. Aquesta transformació produeix a la vegada citosines pro-inflamatòries que donen un estímul perquè hi hagi més replicació dels macròfags. A part dels monòcits, les cèl·lules no funcionals amb bosses de lípids i les cèl·lules musculars mortes, entre d'altres, també contribueixen de forma activa a la lesió.

No totes les estries grasses es transformen i progressen fins a formar una placa arterioscleròtica, però les que ho fan estan determinades per dos processos claus. Un d'ells és la resposta contínua i perpètua de la inflamació iniciada en la fase anterior, i l'altre és la proliferació i la migració de les cèl·lules musculars llises per estímuls aterogènics.

La placa continuarà creixent. Alguns cops arriben a tancar del tot el vas impeding el pas del flux sanguini, però de forma més comuna es produeix la ruptura de la placa per la pèrdua de l'estabilitat; aquesta ruptura genera un estat protrombòtic, o sigui que activa les plaquetes que s'hi aniran adherint per intentar de taponar la lisi fins a formar un coàgul de sang

anomenat trombe. Aquesta formació del trombe bloquejarà totalment o parcialment el corrent sanguini.

Aquesta última etapa de la ruptura és conegut com la trombosi, que conduirà a manifestacions clíniques indicades anteriorment (infart de miocardi o cerebral i malaltia perifèrica). Aquest procés depèn dels tres factors, la naturalesa de la paret arterial, els components de la sang (components trombogènics) i el flux sanguini (l'erosió).

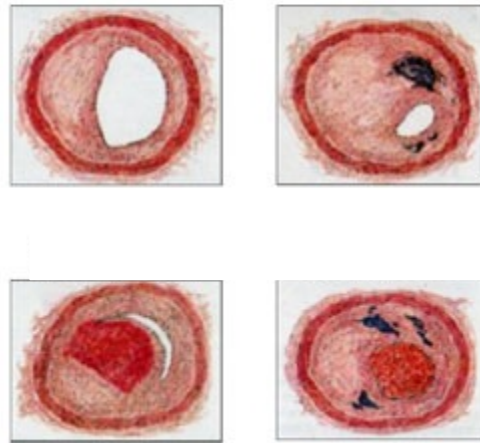


Figura 8: Procés d'arteriosclerosi
Font: Hospital Universitario Quirón Madrid

2.3. LES MALALTIES CARDIOVASCULARS (CVDs)

Les malalties cardiovasculars comprenen un conjunt d'afectacions dels vasos sanguinis que comporten complicacions cardíques. Alguns exemples més importants de les CVDs són la malaltia coronària, que inclou la insuficiència cardíaca i isquèmia cardíaca, la malaltia cerebrovascular o ictus, i la malaltia arterial perifèrica.

Moltes dades demostren que les CVDs són la causa d'un nombre considerable de morts arreu del món i, per tant, és important conèixer les seves causes i fer el que sigui possible per evitar-les.



Figura 9: Comparació de les causes principals de defunció mundial, 2012.
Font: Organització Mundial de la Salut (OMS)

Segons un estudi de l'any 2012 de l'Organització Mundial de la Salut, dins de les causes conegudes de defunció mundial, l'accident cerebrovascular i cardiopatia isquèmica -principals CVDs entre d'altres- representen el percentatge més important (Figura 9.). Un altre estudi menys recent demostra que l'any 2008 van morir 17,3 milions de persones per CVDs, un 30% de les morts registrades en el món. En el nostre país, segons un informe de l'any 2010 del Ministerio de Sanidad, aquesta causa representa un 31,2% del total de defuncions.

No obstant això, la taxa de la mortalitat per CVDs continua incrementant-se. Unes altres dades de l'OMS demostren que 23,3 milions de persones moriran per aquesta d'aquí al 2030. Però el 80% d'aquestes es podrien prevenir; una prevenció molt eficaç és actuar modificant els factors de risc.

2.3.1. ELS FACTORS DE RISC CARDIOVASCULAR

Definim com els factors de risc aquelles característiques innates o adquirides que s'associen a una probabilitat més alta de patir certes malalties. Els que estan relacionats amb les CVDs s'anomenen els factors de risc cardiovascular.

Normalment, segons la nostra capacitat d'acció diferenciem dos tipus de factors de risc: els modificables i els no modificables. Són resumits a la taula següent:

Factors de risc no modificables	Factors de risc modificables
Sexe	Tabaquisme
Edat	Hipertensió
Herència o antecedents familiars	Hipercolesterolèmia
	Diabetis mellitus
	Tipus d'alimentació

Figura 10: Classificació dels factors de risc cardiovascular

2.3.1.1. FACTORS DE RISC NO MODIFICABLES

➤ **SEXE**

Normalment els homes tenen més probabilitat de patir una malaltia cardiovascular que les dones, entre 3 i 4 vegades més elevada. Però a partir de la menopausa, la probabilitat de les dones de patir aquestes malalties s'incrementa, aleshores la probabilitat en els homes és dues vegades més alta que les dones.

➤ **EDAT**

Tot i que no hi ha una relació directa entre l'envelliment i les CVDs, s'ha demostrat estadísticament que l'aparició d'afeccions cardiovasculars és més freqüent en les edats més avançades.

➤ HERÈNCIA O ANTECEDENTS FAMILIARS

En els homes, si els seus familiars de primer grau han tingut una malaltia cardiovascular abans de 50 anys, el seu risc és d'1,5 a 2 vegades major que una persona sense el factor hereditari. Però, en canvi, la genètica no influeix tant en les dones.

2.3.1.2. FACTORS DE RISC MODIFICABLES

➤ EL TABAQUISME

La nicotina i el monòxid de carboni són els principals components de les cigarretes, que incrementen la probabilitat dels fumadors a patir una malaltia cardiovascular.

La nicotina provoca un increment de la secreció d'adrenalina, amb la qual cosa augmenta el ritme cardíac i la pressió arterial. En aquestes condicions, els músculs del cor treballen més i l'òrgan en general es deteriora més ràpid.

I el monòxid de carboni té una gran afinitat amb l'hemoglobina, ja que a l'unir-se amb aquesta disminueix la quantitat d'oxigen circulant en el corrent sanguini. D'aquesta manera, les cèl·lules cardíques es veuen afectades i els músculs cardíacs poden arribar a ser danyats.

➤ LA HIPERTENSIÓ

Sens dubte, una hipertensió sostinguda en el temps genera més efectes en el sistema cardiovascular, ja que una hipertensió arterial (HTA) obliga el cor a treballar amb més esforços, i amb un temps suficientment llarg, el volum del cor augmenta i la funció de bombeig deteriora. A nivell dels vasos sanguinis, l'HTA també comporta més possibilitat de patir arteriosclerosi o l'enduriment de les artèries i, com a conseqüència, la quantitat d'oxigen transportada als òrgans vitals es redueix, i en particular, al cervell i al cor. També s'ha comprovat científicament que la hipertensió redueix el nivell del colesterol bo (cHDL) de la sang i, per tant, encara facilita més el procés d'arteriosclerosi.

Es consideren hipertensos aquells individus amb una pressió arterial superior a 159/94 mmHg i normals aquells amb pressions inferiors a 140/90 mmHg.

La hipertensió gairebé sempre està relacionada amb l'obesitat i el consum de sodi. Malgrat que el sodi és important pel sistema nerviós, s'ha de controlar el seu consum per tenir una pressió arterial normal.

➤ LA HIPERCOLESTEROLÈMIA

Com ja s'ha explicat anteriorment, moltes causes diferents poden donar un nivell de colesterol alt i comportar un procés d'arteriosclerosi accelerat i, per tant, un major risc de patir malalties cardiovasculars.

➤ DIABETIS MELLITUS

Els pacients diabètics són aquells que tenen una anomalia en la producció de la insulina i, com a conseqüència, el nivell de la glucosa en sang augmenta.

La diabetis és un factor que augmenta notablement l'atac de cor o altres manifestacions de les malalties cardiovasculars. Sovint, està relacionada amb les malalties coronàries, altes concentracions de lípids en sang, hipertensió i problemes circulatoris. Aquestes complicacions afecten tant les artèries grans, provocant l'arteriosclerosi, com els vasos sanguinis petits provocant hemorràgies.

Els experts en diabetis expliquen que aquestes complicacions es podrien minimitzar si es manté un nivell de sucre normal.

➤ TIPUS D'ALIMENTACIÓ

Podem dir que el tipus d'alimentació és un factor modificable indirecte, ja que una mala alimentació comporta altres factors com l'alta pressió arterial, obesitat, resistència de la insulina, i alt nivell de lípids en sang. Aquests factors són els que influeixen en altres factors de risc cardiovasculars.

DIETA MEDITERRÀNIA

Seguir una dieta saludable podria reduir notablement el risc de patir una malaltia cardiovascular. És recomanable seguir una dieta mediterrània, ja que científicament s'ha demostrat que aquesta dieta permet evitar certes malalties com diabetis o malalties cardiovasculars. Aquesta està determinada pels aliments típics de les regions mediterrànies, tal i com indica el seu nom. És una dieta que consisteix en una abundància d'aliments vegetals com verdures, amanides, fruites, cereals, pasta, pa, llegums i fruits secs. Utilitza l'oli d'oliva com la font principal de la grassa. Es recomana el consum de peix que sigui ric en omega-3, d'aus, de carn blanca i de productes làctics i d'ous. Està permès un baix consum de carn vermella i de vi. Aquesta dieta és bona i seguida per molta gent ja que és baixa en grassa saturada i colesterol, i rica en hidrats de carboni i fibra. Perquè aquesta dieta sigui eficaç s'ha de combinar amb exercicis físics d'una manera regular.

2.4. TÈCNiques PROTEOMIQUES

Per estudiar les proteïnes fem servir la proteòmica, que és el conjunt d'estudis químics qualitatius, quantitius o semiquantitatius a gran escala del proteoma - el conjunt de proteïnes que expressa el genoma en un moment determinat -.

Les tècniques per a l'estudi de les proteïnes es poden classificar de la següent manera:

- Per a la identificació dels patrons o perfils proteics:
 - Electroforesi bidimensional + Espectrometria de masses
 - Cromatografia líquida + Espectrometria de masses
- Per a la validació i classificació de biomarcadors proteics:
 - *Western Blot*
 - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*
- Sistemes multiplex:
 - *Luminex X-Map*
 - *Proximity Extension Assay (PEA)*

Abans de l'aplicació d'aquestes tècniques cal preparar la mostra, el tipus de preparació depèn de la tècnica que es seguirà i de la naturalesa biològica de les mostres. Per exemple, si volem preparar una mostra de sèrum per fer l'electroforesi, cal separar les proteïnes majoritàries i les minoritàries fent passar el sèrum per una columna. Quan escanegem el gel obtingut amb l'escàner de fluorescència, la taca que es veuria de les proteïnes majoritàries seria tant forta que no deixaria veure les proteïnes minoritàries. Una altre exemple faria referència a les lipoproteïnes, donat que tenen una estructura que conté dues parts, la proteica i la lipídica. Hem de separar aquestes dues parts per preparar la mostra.

2.4.1. TÈCNiques PER A LA IDENTIFICACIÓ DELS PATRONS PROTEICS

2.4.1.1. ELECTROFORESI DE DUES DIMENSIONS

L'electroforesi de dues dimensions és una tècnica semiquantitativa, ja que permet obtenir un perfil proteòmic i quantificar relativament sense valors exactes.

Tal i com indica el seu nom, aquesta tècnica separa les proteïnes presents en una mostra, per exemple, del sèrum, segons dues dimensions, el pH i el pes molecular de les proteïnes.

Les dues dimensions es realitzen de manera separada i cronològicament una darrere l'altra. Primer es separen les proteïnes segons el seu valor de pH sobre les tires (*IPG estrip*) a través de l'isoelectroenfocament, basat en el fet que quan les proteïnes arriben a tenir el punt isoelectric 0 (Figura 11.), es separen. Posteriorment, es col·loquen les *IPG estrips* amb les proteïnes separades sobre el gel de poliacrilamida per començar la segona dimensió (SDS-PAGE) (Figura 12.).



Figura 11: Isoelectroenfocament amb la cubeta d'hydratació

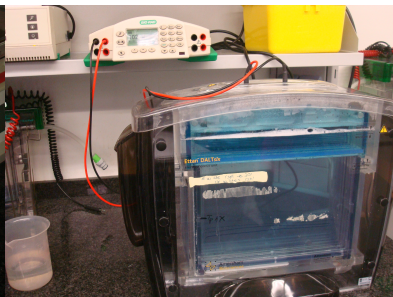


Figura 12: *Ettan Dalt* amb gel de poliacrilamida

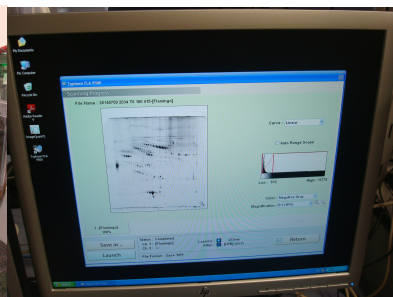


Figura 13: Escaneig del gel

El gel obtingut es pot observar mitjançant una imatge després de l'escaneig (Figura 13.). El resultat que observem és una imatge amb taques en la qual cada taca representa una proteïna. Segons la intensitat de color o la mida de la taca, podem induir la seva concentració en el plasma sanguini sempre comparant amb un altre gel a través del software *PDQuest*. Aquesta comparació també ens pot facilitar la informació de la presència o l'alteració de certes proteïnes en la sang d'un pacient concret.

2.4.1.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

La cromatografia líquida és una tècnica de separació de compostos utilitzant les propietats físiques o químiques de la mostra.

Aquesta tècnica consisteix a introduir la mostra dins el corrent de la fase mòbil, la qual està en contacte amb la fase estacionària. Dins d'aquest sistema, els components de la mostra corren amb diferents velocitats depenent de la seva afinitat amb les dues fases, és a dir, cada component tardarà un cert temps per fer tot el recorregut de la columna cromatogràfica i, per tant, estaran separats (Figura 14.).

Segons la naturalesa de la fase estacionària, podem classificar la cromatografia líquida de la següent manera:

- Cromatografia d'adsorció
- Cromatografia de repartiment/adsorció
- Cromatografia d'intercanvi iònic
- Cromatografia d'exclusió molecular



Figura 14: Equip de la cromatografia líquida

Comparant aquestes dues tècniques, veiem que la primera és molt més precisa que la cromatografia líquida, ja que les proteïnes estan separades per dos criteris, en canvi, la segona només per un sol criteri. Però la poliacrilamida és una substància química que pot influir en les mostres i alterar la seva expressió en el gel; en canvi, si utilitzem la cromatografia líquida evitem aquest problema. Tot i així, en tots dos casos es necessita una comprovació posterior.

Després de l'aplicació de les dues tècniques, tant l'electroforesi de 2D com la cromatografia líquida, si es detecta una proteïna d'interès, la podem identificar a través de l'espectrometria de masses. Una tècnica seria el MALDI-TOF.

MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight*)

MALDI-TOF és una tècnica proteòmica qualitativa que permet la identificació de les proteïnes (Figura 15.).



Figura 15: Espectròmetre de masses

Les mostres que s'analitzen amb aquesta tècnica poden provenir de diferents orígens. Si provenen de l'electroforesi 2D, els gels són sotmesos a l'*Ettan Spot Picker* (Figura 16. , 17.) per obtenir trossos de gels que continguin les proteïnes d'interès.



Figura 16: Programació de l'Ettan Spot Picker



Figura 17: Ettan Spot Picker

Abans d'introduir les mostres a l'espectròmetre, s'han de fer uns passos previs per la preparació de la mostra, com afegir la tripsina. Un cop la mostra estigui preparada es barreja amb el matrix (CHCA) perquè tingui la càrrega 1 positiu. Després s'introdueix la mescla a la placa *Anchor Chip* (Figura 18.).



Figura 18: Placa *Anchor Chip*

La tècnica de MALDI-TOF es basa en què el làser incideix sobre les mostres, les volatiliza i les fa entrar a un camp elèctric i són accelerades per entrar a un tub d'1 m de llargada. Com que s'ha fet el buit al tub, no hi ha res que pugui influir sobre les mostres; si la distància i la càrrega elèctrica són les mateixes per totes les mostres, l'únic factor que influeix

en el seu temps de vol és la seva massa. Així doncs, al final del tub hi ha un detector que detecta les partícules i pot calcular els seus temps de vol.

Actualment, els 20 aminoàcids que formen les proteïnes ja són tots coneguts, i també coneixem la massa de cadascun d'ells. Els fragments del pèptid tallats prèviament per la tripsina són suficientment curts com per desenvolupar uns càlculs amb la finalitat d'associar la massa d'un pèptid amb una composició d'aminoàcids específica. I a més, accedint a una base de dades com pot ser el *Mascot*, podem determinar la seqüència dels aminoàcids i d'aquesta manera s'arriba a identificar la proteïna.

2.4.2. TÈCNiques PER VALIDAR EL BIOMARCADOR PROTEIC

Una vegada feta la identificació del biomarcador proteic a través de les tècniques anteriors, s'ha d'efectuar una validació posterior per donar un resultat fiable. Aquesta validació pot ser realitzada per diferents tècniques.

2.4.2.1. ELISA (Figura 19.)

És una tècnica d'immunoassaig que permet identificar la quantitat d'una determinada proteïna present en una mostra; per tant, és una tècnica quantitativa d'una forma molt precisa. S'utilitza normalment per mesurar una quantitat molt petita de proteïnes.

Aquesta tècnica es fonamenta en la reacció antígen – anticòs, en la conjugació de l'anticòs – enzim, i també en la capacitat catalitzadora de l'enzim. Consisteix en un anticòs primari que capta la proteïna que volem analitzar (antigen – anticòs), i aquesta proteïna s'uneix amb un altre anticòs que després s'enganxarà amb un enzim formant un conjugat enzim – anticòs. En presència d'un substrat, aquest sistema produeix una reacció química i emet una llum que serà excitada per l'espectròmetre. A través del mateix lector de plaques (espectròmetre) es pot llegir l'absorbància. La quantificació es realitza mitjançant la comparació entre la corba estàndard (control donat pel mateix kit) i la corba constituïda pels valors de l'absorbància.



Figura 19: Kit d'ELISA

Malgrat que aquesta tècnica és molt avançada i molt útil, l'inconvenient és que només es pot estudiar una proteïna, però moltes mostres alhora.

En el moment d'aplicar aquesta tècnica s'ha de tenir en compte que el temps i la temperatura són dos factors que han de ser sempre controlats per no alterar tot el procediment, ja que cada proteïna o enzim té una temperatura d'actuació específica, i com que els resultats obtinguts són per comparar, el temps d'actuació ha de ser el mateix per totes les mostres. Una manera de controlar aquets factor pot ser l'ús d'una pipeta multicanal. S'ha de destacar que a ELISA, la reacció de cada mostra es fa el seu duplicat per tal de tenir dos resultats i obtenir una mitjana d'aquets dos resultats que seran més significatius i fiables.

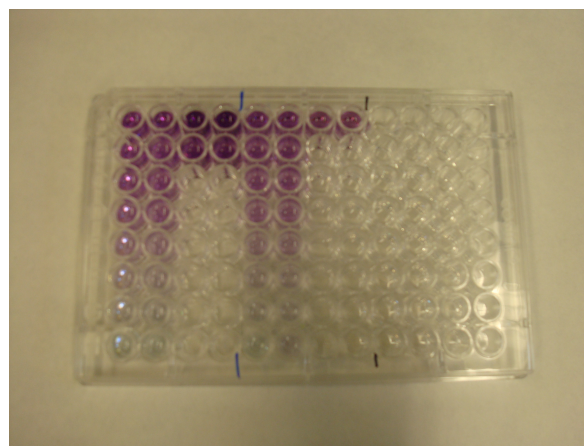


Figura 20: Placa d'ELISA preparada per llegir

Existeixen dos tipus d'ELISA, el competitiu i el *sandwich*, són semblants entre ells des del punt de vista tècnic, i diferents per la seva durada i l'ordre dels passos a seguir.

2.4.2.2. WESTERN BLOT

És una tècnica semiquantitativa, ja que també dona un resultat relatiu. Tot i així, a través d'aquest experiment es pot tenir una fiabilitat més alta d'identificació.

També es basa en la reacció de l'antigen – anticòs. Primer es fa córrer la mostra per un gel de poliacrilamida com la segona part SDS-PAGE de l'electroforesi, però a una escala més petita, per separar les proteïnes segons el seu pes molecular. Després es transfereixen les proteïnes del gel a una membrana emprant la càrrega negativa de les proteïnes, i posteriorment es bloqueja la membrana utilitzant l'ovoalbúmina de vaca (BSA) per evitar unions inespecífiques. Per l'últim, s'incuba la membrana en presència dels anticossos específics per la proteïna que es vol identificar i, a sobre, s'hi afegeix un anticòs secundari que sigui oposat al primer, que en presència d'un substrat dona color. Com més proteïna hi hagi, més anticossos s'hi uniran i, per tant, la banda serà més fosca. Per analitzar el resultat, també ens basem en la intensitat de les bandes que a través del software *Quantity One*, donarà una quantitat relativa (Figura 21.).

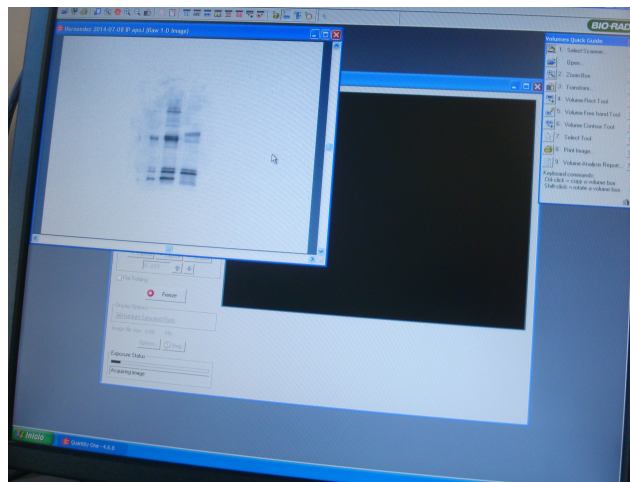


Figura 21: Resultat de lectura de la membrana

Veiem una diferència molt clara entre les dues tècniques, l'ELISA és molt més precisa, i el seu resultat és d'alta fiabilitat; en canvi, el *Western Blot* és menys precís. A més, ELISA és una tècnica més ràpida, tot i que econòmicament és més cara.

2.4.2.3. SISTEMES MULTIPLEX

Són sistemes que permeten identificar i quantificar moltes proteïnes al mateix moment, és a dir agrupen la identificació i la validació que s'ha explicat anteriorment en una sola tècnica.

➤ *Luminex X-Map*

La tècnica del *Luminex X-Map* és una tècnica quantitativa que permet mesurar la quantitat de diferents proteïnes presents en una mostra al mateix temps. També es basa en la reacció antígen – anticòs com l'ELISA.

X-Map es basa en una microesfera que porta un anticòs que s'unirà amb la proteïna. Quan la proteïna ja estigui unida, un altre anticòs que porta un fluorocrom també s'hi unirà.

En aquesta tècnica s'utilitza una microplaca com en el cas d'ELISA, en cada pou porta una barreja de les microesferes que identifiquen diferents proteïnes (Figura 22.).

Posteriorment, a través d'un analitzador *Luminex* que emet làser de color verd i un altre làser de color vermell amb longituds d'ona diferents, els làsers emesos per aquest analitzador exciten els fluorocroms que porten les microesferes i identifiquen el seu color, d'aquesta manera s'arriba a quantificar les proteïnes (Figura 23.).

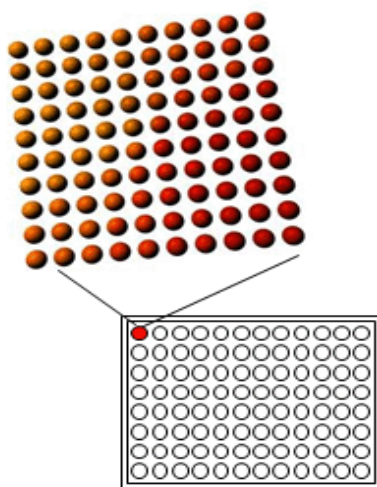


Figura 22: Esquema de la microplaca amb microesferes

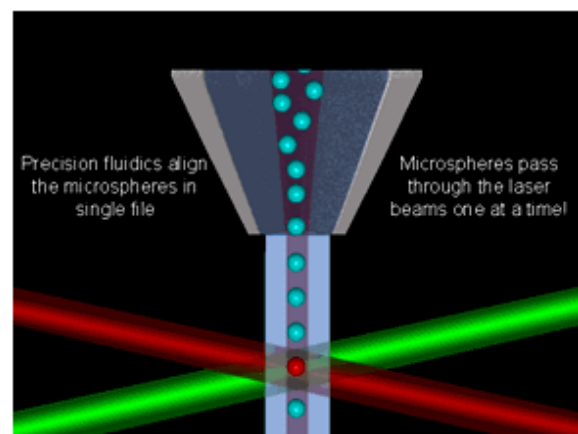


Figura 23: Esquema del funcionament de l'analitzador Luminex

Font: Luminex

➤ *Proximity extension assay* (PEA)

És una tècnica de quantificació de proteïnes. Com totes les tècniques anteriors, també es basa en la reacció antigen – anticòs, però com a diferència només utilitza un sol anticòs en lloc de dos. També es basa en una tècnica nova - PCR en temps real -.

Un parell dels conjugats oligonucleòtids – anticòs poden unir-se a la proteïna diana d'acord amb la reacció antigen – anticòs d'una mostra. Aquesta unió permet que les dues cadenes d'oligonucleòtids s'aproximi i iniciï una reacció en cadena de polimerasa (PCR), i quan estigui amplificat, aquestes unions seran detectades per un sistema del PRC en temps real (Figura 24.).

Aquesta tècnica permet detectar 92 proteïnes alhora en 90 mostres.

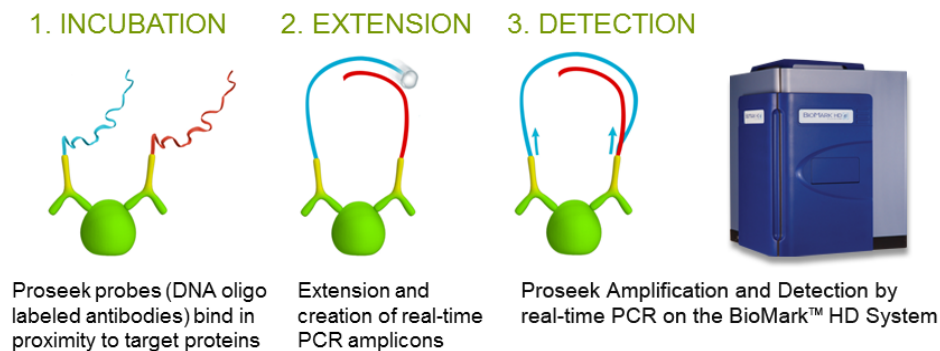


Figura 24: Esquema de la tècnica PEA
Font: Olink Bioscience

Comparant la PEA amb la *Luminex X-Map*, podem dir que la primera és més precisa perquè només es basa en un primer anticòs, mentre que la *Luminex X-Map* fa servir un segon anticòs que redueix la precisió, ja que degut a la unió del primer, la superfície de la proteïna es redueix i, conseqüentment, es redueix l'especificitat de la unió del segon anticòs.

3. HIPÒTESIS I OBJECTIUS DE L'ESTUDI

3.1. HIPÒTESIS

Tal i com s'ha comentat a l'apartat de la introducció, aquells individus que tenen una major probabilitat de presentar una manifestació clínica de malaltia cardiovascular, com l'infart de miocardi, ictus o mort sobtada, poden arribar a presentar-la o no. No obstant, fins el moment actual és molt difícil de predir si aquesta ocorrerà i en quin moment podria passar. Així doncs, és necessari trobar biomarcadors que proporcionin prou informació patofisiològica⁶ com per realitzar una prevenció. Per altra banda, gràcies als avenços científics dels últims anys, s'ha demostrat que les proteïnes són les responsables d'expressar una certa malaltia. D'aquesta manera, en presència del problema observat i dels coneixements exposats, aquest treball s'ha plantejat la hipòtesi següent:

En una patologia clínica com pot ser la hipercolesterolèmia familiar (definida per una mutació genètica en el gen que codifica el r-LDL, que fa incrementar el nivell de colesterol a la sang), existeixen proteïnes que, independentment del nivell de colesterol condicionen la manifestació clínica i predisposen a l'aparició dels processos isquèmics.

3.2. OBJECTIUS

Per poder verificar o rebutjar la hipòtesi plantejada, s'ha plantejat diversos objectius a aconseguir.

Com que aquest estudi està englobat dins d'un altre estudi més extens, prèviament ja s'ha donat altres objectius en els quals els seus resultats afecten directament els estudis posteriors.

3.2.1. OBJECTIUS NO INCLOSOS EN AQUEST TREBALL

- Selecció de pacients HF amb / sense manifestació clínica en una població més extensa.
- Anàlisi completa de proteïnes associades a CVD en els pacients seleccionats amb la tècnica PEA.

⁶ Patofisiològica: pertanyent a les funcions i mecanismes biològics associats a les malalties.

3.2.2. OBJECTIUS PROPIS DE L'ESTUDI

- Caracterització dels pacients amb paràmetres biològics, clínics i temps de seguiment.
- Diferenciació en paràmetres biològics i clínics entre diferents grups de pacients.
- Descripció de les proteïnes analitzades segons les vies metabòliques o funcions biològiques que hi estiguin implicades.
- Anàlisi de les proteïnes diferencials significatives entre diferents grups de pacients.
- Identificació de la importància funcional de les proteïnes diferencials analitzades.

4. MATERIALS

Els materials utilitzats en aquest treball són diferents programes informàtics per a l'anàlisi de dades biològiques.

4.1. SOFTWARE PER ANÀLISIS DE DADES

4.1.1. STATVIEW

StatView és una aplicació d'anàlisi estadístiques en general que permet fer anàlisis estadístiques descriptives i inferencials, entre altres. També permet definir diferents categories a les dades introduïdes, per facilitar sobretot les estadístiques inferencials a l'hora de realitzar testos estadístics com el t-test, *ANOVA*, o el chi quadrat test. En aquest cas, és utilitzat per caracteritzar els pacients emprant sobretot el t-test i el chi quadrat test. També per identificar proteïnes diferencials entre els individus estudiats.

4.1.2. PARTEK GENOMICS SUITE

És un programa específic en l'àmbit de la genòmica que ha sorgit per respondre la necessitat d'analitzar nombroses dades complexes. Té diferents utilitats com per classificar un nombre gran de gens, identificar grups de gens expressats diferencialment, etc. En el desenvolupament d'aquest treball, és utilitzat per identificar també les proteïnes diferencials entre els pacients d'una forma molt més exacta.

4.1.3. MICROSOFT OFFICE EXCEL

Excel és un programa molt conegut però menys específic. És molt útil per organitzar dades en taules i efectuar càlculs d'una forma ràpida i senzilla, és el software que s'ha utilitzat més en aquest treball per caracterització dels pacients i de les proteïnes.

4.2. SOFTWARE PER ANÀLISIS DE VIES DE SENYALITZACIÓ Y FUNCIONS BIOLÒGIQUES

4.2.1. INGENUITY PATHWAY ANALYSIS (IPA)

Aquesta aplicació conté una base de dades que permet identificar totes aquelles vies metabòliques, vies canòniques o funcions biològiques en les quals hi estan implicades totes les proteïnes, i també pot relacionar un grup de proteïnes que l'usuari assigna. Una gran part de dades d'aquest treball ha estat analitzada amb aquest programa, com les de l'apartat de caracterització de les proteïnes associades a CVDs i de les proteïnes diferencials entre pacients segons les vies.

5. MÈTODE

A partir del problema plantejat inicialment, s'han seguit uns passos concrets per tal d'assolir els objectius definits i respondre la hipòtesi inicial.

5.1. CARACTERITZACIÓ DELS PACIENTS

Caracteritzar els pacients seleccionats segons el paràmetre biològic, clínic, i el temps de seguiment és el primer pas que s'ha dut a terme en aquest treball. Aquesta caracterització s'ha fet a partir d'una base de dades dels pacients facilitada pel centre ICCC, on els pacients estan classificats segons el criteri comentat a l'apartat 1.

La base de dades consta de:

➤ Paràmetres biològics:

- Data de naixement
- Sexe
- Pes
- Altura
- Cintura

➤ Paràmetres clínics:

- Tipus de l'esdeveniment posterior a la inclusió.
- Si han patit un esdeveniment abans de la inclusió i el seu tipus.
- El nivell de colesterol més alt abans de la inclusió.
- Factors de risc com el tabac, la diabetis i la hipertensió arterial.
- La freqüència cardíaca, la pressió diastòlica i la sistòlica mesurades al mateix dia que l'extracció de la mostra.
- La presència dels xantomes i arcs corneals.
- El nivell de colesterol total, de triglicèrids, de colesterol LDL i de colesterol HDL.

- Temps de seguiment:
 - Data de l'esdeveniment posterior.
 - Data de la finalització del seguiment.
 - Data de la iniciació del tractament de les estatines.
 - Edat de començar a fumar.
 - Edat de deixar de fumar si es dóna el cas.

A partir de tota aquesta informació, amb un full de càlcul de l'Excel s'ha calculat:

- L'edat de prendre la mostra (la mostra s'ha pres el mateix dia de la inclusió).
(La data de la inclusió – la data del naixement) / 360 = l'edat de presa de la mostra
- L'edat de l'esdeveniment (només s'ha calculat amb pacients que han tingut la manifestació).
(La data de l'esdeveniment – la data del naixement) / 360 = l'edat de l'esdeveniment
- L'edat del IAM (només en els pacients que han tingut l'infart de miocardi com la manifestació clínica).
L'edat del IAM = l'edat de l'esdeveniment
- Els anys que han estat en l'estudi (només en pacients que no han mort).
(La data de la finalització del seguiment – la data del naixement) / 360 = els anys que han estat en l'estudi
- Els anys que ha passat des de la inclusió fins a l'esdeveniment o la mort.
(La data de l'esdeveniment – la data de la inclusió) / 360 = el període des de la inclusió fins a l'esdeveniment o la mort
- Els anys que ha passat des dels tractaments fins a la inclusió.
(La data de la inclusió – la data de l'inici del tractament) / 360 = el període des del tractament fins a la inclusió
- Els anys que ha passat des dels tractaments fins al final del seguiment.
(La data de la finalització del seguiment – la data de la inici del tractament) / 360 = el període des del tractament fins al final del seguiment
- Els anys que han fumat (només en els ex-fumadors).
L'edat que han deixat de fumar – l'edat que han començat a fumar = els anys del tabaquisme

- Els anys que ha passat des de que van deixar de fumar fins a l'esdeveniment (exclusius en els ex-fumadors).

L'edat de l'esdeveniment – l'edat de deixar de fumar = el període des de la finalització del tabaquisme fins a l'esdeveniment

- El valor de l'índex de massa corporal (BMI).

$$\text{Pes} / \text{altura}^2 = \text{BMI (kg/m}^2\text{)}$$

- El valor de l'índex cintura - talla (ICT).

$$\text{Cintura} / \text{altura} = \text{ICT (cm/cm)}$$

- Mitjana de la freqüència cardíaca i pressió sistòlica i la diastòlica (ja que van ser mesurats dues vegades).

$$(\text{FC1} + \text{FC2}) / 2 = \text{FC}$$

$$(\text{Psis1} + \text{Psis2}) / 2 = \text{Psis}$$

$$(\text{Pdia1} + \text{Pdia2}) / 2 = \text{Pdia}$$

5.2. ANÀLISI ESTADÍSTICA

5.2.1. ANÀLISI ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

S'ha fet una anàlisi estadística descriptiva completa de totes les dades utilitzant el *StatView* per definir les poblacions en estudi. En aquest pas, primer s'introdueixen totes les dades de l'Excel al *StatView* i es classifiquen totes les variables en diferents tipus, que podrien ser *real*, *string*, *category*, etc. Dins de l'opció *analyze* es poden fer diferents tipus d'anàlisis, en aquest primer pas s'ha fet una anàlisi estadística descriptiva completa on proporciona informacions següents:

- Mean
- Std. Dev
- Std. Error
- Count
- Minimum
- Maximum
- Missing

- Variance
- Coef. Var
- Range
- Sum
- Sum squares
- Geom mean
- Harm mean
- Skew ness
- Kurtos is
- Median
- IQR
- Mode
- 10% Tr.Mean
- MAD

5.2.2. ANÀLISI ESTADÍSTICA INFERENCIAL

Aquest pas serveix per comparar les poblacions en estudi per trobar aquells factors que no siguin proteïnes i que poden condicionar la manifestació clínica en els pacients.

En els estudis de comparació de grups / poblacions es defineix una hipòtesi nul·la i una hipòtesi alternativa.

- Hipòtesis:
 - La hipòtesi nul·la (H_0): és la hipòtesi que diu que les dues mostres que s'han comparat són iguals.
 - La hipòtesi alternativa (H_1): és la hipòtesi que diu que les dues mostres que s'han comparat són diferents.

Per definició, sempre es suposa que la hipòtesi nul·la és correcta fins que es demostrï el contrari.

Les comparacions s'interpreten segons el *P-Value* donat. És un valor obtingut de les proves de l'estadística inferencial que ens indica la probabilitat que l'acceptació/rebuig de la

hipòtesi nul·la sigui certa, i per poder rebutjar la hipòtesi nul·la el valor ha de ser menor a 0,05, que representa una error inferior a 5%. El 0,05 també representa el límit d'error alfa (tipus 1) que es podria cometre, és a dir, el màxim d'error que un investigador pugui cometre per confirmar la hipòtesi alternativa, essent aquesta falsa en la població.

Amb la finalitat de comprovar si les hipòtesis plantejades en cada factor són certes o falses s'han utilitzat diferents testos estadístics facilitats pel programa *StatView* que es poden definir com paramètrics i no paramètrics. En aquest estudi, per comparar poblacions o grups s'ha fet servir el t-test com anàlisis paramètriques (pels factors definits per números com edats, anys, nivells, etc), i el chi-quadrat com no paramètriques (pels factors no definits per números com el tabaquisme, tractaments mèdics, sexe, etc).

5.3. DESCRIPCIÓ DE LES PROTEÏNES IMPLICADES A CVD

Per realitzar aquest pas, és imprescindible la base de dades publicada en la pàgina *Olink Bioscience* sobre les proteïnes associades a CVD (Vegeu l'annex 1.). I també és important el programa *Ingenuity* comentat anteriorment que relaciona totes aquestes proteïnes amb diferents vies metabòliques o funcions biològiques. Amb aquesta extracció s'ha de fer un filtratge posterior per només obtenir aquelles vies relacionades amb els processos cardiovasculars. Aquest darrer filtratge s'ha dut a terme manualment en Excel. Com que el resultat d'aquesta extracció ve donat per diferents proteïnes implicades en una via, és necessari per caracteritzar les proteïnes marcar totes aquelles funcions dutes a terme per cada proteïna. Aquest l'últim pas s'ha fet a partir de la darrera filtració i manualment en l'Excel.

5.4. ANÀLISI DE PROTEÏNES DIFERENCIALS ENTRE PACIENTS

A partir de l'anàlisi de proteïnes amb la tècnica PEA que s'ha dut a terme anteriorment a aquest treball, s'ha fet una comparació del nivell de les proteïnes en sèrum entre els diferents grups dels pacients amb el programa *StatView* i PGS per identificar aquelles proteïnes que s'expressen de manera diferent.

Les comparacions s'han dut a terme entre els sans i els pacients d'HF sense esdeveniment; els controls sans i els pacients d'HF amb esdeveniment; els pacients HF amb esdeveniment i sense esdeveniment; els pacients HF que han mort i els d'IAM. Per extreure un resultat més significatiu s'ha agafat totes aquelles proteïnes diferencials comunes que s'hagin extret del programa *StatView* i les del PGS, i les que hagin sortit només amb el programa PGS, ja que és més exacte i precís.

5.5. CARACTERITZACIÓ DE LES PROTEÏNES DIFERENCIALS

Un cop identificades les proteïnes diferencials, amb un full d'Excel s'han buscat a quines vies o funcions filtrades anteriorment estan implicades aquestes proteïnes.

Paral·lelament, un altre cop amb el *Ingenuity* es busca en quines funcions biològiques i vies moleculars estan implicades aquestes proteïnes diferencials, i es compara aquest resultat amb el resultat de la filtració realitzada al punt 5.3.

6. RESULTATS I DISCUSSIÓ

6.1. CARACTERITZACIÓ DELS PACIENTS

Tal i com s'ha comentat a l'apartat dels mètodes, amb l'Excel s'han calculat diferents dades dels pacients (vegeu l'annex 2.). A partir dels resultats obtinguts, s'han realitzat els gràfics següents per destacar els aspectes importants.

6.1.1. EDAT D'EXTRACCIÓ DE LA MOSTRA O DE LA INCLUSIÓ

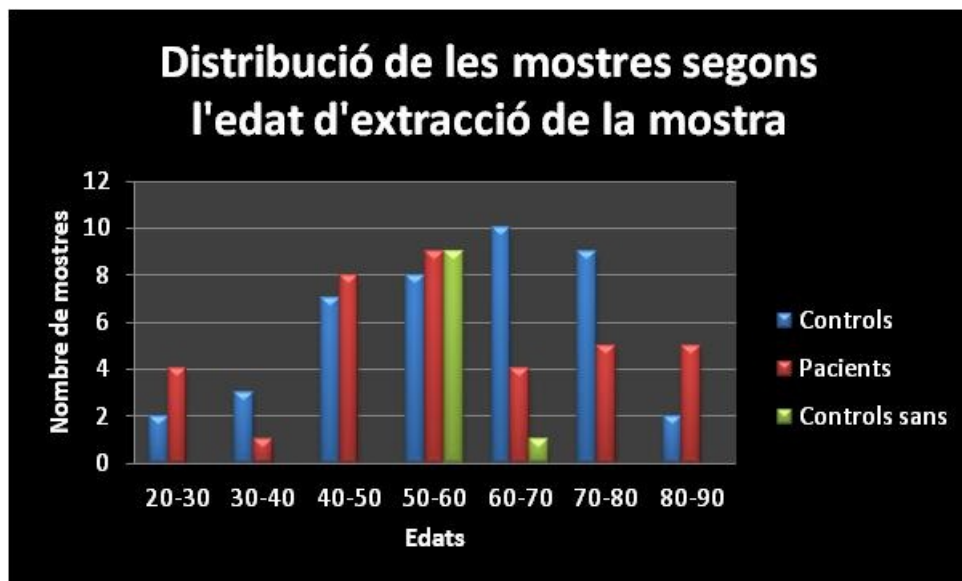


Figura 25: Gràfic de la distribució del nombre de les mostres segons l'edat d'extracció de la mostra

En aquest gràfic, es pot veure que les mostres, tant els controls, controls sans, com els pacients de la manifestació cardiovascular, estan distribuïdes en un rang molt ampli d'edats – entre 20 i 90 anys –. La majoria de les mostres, són de persones d'entre 50-60 anys, això també significaria que la majoria dels pacients amb manifestació clínica també són inclosos en aquest rang, tal i com es pot comprovar en el gràfic. En la mostra, però, hi ha un petit grup de pacients situats entre els 20 i 30 anys. Aquest fet indicaria que hi ha persones que han desenvolupat una manifestació cardiovascular en una edat molt prematura. També es pot observar que els controls sans es troben distribuïts majoritàriament entre els 50 i 60 anys, i només un tenia 62 anys; aquesta selecció dels sans representa un model de control de bona qualitat, ja que són semblants entre ells pel que fa a l'edat. Centrant-nos en els pacients, es pot veure que estan distribuïts en els diferents períodes d'edat, de manera que la proporció és semblant al repartiment dels controls, ja que aquests dos grups d'individus estan seleccionats

de tal manera que a cada pacient li correspongui un control de màxima semblança, per respondre a l'objectiu de seleccionar pacients per tal que sigui significativa la comparació.

6.1.2. EDATS DE LA MANIFESTACIÓ CLÍNICA

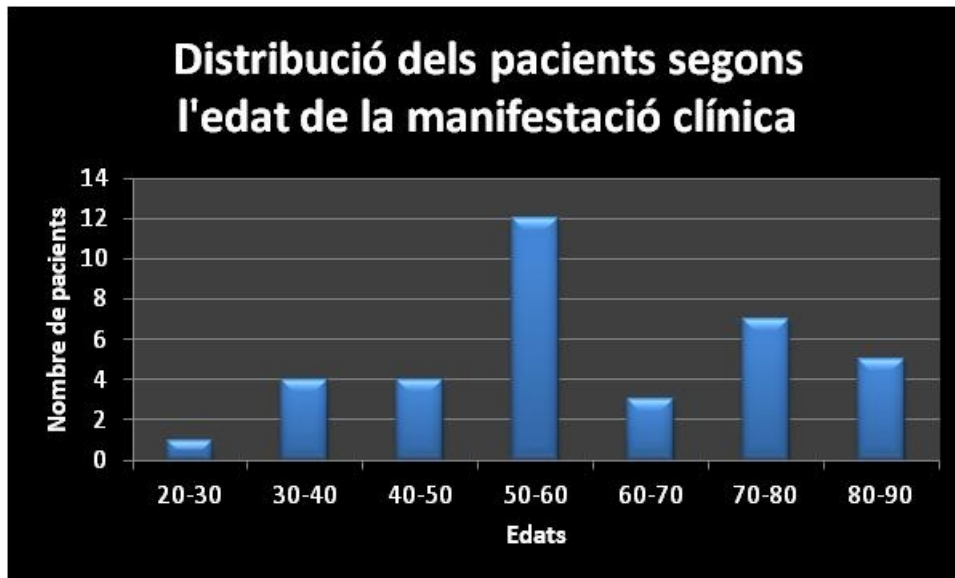


Figura 26: Gràfic de la distribució del nombre de pacients HF segons l'edat de la manifestació clínica

Tot i que no està reflectit en el gràfic, s'ha de destacar que a través dels resultats obtinguts s'observa que únicament s'han inclòs aquells controls que no havien tingut cap manifestació clínica durant o abans de la inclusió (per detalls, vegeu l'annex 2.). Aquesta observació portaria a assegurar l'alta fiabilitat dels resultats de l'estudi. En canvi, hi ha una heterogeneïtat de l'edat de l'esdeveniment en els pacients, dada que reafirma el que s'ha assenyalat a l'apartat anterior i també a la introducció: tot i que hi ha pacients d'edats avançades que pateixen la CVD, no s'ha d'ignorar que els pacients amb només uns trenta anys, ja han arribat a desenvolupar una manifestació greu.

6.1.3. ANYS EN L'ESTUDI O ANYS QUE HAN PASSAT DES DE LA INCLUSIÓ FINS A L'ESDEVENIMENT CLÍNIC

En aquest apartat també es troba una diversitat d'individus d'edats diferents i el mateix passa amb les edats de la manifestació clínica.

6.1.4. TRACTAMENT D'ESTATINES ABANS I DESPRÉS DE LA INCLUSIÓ

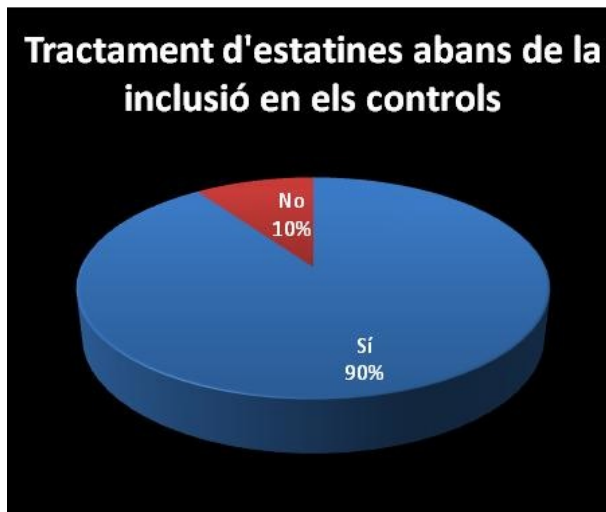


Figura 27: Gràfic del percentatge del nombre dels controls HF que prenen estatines abans de la inclusió

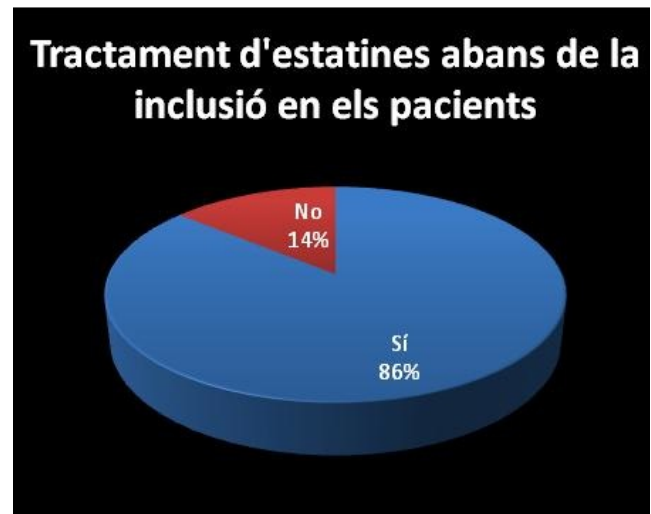


Figura 28: Gràfic del percentatge del nombre dels pacients HF que prenen estatines abans de la inclusió

A partir dels gràfics circulars anteriors, es pot observar que un 10% dels controls HF no prenen estatines abans de la inclusió, mentre que un 90% ho feien. En els pacients HF, hi ha uns percentatges similars als controls HF, un 14% no en prenen mentre que un 86% sí. Aquesta informació ens confirma una altra vegada la semblança entre aquests dos grups, i per tant, la qualitat de l'estudi.

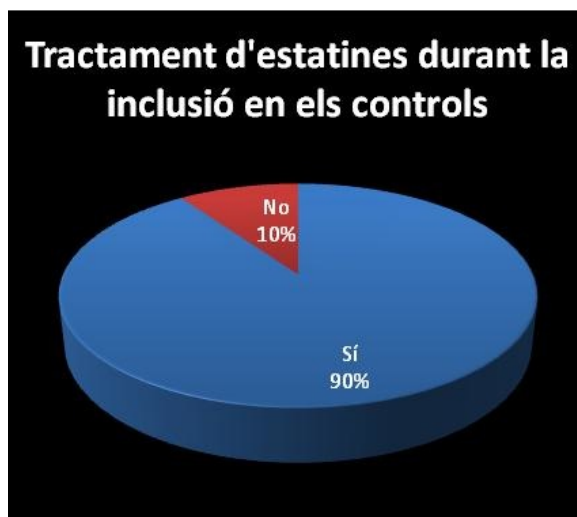


Figura 29: Gràfic del percentatge del nombre dels controls HF que prenen estatines durant la inclusió

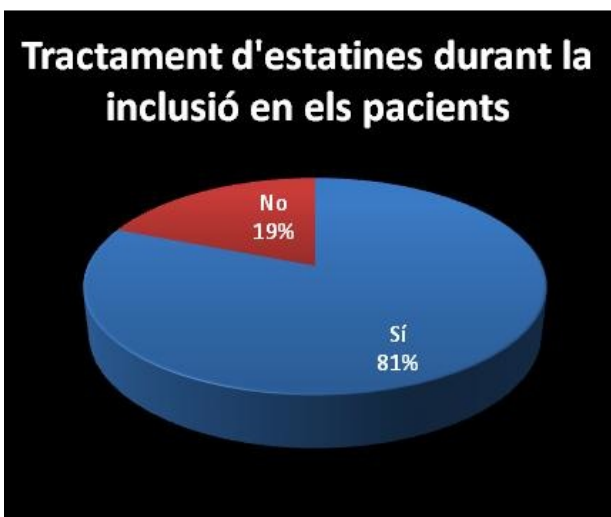


Figura 30: Gràfic del percentatge del nombre dels pacients HF que prenen estatines durant la inclusió

Durant la inclusió, els percentatges dels controls que prenen el tractament no han variat, mentre que en els pacients HF sí que hi hagut una petita variació, han disminuït les persones que prenen estatines durant l'estudi de cohort.

6.1.5. TABAQUISME

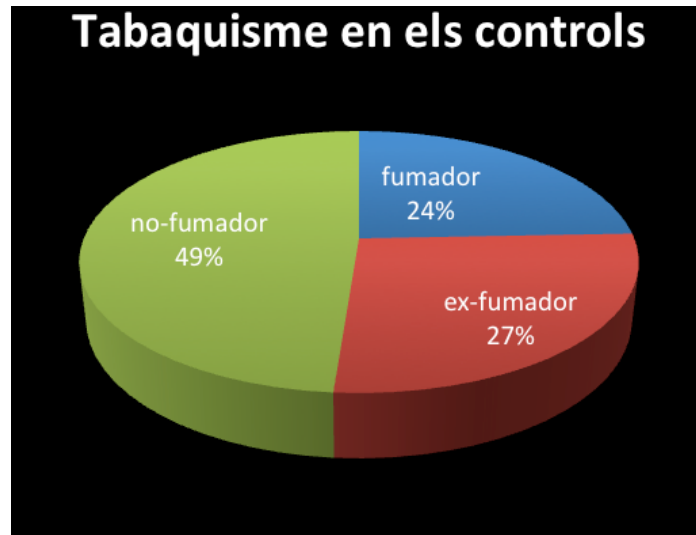


Figura 31: Gràfic del tacaquisme dels controls HF en percentatge del nombre d'individus

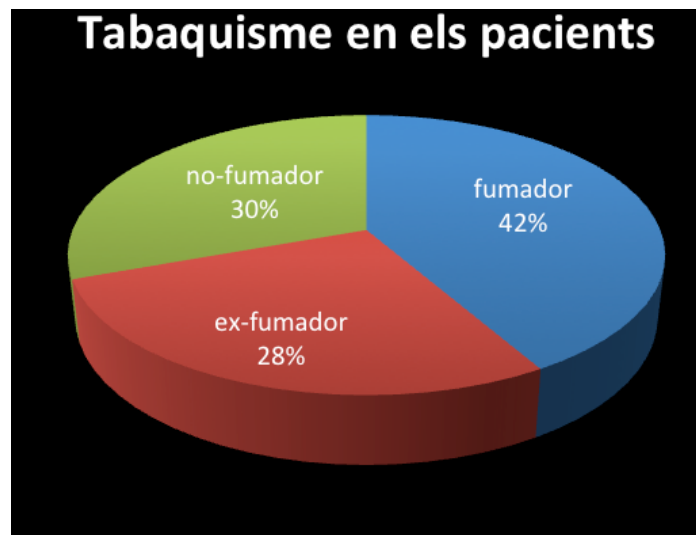


Figura 32: Gràfic del tacaquisme dels pacients HF en percentatge del nombre d'individus

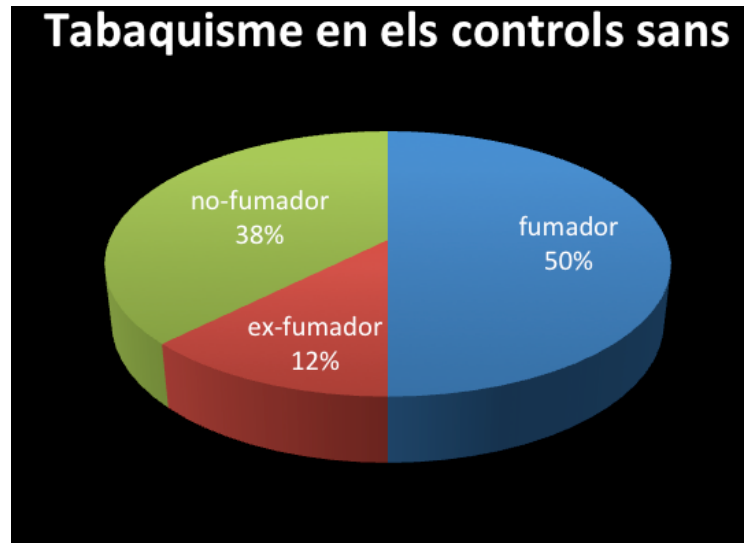


Figura 33: Gràfic del tabaquisme dels controls sans en percentatge del nombre d'individus

En el grup dels controls HF, gairebé la meitat dels individus són no fumadors, i la proporció dels fumadors i ex fumadors són molt semblants. Així com en el grup dels controls sans, la meitat de la població són fumadors, i un alt percentatge són no fumadors. En canvi, al grup dels pacients, gairebé la meitat de la població són fumadors. Així doncs, el percentatge de tabaquisme és més alt en els pacients que en els controls, però el percentatge encara és alt en els controls sans, per tant, es veu clarament que el tabaquisme no pot determinar la presència de l'esdeveniment cardiovascular. Malgrat això, es comprovarà posteriorment amb els estudis estadístics.

6.1.6. BMI

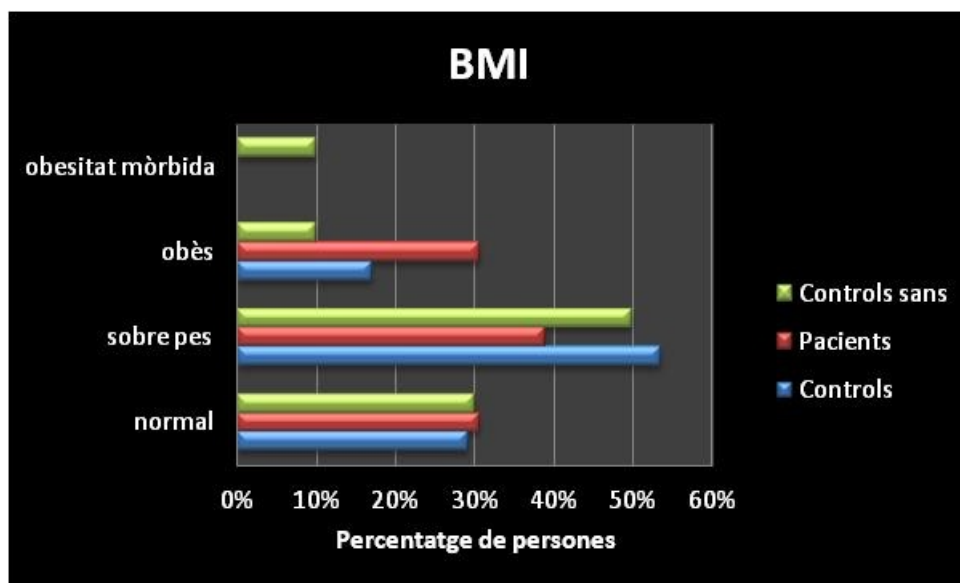


Figura 34: Gràfic de la distribució del percentatge d'individus segons el BMI

Tal i com es pot veure en el gràfic, els individus estudiats estan classificats en tres grups: normal (BMI 18-25), sobrepès (BMI 25-30), obès (BMI 30-40), i obesitat mòrbida (BMI >40). Aproximadament hi ha la mateixa proporció dels pacients, controls i controls sans normals, però hi ha més controls HF i controls sans amb sobrepès que els pacients, en canvi, hi ha més pacients obesos que els controls HF i controls sans. Amb estudis estadístics posteriors es determinarà fins a quin punt són diferents aquests grups pel que fa a l'obesitat.

6.1.7. ÍNDEX CINTURA – TALLA

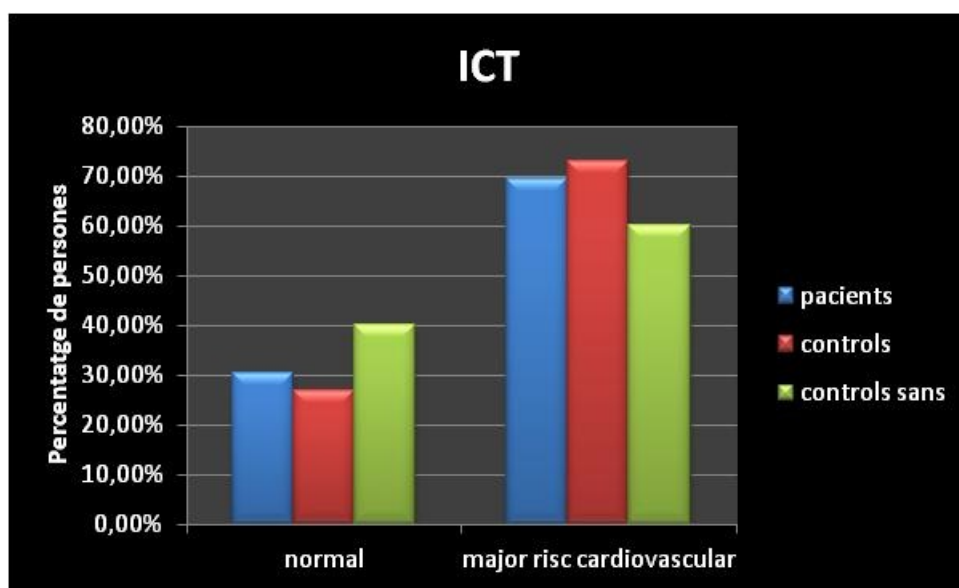


Figura 35: Gràfic de la distribució del percentatge d'individus segons l'ICT

En aquest apartat, s'han classificat els grups de la població estudiada segons l'índex de cintura-talla. Es considera que una persona amb el valor d'ICT igual o major a 0,5, té un risc cardiovascular més gran. Segons aquest gràfic de barres, es pot observar que en tots els grups el percentatge d'individus amb un risc normal és més petit que el d'individus amb un risc major. Aquest fet podria ser degut al canvi d'estil de vida dels darrers anys, ja que la qualitat d'alimentació s'ha incrementat i l'esforç físic ha disminuït molt en la majoria de les persones, cosa que provocaria un cúmul de greixos a la cintura, que és l'objectiu de mesura d'aquest índex. Mirant els individus amb un major risc cardiovascular, s'observa que en els controls sans hi ha menys proporció, però comparant els controls i els pacients d'HF, el percentatge d'individus amb més risc és més alt en els controls HF que en la població dels pacients. Amb aquestes observacions, podem dir que, tot i que l'ICT ens proporciona una informació útil, no és el criteri determinant d'una futura manifestació cardiovascular.

6.1.8. FREQUÈNCIA CARDÍACA, PRESSIÓ SISTÒLICA I DIASTÒLICA

Observant les dades obtingudes (vegeu l'annex 2.), no es pot determinar de quina manera influeixen en la manifestació de la patologia cardiovascular, ja que es desconeixen els hàbits i l'ofici de cada individu. Es podria fer un estudi aproximat a través de l'estadística inferencial.

A continuació es comprovarà si la diferència que s'ha observat en aquest apartat és prou significativa com per tenir importància biològica.

6.2. ANÀLISI ESTADÍSTICA

6.2.1. T- TEST

Paràmetre	Valors	Pacients HF vs controls HF	HF controls vs sans	Pacients vs sans	HF (p+c) vs sans
Edat d'extracció de la mostra	Comptats	36 - 41	41 - 10	36 - 10	77 - 10
	Mitjanes	57.15 - 59.53	59.53 - 56.40	57.15 - 56.40	58.42 - 56.40
	P-Value	0.5391	0.5490	0.8940	0.7067
Edat de la manifestació clínica	Comptats	12 - 24			
	Mitjanes	53.75 - 64.00			
	P-Value	0.0914			
Niv. colesterol més alt abans de la inclusió	Comptats	35 - 40	40 - 9	35 - 9	75 - 9
	Mitjanes	330.71 - 291.80	291.80 - 241.67	330.71 - 241.67	309.96 - 241.67
	P-Value	0.0741	0.0701	0.0205	0.0358

Paràmetre	Valors	Pacients HF vs controls HF	HF controls vs sans	Pacients vs sans	HF (p+c) vs sans
BMI	Comptats	36 - 41	41 - 10	36 - 10	77 - 10
	Mitjanes	28.02 - 27.17	27.17 - 44.95	28.02 - 44.95	27.57 - 44.95
	P-Value	0.3737	0.2909	0.8659	0.5176
Cintura	Comptats	36 - 41	41 - 10	36 - 10	77 - 10
	Mitjanes	91.44 - 88.07	88.07 - 88.10	91.44 - 88.10	89.65 - 88.10
	P-Value	0.3089	0.9952	0.5635	0.7493
ICT	Comptats	36 - 41	41 - 10	36 - 10	77 - 10
	Mitjanes	0.56 - 0.54	0.54 - 0.58	0.56 - 0.59	0.55 - 0.59
	P-Value	0.2886	0.2298	0.6051	0.3195
Freqüència cardíaca	Comptats	36 - 41	41 - 10	36 - 10	77 - 10
	Mitjanes	85.21 - 83.49	83.49 - 77.35	85.21 - 77.35	84.29 - 77.35
	P-Value	0.4232	0.2310	0.1721	0.1100
Pressió sistòlica	Comptats	36 - 41	41 - 10	36 - 10	77 - 10
	Mitjanes	135.39 - 136.84	136.84 - 122.20	135.39 - 122.20	136.16 - 122.20
	P-Value	0.7568	0.1287	0.1949	0.0927
Pressió diastòlica	Comptats	36 - 41	41 - 10	36 - 10	77 - 10
	Mitjanes	76.50 - 77.90	77.90 - 74.55	76.50 - 74.55	77.25 - 74.55
	P-Value	0.5821	0.5307	0.7629	0.5756
Colesterol total	Comptats	36 - 41	41 - 10	36 - 10	77 - 10
	Mitjanes	276.87 - 247.93	247.93 - 231.10	276.87 - 231.10	261.46 - 231.10
	P-Value	0.1028	0.3687	0.1477	0.2281

Paràmetre	Valors	Pacients HF vs controls HF	HF controls vs sans	Pacients vs sans	HF (p+c) vs sans
TIG	Comptats	36 - 41	41 - 10	36 - 10	77 - 10
	Mitjanes	121.35 - 110.06	110.06 - 117.97	121.35 - 117.97	115.37 - 117.97
	P-Value	0.4970	0.6981	0.9018	0.9102
cHDL	Comptats	36 - 41	41 - 10	36 - 10	77 - 10
	Mitjanes	43.25 - 47.97	47.97 - 49.02	43.25 - 49.02	45.76 - 49.02
	P-Value	0.0483	0.7703	0.1477	0.3635
cLDL	Comptats	36 - 41	41 - 10	36 - 10	77 - 10
	Mitjanes	209.48 - 175.73	175.73 - 158.37	209.48 - 158.37	191.51 - 158.37
	P-Value	0.0475	0.3572	0.0822	0.1714

La taula anterior conté un resum de les anàlisis comparatives de les diferents poblacions sobre tots els paràmetres caracteritzables amb números, comparant el *p-value* amb 0,05, límit d'error alfa per acceptar o rebutjar l' H_0 . (Perquè hi hagi diferències entre població el valor ha de ser inferior a 0,05).

En totes les comparacions sobre l'edat d'extracció de la mostra, el *p-value* és més gran que 0,05, la qual cosa significaria que aquest paràmetre és indiferent en cada una de les comparacions i, per tant, les mostres de sang analitzades no es veurien diferents entre elles per les edats del donant.

Comparant l'edat de la manifestació clínica entre P-IAM i P-Ex, també dona un valor superior a 0,05, indicant que no hi ha diferències entre l'edat dels pacients morts per causes cardiovasculars i aquells que han sofert un infart de miocardi no fatal.

El nivell de colesterol més alt abans de la inclusió és una dada d'importància relativa, i només serveix com una informació secundària, ja que estan anotades segons les fonts orals dels pacients, i no sempre amb justificació mèdica; tot i així, els *p-values* són lògics i raonables. No hi ha diferències estadístiques entre els pacients i controls HF, el que podria ser degut a que tots dos casos comparteixen la HF; però tampoc hi ha diferències estadístiques entre HF controls i sans, això es justifica amb el tractament de les estatines que prenen abans de la inclusió. El *p-value* és significatiu comparant els pacients HF amb els controls sans. Tenint en compte els resultats anteriors, aquest valor de 0,0205 semblaria contradictori, però podria ser degut a que els pacients possiblement estan mal controlats des d'un punt de vista clínic comparant amb els controls HF. En la comparació entre els individus HF i controls sans, el valor també és significatiu; no obstant, en el grup total d'HF estan inclosos també els pacients HF, els que estan mal controlats com s'ha comentat anteriorment.

El valor de BMI no distingeix els diferents grups, la qual cosa significa que en aquest cas, l'obesitat no és un factor que influeix i de manera considerada a la manifestació de les CVDs. De la mateixa manera, el contorn de la cintura i l'índex cintura-talla tampoc són factors que hagin influït en la patologia clínica.

Les mesures preses al mateix moment d'extracció de la mostra, com la freqüència cardíaca, la pressió sistòlica i la pressió diastòlica, són informacions que ens demostren que els pacients no pateixen anomalies en aquest sentit; tal i com indiquen els *p-values*, tots són superiors de 0,05.

A continuació s'observa que, a nivell del colesterol mesurat al dia de la inclusió, no hi ha diferència entre les diferents comparacions ja que els pacients amb dislipèmia estan tractats de les estatines. Excepte entre els controls HF i els pacients HF, el nivell de cHDL i cLDL és lleugerament diferent, amb valors de *p-value* inferior a 0,05. Aquest fet suggereix que cHDL i cLDL són rellevants en la manifestació clínica. No obstant, degut a que són valors molt propers a 0,05, faria pensar que altres factors diferents de les cHDL i cLDL també estan contribuint a les diferències en la manifestació clínica.

6.2.2. CHI QUADRAT

Paràmetre	Pacients HF vs controls HF	HF controls vs sans	Pacients vs sans	HF (p+c) vs sans
Sexe	0.7008	0.5120	0.6954	0.5739
Tractament de les estatines abans de la inclusió	0.5733	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Diabetis	0.8682	0.7772	0.8686	0.8092
Hipertensió arterial	0.5223	0.2100	0.1124	0.1442
Tractament de les estatines durant la inclusió	0.2254	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Tabaquisme	0.1873	0.3199	0.6651	0.5279
Arc corneal	0.4367	0.0088	0.0329	0.0124
Xantomes	0.0987	0.1595	0.0337	0.0756

Com ja s'ha comentat a l'apartat dels mètodes, pels paràmetres no caracteritzables amb números s'ha fet una anàlisi comparativa utilitzant el chi quadrat.

Com s'observa en la taula anterior, els grups d'estudi no es diferencien de forma significativa ni en el sexe ni en la presència de factors de risc com diabetis, hipertensió i tabaquisme. Això es deu a que la selecció dels grups s'ha efectuat de forma que aquests factors siguin els més similars possible, amb la finalitat de poder identificar perfils de proteïnes diferencials independents d'aquests factors. De tota manera, el fet que hi hagi nivells similars d'aquests factors entre els grups amb i sense CVD suggereix que aquests no

són determinants per a l'aparició d'esdeveniments cardiovasculars en pacients amb hipercolesterolèmia familiar.

Al contrari, es veu una clara diferència en les comparacions amb els controls sans en referència al tractament amb estatines abans de la inclusió. Ens confirma que també havien sigut sans anteriorment. El *p-value* resultant de la comparacions entre els pacients i els controls HF indica que el tractament de les estatines no és suficient per controlar l'esdeveniment clínic. En referència al tractament amb estatines durant l'estudi, es pot veure que el seu efecte tampoc ha pogut evitar l'IAM o la mort; paral·lelament, els sans han continuat amb el mateix estat de salut, sense patir hiperlipèmia.

Com ja s'ha indicat a la part teòrica, l'arc corneal i els xantomes són evidències de diagnòstic; tot i així, no són presents en tots els malalts d'HF, per tant, en aquest cas els resultats de les comparacions no són representatius. Però s'hauria de destacar que no hi ha diferència entre els pacients i els controls HF, així es pot assegurar que no és una indicació del futur esdeveniment fatal.

En resum de totes les anàlisis estadístiques, no s'ha trobat cap variable entre els analitzats que pugui ser significatiu de cara a la prevenció dels possibles esdeveniments cardiovasculars en la població de pacients amb HF; en altres paraules, no s'ha trobat cap condicionant de la manifestació clínica ni dels processos isquèmics. Fins aquí es podria dir que encara que no es pugui confirmar del tot la hipòtesi plantejada, almenys els resultats que s'han vist fins ara indiquen que el plantejament inicial està ben encaminat. Faltaria l'estudi posterior sobre les proteïnes per acabar de confirmar la hipòtesi.

6.3. CARACTERITZACIÓ DE LES PROTEÏNES IMPLICADES A CVDs

Donat que aquest estudi està inclòs en un altre estudi en desenvolupament que encara no s'ha fet públic, alguns resultats es presentaran amb noms de proteïnes codificats. Utilitzant el programa IPA, s'han analitzat les proteïnes associades a CVD segons les vies o funcions biològiques que hi estiguin implicades. S'han obtingut en total unes 1605 funcions o vies metabòliques. Després d'una filtració segons el procés de desenvolupament de les CVDs, s'han pres totes aquelles funcions importants en el desenvolupament de les CVDs, i

posteriorment s'han classificat aquestes funcions en funcions biològiques, moleculars, cel·lulars, i associades a CVDs. El resultat queda resumit en les taules següents:

Funcions cel·lulars	Funcions moleculars	Funcions biològiques	Funcions associades a CVDs
<p>Cell proliferation</p> <ul style="list-style-type: none"> -Proliferation of endothelial cells -Proliferation of mononuclear leukocytes -Proliferation of vascular endothelial cells -Proliferation of cardiac fibroblasts -Proliferation of cardiomyocytes -Proliferation of ventricular myocytes <p>Cell movement /migration/infiltration</p> <ul style="list-style-type: none"> -Infiltration of leukocytes -Cell movement of monocytes -Cell movement of smooth muscle cells 	<p>Synthesis/production/release / concentration</p> <ul style="list-style-type: none"> -Synthesis of lipid -Concentration of lipid -Release of lipid -Production of reactive oxygen species -Increased synthesis of CRP <p>Ca²⁺</p> <ul style="list-style-type: none"> -Flux of Ca²⁺ -Mobilization of Ca²⁺ <p>Induction</p> <ul style="list-style-type: none"> -Induction of leukocytes 	<p>Recruitment/Adhesion</p> <ul style="list-style-type: none"> -Recruitment of leukocytes -Recruitment of mononuclear leukocytes -Adhesion of endothelial cells <p>Metabolism</p> <ul style="list-style-type: none"> -Metabolism of reactive oxygen species <p>Chemotaxis/chemotraction</p> <ul style="list-style-type: none"> -Chemotaxis of monocytes -Chemoattraction <p>Binding</p> <ul style="list-style-type: none"> -Binding of endothelial cells -Binding of leukocytes <p>Response</p> <ul style="list-style-type: none"> -Immune response of leukocytes -Immune response of cells -Response of mononuclear leukocytes 	<p>Functions associated of heart or blood vessels</p> <ul style="list-style-type: none"> -Vascular disease -Vascular lesion -Disorder of artery -Atherosclerosis -Heart disease -Acute coronary syndrome -Failure of heart -Stenosis of aortic valve -Dilation of heart chamber -Coronary artery disease -Heart failure with preserved left ventricular ejection -Dysfunction of left ventricle -Rupture of myocardium -Dysfunction of myocardium -Chronic heart failure -Stenosis of pulmonary valve

Funcions cel·lulars	Funcions moleculars	Funcions biològiques	Funcions associades a CVDs
<p>Cell movement / migration/infiltration</p> <ul style="list-style-type: none"> -Cell movement of macrophages -Migration of smooth muscle cells -Cell movement of endothelial cells -Migration of endothelial cells -Migration of monocytes -Infiltration by mononuclear leukocytes -Cell movement of vascular smooth muscle cells <p>Cell death/apoptosis</p> <ul style="list-style-type: none"> -Apoptosis of leukocytes -Cell death of endothelial cells -Cell death of mononuclear leukocytes -Apoptosis of mononuclear leukocytes -Apoptosis of mononuclear leukocytes -Apoptosis of mononuclear leukocytes -Apoptosis of endothelial cells -Cell death of heart -Cell death of cardiomyocytes -Apoptosis of cardiomyocytes -Onset of apoptosis of cardiomyocytes 		<p>Differentiation/ function /activation /stimulation</p> <ul style="list-style-type: none"> -Stimulation of mononuclear leukocytes -Differentiation of leukocytes -Differentiation of mononuclear leukocytes 	<p>New blood vessels</p> <ul style="list-style-type: none"> -Vasculogenesis -Angiogenesis -Tubulation of endothelial cells -Vascularization <p>Occlusion</p> <ul style="list-style-type: none"> -Occlusion of blood vessel -Occlusion of artery <p>Size of damage</p> <ul style="list-style-type: none"> -Size of infarct -Size of atherosclerosis <p>Tissue hypertrophy/fibrosis</p> <ul style="list-style-type: none"> -Hypertrophy of heart cells -Hypertrophy of ventricular myocardium -Cardiac fibrosis -Hypertrophy of cardiomyocytes -Hypertrophy of ventricular myocytes -Onset of hypertrophy of cardiomyocytes <p>Infarction/necrosis</p> <ul style="list-style-type: none"> -Infarction -Myocardial infarction -Acute myocardial infarction -Necrosis of myocardium -Infarction of heart -Infarction of myocardium -Non-ST elevation myocardial infarction <p>Inflammation</p> <ul style="list-style-type: none"> -Myocarditis -Inflammation of heart <p>Diabetes</p> <ul style="list-style-type: none"> -Diabetes mellitus -Diabetes complication

A partir del següent gràfic, es pot veure quin nombre de proteïnes associades a CVDs participen en cada tipus de funcions i que totes les funcions són necessàries per les malalties cardiovasculars; tot i així, algunes són més importants que altres pel desenvolupament de les malalties. Mirant el nombre de proteïnes, es poden destacar algunes funcions importants. Així com les funcions associades al cor o a vasos sanguinis estan al primer lloc, sense dubte, aquest tipus de funcions són decisives dins de les CVDs. En segon lloc, el moviment /migració /infiltració cel·lular també és una funció prou destacada, ja que inclouen processos importants com la migració de les cèl·lules musculars, infiltració dels leucòcits, etc. Pel procés d'arteriosclerosi, la proliferació dels leucòcits, de les cèl·lules endotelials també són funcions que acceleren les etapes com la disfunció endotelial o la resposta inflamatòria. Tal i com es demostra en el gràfic, aquest tipus de funcions ocupa el tercer lloc.

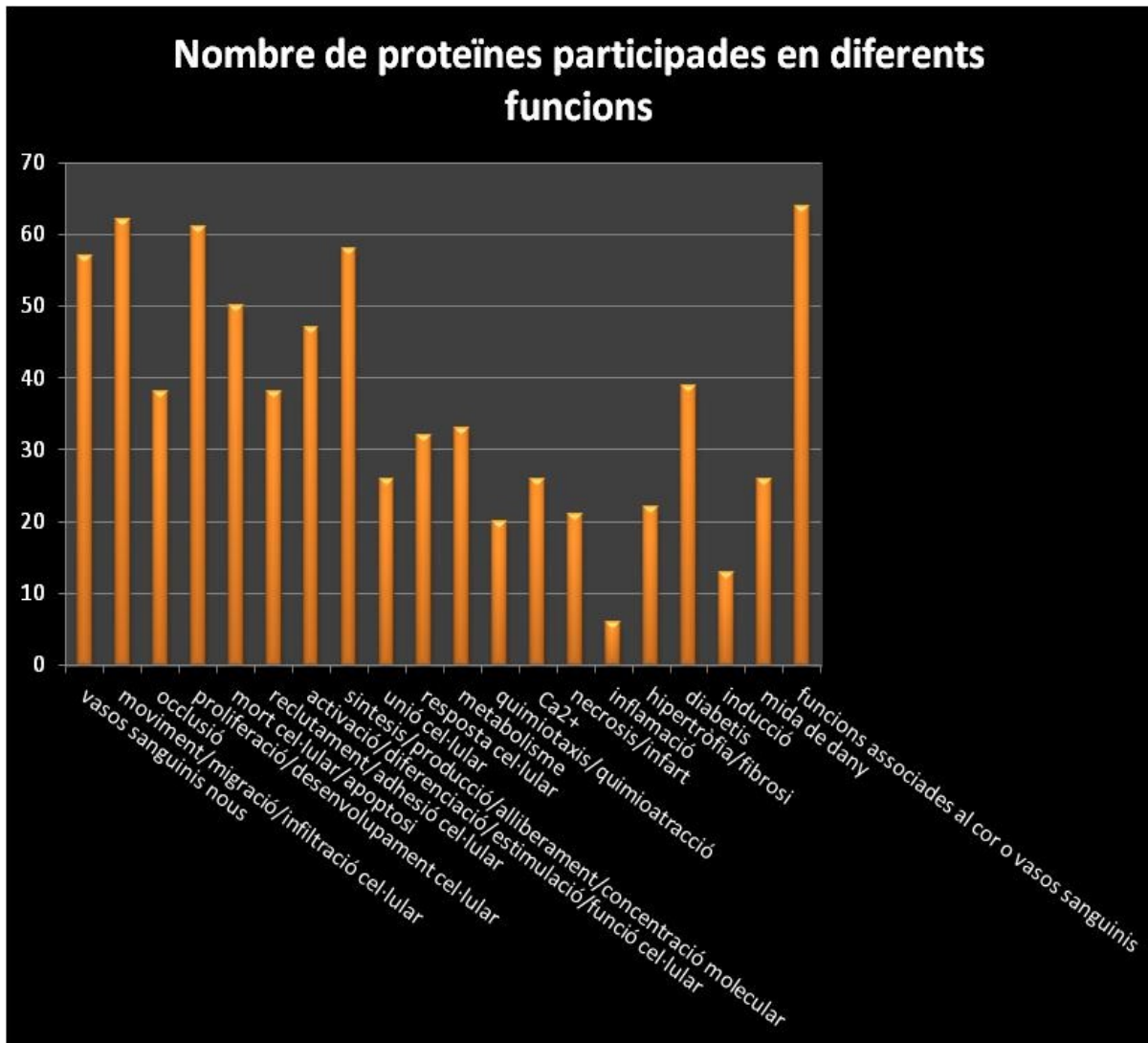


Figura 36: Gràfic de la distribució de les proteïnes associades a CVDs segons les funcions

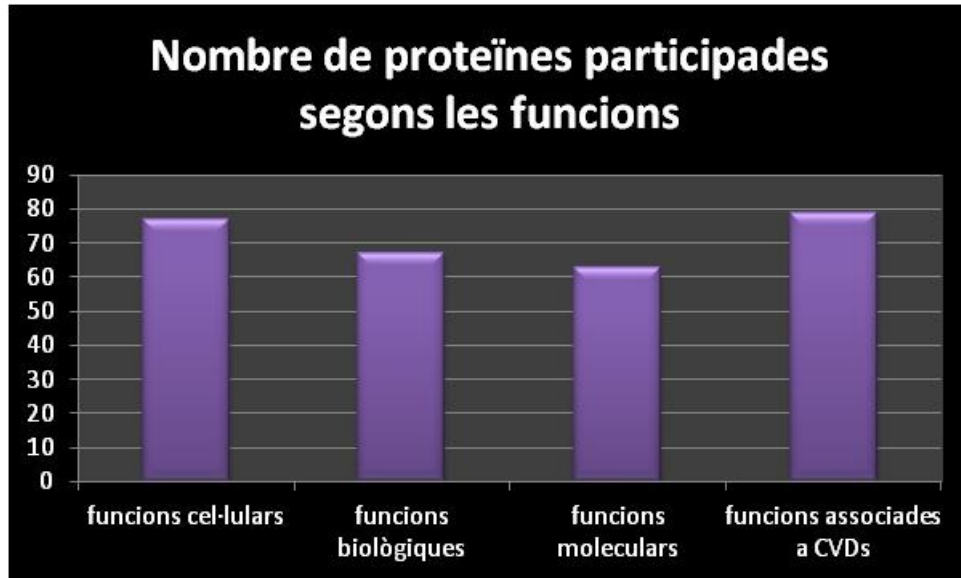


Figura 37: Gràfic de la distribució de les proteïnes associades a CVDs segons les funcions generals

Amb una visió més general, segons les anàlisis, del total de 92 proteïnes associades a CVDs, 77 participen en funcions cel·lulars, 67 en funcions biològiques, 63 en funcions moleculars i 79 en funcions associades a CVDs. Efectivament, comparant amb la taula anterior, les funcions incloses són les que juguen un paper més important dins el desenvolupament de l'arteriosclerosi i la seva manifestació.

6.4. ANÀLISI DE PROTEÏNES DIFERENCIALS SIGNIFICATIVES ENTRE DIFERENTS GRUPS DE PACIENTS

Quan es parla de les proteïnes diferencials es refereix a diversos casos: poden ser una expressió nul·la, una expressió d'excés o de defecte, o una expressió alterada (canvi en el perfil d'una proteïna quan es troba en diferents formes) en un dels dos grups de les comparacions. Després d'una anàlisi amb el PGS i *StatView*, s'han trobat les proteïnes diferencials i les seves distribucions per grups de comparació.

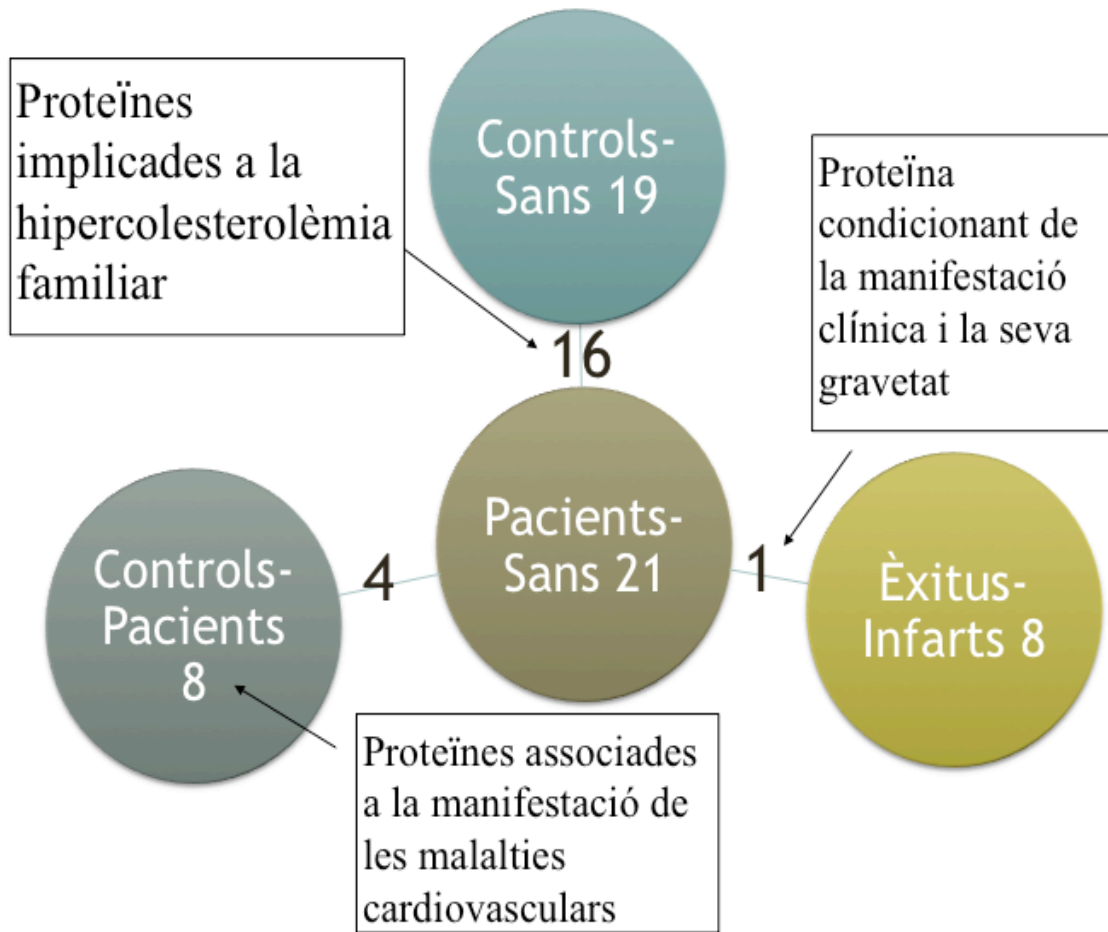


Figura 38: Diagrama de Venn que relaciona les proteïnes diferencials obtingudes amb les diferents comparacions que s'ha fet

El diagrama de Venn anterior mostra com es distribueixen les proteïnes diferencials entre els diferents grups comparats. A la taula següent es trobarà una llista de forma específica de les proteïnes diferencials en cada grup de comparació.

HF Control vs sans (C-S)	HF Pacient vs sans (P-S)	HF Control vs HF Pacient (C-P)	EX vs IAM (E-I)
Proteïna 1	Proteïna 5	Proteïna 21	Proteïna 36
Proteïna 2	Proteïna 12	Proteïna 20	Proteïna 37
Proteïna 3	Proteïna 20	Proteïna 32	Proteïna 38

HF Control vs sans (C-S)	HF Pacient vs sans (P-S)	HF Control vs HF Pacient (C-P)	EX vs IAM (E-I)
Proteïna 4	Proteïna 1	Proteïna 31	Proteïna 39
Proteïna 5	Proteïna 6	Proteïna 33	Proteïna 40
Proteïna 6	Proteïna 2	Proteïna 34	Proteïna 41
Proteïna 7	Proteïna 18	Proteïna 23	Proteïna 42
Proteïna 8	Proteïna 8	Proteïna 35	Proteïna 28
Proteïna 9	Proteïna 3		
Proteïna 10	Proteïna 21		
Proteïna 11	Proteïna 7		
Proteïna 12	Proteïna 22		
Proteïna 13	Proteïna 4		
Proteïna 14	Proteïna 11		
Proteïna 15	Proteïna 14		
Proteïna 16	Proteïna 23		
Proteïna 17	Proteïna 24		
Proteïna 18	Proteïna 25		
Proteïna 19	Proteïna 26		
	Proteïna 27		
	Proteïna 28		
	Proteïna 10		
	Proteïna 19		
	Proteïna 29		
	Proteïna 30		
	Proteïna 17		
	Proteïna 31		
	Proteïna 9		

En la comparació dels pacients HF vs sans (segona columna) és on s'han trobat més proteïnes diferencials. Hi estan marcades les proteïnes que es repeteixen en diferents comparacions. A partir d'aquesta taula es pot interpretar que les proteïnes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 17, 18, 19 (comunes entre C-S i P-S) són les que estan implicades en la hipercolesterolèmia familiar; també es podria dir que les proteïnes 20, 21, 23, 31 (comunes entre P-S i C-P) estan associades a la manifestació clínica de les malalties. En la comparació de C-P s'observa que les proteïnes 32, 33, 34, 35 són exclusives d'aquesta comparació. Això és una evidència clara del fet que les modificacions en aquestes proteïnes no es relacionen amb la presència d'HF, sinó amb l'esdeveniment clínic de la patologia cardiovascular. Fins aquí també es podria afirmar del tot la hipòtesi plantejada: existeixen proteïnes que, independentment del nivell de colesterol, condicionen la manifestació de les CVDs i dels processos isquèmics. Si mirem la proteïna 28, que és comuna en P-S i E-I, la qual cosa significaria que és condicionant de la manifestació clínica i alhora també controla la gravetat d'aquesta.

Sobre la resta de les proteïnes de la primera columna que són absents a la segona, és lògic d'assenyalar que són responsables de la hipercolesterolèmia, perquè són diferents respecte els individus sans, però també seria lògic que aquestes apareguessin a la comparació de P-S. Aquesta absència queda justificada perquè sabem que els controls HF són 41 individus, els pacients HF són 36 i els controls sans són 10. És possible que comparant els controls HF amb controls sans surtin més proteïnes diferencials que comparant els pacients amb els sans, ja que són més individus de controls HF i per tant, més potent és l'anàlisi estadística i més precisos són els resultats. També hauríem de tenir en compte que, essent una estadística inferencial, la considerem significativa només quan el *p-value* sigui menor del 0,05 per defecte; d'aquesta manera, també es podria justificar el cas anterior ja que és possible que aquestes proteïnes hagin sortit iguals comparant P-S només per un valor major que 0,05 però molt aproximat. De la mateixa forma, seria coherent interpretar que les proteïnes marcades en negre siguin les responsables de la manifestació clínica, ja que si fossin d'HF haurien de ser també a la primera columna i es podria preguntar com és que no surten diferents comparant els controls HF amb els pacients HF. Aquest fenomen que s'observa és degut a que la diferència dels individus comparats en P-S és molt més gran que comparant C-P - en el qual són molt semblants i equilibrats -; és a dir, que en el primer cas, els resultats no són tan precisos com en el segon cas.

Tota aquesta interpretació anterior és una suposició no confirmada, ja que amb els resultats de l'estudi aquí presentat no es pot assegurar si una proteïna regula una determinada funció. De fet, les proteïnes actuen en grup per realitzar una funció biològica determinada; és a dir, una via o funció és controlada al mateix moment per moltes proteïnes i a més, una mateixa proteïna pot participar en diferents funcions biològiques sense relacions entre elles. Una altra raó per la qual es difícil de concloure del present estudi la importància funcional d'aquestes proteïnes és que les investigacions en persones humanes no són ciències exactes, un pacient no només es diferencia de l'altre perquè hagi patit un esdeveniment clínic. I a més, una limitació d'aquest estudi és que no s'ha determinat si diferents proteïnes varien conjuntament i quina d'elles tenen una major potència a l'hora d'identificar pacients amb manifestació clínic de malaltia cardiovascular.

6.5. CARACTERITZACIÓ DE LES PROTEÏNES DIFERENCIALS

A partir de la identificació i caracterització de totes les proteïnes associades a CVDs, s'ha fet una anàlisi de funcions de les proteïnes diferencials anteriors. Aquesta anàlisi està representada pels gràfics de barres següents que permetran identificar aquelles funcions més importants en que hi participen la majoria de les proteïnes significatives.

A continuació es detallarà l'anàlisi per cada comparació:

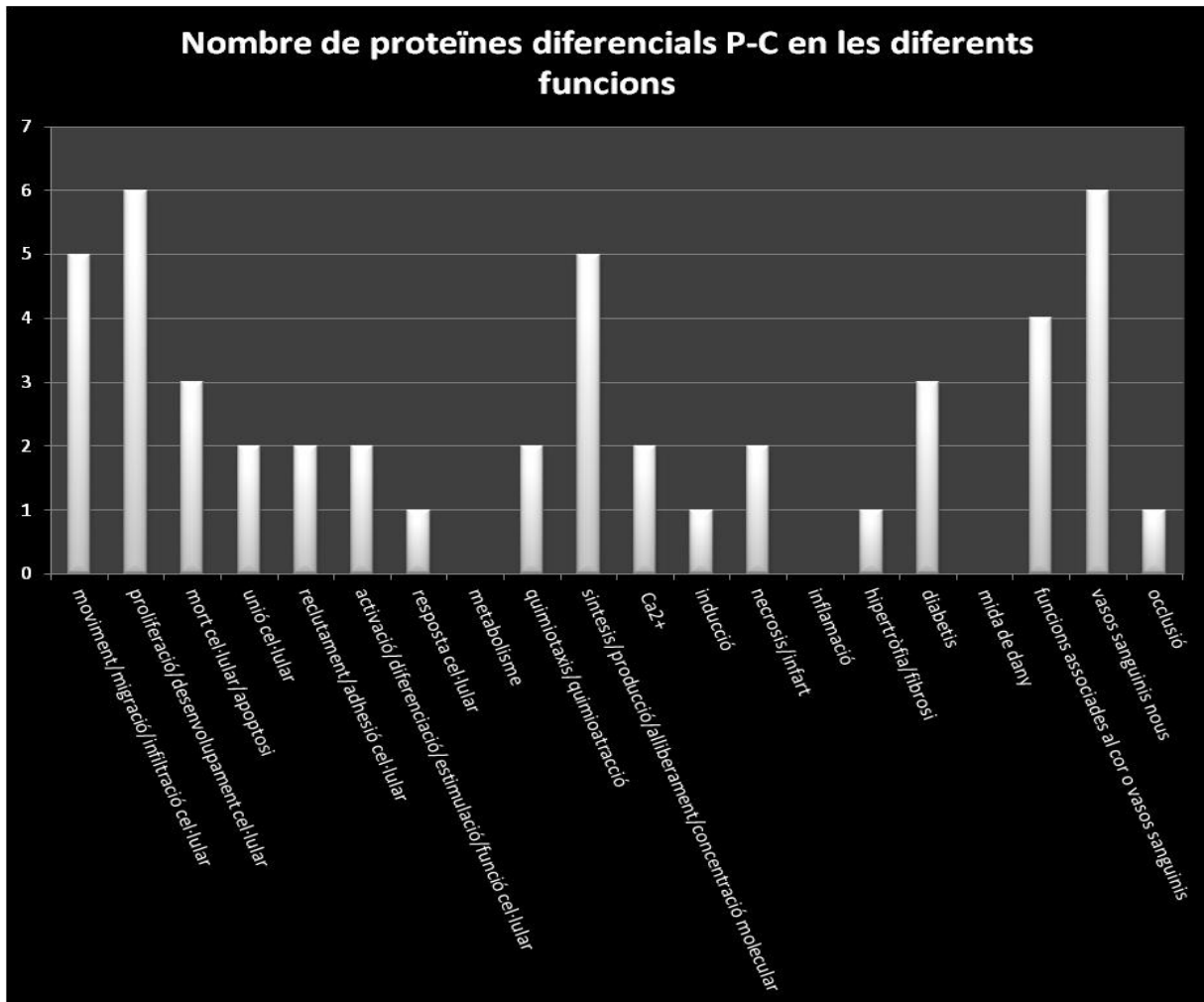


Figura 39: Gràfic de la distribució de les proteïnes diferencials trobades en la comparació pacients HF vs controls HF segons les funcions

El gràfic anterior demostra una comparació del nombre de proteïnes diferencials de la comparació P-C que participa en les funcions relacionades a CVDs.

En la imatge veiem que les funcions més representades són les que corresponen a les funcions moviment/ migració /infiltració cel·lular, proliferació /desenvolupament cel·lular, síntesi /producció /alliberament /concentració molecular i construcció de vasos sanguinis. El nombre de proteïnes que participen en aquestes funcions són 5, 6, 5, 6 de 8 proteïnes diferencials totals respectivament. Tenint en compte els antecedents teòrics, aquestes funcions són les que participen en el procés d'arteriosclerosi; d'aquesta manera es pot deduir que, independentment del nivell elevat de colesterol, aquestes vies o funcions són les que s'expressen d'una manera diferent en els pacients HF respecte els controls HF i, per tant, les que les seves alteracions determinen la manifestació clínica.

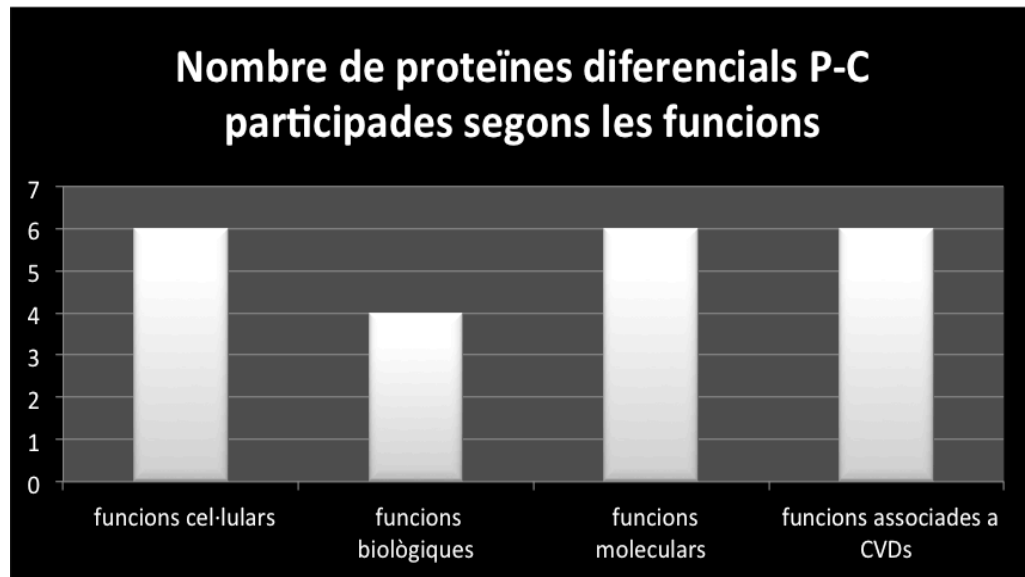


Figura 40: Gràfic de la distribució de les proteïnes diferencials trobades en la comparació pacients HF vs controls HF segons les funcions generals

En aquest gràfic de comparació es pot veure quins tipus de funcions són les més importants per distingir els pacients HF i els controls HF.

En aquest cas, les funcions cel·lulars, moleculars i les associades a CVDs tenen la mateixa importància, ja que en tots els casos hi participen 6/8 proteïnes diferencials. D'aquí es dedueix que les alteracions que es produeixen en pacients HF i que comporten la manifestació clínica cardiovascular són de distintes nivells de complexitat, ocorren tant al nivell molecular, com al cel·lular i a nivell de funcions biològiques.

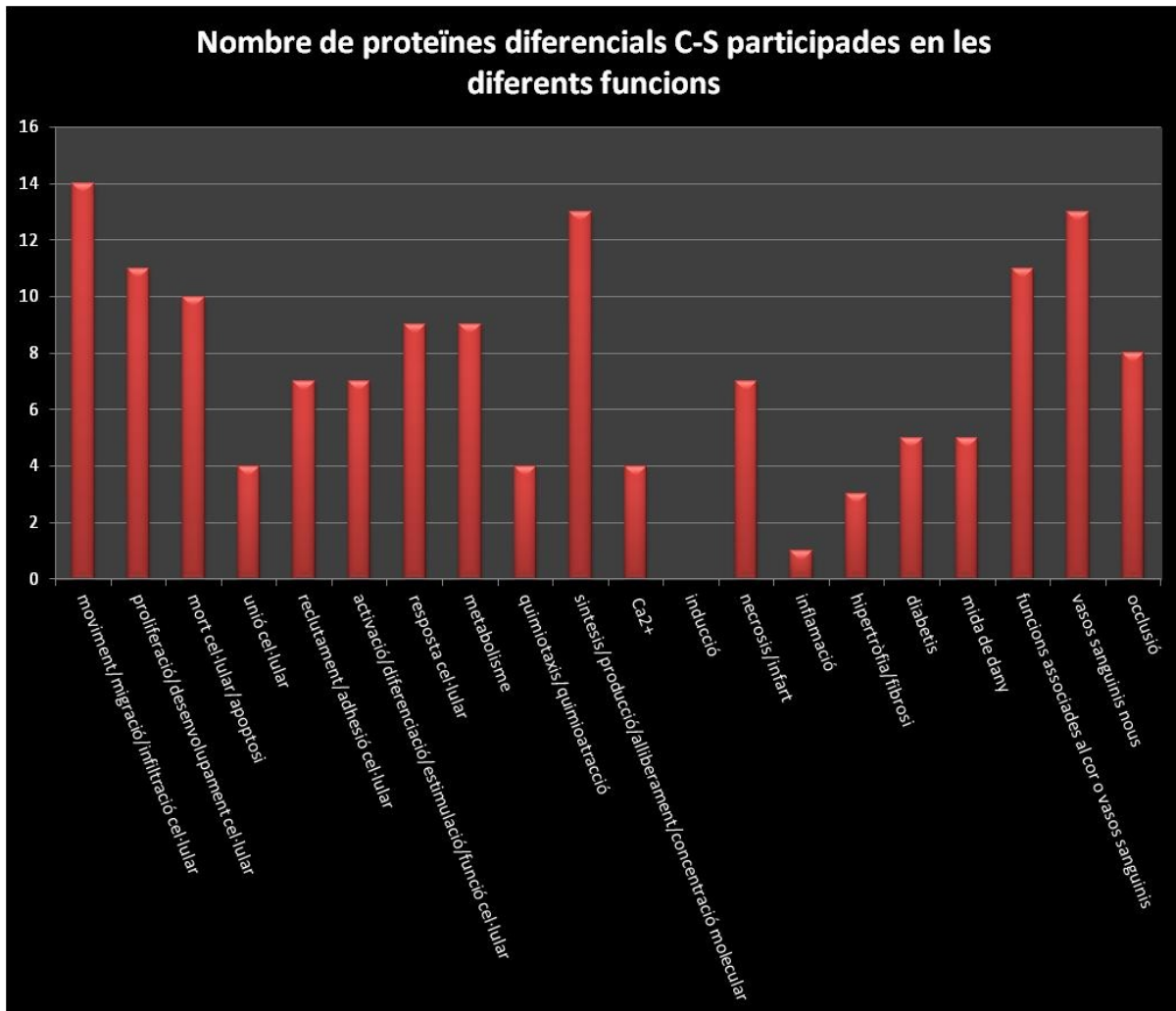


Figura 41: Gràfic de la distribució de les proteïnes diferencials trobades en la comparació controls HF vs controls sans segons les funcions

Aquest gràfic de barres compara el nombre de proteïnes diferencials de la comparació C-S que participen en funcions relacionades amb la patologia cardiovascular.

Aquí es veu que les funcions en què hi participen més proteïnes diferencials són el moviment /migració /infiltració cel·lular, amb 14/19 proteïnes, síntesi /producció /alliberament /concentració molecular, amb 13/19 proteïnes, i la construcció de vasos sanguinis nous, també amb 13/19 proteïnes.

Es pot interpretar que aquesta diferència funcional és deguda a la hipercolesterolèmia que comporta un procés d'arteriosclerosi accelerat, ja que aquestes funcions inclouen processos com la síntesi, l'alliberament i la concentració dels lípids, caracteritzats per la

hipercolesterolèmia. I també funcions que inclouen moviment dels leucòcits, infiltració dels macròfags, construcció dels vasos sanguinis nous que justifiquen el procés d'arteriosclerosi.

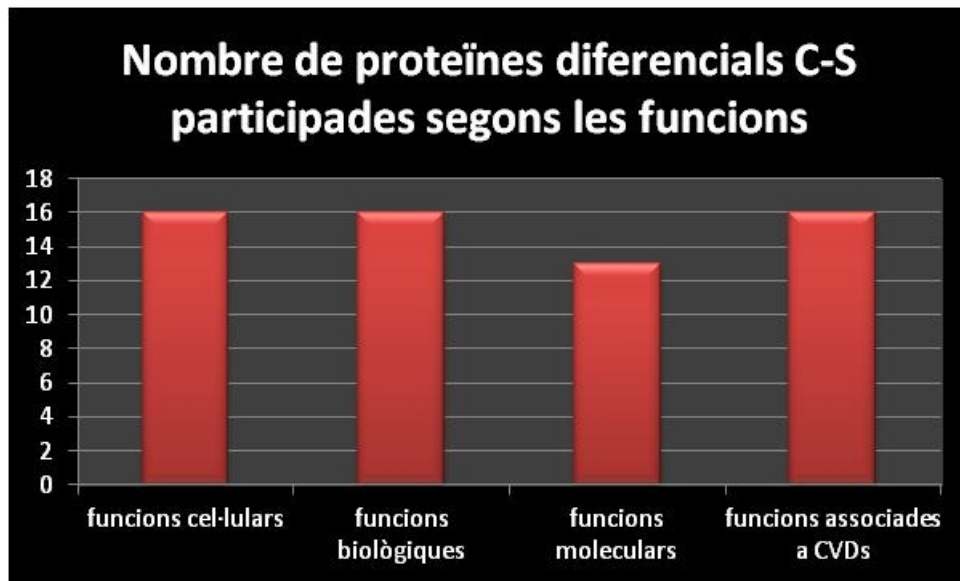


Figura 42: Gràfic de la distribució de les proteïnes diferencials trobades en la comparació controls HF vs controls sans segons les funcions generals

L'anterior gràfic ens indica el tipus de funció més important de la comparació control HF vs sans.

Tal i com indica la comparació C-S, els pacients amb hipercolesterolèmia familiar, tot i que en ells és absent la manifestació clínica, presenten modificacions en proteïnes implicades en diferent grau de complexitat biològica (molecular, cel·lular i funcional).

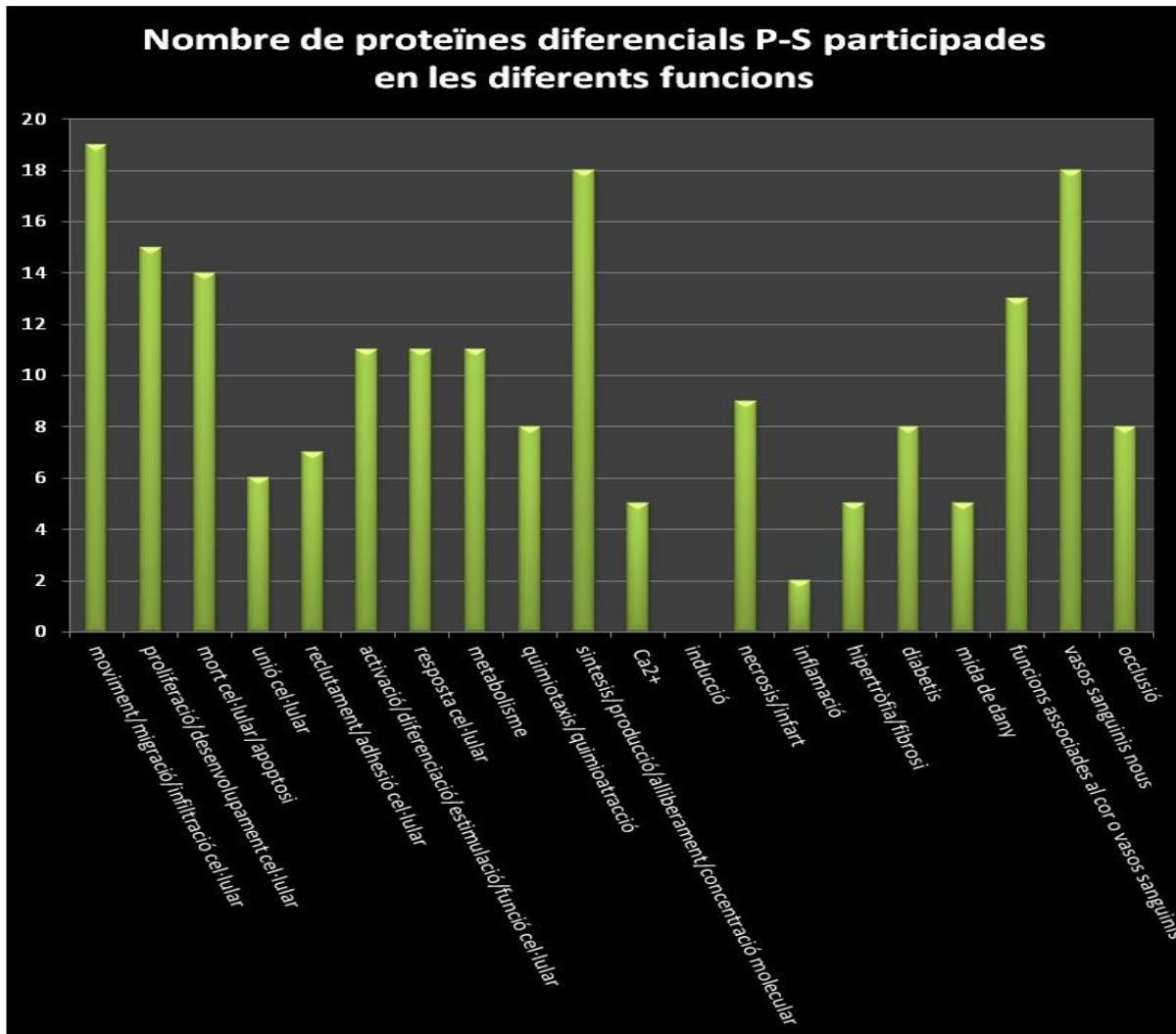


Figura 43: Gràfic de la distribució de les proteïnes diferencials trobades en la comparació pacients HF vs controls sans segons les funcions

Parlant de les proteïnes diferencials de la comparació P-S, a través del gràfic es poden identificar aquelles funcions relacionades amb les proteïnes significativament modificades en pacients HF amb la manifestació cardiovascular respecte a les persones sanes.

En resum, d'un total de 28 proteïnes, 19 participen en el moviment /migració /infiltració cel·lular, 18 participen en la síntesi /producció /alliberament /concentració molecular i en la construcció dels vasos sanguinis nous. Aquestes funcions destacades són les que coincideixen amb les de la comparació P-C, per tant, ens reafirma la importància que juguen aquests processos a la manifestació dels CVDs. No obstant això, sabem que en els pacients que han patit la mort sobtada o infarts de miocardi, es produeix la mort cel·lular, procés biològic que també està reflectit a la imatge. De fet, el 50% d'aquestes proteïnes diferencials participen en la mort cel·lular o l'apoptosi. Totes aquestes observacions suggereixen la importància

d'aquests processos patofisiològics en la manifestació clínica aguda de la malaltia cardiovascular.

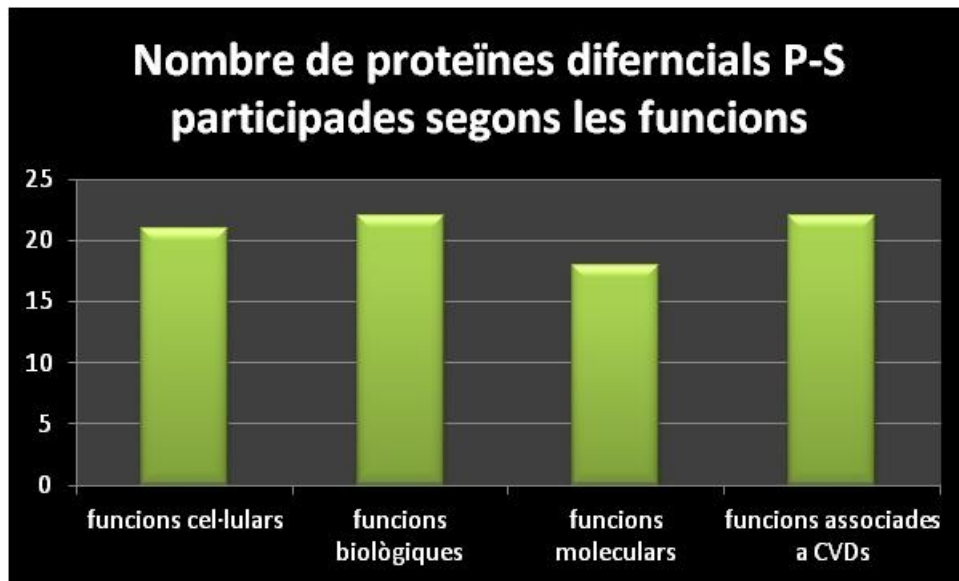


Figura 44: Gràfic de la distribució de les proteïnes diferencials trobades en la comparació pacients HF vs controls sans segons les funcions generals

La demostració anterior assenyala el tipus de funcions destacades comparant els pacients HF i les persones sanes.

Es veu que les que sobresurten del gràfic són funcions biològiques i funcions associades a CVDs. El darrer cas és evident, ja que caracteritza la hipercolesterolèmia familiar respecte els sans; així doncs, queda clar que les funcions biològiques en general juguen papers importants en manifestacions que han patit aquests pacients.

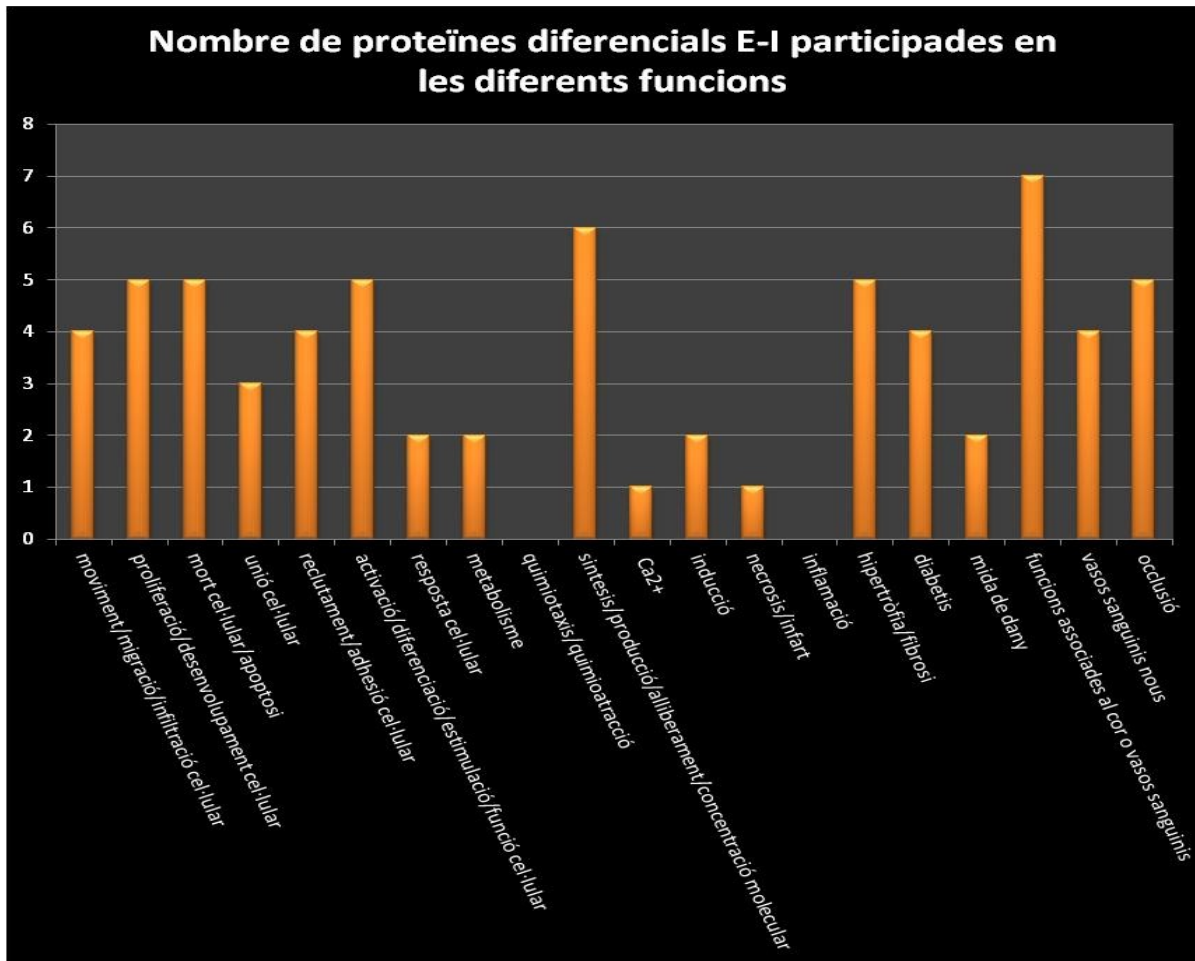


Figura 45: Gràfic de la distribució de les proteïnes diferencials trobades en la comparació pacients HF que han mort vs pacients HF que han tingut un IAM segons les funcions

En el gràfic anterior hi surten reflectides les funcions que diferencien el pacients que han mort dels pacients que han patit un infart de miocardi no fatal.

Es pot observar que les funcions en què hi participen més proteïnes de les 8 diferencials totals són funcions associades al cor o als vasos sanguinis, i la síntesi /producció /alliberament /concentració molecular; així doncs, es pot suposar que el fet de patir una mort sobtada o un infart de miocardi està condicionat pels processos inclosos en aquestes funcions. També es podrien destacar aquelles vies o processos en què hi participen 5/8 proteïnes diferencials; tenint en compte la informació teòrica, se sap que són vies implicades a l'arteriosclerosi, d'aquesta manera es pot deduir que el grau de desenvolupament arterioscleròtic també influeix en el tipus de manifestació clínica.

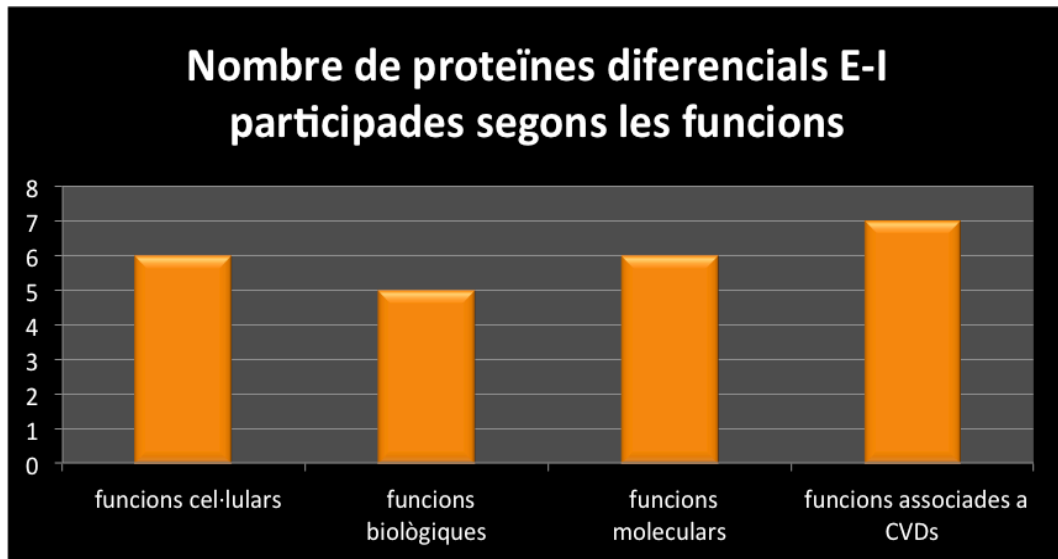


Figura 46: Gràfic de la distribució de les proteïnes diferencials trobades en la comparació pacients HF que han mort vs pacients HF que han tingut un IAM segons les funcions generals

Aquesta comparació dóna la idea de quins tipus de funcions es destaquen diferenciant els pacients HF que han patit un IAM dels que han mort.

S'observa clarament que les funcions relacionades amb les CVDs condicionen el tipus de l'esdeveniment clínic, això s'explica perquè inclouen aquells factors de risc com la diabetis, malalties cardíques, lesions vasculars, etc. Possiblement aquests factors són els condicionants del grau de la manifestació, en altres paraules, els que poden conduir a un IAM no fatal o bé, a la mort.

7. CONCLUSIONS

Tal i com s'ha anat veient al llarg del treball, aquest es basa en una combinació de les anàlisis biològiques amb l'estadística i l'ús de bases de dades disponibles a través d'aplicacions d'internet per a la interpretació dels resultats. Així doncs, les conclusions que s'han anat extraient al llarg del seu desenvolupament pertanyen a dos àmbits. De la part estadística, les conclusions són més aviat de les tècniques de mostreig, dels paràmetres estudiats en els pacients. I de la part biològica, s'han extret conclusions sobre funcions i proteïnes associades a les malalties cardiovasculars. A continuació, es farà un resum de les conclusions més importants.

7.1. CONCLUSIONS (PART ESTADÍSTICA)

- A la part de l'estadística inferencial, per tenir comparacions vàlides i significatives s'ha de comparar el mateix nombre de mostres de cada població.
- Els dos grups comparats amb hipercolesterolèmia familiar són semblants pel que fa a edat, sexe, variables biològiques com lípids, factors de risc com el tabaquisme, diabetis, hipertensió arterial entre altres, perquè presentin com paràmetre principal de comparació l'absència o la presència de la manifestació clínica de la malaltia cardiovascular. Per tant, ni el colesterol, ni els factors de risc poden ser utilitzats en aquest estudi com variables de pronòstic ni de prevenció.
- El grup de control sans és de mida reduïda però permet validar i ampliar la informació que s'ha obtingut al comparar els dos grups amb hipercolesterolèmia familiar.
- A l'anàlisi comparativa de grups en parelles, utilitzant el criteri de *p-value* (*p-value*=0,05 representa una probabilitat d'error 5%) es pot rebutjar o acceptar la hipòtesi nul·la, així diferenciant i caracteritzant els individus.
- Les bases de dades disponibles permet identificar les funcions més representatives per les proteïnes diferencials identificades i relacionar-les amb el desenvolupament de la malaltia, en aquest cas, la patologia cardiovascular.

7.2. CONCLUSIONS (PART BIOLÒGICA)

- Les tècniques proteòmiques permeten identificar de forma simultània les proteïnes que estan modificades (augmentades, disminuïdes, alterades) en un moment específic degut a la presència d'una malaltia, i són de gran utilitat per identificar nous biomarcadors moleculars que podran ser utilitzats en el diagnòstic i pronòstic de malalties, així com en la prevenció primària.

A partir del estudi proteòmic s'ha identificat que:

- Hi ha proteïnes que independentment dels factors de risc condicionen la manifestació clínica de les malalties cardiovasculars, aquestes són les proteïnes identificades en aquest estudi com 20, 21, 23, 31, 32, 33, 34, i 35. Aquestes proteïnes són dianes per ser utilitzades a nivell hospitalari per diagnòstic d'un possible esdeveniment clínic com pot ser la mort sobtada o l'infart agut de miocardi.
- Segons aquestes proteïnes diferencials, els pacients amb un possible esdeveniment cardiovascular tenen alterades les funcions del moviment /migració /infiltració cel·lular, proliferació /desenvolupament cel·lular, síntesi /producció /alliberament /concentració molecular, i la construcció dels vasos sanguinis nous.

8. PERSPECTIVES FUTURES

Els resultats que s'ha extret en aquest treball hauran de ser validats i aprofundits per poder aplicar, ja sigui a nivell hospitalari per la prevenció primària, o per seguir amb les recerques mèdiques.

8.1. VALIDACIÓ

- A causa de l'extensió limitada de la població analitzada, els resultats obtinguts només poden constituir un estudi preliminar, posteriorment s'haurà d'analitzar en una població extensa (prou extensa per ser estadísticament representativa), totes les proteïnes implicades a les funcions diferencials analitzades entre pacient HF i control HF per comprovar si realment aquestes funcions processen d'una manera diferent.
- Re-comprovar mitjançant tècniques quantitatives com ELISA o semi quantitatives com *Western blot* si realment les proteïnes diferencials obtingudes entre els pacients HF i els controls HF expressen d'una forma diferent en els dos grups.

8.2. APROFUNDIMENT

Si les validacions anteriors coincideixen amb els resultats d'aquest treball, s'hauran d'estudiar aquestes funcions rellevants més detalladament per trobar aquelles vies metabòliques concretes que condicionen l'esdeveniment cardiovascular. D'aquesta manera es podrà trobar la causa de la modificació proteica.

Aquests estudis de validació permetran identificar quines proteïnes entre les 8 diferencials seleccionades, podrien arribar a ser d'interès clínic en el diagnòstic de risc de patir patologies com l'infart de miocardi, o ser utilitzades com dianes pel desenvolupament de nous medicaments en relació a les malalties cardiovasculars.

FONTS D'INFORMACIÓ

➤ LLIBRES:

- ALFONSO, Fernando i altres. *Libro de la salud cardiovascular del Hospital Clínico San Carlos y de la Fundación BBVA/ dirigido por Antonio López Farré y Carlos Macaya Miguel*. Bilbao: Fundación BBVA, 2009, pàg. 101, 241-269, 351.
- JUÁREZ GARCÍA, Francisco. *Apuntes de Estadística Inferencial*. Mexico: Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente, 2002, pàg. 19-23, 35-40.

➤ ARTICLES:

- ALONSO, R i altres. “Cardiovascular disease in familial hypercholesterolemia: influence of low-density lipoprotein receptor mutation type and classic risk factors”, *Atherosclerosis ELSEVIER*. Volum 200, 2008 sèrie 2, pàg 315-321.
- ALONSO, R i altres. “Detection of subclinical atherosclerosis in familial hypercholesterolemia using non-invasive imaging modalities”, *Atherosclerosis ELSEVIER*. Volum 222, 2012 sèrie 2, pàg 468-472.
- COSTA. J. “Reacción en cadena de la polimerasa (pcr) a tiempo real”, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Volum 22, 2004 sèrie 5, pàg 299-305.
- MATA, P i altres “Clinical characteristics and evaluation of LDL-cholesterol treatment of the Spanish Familial Hypercholesterolemia Longitudinal Cohort Study (SAFEHEART)”, *Lipids in Health and disease*. Volum 10, 2011 núm article 94.
- MATA, P i altres. “Diagnóstico y tratamiento de la hipercolesterolemia familiar en España: documento de consenso”, *Atención Primaria ELSEVIER DOYMA*. 2014 DOI.
- TOMKIN, G.H , OWENS, D. “LDL as a cause of atherosclerosis”, *The Open Atherosclerosis & Thrombosis Journal*. Volum 5, 2012 pàg 13-21.

➤ PÀGINES WEB:

- ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE BIOPATOLOGÍA MÉDICA

Jornadas – Guadalajara – PCR a tiempo real.pdf
<http://www.aebm.org/jornadas/guadalajara/PCR%20A%20TIEMPO%20REAL.pdf> [Consulta: 29.06.2014]

- THE UNIVERSITY OF CHICAGO MEDICINE.

Children's Health Library – Página principal – trastornos cardiovasculares.
<http://www.uchicagokidshospital.org/online-library/content=s04919>
[Consulta: 29.05.2014]

- FUNDACIÓN HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR.
 - Hipercolesterolemia Familiar – qué es la Hipercolesterolemia Familiar.

<https://www.colesterolfamiliar.org/HFquees.html> [Consulta: 18.06.2014]

 - Hipercolesterolemia Familiar – diagnóstico clínico y genético de la HF.

<https://www.colesterolfamiliar.org/HFDiagnos.html#FIGURAS1a4>
[Consulta: 09.07.2014]

 - Hábitos de vida sanos – dieta y nutrición – dieta mediterránea.

<https://www.colesterolfamiliar.org/DietaMed.html> [Consulta: 09.07.2014]

- FUNDACIÓN ESPANYOLA DEL CORAZÓN.
 - Prevención – Factores de riesgo – Colesterol.

<http://www.fundaciondelcorazon.com/prevencion/riesgo-cardiovascular/colesterol.html> [Consulta: 18.06.2014]

 - Pacientes – tratamientos.

<http://www.fundaciondelcorazon.com/informacion-para-pacientes/tratamientos/estatinas.html> [Consulta: 08.07.2014]

- UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE. Facultad de Medicina.
<http://www.med.unne.edu.ar/catedras/fisiologia1/lipoproteinas1.PDF>
[Consulta: 08.07.2014]
- GENERALITAT DE CATALUNYA. Canal salut - malalties cardiovasculars.
<http://www20.gencat.cat/portal/site/canalsalut/menuitem.af261f715269a25d48af8968b0c0e1a0/?vgnextoid=c852c891b1ee5310VgnVCM1000008d0c1e0aRCRD> [Consulta: 18.05.2014]
- DIPUTACIÓ BARCELONA. La salut i l'entorn urbà.
<http://www.diba.cat/es/web/entorn-urba-i-salut/malalties-cardiovasculares>
[Consulta: 18.05.2014]
- SANT JOAN DE DÉU. Notícies.
<http://www.santjoandedeu.edu.es/noticias/malalties-cardiovasculares>
[Consulta: 18.05.2014]
- ORGANITZACIÓ MUNDIAL DE LA SALUT (OMS). Centro de prensa – eventos - notas descriptivas.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/> [Consulta: 18.05.2014]
- WORLD HEART FEDREATION. Cardiovascular health - different heart disease.
<http://www.world-heart-federation.org/cardiovascular-health/heart-disease/different-heart-diseases/> [Consulta: 18.05.2014]
- ORIGENE. Immunoassay development.

<http://www.origene.com/xmap/#> [Consulta: 10.07.2014]

- OLINK BIOSCIENCE. Technology – PEA Technology.

<http://www.olink.com/technology/pea-technology> [Consulta: 10.07.2014]

- LUMINEX. Technologies & science.

<http://www.luminexcorp.com/TechnologiesScience/xMAPTechnology/>
[Consulta: 10.07.2014]

- UNIVERSIDAD NACIONAL DE EDUCACIÓN A DISTANCIA. Guía de alimentación y salud – alimentación en las enfermedades: Cardiovasculares – factores de riesgo.

http://www.uned.es/pea-nutricion-y-dietetica-I/guia/enfermedades/cardiovasculares/factor_modificables_dire.htm?ca=n0
[Consulta: 15.07.2014]

- INFOSALUS.COM. Actualidad.

<http://www.infosalus.com/actualidad/noticia-indice-cintura-altura-metodo-antropometrico-mas-apropiado-medir-riesgo-cardiovascular-estudio-20091228131950.html> [Consulta: 06.11.2014]

ANNEXOS

1. PROTEINES ASSOCIADES A CVDs

Adrenomedullin (AM)	Agouti-related protein (AGRP)
Angiopoietin-1 receptor (TIE2)	Beta-nerve growth factor (Beta-NGF)
C-C motif chemokine 20 (CCL20)	C-C motif chemokine 3 (CCL3)
C-C motif chemokine 4 (CCL4)	C-X-C motif chemokine 1 (CXCL1)
C-X-C motif chemokine 16 (CXCL16)	C-X-C motif chemokine 6 (CXCL6)
Caspase-8 (CASP-8)	Cathepsin D (CTSD)
Cathepsin L1 (CTSL1)	CD40 ligand (CD40L)
CD40L receptor (CD40) CVDI	Chitinase-3-like protein 1 (CHI3LI)
Cystatin-B (CSTB)	Dickkopf-related protein 1 (Dkk-1)
E-selectin (SELE)	Endothelial cell-specific molecule 1 (ESM-1)
Eosinophil cationic protein (ECP)	Epidermal growth factor (EGF)
Fatty acid-binding protein, adipocyte (FABP4)	Fibroblast growth factor 23 (FGF-23)
Follistatin (FS)	Fractalkine (CX3CL1)
Galanin peptides (GAL)	Galectin-3 (Gal-3)
Growth hormone (GH)	Growth/differentiation factor 15 (GDF-15)
Heat shock 27 kDa protein (HSP 27)	Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF)
Hepatocyte growth factor (HGF)	Interleukin-1 receptor antagonist protein (IL-1ra)
Interleukin-16 (IL16)	Interleukin-18 (IL-18)
Interleukin-27 subunit alpha (IL27-A)	Interleukin-4 (IL-4)
Interleukin-6 (IL-6)	Interleukin-6 receptor subunit alpha (IL-6RA)
Interleukin-8 (IL-8)	Kallikrein-11 (hK11)
Kallikrein-6 (KLK6)	Lectin-like oxidized LDL receptor 1 (LOX-1)
Leptin (LEP)	Macrophage colony-stimulating factor 1 (CSF-1)
Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1)	Matrix metalloproteinase-10 (MMP-10)
Matrix metalloproteinase-12 (MMP-12)	Matrix metalloproteinase-3 (MMP-3)
Matrix metalloproteinase-7 (MMP-7)	Melusin (ITGB1BP2)
Membrane-bound aminopeptidase P (mAmP)	Monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1)
Myeloperoxidase (MPO)	Myoglobin (MB)
N-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-pro-BNP)	Natriuretic peptides B (BNP)
NF-kappa-B essential modulator (NEMO)	Osteoprotegerin (OPG)
Ovarian cancer-related tumor marker CA 125 (CA-125)	P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1)
Pappalysin-1 (PAPPA)	Pentraxin-related protein PTX3 (PTX3)
Placenta growth factor (PlGF)	Platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1)
Platelet-derived growth factor subunit B (PDGF subunit B)	Prolactin (PRL)
Protein S100-A12 (EN-RAGE)	Proteinase-activated receptor 1 (PAR-1)

Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src (SRC)	Receptor for advanced glycosylation end products (RAGE)
Renin (REN)	Resistin (RETN)
SIR2-like protein (SIRT2)	Spondin-1 (SPON1)
ST2 protein (ST2)	Stem cell factor (SCF)
Thrombomodulin (TM)	TIM-1 (TIM)
Tissue factor (TF)	Tissue-type plasminogen activator (t-PA)
TNF-related activation-induced cytokine (TRANCE)	TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)
TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 2 (TRAIL-R2)	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 14 (TNFSF14)
Tumor necrosis factor receptor 1 (TNF-R1)	Tumor necrosis factor receptor 2 (TNF-R2)
Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6 (FAS)	Urokinase plasminogen activator surface receptor (U-PAR)
Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A)	Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D)

2. RESULTATS

ICCC-CODI	GRUP	EDAT DE LA PRESA DE LA MOSTRA /INCLUSIÓ	EDAT DE L'ESDEVENIMENT	EDAT 1ER IAM POST-INCLUSIÓ	ANYS EN L'ESTUDI	ANYS INCLUSIÓ - L'IAM O MORT
ICCC-1	C-Ex	40			10,98	
ICCC-2	C-Ex	55			10,40	
ICCC-3	C-Ex	77			9,88	
ICCC-5	C-Ex	71			9,24	
ICCC-6	C-Ex	69			10,93	
ICCC-7	C-Ex	43			10,06	
ICCC-8	C-Ex	87			9,79	
ICCC-9	C-Ex	79			4,19	
ICCC-10	C-Ex	77			4,20	
ICCC-11	C-Ex	32			4,19	
ICCC-12	C-Ex	60			3,63	
ICCC-13	C-Ex	79,46			2,13	
ICCC-14	C-Ex	66,98			10,91	
ICCC-15	C-Ex	51,85			9,39	
ICCC-16	C-Ex	69,01			9,24	
ICCC-17	C-Ex	32,62			8,82	
ICCC-18	C-Ex	81,46			7,99	
ICCC-19	C-Ex	54,65			4,68	
ICCC-20	C-Ex	75,50			4,91	
ICCC-21	C-Ex	75,42			4,69	
ICCC-22	C-Ex	69,05			2,69	
ICCC-23	C-Ex	36,86			10,07	
ICCC-24	C-Ex	67,12			2,85	
ICCC-25	C-Ex	77,38			5,16	
ICCC-26	C-Ex	69,14			8,00	
ICCC-27	C-Ex	57,17			4,69	

ICCC-CODI	GRUP	EDAT DE LA PRESA DE LA MOSTRA /INCLUSIÓ	EDAT DE L'ESDEVENIMENT	EDAT 1ER IAM POST-INCLUSIÓ	ANYS EN L'ESTUDI	ANYS INCLUSIÓ - L'IAM O MORT
ICCC-28	C-Ex	72,59			3,26	
ICCC-29	C-IAM	55,86			10,08	
ICCC-30	C-IAM	25,66			10,34	
ICCC-31	C-IAM	48,96			9,24	
ICCC-32	C-IAM	60,44			8,86	
ICCC-33	C-IAM	49,44			4,91	
ICCC-34	C-IAM	46,52			4,69	
ICCC-35	C-IAM	69,24			4,69	
ICCC-36	C-IAM	68,61			4,34	
ICCC-37	C-IAM	48,70			2,69	
ICCC-38	C-IAM	47,30			1,72	
ICCC-39	C-IAM	58,86			1,72	
ICCC-40	C-IAM	56,94			10,03	
ICCC-41	C-IAM	50,35			9,37	
ICCC-42	C-IAM	21,83			3,95	
ICCC-101	EX	42,36	45,02			2,66
ICCC-102	EX	49,30	51,88			2,58
ICCC-103	EX	82,40	89,48			7,08
ICCC-104	EX	45,96	49,05			3,10
ICCC-105	EX	53,64	53,72			0,07
ICCC-106	EX	67,53	72,98			5,44
ICCC-107	EX	43,69	45,33			1,64
ICCC-108	EX	80,83	87,64			6,82
ICCC-109	EX	88,58	89,99			1,42
ICCC-111	EX	30,58	33,63			3,04
ICCC-112	EX	66,28	67,75			1,46
ICCC-113	EX	80,29	80,96			0,68
ICCC-114	EX	73,25	78,61			5,37

ICCC-CODI	GRUP	EDAT DE LA PRESA DE LA MOSTRA /INCLUSIÓ	EDAT DE L'ESDEVENIMENT	EDAT 1ER IAM POST-INCLUSIÓ	ANYS EN L'ESTUDI	ANYS INCLUSIÓ - L'IAM O MORT
ICCC-115	EX	48,04	53,93			5,89
ICCC-116	EX	64,83	72,64			7,81
ICCC-117	EX	25,83	32,08			6,25
ICCC-118	EX	54,96	57,15			2,19
ICCC-119	EX	77,26	79,34			2,08
ICCC-120	EX	82,95	84,55			1,59
ICCC-121	EX	65,27	66,61			1,34
ICCC-122	EX	29,23	36,84			7,62
ICCC-123	EX	71,70	72,94			1,24
ICCC-125	EX	55,15	59,15			4,00
ICCC-126	EX	72,23	74,64			2,41
ICCC-127	IAM	53,95	55,24	55,24	10,24	1,29
ICCC-128	IAM	24,70	32,45	32,45	9,95	7,74
ICCC-129	IAM	57,64	58,81	58,81	9,04	1,16
ICCC-130	IAM	48,18	51,34	51,34	4,69	3,16
ICCC-131	IAM	77,47	78,14	78,14	4,69	0,67
ICCC-132	IAM	56,94	58,46	58,46	4,34	1,51
ICCC-133	IAM	44,86	44,92	44,92	2,69	0,06
ICCC-134	IAM	52,82	53,98	53,98	1,72	1,16
ICCC-135	IAM	57,34	58,39	58,39	1,72	1,05
ICCC-136	IAM	59,35	68,68	68,68	9,24	9,33
ICCC-137	IAM	45,99	55,16	55,16	9,45	9,17
ICCC-138	IAM	26,09	29,40	29,40	3,91	3,31

ICCC-CODI	GRUP	EDAT DE LA PRESA DE LA MOSTRA /INCLUSIÓ	EDAT DE L'ESDEVENIMENT	EDAT 1ER IAM POST-INCLUSIÓ	ANYS EN L'ESTUDI	ANYS INCLUSIÓ - L'IAM O MORT
ICCC-201	cont-sm	54,84			9,24	
ICCC-202	cont-sm	52,51			3,53	
ICCC-203	cont-sm	55,44			4,91	
ICCC-204	cont-sm	56,82			7,92	
ICCC-205	cont-sm	53,62			3,63	
ICCC-206	cont-sm	56,88			2,85	
ICCC-207	cont-sm	62,30			2,13	
ICCC-208	cont-sm	54,88			2,85	
ICCC-209	cont-sm	58,99			4,91	
ICCC-210	cont-sm	57,71			4,69	

ICCC-CODI	GRUP	ESDEVENIMENT ANTERIOR: SI /NO	ESTATINES ABANS D'ENTRAR A LA COHORT SI/NO	ANYS D'ESTATINES FINS A LA INCLUSIÓ
ICCC-1	C-Ex	no	si	2,21
ICCC-2	C-Ex	no	si	6,85
ICCC-3	C-Ex	no	si	4,32
ICCC-5	C-Ex	no	si	15,10
ICCC-6	C-Ex	no	si	9,36
ICCC-7	C-Ex	no	si	5,15
ICCC-8	C-Ex	no	si	13,54
ICCC-9	C-Ex	no	si	18,13
ICCC-10	C-Ex	no	si	5,94
ICCC-11	C-Ex	no	si	2,91
ICCC-12	C-Ex	no	no	
ICCC-13	C-Ex	no	si	8,02
ICCC-14	C-Ex	no	si	6,34
ICCC-15	C-Ex	no	si	2,78
ICCC-16	C-Ex	no	no	
ICCC-17	C-Ex	no	si	2,34
ICCC-18	C-Ex	no	si	17,38
ICCC-19	C-Ex	no	si	4,45
ICCC-20	C-Ex	no	si	3,20
ICCC-21	C-Ex	no	si	5,45
ICCC-22	C-Ex	no	si	21,66
ICCC-23	C-Ex	no	si	1,09
ICCC-24	C-Ex	no	si	17,44
ICCC-25	C-Ex	no	si	11,08
ICCC-26	C-Ex	no	si	9,24
ICCC-27	C-Ex	no	si	10,52
ICCC-28	C-Ex	no	si	5,87
ICCC-29	C-IAM	no	si	10,21
ICCC-30	C-IAM	no	si	6,91

ICCC-CODI	GRUP	ESDEVENIMENT ANTERIOR: SI /NO	ESTATINES ABANS D'ENTRAR A LA COHORT SI/NO	ANYS D'ESTATINES FINS A LA INCLUSIÓ
ICCC-31	C-IAM	no	si	4,96
ICCC-32	C-IAM	no	no	
ICCC-33	C-IAM	no	si	18,43
ICCC-34	C-IAM	no	si	11,54
ICCC-35	C-IAM	no	si	14,58
ICCC-36	C-IAM	no	si	5,80
ICCC-37	C-IAM	no	si	12,53
ICCC-38	C-IAM	no	si	17,56
ICCC-39	C-IAM	no	si	26,69
ICCC-40	C-IAM	no	si	1,13
ICCC-41	C-IAM	no	si	14,98
ICCC-42	C-IAM	no	no	
ICCC-101	EX	sí	si	9,26
ICCC-102	EX	sí	si	7,31
ICCC-103	EX	no	si	0,70
ICCC-104	EX	no	no	
ICCC-105	EX	no	no	
ICCC-106	EX	no	si	5,16
ICCC-107	EX	sí	si	2,16
ICCC-108	EX	sí	si	8,33
ICCC-109	EX	no	si	20,46
ICCC-111	EX	no	no	
ICCC-112	EX	sí	si	22,75
ICCC-113	EX	sí	si	22,22
ICCC-114	EX	no	si	11,64
ICCC-115	EX	no	si	14,55
ICCC-116	EX	sí	si	11,04
ICCC-117	EX	no	si	1,30

ICCC-CODI	GRUP	ESDEVENIMENT ANTERIOR: SI /NO	ESTATINES ABANS D'ENTRAR A LA COHORT SI/NO	ANYS D'ESTATINES FINS A LA INCLUSIÓ
ICCC-118	EX	sí	si	8,51
ICCC-119	EX	sí	no	
ICCC-120	EX	sí	si	
ICCC-121	EX	no	si	20,64
ICCC-122	EX	no	no	
ICCC-123	EX	sí	si	10,34
ICCC-125	EX	sí	si	20,67
ICCC-126	EX	sí	si	18,05
ICCC-127	IAM	no	si	12,08
ICCC-128	IAM	no	si	17,44
ICCC-129	IAM	no	si	15,31
ICCC-130	IAM	no	si	29,80
ICCC-131	IAM	sí	si	20,67
ICCC-132	IAM	sí	si	20,00
ICCC-133	IAM	no	si	11,51
ICCC-134	IAM	sí	si	21,61
ICCC-135	IAM	sí	si	13,50
ICCC-136	IAM	no	si	11,04
ICCC-137	IAM	no	si	20,99
ICCC-138	IAM	no	si	7,25

ICCC-CODI	GRUP	ESDEVENIMENT ANTERIOR: SI /NO	ESTATINES ABANS D'ENTRAR A LA COHORT SI/NO	ANYS D'ESTATINES FINS A LA INCLUSIÓ
ICCC-201	cont-sm	no	no	
ICCC-202	cont-sm	no	no	
ICCC-203	cont-sm	no	no	
ICCC-204	cont-sm	no	no	
ICCC-205	cont-sm	no	no	
ICCC-206	cont-sm	no	no	
ICCC-207	cont-sm	no	no	
ICCC-208	cont-sm	no	no	
ICCC-209	cont-sm	no	no	
ICCC-210	cont-sm	no	si	16,61

ICCC-CODI	GRUP	ANYS D'ESTATINES FINS A LA FINALITZACIÓ DEL SEGUIMENT	TRACTAMENT D'ESTATINES DURANT LA INCLUSIÓ	ANYS QUE HAN FUMAT	ANYS DES DE QUE ES DEIXI DE FUMAR FINS A L'ESDEVENIMENT
ICCC-1	C-Ex	13,19	si		
ICCC-2	C-Ex	17,24	si	28	
ICCC-3	C-Ex	14,20	si		
ICCC-5	C-Ex	24,35	si		
ICCC-6	C-Ex	20,29	si		
ICCC-7	C-Ex	15,22	si		
ICCC-8	C-Ex	23,33	si		
ICCC-9	C-Ex	22,32	si	17	
ICCC-10	C-Ex	10,14	si		
ICCC-11	C-Ex	7,10	si		
ICCC-12	C-Ex		si	35	
ICCC-13	C-Ex	10,14	si		
ICCC-14	C-Ex	17,24	si		
ICCC-15	C-Ex	12,17	si		
ICCC-16	C-Ex		no		
ICCC-17	C-Ex	11,16	si		
ICCC-18	C-Ex	25,36	si	40	
ICCC-19	C-Ex	9,13	si	22	
ICCC-20	C-Ex	8,11	si		
ICCC-21	C-Ex	10,14	si		
ICCC-22	C-Ex	24,35	si	44	
ICCC-23	C-Ex	11,16	si		
ICCC-24	C-Ex	20,29	si		
ICCC-25	C-Ex	16,23	si	31	
ICCC-26	C-Ex	17,24	si		
ICCC-27	C-Ex	15,22	si		
ICCC-28	C-Ex	9,13	si	40	

ICCC-CODI	GRUP	ANYS D'ESTATINES FINS A LA FINALITZACIÓ DEL SEGUIMENT	TRACTAMENT D'ESTATINES DURANT LA INCLUSIÓ	ANYS QUE HAN FUMAT	ANYS DES DE QUE ES DEIXI DE FUMAR FINS A L'ESDEVENIMENT
ICCC-29	C-IAM	20,29	si	33	
ICCC-30	C-IAM	17,24	si		
ICCC-31	C-IAM	14,20	si		
ICCC-32	C-IAM		no		
ICCC-33	C-IAM	23,33	si		
ICCC-34	C-IAM	16,23	si		
ICCC-35	C-IAM	19,28	si		
ICCC-36	C-IAM	10,14	no		
ICCC-37	C-IAM	15,22	si		
ICCC-38	C-IAM	19,28	si		
ICCC-39	C-IAM	28,41	si	37	
ICCC-40	C-IAM	11,16	si	20	
ICCC-41	C-IAM	24,35	si		
ICCC-42	C-IAM		no		
ICCC-101	EX		si	26	5,02
ICCC-102	EX		si	20	10,88
ICCC-103	EX		si		
ICCC-104	EX		no		
ICCC-105	EX		no		
ICCC-106	EX		si		
ICCC-107	EX		si		
ICCC-108	EX		si		
ICCC-109	EX		si		
ICCC-111	EX		no		
ICCC-112	EX		si		
ICCC-113	EX		no	44	16,96

ICCC-CODI	GRUP	ANYS D'ESTATINES FINS A LA FINALITZACIÓ DEL SEGUIMENT	TRACTAMENT D'ESTATINES DURANT LA INCLUSIÓ	ANYS QUE HAN FUMAT	ANYS DES DE QUE ES DEIXI DE FUMAR FINS A L'ESDEVENIMENT
ICCC-114	EX		si		
ICCC-115	EX		si		
ICCC-116	EX		si	43	14,64
ICCC-117	EX		si		
ICCC-118	EX		si	34	9,15
ICCC-119	EX		si	40	21,34
ICCC-120	EX		si		
ICCC-121	EX		si		
ICCC-122	EX		no		
ICCC-123	EX		si		
ICCC-125	EX		si	12	
ICCC-126	EX		si	43	
ICCC-127	IAM	22,32	si		
ICCC-128	IAM	27,39	si		
ICCC-129	IAM	24,35	no		
ICCC-130	IAM	34,49	no		
ICCC-131	IAM	25,36	si		
ICCC-132	IAM	24,35	si	25	21,46
ICCC-133	IAM	14,20	si		
ICCC-134	IAM	23,33	si		
ICCC-135	IAM	15,22	si	24	15,39
ICCC-136	IAM	20,29	si		
ICCC-137	IAM	30,44	si	22	15,16
ICCC-138	IAM	11,16	si		

ICCC-CODI	GRUP	ANYS D'ESTATINES FINS A LA FINALITZACIÓ DEL SEGUIMENT	TRACTAMENT D'ESTATINES DURANT LA INCLUSIÓ	ANYS QUE HAN FUMAT	ANYS DES DE QUE ES DEIXI DE FUMAR FINS A L'ESDEVENIMENT
ICCC-201	cont-sm		no		
ICCC-202	cont-sm		no	30	
ICCC-203	cont-sm		no		
ICCC-204	cont-sm		no		
ICCC-205	cont-sm		no		
ICCC-206	cont-sm		no		
ICCC-207	cont-sm		no		
ICCC-208	cont-sm		no		
ICCC-209	cont-sm		no		
ICCC-210	cont-sm		si		

ICCC-CODI	GRUP	Talla(m)	BMI	ICT (cm/cm)	Freqüència cardíaca	Pressió sistòlica	Pressió diastòlica
ICCC-1	C-Ex	1,71	24,3	0,42	83,5	116,5	77,5
ICCC-2	C-Ex	1,81	29,6	0,56	86	115,5	74
ICCC-3	C-Ex	1,47	26,4	0,61	98,5	189	83,5
ICCC-5	C-Ex	1,65	26,1	0,58	86	146	72
ICCC-6	C-Ex	1,5	28,1	0,45	77	145,5	67
ICCC-7	C-Ex	1,59	22,2	0,37	69,5	113	69,5
ICCC-8	C-Ex	1,42	22,3	0,47	74,5	152,5	80,5
ICCC-9	C-Ex	1,69	26,3	0,57	73,5	149	68
ICCC-10	C-Ex	1,57	31,2	0,60	94	169	82,5
ICCC-11	C-Ex	1,71	33,9	0,58	98,5	120,5	72
ICCC-12	C-Ex	1,78	29,4	0,60	90	137,5	80
ICCC-13	C-Ex	1,52	22,5	0,60	70	171	87,5
ICCC-14	C-Ex	1,63	29,4	0,55	76,5	131,5	83,5
ICCC-15	C-Ex	1,68	23,7	0,37	78	112	69
ICCC-16	C-Ex	1,61	25,1	0,52	82,5	145,5	92
ICCC-17	C-Ex	1,62	27,8	0,49	76,5	111	68,5
ICCC-18	C-Ex	1,48	32,0	0,66	73,5	143	69
ICCC-19	C-Ex	1,68	27,6	0,54	88	120	67,5
ICCC-20	C-Ex	1,64	29,0	0,62	91,5	145,5	74,5
ICCC-21	C-Ex	1,58	24,8	0,56	78	127	74
ICCC-22	C-Ex	1,57	28,4	0,60	80,5	123	63
ICCC-23	C-Ex	1,64	31,6	0,58	96	99	73,5
ICCC-24	C-Ex	1,57	30,8	0,66	101,5	161	92,5
ICCC-25	C-Ex	1,7	28,4	0,50	87	143,5	81
ICCC-26	C-Ex	1,55	32,5	0,54	95,5	139	83,5
ICCC-27	C-Ex	1,61	25,1	0,52	79,5	132,5	77,5
ICCC-28	C-Ex	1,63	25,6	0,56	80	140,5	71
ICCC-29	C-IAM	1,69	38,5	0,65	94	146	96,5
ICCC-30	C-IAM	1,74	24,4	0,49	86,5	126	83,5

ICCC-CODI	GRUP	Talla(m)	BMI	ICT (cm/cm)	Freqüència cardíaca	Pressió sistòlica	Pressió diastòlica
ICCC-31	C-IAM	1,71	26,7	0,54	87,5	127,5	75
ICCC-32	C-IAM	1,68	26,6	0,45	78,5	188,5	103,5
ICCC-33	C-IAM	1,66	26,1	0,54	83	128,5	75
ICCC-34	C-IAM	1,61	23,1	0,48	75,5	102	67
ICCC-35	C-IAM	1,47	25,5	0,59	88,5	138,5	83
ICCC-36	C-IAM	1,63	24,1	0,54	82	150,5	77,5
ICCC-37	C-IAM	1,71	29,1	0,58	89,5	125	80
ICCC-38	C-IAM	1,56	22,6	0,49	85	140	77
ICCC-39	C-IAM	1,71	28,0	0,60	68	139	82
ICCC-40	C-IAM	1,54	28,7	0,60	81	132,5	73
ICCC-41	C-IAM	1,6	23,0	0,42	79	125,5	90
ICCC-42	C-IAM	1,8	23,5	0,53	79,5	142	77
ICCC-101	EX	1,73	27,4	0,51	75,5	113	61
ICCC-102	EX	1,67	25,1	0,49	75	131	67,5
ICCC-103	EX	1,43	22,5	0,43	78	145	78,5
ICCC-104	EX	1,7	26,3	0,41	88	130	84
ICCC-105	EX	1,65	30,5	0,62	91,5	158,5	82
ICCC-106	EX	1,4	25,8	0,59	82	133,5	72,5
ICCC-107	EX	1,56	34,7	0,63	99,5	161	88
ICCC-108	EX	1,4	25,0	0,60	83	152,5	58,5
ICCC-109	EX	1,58	29,2	0,65	86	117,5	65
ICCC-111	EX	1,83	25,1	0,46	83	122	69,5
ICCC-112	EX	1,64	35,7	0,73	95	132,5	85
ICCC-113	EX	1,54	23,2	0,53	72	119,5	71,5
ICCC-114	EX	1,62	26,7	0,61	86,5	99,5	63,5
ICCC-115	EX	1,49	20,7	0,34	81,5	140,5	67,5
ICCC-116	EX	1,63	31,2	0,61	98,5	175	100
ICCC-117	EX	1,75	37,2	0,66	100,5	134,5	84
ICCC-118	EX	1,67	31,2	0,64	88	146	74,5

ICCC-CODI	GRUP	Talla(m)	BMI	ICT (cm/cm)	Freqüència cardíaca	Pressió sistòlica	Pressió diastòlica
ICCC-119	EX	1,56	39,4	0,80	99	155	94
ICCC-120	EX	1,46	28,6	0,64	80	142,5	56,5
ICCC-121	EX	1,61	23,5	0,63	87,5	155	95
ICCC-122	EX	1,54	24,7	0,47	92,5	121	72,5
ICCC-123	EX	1,5	36,0	0,72	104,5	164	99,5
ICCC-125	EX	1,71	29,1	0,57	83,5	129,5	83,5
ICCC-126	EX	1,83	34,0	0,64	84	94,5	60
ICCC-127	IAM	1,65	25,7	0,51	86	152	80,5
ICCC-128	IAM	1,85	26,3	0,45	84	125,5	68
ICCC-129	IAM	1,62	30,3	0,55	90	177	85
ICCC-130	IAM	1,65	27,2	0,54	88	111	65,5
ICCC-131	IAM	1,59	27,7	0,59	86,5	155	72,5
ICCC-132	IAM	1,59	24,1	0,57	75	113,5	112,5
ICCC-133	IAM	1,76	27,1	0,55	94	118	76
ICCC-134	IAM	1,55	35,4	0,70	82	162	90
ICCC-135	IAM	1,75	21,6	0,48	46	135	68
ICCC-136	IAM	1,65	22,8	0,49	86	128	61,5
ICCC-137	IAM	1,7	23,2	0,38	78,5	120,5	77,5
ICCC-138	IAM	1,77	24,6	0,45	77	103,5	63,5

ICCC-CODI	GRUP	Talla(m)	BMI	ICT (cm/cm)	Freqüència cardíaca	Pressió sistòlica	Pressió diastòlica
ICCC-201	cont-sm	1,73	27,4	0,41	88,5	119,5	79,5
ICCC-202	cont-sm	1,9	28,3	0,56	84,5	139	84
ICCC-203	cont-sm	1,53	22,6	0,49	85	122,5	67,5
ICCC-204	cont-sm	1,63	29,0	0,53	74,5	137,5	79
ICCC-205	cont-sm	1,62	25,1	0,56	90	149	108,5
ICCC-206	cont-sm	1,74	29,7	0,60	103	165,5	99,5
ICCC-207	cont-sm	1,57	21,1	0,44	74	118	60
ICCC-208	cont-sm	1,65	23,1	0,50	82,5	115	75,5
ICCC-209	cont-sm	1,38	43,1	0,65	0	0	0
ICCC-210	cont-sm	1,55	37,9	0,68	91,5	156	92

	FH- pacients		Sense mutació
	CVE després de la inclusió (pacients HF)	No manifestació clínica CVE (controls HF)	FH
			Controls sans
Informació bàsica			
Població total (N)	38	42	10
Edat de la inclusió (edat)	58.2 ± 2.8	59.3 ± 2.5	56.4 ± 0.9
Edat de la manifestació clínica després de la inclusió	61.9 ± 2.9	----	----
Edat fins al 31/12/2013	----	66.03 ± 2.46	61.06 ± 1.04
Anys des de la inclusió fins a la manifestació clínica (anys)	3.6 ± 0.5	----	----
Anys que han estat a la cohort fins al 31/12/2013	6.0 ± 1.0	6.76 ± 0.49	4.66 ± 0.72

	FH- pacients		Sense mutació	FH
	CVE després de la inclusió (pacients HF)	No manifestació clínica CVE (controls HF)	Controls sans	
Informació clínica				
Èxitus (N)	26	----	----	
Mort sobtada	8	----	----	
IAM	9	----	----	
Insuficiència cardíaca	5	----	----	
Angioplàstia/ Bypass coronari	4	----	----	
IAM (no - fatal)	12	----	----	
Estatines durant la inclusió (N)	31	37	0	
Anys d'estatines fins al 31/12/2013	22.74 ± 1.95	16.3 ± 0.9	----	
Xantomes	12	7	0	
Arc corneal	19	24	1	
Antecedents clínics				
FH mutació	35	40	----	
Manifestació clínica anterior	18	----	----	

	FH- pacients		Sense FH
	CVE després de la inclusió (pacients HF)	No manifestació clínica CVE (controls HF)	mutació Controls sans
Antecedents clínics			
Nivell de colesterol + alt abans d'entrar a la cohort (mg/dL)	327.32 ± 17.39	290.05 ± 12.10	241.67 ± 14.83
Diabetis (N)	3	3	1
Hipertensió (N)	14	12	1
Estatines abans de la inclusió	33	37	1
Anys d'estatines abans de la inclusió	13.59 ± 1.28	9.61 ± 1.05	16.61
Fumadors (N)	15	11	4
Ex-fumadors (N)	11	11	1
No fumadors (N)	12	20	3
Anys que han fumat (anys)	32.17 ± 3.58	31.55 ± 2.68	----

	FH- pacients		Sense mutació
	CVE després de la inclusió (pacients HF)	No manifestació clínica CVE (controls HF)	FH
			Controls sans
Informació biològica			
Sexe (M/F) (N)	25/13	30/12	6/4
Pes (kg)	75.63 ± 2.77	72.24 ± 2.00	81.4 ± 8.2
Alçada (cm)	162.71 ± 1.90	162.88 ± 1.40	157.4 ± 9.1
BMI (Kg/m²)	28.4 ± 0.8	27.1 ± 0.5	25.8 ± 1.0
Cintura (cm)	92.2 ± 2.7	87.91 ± 1.87	88.1 ± 4.4
ICT (cm/cm)	0.57 ± 0.02	0.54 ± 0.01	0.59 ± 0.06
Informació suplementàries de la mostra			
Colesterol total (mg/dL)	273.2 ± 15.3	247.6 ± 8.4	231.1 ± 12.1
cHDL (mg/dL)	43.24 ± 1.71	48.02 ± 1.50	49.02 ± 3.62
cLDL (mg/dL)	205.86 ± 14.22	175.46 ± 8.63	158.37 ± 10.14
TG (mg/dL)	120.96 ± 13.18	109.65 ± 9.34	117.97 ± 11.54
Freqüència cardíaca (batecs/min)	85.63 ± 1.68	83.39 ± 1.28	85.94 ± 2.97
Pressió sistòlica (mmHg)	134.57 ± 3.44	136.91 ± 3.06	135.78 ± 6.08
Pressió diastòlica (mmHg)	75.99 ± 2.13	78.02 ± 1.34	82.83 ± 5.08