

## **COAGULANT SENSE DESCANS. ESTUDI DE LA MUTACIÓ DEL FACTOR V LEIDEN A LA POBLACIÓ DE LA GARROTXA**

*Ainoa GUINART I PLANELLAS*

*PREMI JORDI PUJULÀ 2014 EN ÀMBIT CIÈNCIES DE LA SALUT*

Decidir el tema del treball de recerca, quin problema!

Segur que molts alumnes de batxillerat es troben amb els mateixos dubtes que jo al moment de triar-lo.

En volia escollir un que barregés una part teòrica científica de base amb un treball pràctic. Moltes setmanes de dubtes, molts temes descartats...

I llavors vaig ser afortunada. Vaig tenir la sort de comptar amb l'ajuda, el suport i la paciència de la tutora del meu treball, la Roser Melià: ella em va facilitar el contacte amb el doctor Ferran Soldevila, cap del *Servei de Laboratori de l'Hospital d'Olot*.

Entre tots tres vam decidir de fer un estudi de la incidència de la mutació del factor V Leiden en la població de la Garrotxa, un tema que m'era absolutament desconegut però que em va apassionar durant els mesos que va durar la feina.

### **Resum**

La mutació del factor V Leiden és un trastorn poc conegut dels factors de la coagulació. És un trastorn hereditari i heretat de manera autosòmica i dominant, i és la forma hereditària més comuna de la trombofilia.

El doctor Ferran Soldevila, a partir de la seva experiència en els anys que porta treballant a la nostra comarca i dels resultats de les anàlisis durant

aquests anys, creia que aquesta mutació podia ser més elevada en la gent de la Garrotxa pel caràcter hereditari de la malaltia i per les condicions socials de la nostra comarca, amb tendència geogràfica, social i cultural al tancament.

Les hipòtesis inicials que em vaig plantejar van ser les següents:

1. La mutació del factor V Leiden té una prevalença molt baixa (1-2%) en la població general.
2. La gent d'origen garrotxí presenta un percentatge més alt d'individus patògens respecte a la mutació.
3. El gènere femení és més propens a patir la mutació del factor V Leiden que el masculí.

Aquestes tres són les hipòtesis principals en què es va centrar el meu treball. El fet de ser un trastorn poc conegut i de poca difusió em féu pensar que devia tenir poca incidència en la població mundial i d'aquesta idea en vaig extreure la primera hipòtesi. La segona venia donada per la coneixença d'una certa endogàmia a la comarca de la Garrotxa, una tendència geogràfica i cultural per ser una zona força tancada, fins fa pocs anys, i donada a relacionar-se dins els seus límits. Si això era cert, aleshores es donarien més casos de la mutació, ja que els individus portadors s'anirien relacionant amb individus del mateix lloc i el trastorn acabaria afectant un nombre més gran de gent. La tercera hipòtesi no es basa en cap coneixement i és totalment experimental.

El treball es va dividir en dues parts: un marc teòric que em permetés conèixer el funcionament de l'aparell circulatori, l'hemostàsia i els diferents trastorns de coagulació, amb especial atenció a la mutació del factor V Leiden, i una part pràctica que em donés les dades de les proves realitzades en un grup ampli de la població, separant els resultats en funció de l'origen dels voluntaris.

## MARC TEÒRIC

### L'aparell circulatori, la sang i la coagulació

Calia d'entrada situar-se en el propi cos, cosa que em va portar a estudiar l'aparell circulatori i la sang. Com a resum, podem dir que l'aparell circulatori és l'estructura anatòmica composta pel sistema cardiovascular, encarregat de la distribució de la sang, i pel sistema limfàtic, encarregat de fer circular la sang per l'interior de l'organisme.

La sang és el fluid que circula per tot l'organisme a través del sistema circulatori, format pel cor i per un sistema de tubs i vasos sanguinis. La sang és

un teixit líquid, compost per aigua i substàncies orgàniques i inorgàniques (sals minerals) dissoltes que formen el plasma sanguini.

La mutació del factor V Leiden afecta la coagulació de la sang. Per això, el següent pas va ser estudiar l'hemostàsia (detenció d'una hemorràgia), els components que hi participen i les seves fases (hemostàsia primària, coagulació i fibrinòlisi). Com és evident, la segona fase, la coagulació, va merèixer una atenció especial.

La coagulació depèn de diferents factors segons la seva naturalesa, la seva procedència, les influències a què són sensibles i la seva funció. Aquests factors es denominen amb numeració romana.

El factor V es coneix també com a factor làbil o proaccelerina. És una glucoproteïna. No es troba en el sèrum; aproximadament un 25% del factor V es troba localitzat en els grànuls plaquetaris. És de síntesi hepàtica. En activar-se, funciona com a cofactor i forma part de la protombinasa, que activa la protrombina. El factor Va és inhibït per la proteïna C.

La coagulació no només comprèn els mecanismes d'activació sinó que també necessita d'uns mecanismes d'inhibició que actuïn sobre ella. Normalment, la coagulació es limita a la zona vascular lesionada com a conseqüència de dos mecanismes:

- La capacitat de diluir del flux normal de la sang, que fa que les formes activades dels factors circulin fins al fetge per ser destruïdes.
- La presència en el plasma de substàncies inhibidores que neutralitzen les formes actives i reben el nom de factors inhibidors de la coagulació

Un d'aquests factors inhibidors és la proteïna C, que és una proteïna plasmàtica de síntesi hepàtica i vitamina K dependent. La proteïna C circula habitualment per la sang en forma inactiva i s'activa amb la trombina gràcies a l'ajuda del cofactor trombomodulina, que és el receptor de la trombina en les cèl·lules endotelials. La proteïna C inhibeix els factors Va i VIIa. Es creu que en el plasma hi ha, normalment, un inhibidor natural de la proteïna C.

### **Trastorns de la coagulació**

Hi ha diferents trastorns de la coagulació causats per alteracions plaquetàries o per alteracions dels factors de la coagulació. Aquests trastorns poden provocar patologies hipocoagulants o hipercoagulants. La patologia més coneguda entre les hipocoagulants és l'hemofília, i la trombosi és la més habitual de les hipercoagulants.

El terme trombofilia s'utilitza per denominar diverses condicions, genètiques o adquirides, o les dues coses a la vegada, que predisposen a desenvolupar trombosis, que són estats d'hipercoagulabilitat de la sang. És la propensió a desenvolupar trombosis (coàguls sanguinis) a causa d'anormalitats en el sistema de la coagulació. Els defectes hereditaris en un o més dels factors de la coagulació poden provocar la formació de coàguls potencialment perillosos.

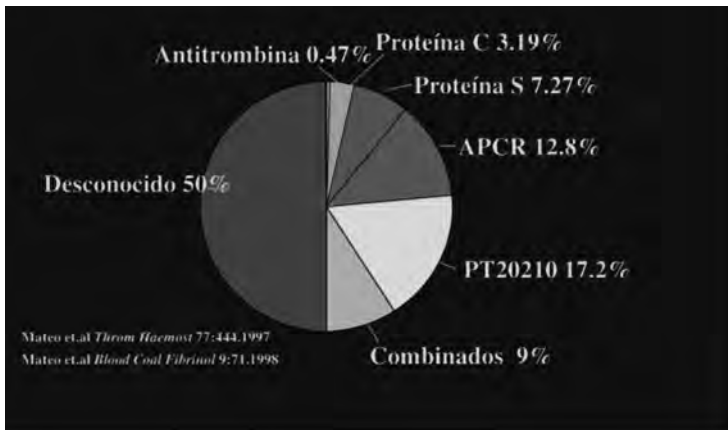
Tot i tenir una incidència tan gran i estar molt estudiades, la majoria de les causes de la trombosi són de procedència desconeguda. Es calcula que el 50% de les trombosis no tenen una causa coneguda.

### Causas biològiques de trombosi en la població espanyola

En aquest treball ens centrarem en l'estudi de l'APCR (resistència a la proteïna C activada), que representa el 12,8% de les causes i que és el defecte hereditari més freqüent.

Hi ha diferents causes de trombosi hereditària. Pot ser deguda a diversos dèficits (Antitrombina III, Cofactor II de l'heparina, Proteïna C, Proteïna S, resistència a la proteïna C activada, Hipo i displaminogenèmia, Disfibrinogenèmia, Hiperprotombinèmia, Factor XII, Coagulació intravascular o, a vegades, dèficits combinats).

La identificació de la trombofilia es realitza fonamentalment per prendre conductes profilàctiques i terapèutiques davant les situacions de risc en aquelles persones que són portadores d'una alteració que augmenta el risc a desenvolupar una trombosi.



Els pacients que s'han de considerar per realitzar un estudi de trombosi són els que presenten història familiar de tromboembòlies venoses, trombosi idiopmàtica recurrent, edat molt jove del primer episodi, trombosi després de situacions de risc lleus, associació de trombosi venosa i arterial, associació de trombosi amb pèrdua fetal recurrent, trombosi en llocs inusuals, necrosi de pell induïda per anticoagulants orals o púrpura fulminant del nou-nat

Una vegada conegut el defecte, si és congènit s'aconsella un estudi familiar per confirmar l'origen genètic de l'alteració i, a més, per identificar els portadors sans de l'alteració. Té sentit, doncs, realitzar un estudi familiar, ja que la conducta terapèutica a prendre per part del pacient es pot veure modificada i, si hi ha membres de la família joves i asimptomàtics, es podran prendre mesures profilàctiques davant l'exposició de factors de risc com embaràs, puerperi, cirurgies...

### **El factor V**

El factor V és una glicoproteïna del sistema de la coagulació sanguínia, ocasionalment anomenat proaccelerina o factor làbil. En contrast amb la majoria dels altres factors de la coagulació, aquest factor funciona com a cofactor.

El gen que codifica el factor V es troba al braç curt del primer cromosoma humà (1q23) i és homòleg del factor VIII de la coagulació. El gen s'estén per 70 kilobases (parell de bases, dos nucleòtids ubicats en "al·lèls" oposats de l'ADN o l'ARN complementaris, que estan connectats per via enllaços d'hidrogen) consta de 25 exons (regions del gen que codifiquen una porció específica de la proteïna completa) i la proteïna resultant té una massa molecular relativa d'aproximadament 330.000 Dalton.



*Proteïna del factor V*

El factor V circula en el plasma sanguini com una molècula de cadena única amb una vida mitjana plasmàtica d'aproximadament 12 hores. Tot i això, s'han reportat períodes de semidesintegració que arriben a les 36 hores.

El factor V és capaç d'unir-se a les plaquetes activades i s'activa per contacte amb la trombina. En activar-se, el factor V s'empalma en dues cadenes que s'uneixen de manera no-covalent entre elles per intermediació del calci. El factor V s'activa com a cofactor del complex de la trombinasa. El factor X activat requereix el calci i el factor V per convertir la protrombina en trombina, pas indispensable en la coagulació de la sang.

El factor Va es degrada per l'acció de la proteïna C activada, un dels principals inhibidors fisiològics de la coagulació. En presència de la trombomodulina, la trombina actua per disminuir la coagulació mitjançant l'acció de la PCA; per tant, la concentració i l'acció de la PCA són molt importants per limitar l'activació de la trombina.

### **El factor V Leiden**

La mutació del factor V Leiden és un trastorn poc conegut dels factors de la coagulació. Les propietats hemodinàmiques de la sang es deuen a un equilibri natural entre els factors que tendeixen a promoure la coagulació i els que tendeixen a controlar-la. Un exemple d'aquesta cooperació és la que existeix entre el factor V i el seu antagonista, la proteïna C activada. Quan hi ha una mutació en aquest factor V de la coagulació, aquesta relació falla.

El factor V Leiden és el nom amb què es coneix un trastorn hereditari de la coagulació de la sang. Consisteix en una mutació (alteració genètica) que es produeix en el gen que codifica el factor V de la coagulació i causa un trastorn d'hipercoagulabilitat, un augment de la tendència a formar coàguls de sang anormals en els vasos sanguinis.

El factor V Leiden és un trastorn heretat de manera autosòmica i dominant. La mutació d'aquest gen consisteix en un polimorfisme de nucleòtid simple (SNP) situat a l'exó 10 del gen localitzat al braç curt del cromosoma 1 humà. Ocorre com una "substitució sense sentit" la substitució d'una guanina per una adenina i produeix una proteïna amb canvi d'aminoàcids glutamina en lloc de arginina. El nucleòtid variant pot ocórrer a nivell de la posició 1691 (canvi d'adenina per guanina) o de la 1746; el canvi d'aminoàcid es produeix a la posició 506 o 534 respectivament. Atès que aquest aminoàcid és normalment el punt de tall per la proteïna C activada, la mutació impedeix la inactivació efectiva del factor V. Quan el factor V es manté actiu, facilita la superproducció de trombina, que condueix a la generació de fibrina en excés i, en conseqüència, a un excés de coagulació.

El factor V Leiden és la forma hereditària més comuna de la trombofilia. Entre el 3 i 8% de la població és formada per individus heterozigòtics i 1 de cada 5000 és homozigòtic respecte a la mutació. La mutació és més comuna en la població blanca i caucàsica que en altres poblacions.

A Europa, aproximadament del 6 al 8% de la població és portadora d'aquesta mutació. Això explica la taxa relativament alta de malalties vasculars en la gent caucàsica. El factor V Leiden és el trastorn d'hipercoagulabilitat hereditari més comú entre els euroasiàtics; sol ser la causa d'aquesta patologia en el 20-50% dels pacients amb trombofilia. Aquesta mutació no es presenta en altres poblacions (Àsia, Àfrica). Quan una alteració genètica afecta més del 2% de la població, també es parla de "polimorfisme", encara que la denominació correcta seria "polimorfisme del factor V".

El nom Leiden prové de la ciutat de Leiden (Països Baixos), on va ser identificat per primera vegada el 1994 pel professor R. Bertina.

Els símptomes varien entre els individus. Hi ha algunes persones que tenen el gen que produeix el factor V alterat però que mai desenvoluparan cap trombosi, mentre que altres pateixen trombosis freqüents abans dels 30 anys d'edat. Aquesta variabilitat ve influenciada pel tipus de mutació que té la persona i per la presència d'altres alteracions com la cirurgia, els anticonceptius orals o l'embaràs.

Tot i així, els símptomes generals i principals factors d'estudi són:

- Tenir una primera trombosi venosa profunda (TVP) o embòlia pulmonar (PE) abans dels 50 anys d'edat.
- Patir una trombosi venosa en llocs inusuals del cos, tals com el cervell o el fetge.
- Tenir una TVP o PE durant o immediatament després de l'embaràs.
- Tenir un fort historial familiar de malalties tromboembòliques venoses.
- Patir flebitis superficials reiterades.
- Patir una malaltia vascular perifèrica, particularment una malaltia oclusiva dels membres inferiors.
- Haver patit un episodi trombòtic, especialment en llocs habituals com la vena porta, la vena mesentèrica o la vena axil·lar.

El factor V Leiden i la mutació del gen de la protrombina són els polimorfismes més freqüents implicats en la trombosi.

La coagulació excessiva que es produeix en aquesta malaltia és quasi sempre limitada a les venes on la coagulació pot causar una trombosi venosa profunda (TVP). Si els coàguls venosos s'arriben a trencar, poden viatjar a través del

costat dret del cor fins als pulmons, on es bloqueja un vas sanguini pulmonar i causa un tromboembolisme pulmonar. Les dones amb aquest trastorn tenen un major risc d'avortament involuntari i mort fetal. És molt infreqüent que aquest trastorn causi la formació de coàguls a les artèries, els quals provocarien un accident cerebral vascular o un infart agut de miocardi; el més freqüent és l'aparició d'un atac isquèmic transitori. Atès que aquesta malaltia presenta dominància incompleta, els que són homozigòtics per l'al·lel mutat tenen un risc major per als episodis tromboembòlics que aquells que són heterozigots per la mutació.

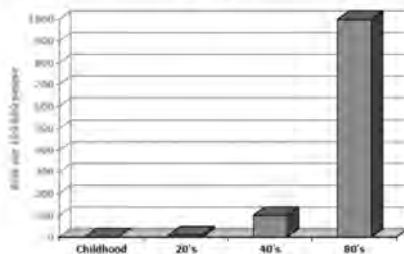
El metge pot sospitar d'un diagnòstic per aquesta mutació si l'individu presenta antecedents de trombosi venosa, siguin personals o familiars. El diagnòstic es realitza mitjançant una prova anomenada prova de detecció de la coagulació o mitjançant proves genètiques on s'analitza l'ADN del gen que codifica pel factor V.

Com que la mutació del factor V Leiden té un patró d'herència autosòmica dominant, és molt probable que la meitat dels parents de primer grau del pacient amb la mutació siguin portadors del mateix defecte.

Tenir la mutació del factor V Leiden vol dir un major risc de desenvolupar un coàgul de sang perillós a les cames (TVP) o als pulmons (PE). Els estudis diuen que 1 persona de cada 10.000 desenvoluparà un coàgul d'aquests a DVT o PE cada any, i el risc augmenta amb l'edat: un nen petit té un risc d' 1 entre 100.000 per any, una jove de 20 anys ja té un risc d' 1 entre 10.000, a partir dels 40 anys el risc augmenta fins a 1 entre 1.000, i als 80 anys el risc és d' 1 entre 100 per any.

Tot i això, la mutació en el factor V Leiden no sembla estar relacionada amb el risc de patir un atac de cor sobtat ni un infart. Tampoc influeix ni augmenta el risc de patir càncer ni defectes a l'hora de procrear.

With Factor V Leiden the risk of a blood clot increases with age



*Incidència de la mutació Leiden en el risc de patir una trombosi segons l'edat*



El tractament de pacients amb factor V depèn de les circumstàncies clíniques. Les persones amb aquesta mutació que ja han tingut una TVP o EP solen ser tractades amb anticoagulants, que són uns medicaments que controlen i regulen la coagulació de la sang. Un anticoagulant és una substància, endògena o exògena, que inhibeix la coagulació de la sang en interferir algun dels seus mecanismes, afavorint que es produeixi l'hemorràgia, si cal. En el plasma sanguini hi ha diferents antiacoagulants: l'antitromboplastina, l'antitrombina, l'anticoagulant lúpic (AL), que es donen durant períodes variables de temps depenent de la situació de cada persona. L'anticoagulant més usat és l'heparina. Generalment no es recomana que les persones que només han patit una TVP o EP siguin tractades tota la vida amb anticoagulants, a no ser que existeixin altres factors de risc presents.

En general, les persones que tenen el factor V Leiden però mai no han tingut un episodi de trombosi no són tractades amb anticoagulants. A aquestes persones se'ls aconsella reduir o delimitar altres factors de risc i, durant els períodes en què el risc augmenta, com per exemple una cirurgia complexa, poden prendre tractaments temporals d'anticoagulants.

## **PART PRÀCTICA**

### **Recerca de voluntaris i preparació**

Era necessari disposar d'un nombre elevat de gent que s'oferís com a voluntària per participar en l'estudi. No importava l'edat, el sexe o el diagnòstic de cadascú, però el poc coneixement de la mutació i la necessitat de realitzar extraccions de sang podien complicar la recerca.

En primer lloc, vaig informar-ne els companys, mestres i personal de l'Institut, i val a dir que l'acceptació va ser important. Un altre mètode va ser enviar missatges per les xarxes socials (facebook, twitter...) i, finalment, també vaig informar del treball els familiars i coneguts de diferents àmbits.

Però va ser una gran sort fer l'estada a l'empresa a l'hospital Sant Jaume d'Olot. No pensava aconseguir voluntaris durant aquesta etapa i va ser una gran sorpresa la implicació que va demostrar el personal que treballava al laboratori i a la sala d'extraccions. Vull dir que em van donar la possibilitat d'anar a la sala d'extraccions al matí, de 8 a 10, durant l'horari en què les persones amb visita van a punxar-se per realitzar-se les anàlisis que els ha demanat el metge. Jo pujava a la sala d'espera i els explicava el meu treball i, si hi havia algú interessat a col·laborar-hi, li realitzaven l'extracció de les mostres juntament amb les seves anàlisis programades. Aquest mètode va resultar ser el més efectiu de tots, ja que molta gent cada dia va a realitzar-se anàlisis i estava molt disposada a col·laborar.

Tot voluntari que volia realitzar la prova era numerat amb etiquetes i disposava de tres documents, sense els quals no podia sotmetre-s'hi:

- Document de consentiment informat
- Full de petició de la prova
- Full amb les dades personals (sexe, edat i grup a què pertanyia)

A efectes de poder separar els resultats en funció de la procedència i diferenciar els resultats dels individus més clarament “garrotxins”, vaig establir una divisió per grups segons si llurs avis/àvies eren nascuts a la Garrotxa o no.

Si el pare i la mare d'un progenitor eren nascuts a la Garrotxa, el progenitor es considerava del 100%.

Si, dels 2, només un era nascut a la Garrotxa, el progenitor es considerava del 50%.

Si cap dels 2 era nascut a la Garrotxa, el progenitor es considerava del 0%.

Això donava la següent classificació:

- Garrotxí 100-75%: els 2 progenitors 100% o un 100% i l'altre 50%
- Garrotxí 50%: un progenitor 100%, l'altre 0%
- Garrotxí 25%: els dos progenitors 50%
- Europeu: resta espanyols/europeus
- No Europeu: progenitors nascuts fora d'Europa

### **Dades de la mostra**

L'elecció de voluntaris no estava limitada per cap paràmetre, sinó que gent de tot sexe, edat o grup podia oferir-se per ser estudiada. L'única diferència es feia amb els voluntaris menors d'edat, que necessitaven un full d'autorització per part dels tutors.

La impossibilitat de fer un estudi més ampli comporta que els percentatges d'edat, sexe i grup no siguin exactes als de la població general.

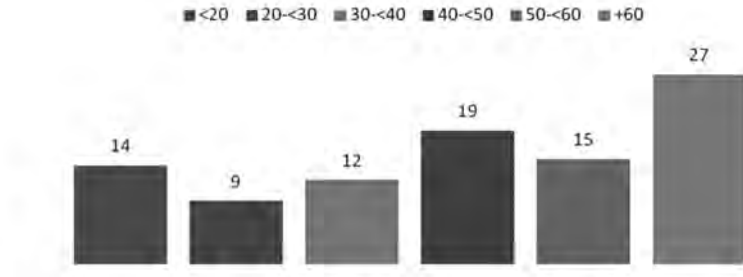
Com podem observar, una tercera part dels voluntaris són majors de 40 anys i la majoria de la població és més gran de 60 anys. Això ve donat bàsicament pel fet que el gruix dels voluntaris van ser captats a l'hospital, on hi ha majoria de gent gran.

La mitjana general d'edat se situa a 47'42 anys. 53'35 és la mitjana per a les dones i 44'17 per als homes

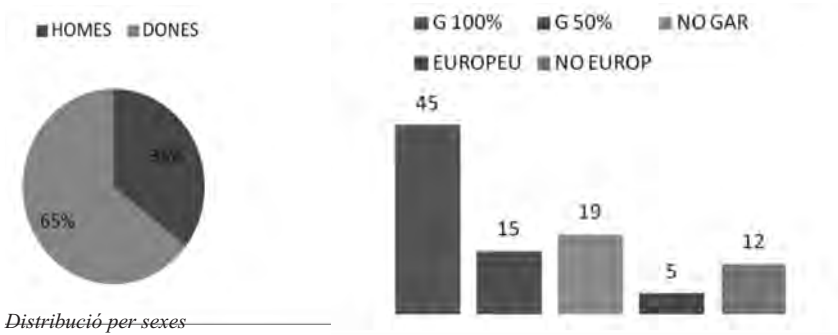
Hi ha una majoria de persones del sexe femení (65%), que es correspon a la majoria de dones en la nostra societat.

Com és fàcilment destacable, gairebé la meitat dels voluntaris estudiats són 100% autòctons de la Garrotxa. Això és justificable, ja que es tractava d'intentar estudiar la incidència que tenia la mutació del factor V Leiden en aquesta comarca.

El resum de les dades dels participants queda prou clar en les següents gràfiques:

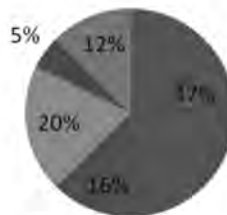


Distribució per edats



Distribució per sexes

Distribució per grups



Distribució per grups

Les extraccions es van realitzar en diferents dies del mes de juliol del 2013.

## **Protocol tècnic**

Les proves es van fer seguint el Protocol normalitzat i les directrius del Pla de Qualitat de l'Hospital Sant Jaume d'Olot.

### **1 - Utilitat:**

Detecció de la mutació FV Q506 a través de la resistència que presenta aquesta un cop mutada a l'acció de la proteïna C de la coagulació.

### **2 - Reactius:**

Hemosil Factor V Leiden (APC Resistance V) (002000700) distribuït per IZASA (inclou control intern).

2.1 Estabilitat del reactiu.

2.1.1 Sense reconstituir fins a la data de caducitat.

2.1.2 Un cop reconstituït, fins a 3 mesos congelat a -20°C.

### **3 - Llista de treball:**

Hemostàsia Especial. Cada dia s'ha de treure la llista de treball i comprovar que les mostres pendents es congelen al congelador CO-001, al calaix de mostres.

### **4 - Freqüència de determinacions:**

Es faran les determinacions un cop es tinguin 5 mostres congelades pendents de resultat, o 1 cop al mes en cas de poca demanda.

### **5 - Tècnica:**

5.1 Es realitza un aPTT i un aPTT-APC en una mostra prediluïda amb plasma deficient en factor V.

5.2 Si hi ha una mutació Leiden al factor V per aparèixer resistència a la degradació per la APC, la raó entre l'aPTT sense APC i l'aPTT amb APC serà inferior a l'interval de normalitat esperat (2.18 a 3.38).

### **6 – Pla de qualitat:**

6.1 Control Intern: cada cop que es realitza la tècnica s'ha d'incloure el control C2 (patològic) inclòs en el mateix kit (ja està programat a l' ACL-9000 com a Control de qualitat). Si totes les determinacions que es realitzen són patològiques, abans d'informar dels resultats cal fer el control C1 (nor-

mal) inclòs en el kit.

6.2 Control Extern: estem inscrits al Programa d'Avaluació Externa de la Qualitat FPCQLC (<http://www.hemqual.com/>)

## **Preparació i conservació de les mostres**

Les extraccions de sang les realitzaven al consultori 11 de l'Hospital Sant Jaume d'Olot els responsables del laboratori d'anàlisis.

S'extreien 2 tubs de citrat de 2 ml de sang cadascun, que s'etiquetaven i numeraven. Els tubs i documents es baixaven al laboratori, on s'entraven les dades i el codi dels voluntaris a l'ordinador.

Els tubs eren centrifugats i se n'utilitzava un per a les primeres proves: el temps de protrombina (Quick o PT) i el temps de tromboplastina parcial activada (aPTT o cefalina). Aquestes són proves de projecció, que ajuden a estudiar la via intrínseca o extrínseca de la coagulació. El segon tub era sotmès a una extracció del plasma, que es congelava i es guardava en 2 tubs més petits en un congelador a -20°.

El dia que es volia realitzar la prova de la RPCA, les mostres havien de ser descongelades. Només es descongelava una mostra de plasma per pacient, de les dues que van ser guardades; la segona es deixava al congelador per si hi havia algun problema amb la primera i s'havia de realitzar una rèplica. Aquest segon tub només es guardava fins a la finalització de la prova de la RPCA. Una vegada els resultats havien estat correctes i validats, la mostra es llençava en un contenidor de residus de l'hospital.

## **Prova de la RPCA**

Les proves de les mostres dels voluntaris per a la RPCA es van realitzar en dos dies diferents. En total comptàvem amb unes 120 mostres, però el reactiu disponible només arribava per realitzar-ne 95. Per tant, vàrem haver de descartar-ne unes quantes. El criteri que es va seguir a l'hora de triar quines mostres tenien prioritat per sobre de les altres va ser atenent a les zones geogràfiques a què pertanyien.

Els voluntaris que eren 100% i 50% de la Garrotxa van ser els que es van seleccionar primer, ja que la qüestió era estudiar si hi havia molta presència de la mutació en aquesta comarca.

Com que amb tots aquests no s'arribava al límit, hi vam poder incloure tots els voluntaris europeus i no europeus, per mirar si l'ètnia caucàsica presentava un índex de la mutació superior als voluntaris d'altres ètnies. Per

últim, també es van seleccionar alguns voluntaris de la península, tot i que no els vàrem poder analitzar tots. Aquest van ser els més descartats per falta de reactiu.

A causa de la durada de la prova, vàrem decidir realitzar-la en dos dies diferents, per no obstaculitzar durant molt de temps la màquina utilitzada (que també es fa servir per realitzar les proves rutinàries i les urgències de cefalina i temps de protrombina).

Per realitzar la prova es van triar el dimarts 16 i dijous 25 de juliol.

Es va utilitzar un aparell ACL 9000. Primer de tot, abans de passar cap mostra de cap voluntari, és imprescindible comprovar el correcte funcionament de l'aparell, per poder donar per vàlids tots els resultats posteriors. Per fer aquesta comprovació s'utilitzen els controls que vénen a la caixa de reactius. D'aquest controls n'hi ha un de normal i un de patològic.

Es fa funcionar l'aparell per passar només aquestes dues mostres i, si els resultats són els adients, es donen per vàlids i es pot començar a treballar amb les mostres de voluntaris reals.

Primer de tot s'han de descongelar i preparar les mostres. Un cop s'ha emplenat el "canu" amb les mostres dels voluntaris i s'han col·locat els reactius als llocs específics, es col·loca el "canu" al lloc indicat i s'indica mitjançant la pantalla tàctil que ja es pot iniciar la prova.

Després, el procediment és totalment digital i no necessita a intervenció humana, a no ser que s'acabin les paletes de reaccions o algun reactiu.

La prova, si hi ha el màxim de mostres (40), sol durar unes dues hores. Els resultats es van enviant, mitjançant la xarxa de l'hospital, als ordinadors centralitzats al moment que són realitzats.

## Resultats de les proves

Abans d'analitzar els resultats de les RPCA s'havia de mirar si alguna mostra resultava patològica respecte a la primera prova que es feia, el temps de protrombina i el temps de tromboplastina parcial activada, ja que aquest primer resultat patològic podia modificar el de la prova de la resistència a la proteïna C activada.

Per tant, primer em vaig disposar a analitzar aquests primers resultats. Tant en la protrombina com a la cefalina el rati normal és d'entre 0.8 i 1,2

En el cas de les nostres mostres, tots els resultats patològics (4%) són deguts als "sintroms", que és un tractament anticoagulant que prenen alguns pacients.

Un cop comprovats aquests resultats i havent estat validats, es pogué passar a estudiar les RPCA, que van donar un 100% de resultats normals.

INTERVAL	MITJANA	NOMBRE DE VOLUNTARIS
2.30-2.39	2,340	4
2.40-2.49	2,435	4
2.50-2.59	2,572	4
2.60-2.69	2,639	12
2.70-2.79	2,738	8
2.80-2.89	2,833	23
2.90-2.99	2,940	22
3.00-3.09	3,041	12
3.10-3.19	3,131	6
Error		1
		96

La resistència a la PCA es considera patològica a partir del 3.18 i, com es veu, no va sortir cap resultat alterat. Per tant, totes les mostres eren sanes i estaven dins els resultats normals.

Un cop recollides i classificades totes les dades, em vaig disposar a estudiar-les de diferents maneres: agrupant-les, observant-les i comparant-les entre diferents grups, per poder arribar a extreure'n totes les conclusions possibles.

Podem observar que la majoria dels resultats es troben en l'interval (2.90-2.99), seguits de l'interval (2.80-2.89).

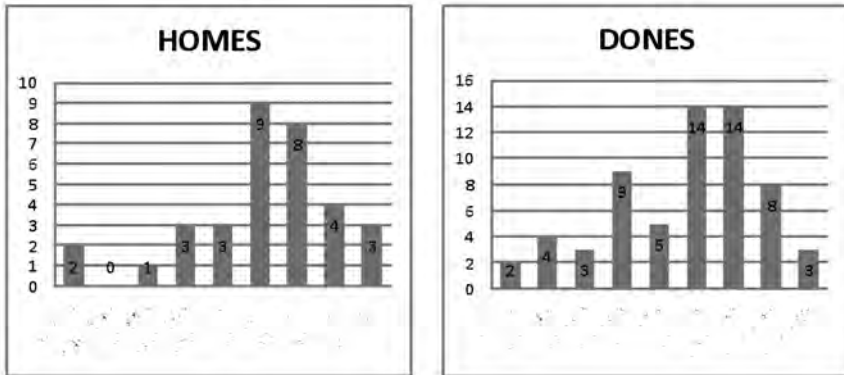
Els grups que han obtingut menys voluntaris (4%) són els intervals de (2.30-2.39), (2.40-2.49) i (2.50-2.59).

El valor mínim que s'ha diagnosticat ha estat 2.32, del voluntari 90074535, i es tracta d'una persona del sexe femení, de 17 anys i que per-

tany al grup dels europeus. El valor màxim que s'ha trobat ha estat 3.17, un valor realment molt alt (recordem que a partir de 3.18 ja es considera un resultat patològic respecte a la mutació). 90074587 és el nombre que representa l'individu que ha marcat aquest resultat i es tracta d'una dona de 66 anys, 100% garrotxina.

Tot i així, la mitjana dels resultats es troba en 2'823. 2'805 per als homes i 2'856 per a les dones. Veiem que la mitjana per a les dones és lleugerament més alta, però sense gaires diferències a destacar.

Aquests mateixos resultats i gràfics encara es poden afinar més, comparant els rangs de valors anteriors amb el sexe, l'edat o el grup dels individus:

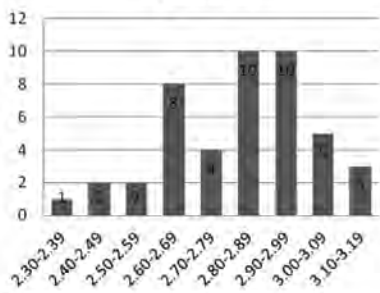


Veiem que, tant en homes com en dones, els valors en els quals es troben més voluntaris són els compresos entre (2.80-2.89). Com a característica general es podria dir que les dues gràfiques són molt similars. Tot i així, hi ha presents algunes diferències: una d'aquestes és que els homes no tenen cap representant en el període de valors compresos entre (2.40-2.49), mentre que les dones en tenen quatre.

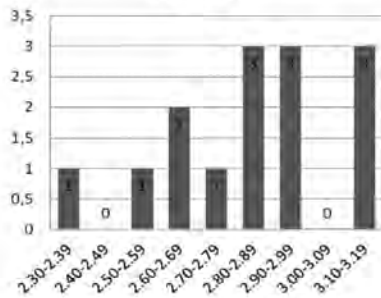
Un altre detall és el corresponent a l'estudi dels resultats segons el grup.



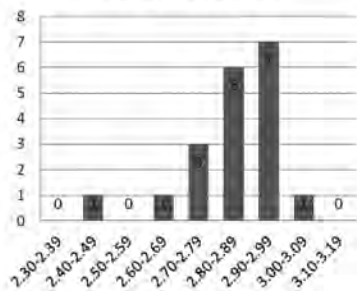
**G 100%**



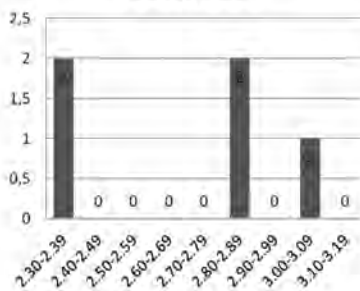
**G 50%**



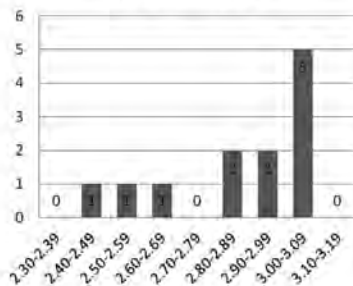
**NO GARROTXA**



**EUROPEU**

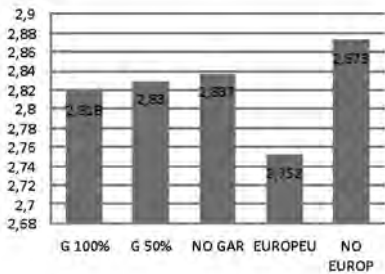


**NO EUROPEU**

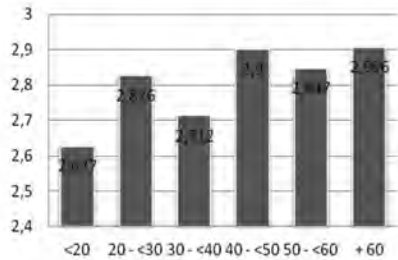


Podem observar que tots els grups presenten una característica en comú: la majoria dels seus voluntaris es troben compresos en l'interval que es troba entre (2.80 – 3.09). El grup que més es diferencia dels altres a simple vista és el dels europeus, ja que és el que tenia menys representants i voluntaris.

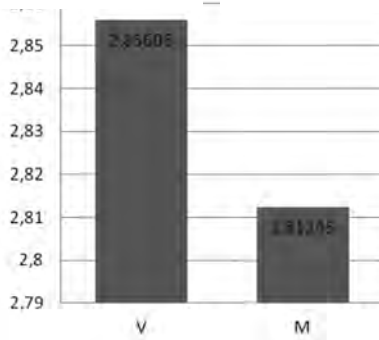
Finalment, també vaig estudiar les diferències per edat, sexe i grup.



Mitjana segons grup



Mitjana segons edat



Mitjana segons sexe

Veiem que hi ha una clara diferència entre els valors de la mitjana dels homes amb els de les dones. Presenten una diferència de 0.0436. Pot semblar molt petita, però en realitat en aquesta prova és molt important. Tot i així, per ser una mutació hereditària que s'hereta per igual a tots dos sexes, no hi ha una explicació científica que justifiqui aquests resultats

més enllà de l'atzar.

Podem observar que les sèries amb els resultats més alts són les compreses entre les edats de 40 a més de 60 anys. Això ens pot portar a pensar que el risc de presentar aquesta mutació augmenta amb l'edat. Però aquest seria un pressupòsit fals, ja que la mutació és hereditària i, per tant, ha d'estar present des del naixement i l'edat no hauria d'influir en el resultat. El que sí que es pot extreure dels resultats comparats amb les edats, és que hi va haver una època, anys enrere, que, segurament perquè la comarca estava més tancada que actualment, el risc de patir-la era més alt. Per això els resultats de la gent més gran són més alts.

Pel que fa al grup, observem que el que més es diferencia de la resta per tenir els valors més alts de mitjana és el que correspon a les mostres dels voluntaris no europeus, seguit del corresponent als resultats de no garrotxins, garrotxins 50% i garrotxins 100%. I, amb una clara diferència, el mínim es presenta en els resultats dels voluntaris europeus, que es troben amb una gran diferència per sota els altres. La diferència que hi ha entre la mitjana dels no europeus (valors màxims) i els no europeus (mínims) és de 0.121. De totes maneres, el petit percentatge dels dos darrers grups no permet extreure conclusions definitives.

També vam analitzar les dades creuant les diferents característiques (edat, sexe, grup), però no es donen aspectes significatius a remarcar en aquest resum.

Si comparem les observacions de les diferents franges, veiem que els grups que es repeteixen més vegades amb la mitjana més alta són els de no europeus i els de no garrotxins. I el grup que es dona més vegades amb els valors més baixos és el grup dels no garrotxins. És un resultat ambigu, ja que el grup que ha donat els valors més baixos també és el que ha donat els valors més alts. Com a resum, podríem dir que hi ha molta diversitat entre els diferents valors, grups i franges. Tot i així, les diferències són mínimes. La màxima la trobem en la primera franja d'edat (els menors de 20 anys) entre els no europeus i els europeus, de 0.68 punts. I la mínima diferència la trobem en l'última franja d'edat (els majors de 60 anys) que és de 0.067 punts. Com s'ha dit abans, que hi hagi tanta diferència entre els valors dels més joves, i menys entre els dels més grans, pot venir donat per la tendència de la Garrotxa, i igualment es podria estendre a altres països, de ser una població tancada, tirada a l'endogàmia, ja sigui per problemes de vies de comunicació o de cultura.

## Conclusions

Amb els resultats obtinguts he pogut arribar a diverses conclusions. Algunes segueixen i confirmen les hipòtesis plantejades; d'altres, però, no s'han acomplert i refuten la meua idea inicial.

Com s'ha vist en els resultats, no n' he trobat cap de patològic respecte a la mutació del factor V Leiden en les 96 mostres estudiades. Aquest resultat és molt important perquè m'aporta molta informació.

Per una banda, em confirma la hipòtesi que el factor V Leiden és una mutació que té poca prevalença en la població general, ja que no s'ha trobat cap resultat mutat en les anàlisis realitzades. No es confirmen totalment les dades obtingudes en el marc teòric, on es diu que la mutació del factor V Leiden té una presència del 6-8% en la població caucàsica i una mica menys en la resta; en el meu estudi ha estat del 0%. Tot i així, encara que no s'ha donat el resultat exacte, sí que es confirma la meua hipòtesi que la mutació és un trastorn poc comú en la població general.

Per altra banda, la segona hipòtesi resulta totalment refutada en aquest estudi. Aquesta hipòtesi citava textualment: "La gent d'origen garrotxí presenta un percentatge més alt d'individus patògens respecte a la mutació". Aquesta hipòtesi afirmava que la gent de la Garrotxa presenta un nombre més alt d'individus mutats. Segons els resultats obtinguts, queda totalment clar que la gent 100% garrotxina presenta un nombre similar de casos de la mutació al de la resta de població i grups estudiats. Per tant, aquesta hipòtesi es dona per refutada. Tot i això, no descarto la possibilitat que es tracti d'un resultat derivat de la falta de mostres. Aquest problema no ha vingut donat per falta de voluntaris, que eren suficients per realitzar un bon estudi, sinó per manca de recursos econòmics, ja que no disposàvem de suficient pressupost per comprar el reactiu necessari per realitzar la prova a totes les mostres. En conseqüència, i per estar-ne totalment segurs, seria necessari realitzar un estudi a gran escala.

Com que això no serà viable, jo extrec les conclusions possibles dels meus resultats, amb les seves limitacions i imprecisions. Tot em porta a pensar que l'opció bona ha estat refutar la hipòtesi, ja que, personalment i després de veure els resultats, no crec que hi hagi una diferència destacada per ser d'una zona o d'una altra. Sí que la Garrotxa ha estat una comarca relativament aïllada, tant físicament, per les limitacions d'accessibilitat, com per la mentalitat més tancada de la gent a l'hora de relacionar-se amb persones de fora de la comarca; però aquest fet no crec

que sigui suficientment rellevant com per provocar un augment d'una mutació com aquesta.

També m'agradaria puntualitzar que tots els comentaris i observacions fets en cada gràfic dels resultats responen a una interpretació literal de la informació que s'hi descriu. No tenen cap valor científic, ja que, com molt bé s'especifica en la part teòrica, la mutació no depèn del sexe, ja que es tracta d'un caràcter dominant que no distingeix entre homes o dones. Tampoc no depèn de l'edat, ja que no és una mutació adquirida, sinó que s'hi neix o no, tant en posició homozigòtica com heterozigòtica. Tot i així, de l'edat sí que en podem extreure una conclusió important que respon a aquesta pregunta: si es tracta d'una mutació no adquirida, com s'explica que la gent de major edat presenti resultats més alts que els més joves? Aquesta pregunta pot tenir diferents respostes:

- Es tracta d'una casualitat.
- Realment, com que anteriorment la Garrotxa era una comarca més tancada, sí que es va incrementar el nombre d'individus mutats; però actualment, quan s'ha millorat en aquest aspecte, ja no hi ha diferències respecte a la resta de la població.

De les dues respostes, jo donaria com a viable la primera, que es tracta d'una casualitat, ja que, com s'ha dit anteriorment, la segona hipòtesi es donaria per refutada.

La tercera i última hipòtesi era: “ les persones de sexe femení presenten més aquesta mutació que les de sexe masculí”. Aquesta afirmació també es veu refutada, ja que he obtingut el mateix nombre de resultats patològics tant per als individus masculins com per als femenins. Tot i això, amb els resultats no queda del tot demostrat, ja que en realitat no s'ha trobat cap resultat patològic per a cap dels sexes, i es podria pensar que potser sí que existeix una diferència. En aquest cas, es treu la justificació directament de la teoria. El que aquesta ens diu és que sí que hi ha més incidència i possibilitat de patir trombosi en dones; aquesta major proporció ve donada pels temes ja esmentats de l'embaràs, els anticonceptius orals... Tot i això, la teoria també ens diu que no totes les trombosis vénen provocades per la mutació del factor V Leiden, sinó que hi ha moltes causes diverses que poden desembocar-hi. La prova es troba en el tipus de mutació de què es tracta, que és una mutació de caràcter dominant i, per tant, no presenta cap distinció referent al sexe i, conseqüentment, estadís-

ticament parlant, no s'hauria de donar cap diferència entre els individus de sexe femení i masculí.

Tenint presents aquestes conclusions, crec que el fet que no hagi trobat cap resultat patològic no ha representat un impediment ni una menysvaloració del treball. Estic fins i tot contenta d'aquest resultat, ja que el trobo molt lògic i versemblant; crec que s'ajusta a la teoria i no la contradu. Per tant, és un indicador que el treball ha estat realitzat correctament.

A més a més, aquest treball m'ha servit per conèixer de més a prop el funcionament d'un sistema tan important com és l'hemostàsia i la seva importància en el cos humà. També he pogut aprofundir en diversos temes de laboratori i he millorat el meu coneixement del cos en general.

Paral·lelament, també he après a realitzar un estudi de recerca seriós i m'he adonat de la dificultat que representa en algunes ocasions seguir-ne els procediments exactes. En tots els casos és complicat quan es vol estudiar un factor variant. I encara s'incrementa més la dificultat si en aquest estudi s'hi afegeix una part estadística en què les diverses variables es mouen i canvien independentment. Tot i així, estic molt orgullosa de la feina feta i dels resultats obtinguts, de tot el contingut que n'he pogut extreure i aprendre.

Per últim, però no menys important, m'he adonat que per a tot en aquesta vida, sigui per a la ciència o també en la vida personal, és molt important disposar dels recursos econòmics suficients. Dic això referint-me al fet que ha estat un tema que ha influït en el meu treball, ja que per falta de pressupost es varen haver de retallar les mostres a estudiar. Aquest fet no solament em va reduir l'estudi en general sinó també, i això és el més important, la seva exactitud i credibilitat, que és el que realment em sap greu. Veig que podia haver fet molt més del que he fet i que, per culpa de no disposar de suficient pressupost, m'he quedat a les portes d'un projecte que podria haver arribat a ser gran. Sí, he sentit impotència, però això també té la part positiva: m'ha fet aprendre que és un fet que cada vegada més en el món professional, i especialment en el món científic, molts projectes (més grans i importants per a la humanitat que aquest, segur) es queden a les portes i es veuen frustrats per manca de pressupost. I aquesta realitat ens fa veure a tots els estudiants el que costa realitzar un treball sense tots els recursos i valorar molt seriosament i amb admiració la tasca de tots els científics que, malgrat les dificultats, tiren endavant projectes de gran envergadura.

Aquestes són les conclusions que he pogut extreure del treball. I per tot això, en faig una valoració positiva, i estic molt contenta i satisfeta de tot el que m'ha aportat en general aquesta experiència.