



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Farmacia – Programa de Magíster en Bioquímica Clínica e  
Inmunología

## **Impacto de la cuantificación de las apolipoproteínas A1 y B en niños y adolescentes con historia familiar de enfermedad cardiovascular precoz**

Tesis para optar al grado de Magíster en Bioquímica Clínica e  
Inmunología

CONSUELO DEL ROSARIO MERINO GONZÁLEZ  
CONCEPCIÓN - CHILE  
2018

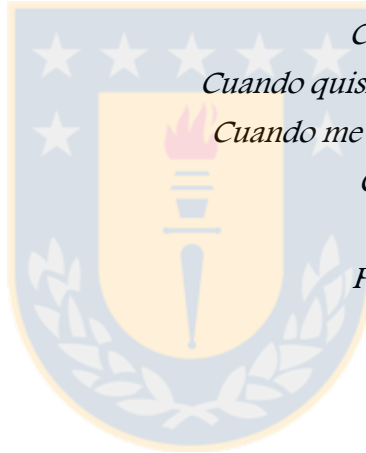
Profesora Guía: Paulina Bustos Araya, MSc.  
Dpto. de Bioquímica Clínica e Inmunología, Facultad de Farmacia  
Universidad de Concepción

*A mi madre, luchadora eterna, tu recuerdo y presencia seguirá por siempre.*



*A mi padre por estar y continuar.*

*Soy Teresa Wilms Montt  
y aunque nací cien años antes que tú,  
mi vida no fue tan distinta a la tuya.  
Yo también tuve el privilegio de ser mujer.  
Es difícil ser mujer en este mundo.  
Tú lo sabes mejor que nadie.  
Viví intensamente cada respiro y cada instante de mi vida.  
Destilé mujer.  
Trataron de reprimirme, pero no pudieron conmigo.  
Cuando me dieron la espalda, yo di la cara.  
Cuando me dejaron sola, di compañía.  
Cuando quisieron matarme, di vida.  
Cuando quisieron encerrarme, busqué libertad.  
Cuando me amaban sin amor, yo di más amor.  
Cuando trataron de callarme, grité.  
Cuando me golpearon, contesté.  
Fui crucificada, muerta y sepultada,  
por mi familia y la sociedad.  
Nací cien años antes que tú  
sin embargo te veo igual a mí.  
Soy Teresa Wilms Montt,  
y no soy apta para señoritas.*



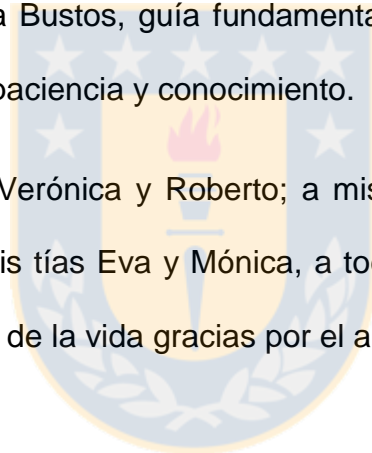
Teresa Wilms Montt  
Escritora chilena  
(1893-1921)

## FUENTE DE FINANCIAMIENTO Y AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó gracias al financiamiento del proyecto SOCHED 2014-9, el apoyo de profesores y personal técnico del Dpto. de Bioquímica Clínica e Inmunología y el trabajo conjunto con la Dra. Katia Sáez del Dpto. Estadística, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Concepción, para el análisis estadístico de los datos.

Profesora Paula Bustos, guía fundamental en este proceso, gracias por el apoyo, dedicación, paciencia y conocimiento.

A mis Padres, Verónica y Roberto; a mis hermanos, Antonia, Carolina, Camila y Nicolás; a mis tías Eva y Mónica, a toda mi familia, amigas y amigos de carrera, de colegio, de la vida gracias por el apoyo, comprensión y paciencia.



## TABLA DE CONTENIDOS

<b>Fuente de financiamiento Y Agradecimientos</b> .....	iv
<b>Índice de tablas</b> .....	ix
<b>Índice de figuras</b> .....	xi
<b>Abreviaciones</b> .....	xiii
<b>Resumen</b> .....	xvi
<b>Abstract</b> .....	xviii
<b>Introducción</b> .....	1
1. Enfermedad cardiovascular .....	1
2. La aterosclerosis y sus factores de riesgo .....	2
3. Antecedentes de enfermedad cardiovascular precoz como factor de riesgo.....	10
4. Dislipidemias como factor de riesgo.....	13
4.1. Metabolismo lipídico .....	13
4.2. LDL y aterosclerosis .....	22
4.3. HDL y aterosclerosis .....	24
5. Nuevos predictores de riesgo cardiovascular .....	27
5.1. Apolipoproteína B .....	27
5.2. Apolipoproteína A1 .....	28
5.3. Apo B y ApoA1: predictores de riesgo cardiovascular .....	29
6. Determinación de riesgo de enfermedad cardiovascular en niños y adolescentes .....	33
7. Métodos de cuantificación de Apolipoproteínas .....	35
<b>Pregunta de investigación</b> .....	38

<b>Hipótesis</b> .....	39
<b>Objetivo</b> .....	39
<b>Objetivos específicos</b> .....	39
<b>Materiales y metodos</b> .....	42
1. Antígenos Apo B y Apo A1.....	42
1.1. Extracción de lipoproteínas LDL/HDL.....	42
1.2. Sueros controles y estándares de apolipoproteínas.....	44
2. Anticuerpos monoclonales anti-Apo A1 y anti-Apo B.....	44
2.1. Descongelamiento de hibridomas .....	44
2.2. Cultivo de hibridomas .....	45
2.3. Reactividad de anticuerpos monoclonales .....	46
2.4. Determinación del isotipo de los anticuerpos monoclonales .....	46
2.5. Producción de fluido ascítico .....	47
2.6. Precipitación de globulinas.....	48
2.7. Purificación de los anticuerpos monoclonales.....	49
2.8. Conjugación de anticuerpos con biotina.....	50
2.9. Titulación de anticuerpos monoclonales.....	50
3. Caracterización de AcMs anti-Apo B y anti-Apo A1 para estandarización de inmunoensayos .....	51
3.1. ELISA Sandwich para determinar reactividad de AcMs anti-Apo B..	51
3.2. ELISA de competencia para evaluar la reactividad de anticuerpos 8B12 y 8A4.....	52
3.3. ELISA sandwich para la determinación de la reactividad del anticuerpo 2C10.....	53
4. Estandarización de las curvas de calibración para Apo A1 y Apo B .....	54
4.1. ELISA sandwich para la cuantificación de Apo A1 .....	54
4.2. ELISA de inhibición competitiva para cuantificación de Apo B .....	55

5. Validación de los inmunoensayos .....	56
5.1. Selectividad .....	56
5.2. Linealidad .....	57
5.3. Precisión intraensayo .....	57
5.4. Precisión interensayo .....	58
5.5. Exactitud.....	58
6. Reclutamiento de sujetos de estudio .....	59
7. Cuantificación de muestras de suero .....	60
8. Métodos estadísticos .....	61
9. Eliminación de residuos peligrosos.....	61
<b>Resultados</b> .....	<b>63</b>
1. Obtención de LDLn y HDLn a partir de plasma humano.....	63
2. Obtención y caracterización de anticuerpos monoclonales anti-Apo B y anti-Apo A1 .....	64
2.1. Reactividad de sobrenadantes de cultivo de hibridomas.....	64
2.2. Purificación de AcMs.....	66
2.3. Titulación de AcMs purificados .....	68
2.4. Conjugación de AcMs con biotina .....	71
2.5. Reactividad de los AcMs 8G12B4 y 2F4(1)E7 anti-Apo B .....	75
2.6. Reactividad de los AcMs 8B12, 8A4 y 2C10 anti-Apo A1 .....	78
3. Estandarización de las curvas de calibración para la cuantificación de Apo B y Apo A1 .....	80
3.1. Estandarización de la curva de calibración para cuantificación de Apo B por ELISA de inhibición competitiva.....	80
3.2. Estandarización de la curva de calibración para cuantificación de Apo A1 por ELISA tipo sandwich .....	83

4. Validación de métodos para la cuantificación de Apo B y Apo A1 séricas.....	86
4.1. Validación del método de ELISA de inhibición competitiva para cuantificación de Apo B sérica .....	86
4.2. Validación del método de ELISA sandwich para cuantificación de Apo A1.....	93
5. Cuantificación de Apo A1 sérica en muestras de niños y adolescentes con antecedentes familiares de ECV precoz.....	99
<b>Discusión.....</b>	<b>105</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>119</b>
<b>Anexo 1:</b> Información para el contacto de posibles participantes (niños y adolescentes) y documento de consentimiento informado .....	133
<b>Anexo 2:</b> Información para el (o la) participante de edades entre 18 y 20 años y documento de consentimiento informado .....	135
<b>Anexo 3:</b> Información para el (o la) menor de 18 años participante y documento de asentimiento.....	137
<b>Anexo 4:</b> Aprobación del Comité Ético Científico del Servicio de Salud Concepción.....	139



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación de factores de riesgo cardiovascular convencionales .....	9
<b>Tabla 2.</b> Composición de lipoproteínas involucradas en el metabolismo lipídico. .....	15
<b>Tabla 3.</b> Rangos de concentraciones plasmáticas aceptable, límite y alto para lípidos, lipoproteínas y apolipoproteínas definidos por NHLBI.....	35
<b>Tabla 4.</b> Reactividad de los sobrenadantes de cultivo de los clones seleccionados para producción de anticuerpos monoclonales anti-Apo A1 y anti-Apo B.....	66
<b>Tabla 5.</b> Obtención y purificación de AcMs. ....	67
<b>Tabla 6.</b> Títulos obtenidos para los anticuerpos monoclonales seleccionados.	69
<b>Tabla 7.</b> Títulos obtenidos para los AcMs biotinilados.....	71
<b>Tabla 8.</b> Reacción de los anticuerpos monoclonales 8G12B4 y 2F4(1)E7-bit en ausencia de antígeno.....	77
<b>Tabla 9.</b> Evaluación de la selectividad del método ELISA de inhibición competitiva para cuantificación de Apo B .....	87
<b>Tabla 10.</b> Evaluación de la exactitud y precisión de las determinaciones de selectividad del método de ELISA de inhibición competitiva para cuantificación de Apo B .....	88
<b>Tabla 11.</b> Evaluación de la selectividad del método ELISA sandwich para cuantificación de Apo A1 .....	94
<b>Tabla 12.</b> Evaluación de la exactitud y precisión de las determinaciones de selectividad del ELISA sandwich para cuantificación de Apo A1 .....	94
<b>Tabla 13.</b> Evaluación de precisión intraensayo e interensayo de las concentraciones de la curva de calibración para cuantificación de Apo A1 .....	95
<b>Tabla 14.</b> Evaluación de precisión intraensayo e interensayo de un suero control de concentración conocida para ELISA sandwich para la cuantificación de Apo A1 .....	97

**Tabla 15.** Evaluación de la exactitud para el método de ELISA sandwich para la cuantificación de Apo A1 ..... 98

**Tabla 16.** Características clínico-antropométricas de la población de estudio y la población control..... 99

**Tabla 17.** Perfil lipídico de la población de estudio y la población control ..... 101

**Tabla 18.** Prevalencias de parámetros alterados en el perfil lipídico en población de estudio y la población control..... 102

**Tabla 19.** Determinación de Apo A1 en población de estudio y población control, según sexo..... 102



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema de la estructura de una lipoproteína.....	15
<b>Figura 2.</b> Transporte reverso de colesterol .....	21
<b>Figura 3.</b> Verificación de la pureza de LDL nativa.....	64
<b>Figura 4.</b> Cromatogramas de la purificación de los anticuerpos monoclonales.....	68
<b>Figura 5.</b> Curvas de titulación para anticuerpos monoclonales .....	70
<b>Figura 6.</b> Curvas de titulación para anticuerpos monoclonales conjugados con biotina .....	72
<b>Figura 7.</b> Ensayos de reactividad cruzada del conjugado 8G12B4-bit con BSA y LDLn .....	74
<b>Figura 8.</b> Titulación AcMs anti-Apo B en presencia y ausencia de la proteína de bloqueo BSA.....	75
<b>Figura 9.</b> Testeo del anticuerpo monoclonal 8G12B4 como anticuerpo de captura y de 2F4(1)E7-bit como anticuerpo de revelado .....	76
<b>Figura 10.</b> Inhibición de los AcMs 8B12 y 8A4 por HDL, en presencia y ausencia de tween .....	79
<b>Figura 11.</b> Determinación de la concentración de 2C10 como anticuerpo de captura.....	80
<b>Figura 12.</b> Determinación del rango lineal de la curva de calibración para la cuantificación de Apo B por ELISA de inhibición competitiva. ....	81
<b>Figura 13.</b> Curva de calibración para cuantificación de Apo B por ELISA de inhibición competitiva.....	83
<b>Figura 14.</b> Determinación del rango lineal de la curva de calibración para la cuantificación de Apo A1 por ELISA sandwich .....	84
<b>Figura 15.</b> Estandarización de la curva de calibración para cuantificación de Apo A1 por ELISA sandwich.....	85
<b>Figura 16.</b> Comparación de inhibición de tres matrices diferentes en tres concentraciones de Apo B .....	89

**Figura 17.** Relación de la concentración de Apo B en muestras cuantificadas por ELISA estandarizado y ELISA comercial ..... 91

**Figura 18.** ELISA de inhibición competitiva para cuantificación de Apo B en condiciones no denaturantes ..... 92

**Figura 19.** Evaluación de precisión intraensayo e interensayo para las concentraciones de la curva de calibración para la cuantificación de Apo A1.. 96

**Figura 20.** Correlación entre valores de HDL y Apo A1 ..... 103



## ABREVIACIONES

**ABCA1:** Receptor *ATP binding cassette* subfamilia A tipo 1

**ABCG1:** Receptor *ATP binding cassette* subfamilia G tipo 1

**ACAT:** Acil-CoA-colesterol-O-aciltransferasa

**AcMs:** Anticuerpos monoclonales

**Acs:** Anticuerpos

**Apo:** Apolipoproteína

**Bit:** Biotina

**BSA:** Albúmina de suero bovino

**CC:** Circunferencia de cintura

**CCI:** Coeficiente de correlación interclase

**CETP:** Proteína de transferencia de colesterol esterificado

**C-HDL:** Colesterol asociado a lipoproteína de alta densidad

**CIMT:** Engrosamiento de la íntima-media de la carótida

**C-LDL:** Colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad

**C-no HDL:** Colesterol no HDL.

**CT:** Colesterol total

**CV:** Coeficiente de variación

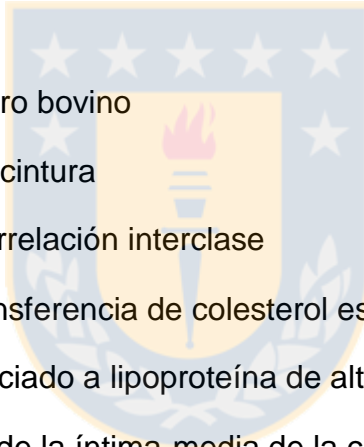
**D.O.:** Densidad óptica

**DE:** Desviación estándar

**ECV:** Enfermedad cardiovascular

**ELISA:** Ensayos de inmunoabsorción asociados a enzimas

**ENT:** Enfermedad no transmisible



**HDL:** Lipoproteína de alta densidad

**HDLn:** HDL nativa

**ICAM-1:** *Intercellular Adhesion Molecule 1*

**IDL:** Lipoproteínas de densidad intermedia

**Ig:** Inmunoglobulina

**IMC:** Índice de masa corporal

**LCAT:** Enzima lecitin-colesterol-acil-tranferasa

**LDL:** Lipoproteína de baja densidad

**LDLn:** LDL nativa

**LDLox:** LDL oxidada

**Lox-1:** *Lecitin-like oxidized LDL receptor-1*

**Lps:** Lipoproteínas

**MATPEL:** Manejo de residuos y sustancias peligrosas

**MINSAL:** Ministerio de Salud de Chile

**NHLBI:** *National Heart Lung and Blood Institute*

**NO:** Óxido nítrico

**NOS:** Óxido nítrico sintasa

**OMS:** Organización Mundial de la Salud.

**OPD:** Ortofenilendiamina

**OVA:** Ovoalbúmina

**PBS:** *Buffer* fosfato salino.

**RE:** Reticulo endoplasmático

**R-LDL:** Receptor de lipoproteínas de baja densidad



**ROS:** Especies reactivas del oxígeno

**SFB:** Suero fetal bovino

**SR-BI:** Receptor *scavenger* clase B tipo 1

**SREBP:** Proteína de unión al elemento regulador de esteroides

**TG:** Triglicéridos

**TMB:** 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

**VCAM-1:** *Cell adhesion protein 1*

**VLDL:** Lipoproteínas de muy baja densidad



## RESUMEN

Las Apolipoproteínas (Apo), A1 y B, son el principal componente proteico de las lipoproteínas HDL y LDL, respectivamente, y son parte del metabolismo lipídico. Apo A1, permite el eflujo de colesterol desde las células extrahepáticas y se define como molécula anti-aterogénica. Apo B permite el traspaso de lípidos hacia las células extrahepáticas y está descrita como una molécula aterogénica. Las determinaciones de Apo A1 y Apo B surgen como una alternativa y/o complemento a la cuantificación de colesterol asociado a lipoproteínas, para mejorar la estratificación de riesgo cardiovascular.

Los antecedentes familiares de Enfermedad cardiovascular (ECV) precoz representan la combinación de efectos de componentes genéticos, bioquímicos y ambientales que predisponen al individuo a un mayor riesgo cardiovascular de base, que los hace foco de mayor estudio y pesquisa temprana de otros factores de riesgo asociados.

El objetivo de este trabajo fue estandarizar dos inmunoensayos para la cuantificación de Apo A1 y Apo B, para determinar sus valores séricos en una población chilena de niños y adolescentes con historia familiar de ECV precoz.

Los resultados obtenidos, permitieron estandarizar un ELISA de competencia para cuantificar Apo B y un ELISA sandwich, para Apo A1. Este último fue validado y se utilizó en los niños y adolescentes en estudio. En general, esta población presentó una mayor prevalencia de dislipidemia (55%) y



de Apo A1 disminuida (13%). Estos resultados permiten conocer cómo se encuentran metabólicamente niños y adolescentes con antecedente de ECV precoz en una población chilena y así tempranamente tomar medidas para prevenir la ECV en su vida adulta.



## ABSTRACT

Apolipoproteins (Apo), Apo A1 and Apo B, are the main protein component of lipoproteins (Lp) HDL and LDL, respectively, and are part of lipid metabolism. Apo A1 allows the release of cholesterol from extrahepatic cells and is defined as anti-atherogenic molecule. Apo B allows the lipid transfer to extrahepatic cells and is described as atherogenic molecule. The measurement of Apo A1 and Apo B concentrations arise as an alternative and/or complement to the cholesterol associated to Lp quantification to improve the cardiovascular risk (CV) stratification.

Family history of early cardiovascular disease (CVD) represents a genetic, biochemical and environmental component effect combination that predisposes the individual to a higher CV risk, which makes them a focus of further study and early investigation of other risk factors associated.

The objective of this work was to standardize two immunoassays for Apo A1 and Apo B quantification to determine these plasma protein levels in a children and adolescent Chilean population with a family history of early CVD.

The results obtained allowed the standardization of a competitive ELISA for Apo B and a sandwich ELISA for Apo A1 quantification. The latter was validated and applied in children and adolescents under study. In general, this population had a higher prevalence of dyslipidemia (55%) and decreased Apo A1 levels (13%). These results allow assessing the metabolic status of Chilean

population children and adolescents with a history of early CVD and thus taking measures to prevent CVD in their adult life.



**Marie Curie** (Varsovia, 1867 - 1934) Científica.

Premio Nobel de Física en 1903 «en reconocimiento por los extraordinarios servicios  
rendidos en sus investigaciones conjuntas sobre los fenómenos de radiación  
descubiertos por Henri Becquerel»

Premio Nobel de Química de 1911 «en reconocimiento por sus servicios en el avance  
de la química por el descubrimiento de los elementos radio y polonio, el aislamiento del  
radio y el estudio de la naturaleza y compuestos de este elemento»

Primera mujer en el mundo en recibir un premio Nobel.

## INTRODUCCIÓN

### 1. Enfermedad cardiovascular

La enfermedad cardiovascular (ECV) se define como una enfermedad no transmisible (ENT) que contempla un conjunto de trastornos al corazón y a los vasos sanguíneos (Organización Mundial de la Salud), dentro de los cuales se encuentran las cardiopatías isquémicas (infarto agudo al miocardio), enfermedades cerebrovasculares, arteriopatías periféricas, cardiopatía reumática, cardiopatías congénitas, trombosis venosas profundas y embolias pulmonares [1]. Al año 2012, esta patología se encuentra liderando las tasas de mortalidad por ENT, con un 46,2% de las muertes a nivel mundial, según consigna la Organización Mundial de la Salud (OMS), seguida muy por debajo, por cáncer y enfermedades respiratorias [2]. Es destacable, además, que del total de fallecidos menores de 70 años, un 52% corresponde a muertes por ENT y dentro de éstos, un 37% correspondería a muertes prematuras por ECV [2]. Al año 2015, esta situación no varió mayormente, ya que del total de muertes por ENT a nivel mundial, el 45% corresponde a esta causa [3]. En Chile, la situación es bastante similar, según el informe presentado en la última Encuesta Nacional de Salud, del año 2010, y por los indicadores básicos de salud, publicados por el Departamento de Estadísticas e Información de Salud, año 2011, donde se observó un elevado nivel de morbilidad y mortalidad por ENT y sus factores de

riesgo, siendo las enfermedades asociadas al sistema circulatorio las causantes del 27% de las muertes en nuestro país [4, 5].

Tomando en cuenta los altos índices de mortalidad poblacional asociados a la ECV, donde además es necesario considerar la desigualdad observada en relación a sexo, edad, nivel educacional, sector rural/urbano y región habitada, esta patología es considerada un problema de salud pública en nuestro país. Razón por la cual se han llevado a cabo una serie de iniciativas e implementación de programas a nivel nacional, como el programa de salud cardiovascular [6], que incorpora estrategias para mejorar el manejo de la atención primaria en los sistemas de salud; modelos de vigilancia de ENT [7]; promoción de dietas saludables; fomento de la realización de actividad física y estilos de vida saludable en general, como la incorporación en el sistema de garantías explícitas de salud (GES) [8, 9].

## **2. La aterosclerosis y sus factores de riesgo**

La aterosclerosis corresponde a la patología que subyace a la manifestación clínica de la enfermedad cardiovascular. Se inicia a temprana edad, de forma subclínica y sin presentar sintomatología aparente [6]. Corresponde a un proceso inflamatorio de tipo crónico que conlleva la acumulación progresiva de colesterol en el subendotelio, generando el engrosamiento de las capas íntima y media, principalmente en arterias de

mediano y grueso calibre, con pérdida de la elasticidad del tejido [10]. Este proceso comienza con la disfunción endotelial, la cual corresponde a un desequilibrio en la homeostasis del endotelio vascular, generada por condiciones patológicas que exacerban un ambiente oxidante e inflamatorio, favorecidos también con la edad [11].

El endotelio corresponde al órgano que recubre todos los vasos sanguíneos y está constituido por una monocapa de células epiteliales, llamadas células endoteliales. Este órgano participa, contribuye y regula una serie de funciones, como la mantención de la hemostasia, la permeabilidad vascular, el tráfico de leucocitos, procesos inflamatorios y mantención del tono vascular, entre otras [12]. Para cumplir con estas funciones, las células endoteliales sintetizan y secretan una serie de mediadores y factores vaso-activos como óxido nítrico (NO), prostaciclina y el factor hiperpolarizante derivado de endotelio conocidos en su conjunto como *Endothelium-derived relaxing factors* que inducen un estado vasodilatador. Por otro lado, la síntesis de endotelina-1, tromboxano-A2 y angiotensina II, en conjunto llamados *endothelium-derived contracting factors*, mantienen un estado vasoconstrictor. El equilibrio en estos procesos permite mantener regulados los efectos trombóticos, oxidantes e inflamatorios que se producen a nivel del endotelio [13, 14].

Una de las moléculas vasodilatadoras más importantes secretadas por el endotelio corresponde al NO, el cual es producido por un complejo enzimático llamado óxido nítrico sintasa (NOS), que convierte L-arginina en L-citrulina liberando NO. Este complejo está presente en el organismo en 4 isoformas: óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS o NOS tipo I), inducible (iNOS o NOS tipo II), endotelial (eNOS o NOS tipo III) y mitocondrial (mtNOS o NOS tipo IV) [15, 16]. La activación de la eNOS lleva a la formación de NO en las células endoteliales, éste actúa principalmente a nivel de las células musculares lisas vía guanilil-ciclasa soluble (sGC) / guanosínmonofosfato cíclico (cGMP) / proteinkinasa C (PKC), generando la relajación muscular [16, 17] y manteniéndolas en un estado no-proliferativo; actúa además a nivel de plaquetas y células del sistema inmune, inhibiendo su activación [18]. La actividad de eNOS es inducida por una serie de factores endógenos como estrógenos, aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular y *shear stress*, siendo este último, una de las principales causas. También, puede ser inhibida por distintas condiciones como el estrés oxidativo o disminución de niveles de estrógenos o sirtuina-1 [18]. Uno de los mecanismo de inhibición o inactivación de la eNOS se debe a la incapacidad de la proteína para dimerizar o la falta de cofactores para que esta actúe, lo que lleva a la producción de anión superóxido ( $O_2^-$ ) en vez de NO, proceso denominado desacoplamiento de la eNOS [19].

La disminución de la síntesis, liberación y/o activación de NO, llevan a la disfunción endotelial [20]. Entre los distintos y complejos mecanismos que se



pueden asociar a este proceso, el más común y que subyace a la mayoría de ellos, corresponde al estrés oxidativo. Este es generado por el aumento patológico en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), debido a un desbalance entre los mecanismos pro-oxidantes y anti-oxidantes endógenas, a favor de las primeras [21]. Este desbalance, es el resultado de respuestas compensatorias a injurias, que llevan al desacoplamiento de la eNOS y/o la disminución en la biodisponibilidad de NO [14]. Los procesos inflamatorios debido a estas noxas, producen la activación del endotelio con la expresión de moléculas de adhesión en la superficie celular como la *vascular cell adhesion protein 1* (VCAM-1), *Intercellular Adhesion Molecule 1* (ICAM-1) y/o E-selectina [20], y el reclutamiento y activación de neutrófilos y macrófagos, por medio de citoquinas pro-inflamatorias, que catalizan ROS por el complejo *phagocyte oxidase* para realizar su acción inmune [17]. La cronicidad de este proceso inflamatorio y de la presencia de ROS llevan, por un lado, a la oxidación de complejos macromoleculares como la lipoproteína de baja densidad (LDL) y, por otro, a la remodelación endotelial, con un engrosamiento de las paredes y el aumento de la permeabilidad vascular hacia el espacio subendotelial. El aumento de permeabilidad da paso al ingreso de constituyentes del plasma como lipoproteínas, particularmente LDL la cual es altamente susceptible a oxidaciones, y aumento de las células inmunes en el subendotelio [22]. Los macrófagos dentro de la íntima expresan receptores *scavenger* que facilitan la captación y acumulación de lípidos oxidados y ésteres de colesterol, que llevan

a la transformación de estos macrófagos en células de espuma [23]. Este proceso aumenta aún más la expresión de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas, que en conjunto con el aumento de las oxidaciones de LDL, atraen a un mayor número de células inmunes, que se acumulan en la íntima, aumentando el daño y formando focos necróticos, por la liberación de contenido lipídico, acumulación de restos celulares por la apoptosis de los macrófagos y una fagocitosis defectuosa (eferocitosis) de estos restos por parte de los mismos macrófagos. Acompañando este proceso, por la disminución de los niveles de NO, y por el propio estrés oxidativo, se produce proliferación y migración de las células del músculo liso generando una restructuración de la lesión, con la formación de tejido fibrótico que va a recubrir el núcleo lipídico y necrótico formando estrías lipídicas, y finalmente placas ateroscleróticas [22].

Las placas ateroscleróticas pueden ser clasificadas según su progresión en 4 tipos: tipo I o lesión inicial, que contempla pequeños depósitos de lípidos con grupos aislados de macrófagos activados por la presencia de estos depósitos. Las lesiones tipo I sólo pueden observarse microscópicamente por su pequeño tamaño y son frecuentemente descritas a temprana edad. La lesión tipo II presenta en su mayoría estrías lipídicas visibles con tinciones como *red oil*, se observa un gran número de macrófagos con o sin lípidos en su interior, que se extienden por toda la lesión, y en menor cantidad otras células inmunes como linfocitos T. Las células musculares lisas también presentan lípidos en su interior, observables de forma microscópica. La lesión de tipo III o pre-ateroma,

considerada el intermedio morfológico y químico entre las lesiones tipo II y el ateroma propiamente tal, presentan un mayor acúmulo de lípidos extracelular, no para desarrollar del todo una acumulación masiva ni marcada que forme el núcleo lipídico, pero sí para generar la separación de las células musculares y reemplazar las fibras de la matriz y proteoglicanos. La lesión tipo IV o ateroma, se considera una lesión avanzada por el marcado núcleo lipídico que presentan y la desorganización del tejido que puede llevar a la desestabilización súbita de la lesión, terminando en un evento isquémico [24].

Todo el proceso de formación de placas ateroscleróticas descrito es favorecido por una serie de condiciones o conductas del individuo que aumentan la probabilidad de desarrollar ECV. Estas condicionantes son denominadas “factores de riesgo cardiovascular” [6] y en la actualidad permiten calcular el riesgo cardiovascular, que se define como la probabilidad del individuo de presentar un evento cardiovascular en un tiempo determinado [25]. Poder identificar este riesgo permite realizar un tratamiento precoz y disminuir las co-morbilidades asociadas a la ECV.

Existen en la actualidad diferentes instrumentos de estratificación del riesgo cardiovascular, que varían principalmente en el número y tipo de factores de riesgo que utilizan para realizar el cálculo de éste, el cual se puede realizar de forma cualitativa (bajo, medio y alto riesgo) o de forma cuantitativa (escala numérica de riesgo) [25]. El desarrollo de estos baremos se basa en directrices

determinadas por grupos de expertos de Europa [26] o Estados Unidos (NCEP-ATP III) [27]. Uno de los algoritmos de estratificación más utilizados corresponde al realizado por el estudio de Framingham [28], en función de la edad, sexo, presión arterial sistólica, tabaquismo, colesterol total (CT) y colesterol asociado a lipoproteína de alta densidad (C-HDL).

En Chile, la estratificación de riesgo se realiza de forma cualitativa, según el número y tipo de los factores de riesgo, o de forma cuantitativa, según las tablas de Framingham modificadas para la población chilena, para predecir el riesgo coronario a 10 años [29]. Las modificaciones incluyen diabetes dentro de los factores considerados y un rango etario entre 35 y 74 años, aunque es necesario destacar que ninguno de estos instrumentos ha sido aún validado. La adaptación de este algoritmo en la población chilena se hace necesario debido a que se ha observado una sobrestimación del riesgo por función de Framingham en países que presentan una menor incidencia de ECV, como es el caso de Chile [6, 30].

La clasificación de los factores de riesgo clásicos o convencionales que proporciona el Ministerio de Salud de Chile (MINSAL) se realiza de acuerdo a: 1) la importancia como factor causal en el desarrollo de la ECV (en mayores o condicionantes) y 2) según la posibilidad de influir en ellos (no modificables o modificables). Los factores de riesgo no modificables corresponden a aquellas condiciones inherentes a la persona: edad, sexo, antecedentes personales de

ECV y antecedentes familiares de ECV; y los factores de riesgo modificables, al comportamiento social o cambios metabólicos/fisiopatológicos del individuo: tabaquismo, sedentarismo, dietas altas en grasas, hipertensión arterial, sobrepeso u obesidad, diabetes y dislipidemias (tabla 1) [6, 31].

**Tabla 1.** Clasificación de factores de riesgo cardiovascular convencionales. Fuente: [6].

<b>Factores de Riesgo Mayores</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Edad               <ul style="list-style-type: none"> <li>- hombre <math>\geq 45</math> años</li> <li>- mujer <math>\geq 55</math> años</li> </ul> </li> <li>• Sexo masculino y mujer postmenopausia</li> <li>• Antecedente personal de ECV</li> <li>• Antecedente de ECV prematura en familiar de primer grado               <ul style="list-style-type: none"> <li>- hombre <math>&lt; 55</math> años</li> <li>- mujer <math>&lt; 65</math> años</li> </ul> </li> </ul>	<b>No modificables</b>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hipertensión arterial</li> <li>• Diabetes</li> <li>• Dislipidemias (colesterol LDL alto y/o colesterol HDL bajo)</li> <li>• Tabaquismo</li> <li>• Enfermedad renal crónica etapa 3b-5 y/o albuminuria moderada/severa persistente</li> </ul>	<b>Modificables</b>
<b>Factores de Riesgo Condicionantes</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Obesidad (<math>IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2</math>)</li> <li>• Obesidad abdominal (<math>CC \geq 90 \text{ cm}</math> hombre y <math>CC \geq 80 \text{ cm}</math> en mujeres)</li> <li>• Triglicéridos <math>\geq 150 \text{ mg/dL}</math></li> <li>• Sedentarismo</li> </ul>	

ECV: Enfermedad cardiovascular; LDL: lipoproteína de baja densidad; HDL: lipoproteína de alta densidad; IMC: índice de masa corporal; CC: circunferencia de cintura.

### **3. Antecedentes de enfermedad cardiovascular precoz como factor de riesgo**

Los antecedentes familiares de ECV representan la combinación de efectos de componentes genéticos, bioquímicos y ambientales que predisponen a un individuo a un mayor riesgo cardiovascular de base [26, 32], ya que al corresponder a un factor de riesgo no modificable, su efecto debe sumarse a los otros factores que pueda presentar este individuo, exacerbando su riesgo.

Los mecanismos asociados a la historia familiar de ECV precoz, que subyacen una morbilidad y mortalidad hereditaria, aún no se conocen del todo, pero a la fecha, existen estudios que presentan desórdenes mendelianos y distintas mutaciones asociadas a la ECV [33-35]. Una de las patologías hereditarias más reconocidas que asocia un mayor riesgo de ECV corresponde a la hipercolesterolemia familiar, que involucra una alteración del metabolismo lipídico, debido principalmente a mutaciones en el gen del receptor de lipoproteínas de baja densidad (R-LDL), disminuyendo el influjo de colesterol a las células extrahepáticas, acumulándose en el torrente sanguíneo [36].

La historia familiar de ECV se ha descrito como un factor de riesgo de alta importancia en las pautas sugeridas por los distintos grupos de expertos europeos [26] y estadounidense [27], y corresponde a un factor independiente de los otros factores de riesgo [37]. Existen distintas definiciones de este parámetro, que varían en el rango etario en que el pariente presentó un evento

y el número de estos eventos, lo cual puede influir en la categorización de riesgo [38]. Aún así, se han llegado a consensos, según lo determinado en una serie de estudios, donde la historia familiar de un evento cardiovascular precoz, correspondiente a padres menores a 55 años y/o madres menores a 65 años, confiere un mayor riesgo que si este evento ocurre a edades más avanzadas [39-41]. Existe además cierta controversia, en cuanto al nivel de riesgo que proporcionaría que el evento lo padeciese el padre o la madre, ya que aunque en la mayoría de los estudios no habría diferencia entre éstos [42], existen otros que señalan que un evento asociado a la madre, a cualquier edad, predispondría a un mayor riesgo que en el caso del padre [39].

Los marcadores clásicos de aterosclerosis que determinan un remodelamiento en la estructura vascular y complementan la predicción de riesgo cardiovascular como el engrosamiento de la íntima-media de la carótida (CIMT) y la calcificación de arterias coronarias [43], han sido extensamente utilizados para determinar aterosclerosis temprana entre grupos con y sin historia familiar precoz [44, 45]. Más aun, diversos son los estudios que utilizan estos parámetros para población de temprana edad, donde ya es posible determinar cambios en la estructura vascular. Los resultados de estos estudios son divergentes, mientras la mayoría de éstos establecen diferencias significativas en la determinación de CIMT u otros parámetros asociados a aterosclerosis entre niños con y sin historia familiar de ECV precoz [46, 47], avalando la importancia de este factor y la relevancia de la pesquisa temprana

de este parámetro, otros no han podido establecer relación entre la historia familiar y el aumento del CIMT por sí solo [48], pero sí hay estudios que demuestran esta relación al sumarle otros antecedentes familiares como la hipertensión [49].

Se ha determinado que un individuo con historia familiar de ECV, que incluye la actividad física dentro de su estilo de vida, permite reducir el riesgo base que presenta [50], por otro lado, se ha descrito que individuos con antecedentes de ECV precoz presentan una fuerte asociación con el síndrome metabólico, el cual se define por medio de cinco parámetros: obesidad abdominal, hiperglicemia, hipertrigliceridemia, C-HDL bajo e hipertensión [51]; Por ende, la presencia de este síndrome llevaría a una mayor predisposición a un evento cardiovascular futuro. Aún más, se ha determinado que existe una predisposición de individuos con historia familiar de ECV precoz a otras patologías importantes y riesgosas para un posible evento cardiovascular, como obesidad, hipertensión y diabetes, que individuos sin estos antecedentes [52].



#### 4. Dislipidemias como factor de riesgo

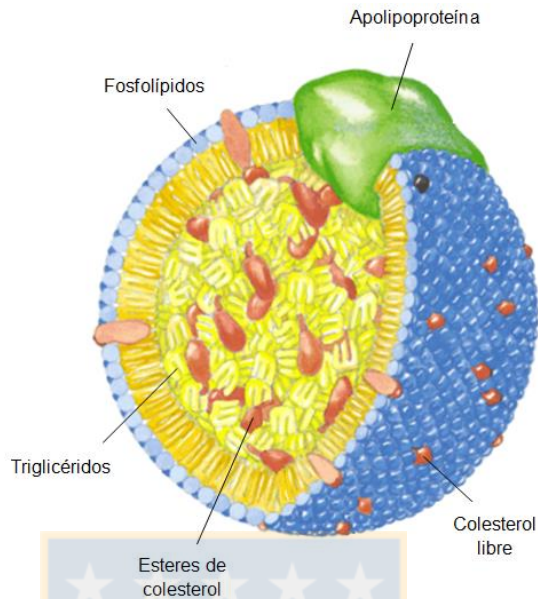
Uno de los factores de riesgo modificable reconocido en la ECV corresponde a la alteración del metabolismo lipídico, denominado dislipidemia, las cuales se deben a un aumento de las concentraciones séricas de triglicéridos (TG), CT, colesterol asociados a lipoproteínas de baja densidad (C-LDL) o disminución C-HDL, en relación a los rangos de referencias establecidos [53, 54].

##### 4.1. Metabolismo lipídico

Para ingresar a nuestro organismo, movilizarse por el torrente sanguíneo y distribuirse a las diferentes células, las moléculas lipídicas, debido a su naturaleza hidrofóbica, necesitan *carriers* proteicos. Es así como proteínas denominadas apolipoproteínas (Apo), en conjunto con los triglicéridos, colesterol y fosfolípidos, forman complejos macromoleculares llamados lipoproteínas (Lps). Las Lps se clasifican según su densidad por ultracentrifugación [55]: Quilomicrones (<0.94 g/mL), Lps de muy baja densidad (VLDL) (0.94–1.006 g/mL), Lps de densidad intermedia (IDL) (1.006–1.019 g/mL), Lps de baja densidad (LDL) (1.019–1.063 g/mL) y Lps de alta densidad (HDL) (1.063–1.210 g/mL). La densidad de estos complejos macromoleculares está dada por la presencia de las distintas apolipoproteínas y la concentración de lípidos asociados a ésta (tabla 2). Estructuralmente las Lps presentan un

core o núcleo lipídico, altamente hidrofóbico, formado por TG y ésteres de colesterol; y una capa hidrofílica compuesta por fosfolípidos, colesterol libre y las Apos (figura 1) [56, 57]. Existen dos formas de obtener los lípidos circulantes en la sangre: de forma exógena, incorporando los lípidos a través de la dieta y de forma endógena, por medio de la metabolización de lípidos por las células [53].





**Figura 1.** Esquema de la estructura de una lipoproteína. Fuente: Modificado de [58].

**Tabla 2.** Composición de lipoproteínas involucradas en el metabolismo lipídico.

Lipoproteína	Quilomicrones	VLDL	IDL	LDL	HDL	Ref.
<b>Densidad</b>	< 1,006	0,95-1,006	1.006-1.019	1,016-1,063	1,063-1,210	[57]
<b>Diámetro (nm)</b>	75-450	60-80	-	18-25	7,2-12	[57]
<b>Apolipoproteínas</b>	Apo B-48 Apo A1 Apo A2 Apo A4 Apo A5 Apo C2 Apo C3 Apo E	Apo B-100 Apo C1 Apo C2 Apo C3 Apo E	Apo B-100 Apo E	Apo B-100	Apo A1 Apo A2 Apo A4 Apo C1 Apo C2 Apo C3 Apo E	[59]
<b>Proteínas (%)</b>	2	10	18	23	55	[58, 60]
<b>Fosfolípidos (%)</b>	9	18	22	20	24	
<b>Colesterol libre (%)</b>	1	7	34	8	2	
<b>Ésteres de colesterol (%)</b>	3	12		37	15	
<b>Triglicéridos (%)</b>	85	50	26	10	4	

El metabolismo exógeno de los lípidos, comienza con la emulsión y posterior hidrólisis de éstos en el lumen del intestino delgado, donde los TG son hidrolizados a ácidos grasos libres y monoacilglicerol; los fosfolípidos a ácidos grasos libres y lisofosfolípidos; los ésteres de colesterol a ácidos grasos libres y colesterol libre [61]. Los productos hidrolizados son internalizados por el enterocito por difusión o por transportadores de membrana, formando gotas lipídicas y/o llevados al retículo endoplasmático (RE) [62]. En el RE hay una nueva síntesis de triglicéridos, fosfolípidos y colesterol esterificado [61] los cuales son dispuestos espacialmente para la formación de quilomicrones, agregados lipoproteicos constituidos por lípidos y la forma truncada de Apo B, denominada Apo B-48. Esta Apo necesita de proteínas chaperonas, como la proteína microsomal transportadora de triglicéridos, que evita su degradación y presenta un rol clave en la transferencia de lípidos, ensamblaje y secreción de las Lps [63, 64]. A nivel del RE, la Apo B-48 es lipidada y exportada al aparato de Golgi, donde ocurren procesos de glicosilación, adquisición de otras apolipoproteínas como Apo A1, y maduración del quilomicron, el que finalmente es liberado a través de vesículas hacia el sistema linfático y posteriormente al sistema circulatorio [63]. Una vez en circulación, el quilomicron adquiere otras apolipoproteínas intercambiables como Apo C2, Apo C3 y Apo E. Se produce degradación de triglicéridos por acción de la enzima lipoprotein lipasa expresada en la superficie de las células endoteliales y la liberación de ácidos grasos libres que son asimilados por el tejido adyacente. Apo C2 actúa como

co-factor, promoviendo la actividad de la lipoprotein lipasa y Apo C3 como inhibidor de ésta [65]. Los quilomicrones remanentes interactúan a través de Apo E con el R-LDL y proteoglicanos de heparán sulfato en la superficie de los hepatocitos donde son removidos de circulación por endocitosis [66].

En el hígado se realiza la mayor síntesis, secreción y eliminación de colesterol, por lo que este órgano es considerado el mayor sitio de control de la homeostasis de lípidos [67]. Así, a nivel de los hepatocitos se regula el transporte de lípidos hacia los tejidos extrahepáticos según los requerimientos de éstos. La distribución se realiza por medio de tres Lps: VLDL, IDL y LDL. La Apo B, sintetizada en el RE del hepatocito, y el contenido lipídico presente en la célula, proveniente de los quilomicrones remanentes y principalmente de la síntesis endógena, son requeridos para el ensamblaje y la secreción de VLDL, en un proceso similar a la formación de los quilomicrones en el enterocito [68]. La composición de VLDL varía según la cantidad de lípidos en la célula, modificando su tamaño, sin variar el número de partículas liberadas [69]. Las VLDL son secretadas a circulación donde los triglicéridos asociados son hidrolizadas por acción de lipoprotein lipasa liberando ácidos grasos libres, proceso que lleva a la formación de VLDL remanentes o IDL, las cuales están enriquecidas en ésteres de colesterol. Aproximadamente el 50% de las IDL son removidas desde la circulación por el hígado, por medio de la unión de Apo E con R-LDL, proceso similar a la remoción de los quilomicrones remanentes [59]. Los triglicéridos de las IDL que permanecen en circulación siguen

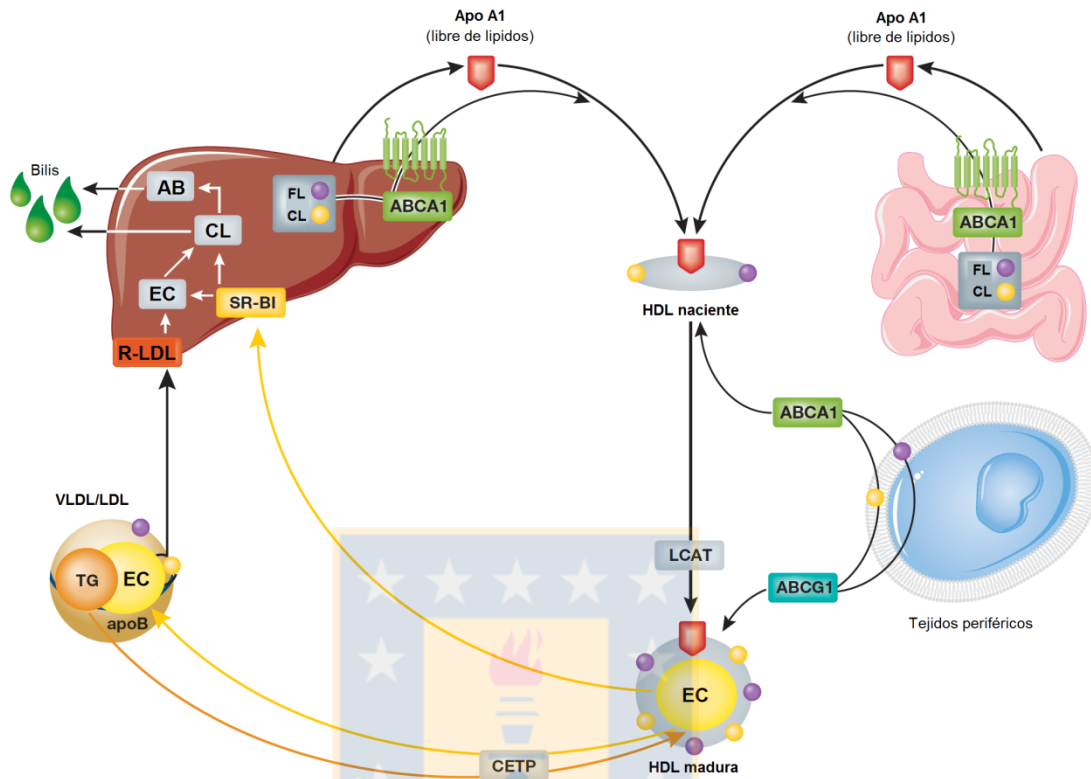
hidrolizándose y las apolipoproteínas intercambiables presentes en IDL son traspasadas a otras lipoproteínas, formando las LDL. Las LDL son macrocomplejos altamente enriquecidos en colesterol y que sólo presentan una partícula de Apo B en su estructura. Su tamaño y densidad dependen del contenido de colesterol que presentan [59]. La LDL circulante interactúa mediante Apo B con R-LDL, presente en la superficie de la mayoría de las células de mamíferos. El R-LDL es sintetizado en el RE y se sitúa en la superficie celular, donde interactúa con LDL endocitándola para su degradación [70]. El colesterol liberado desde las LDL es utilizado para distintos procesos celulares y activa mecanismos regulatorios para mantener los niveles de colesterol intracelular requeridos por la célula. Siendo el responsable de suprimir la actividad de la enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A reductasa (HMG CoA reductasa) [71], clave en la producción endógena de colesterol. La inhibición de esta enzima se lleva a cabo a distintos niveles que incluyen la supresión del gen que la transcribe, a través de la vía de la proteína de unión al elemento regulador de esteroides (SREBP) y la aceleración de su degradación [71]. Además, se genera un *feedback* negativo con el cual se inhibe la transcripción del R-LDL, y al mismo tiempo se activan enzimas como acil-CoA-colesterol-O-aciltransferasa (ACAT), esterificadoras de colesterol, que permiten el almacenamiento de éste como gotas de lípidos en el citoplasma [71].

Por otro lado, los lípidos acumulados en los tejidos periféricos pueden alcanzar la circulación sanguínea y ser excretados por la vía biliar, proceso

denominado transporte reverso de colesterol (Figura 2). Este proceso se lleva a cabo por la acción de HDL, Lp altamente heterogénea en su composición y sus propiedades estructurales, químicas y biológicas. Se han descrito 2 subclases de HDL, según su densidad: HDL<sub>2</sub> (1,063–1,125 g/mL) la menos densa y HDL<sub>3</sub> (1,125–1,210 g/mL) de mayor densidad [72]. Cada subclase se ha descrito también por su tamaño, que permite una segunda clasificación, según el diámetro de la partícula: HDL<sub>3C</sub> (7,2–7,8 nm), HDL<sub>3B</sub> (7,8–8,2 nm), HDL<sub>3A</sub> (8,2–8,8 nm), HDL<sub>2A</sub> (8,8–9,7 nm) y HDL<sub>2B</sub> (9,7–12,0 nm) [73]. Más aún, en cuanto a la migración electroforética puede ser clasificada en partículas de migración  $\alpha$  (HDL- $\alpha$ ), correspondiendo a la mayoría de las HDL circulantes y esféricas, y partículas de migración pre- $\beta$  (pre  $\beta$  HDL) [74], que corresponden a las partículas discoidales nacientes y las HDL pobremente lipidadas. De su composición proteica, aproximadamente el 70% corresponde a Apo A1 y un 20% a Apo A2 [75]. Apo A1, sintetizada a nivel de hepatocitos y enterocitos, es secretada libre de lípidos a la circulación sanguínea e interactúa con el receptor *ATP binding cassette* subfamilia A tipo 1 (ABCA1) en la membrana celular, activando el eflujo de colesterol y fosfolípidos desde la célula a la molécula de Apo A1, llevando a la formación de HDL nacientes o pre  $\beta$  HDL [76]. La presencia de Apo A1 en HDL activa la enzima lecitin-colesterol-aciltransferasa (LCAT), que esterifica el colesterol captado y promueve la formación de HDL madura, por la migración de los ésteres de colesterol al core de la partícula, aumentando su tamaño [77]. La transferencia de colesterol y

fosfolípidos hacia la HDL madura continua principalmente por la acción del receptor *ATP binding cassette* subfamilia G tipo 1 (ABCG1), que aumenta las concentraciones de colesterol en la membrana plasmática, permitiendo la difusión unidireccional a las moléculas de HDL [78]. Las HDL maduras circulantes llevan el colesterol hasta el hígado para su excreción, allí la interacción directa entre Apo A1 y el receptor *scavenger* clase B tipo 1 (SR-BI) permite la captación selectiva del colesterol esterificado desde las HDL a la membrana celular del hepatocito [79, 80]. De forma alternativa, la acción de la proteína de transferencia de colesterol esterificado (CETP), permite el intercambio de ésteres de colesterol presentes en HDL por TG presentes en complejos macromoleculares que contienen Apo B (VLDL, IDL, LDL), las que por medio de la interacción con el R-LDL, entregan el colesterol esterificado al hígado donde es excretado [81, 82].





**Figura 2. Transporte reverso de colesterol.** La Apo A1 libre de lípidos es secretada por el hígado y el intestino, adquiriendo colesterol libre (CL) a través del transportador ATP *binding cassette* subfamilia A tipo 1 (ABCA1) hepático e intestinal. La lipoproteína de alta densidad (HDL) nascente capta más CL desde tejidos periféricos y lipoproteínas ricas en triglicéridos (TG). La enzima lecitín-colesterol-acil-transferasa (LCAT) asociada a HDL esterifica parte del LC generando ésteres de colesterol (EC), formando así el núcleo hidrofóbico de la partícula HDL. Esta lipoproteína acepta más CL y fosfolípidos (FL) a través de la interacción con transportador ATP *binding cassette* subfamilia G tipo 1 (ABCG1), formando la HDL madura. El colesterol asociado a HDL se transfiere directamente al hígado a través del receptor *scavenger* clase B tipo 1 (SR-B1) hepático o después de la transferencia mediada por la proteína de transferencia de colesterol esterificado (CETP) a lipoproteínas de muy baja y baja densidad (VLDL/LDL) a través del receptor de LDL hepático, para ser metabolizado y eliminado en forma de ácidos biliares (AB) a través de bilis. Fuente: Modificado de [83].

## 4.2. LDL y aterosclerosis

La disfunción endotelial conlleva a una expresión de moléculas de adhesión, moléculas quimiotácticas y a un aumento de permeabilidad de las células endoteliales, lo cual conlleva la entrada de complejos macromoleculares como LDL, la cual es retenida por la unión de Apo B a los proteoglicanos en la matriz extracelular [84]. En este lugar, LDL es altamente susceptible a modificaciones, generándose una oxidación progresiva de la LDL nativa a LDL mínimamente oxidada y, finalmente, a LDL oxidada (LDLox) [85]. LDLox promueve el proceso aterosclerótico por una serie de mecanismos y su efecto es mediado por distintos receptores *scavenger* como CD36 y *lecitin-like oxidized LDL receptor-1* (Lox-1). El primero tiene un rol limitado en la patogénesis de la enfermedad, cobrando mayor importancia en placas inestables y en presencia de co-morbilidades, como insulino-resistencia y diabetes. Lox-1, por su parte, se expresa mayormente en un ambiente pro-inflamatorio, jugando un rol crucial en la patogénesis de la aterosclerosis y siendo regulado positivamente por la misma LDLox [86]. Este receptor se expresa en todas las células esenciales en el proceso aterosclerótico: células endoteliales, células del músculo liso, macrófagos y plaquetas, generando la mayoría de los procesos patológicos de la enfermedad [87]. Así, LDLox promueve el reclutamiento, activación y proliferación de monocitos-macrófagos en el sitio de la lesión, los macrófagos fagocitan y procesan las moléculas de LDLox por medio de este receptor y otros receptores tipo *scavenger* como SR-A

y CD36. Ninguno de éstos es capaz de generar *feedback* negativo frente al aumento de concentración intracelular de colesterol, por lo cual no hay una inhibición del proceso. Los lípidos son almacenados como colesterol esterificado en vesículas citoplasmáticas generadas en el RE por acción de ACAT. La excesiva entrada y almacenamiento resulta en la formación de células de espuma, y la sobrecarga del RE produce estrés celular conduciendo a la apoptosis. Estos procesos, en conjunto con la eferocitosis, contribuyen al *core* necrótico de la placa [88, 89]. Además, la acción de LDLox favorece la formación de la placa por: 1) Aumenta la expresión de factores de crecimiento por las células endoteliales y macrófagos. Estos factores estimulan la migración y posterior proliferación de células musculares lisas, y promueven la producción de colágeno por estas mismas células contribuyendo a la formación de tejido fibroso y aumentando el grosor de la placa. 2) promueve la secreción de metaloproteinasas que degradan esta capa fibrótica, volviendo el ateroma más vulnerable a ruptura. 3) Produce un efecto citotóxico en las células endoteliales llevando a la apoptosis y contribuyendo a la formación del *core* necrótico. 4) Genera disminución de la producción de NO causando la activación y adhesión plaquetaria, lo que promueve procesos trombóticos. Todo esto en su conjunto, lleva a la progresión y complicación de las placas ateroscleróticas [90]. La fisiopatología descrita anteriormente, permite catalogar a la LDLox como una molécula altamente aterogénica. Además, la LDL, principalmente las partículas pequeñas y densas, que debido a su menor tamaño, presentan un mayor

alcance del subendotelio y una menor capacidad para interactuar con el R-LDL, es susceptible a mayores modificaciones, por lo cual presenta un mayor poder aterogénico y aumenta el riesgo de padecer un evento cardiovascular [91].

Las concentraciones séricas elevadas de C-LDL por tanto, se presentan como un factor de riesgo cardiovascular de alta importancia en el área clínica, siendo C-LDL recomendado para ser aplicado como el primer marcador en la guía de manejo de lípidos, tanto en prevención primaria (sin ECV previa) como en prevención secundaria (posterior a un evento cardiovascular) y/o en presencia de otros factores de riesgo. Así distintas concentraciones de C-LDL se proponen como objetivos terapéuticos, según el número de factores de riesgo del paciente, teniendo siempre como meta disminuir la concentración de colesterol, para disminuir el riesgo de ECV del paciente [54].

### **4.3. HDL y aterosclerosis**

HDL se ha asociado a una serie de funciones anti-aterogénicas, por su rol en el transporte reverso de colesterol y por la acción de diferentes moléculas que son parte de su composición. La función más importante está asociada al transporte reverso de colesterol, que como se describió anteriormente, permite el eflujo de colesterol hacia HDL para su excreción. Por esto, debido a que en el ambiente patológico del proceso ateromatoso, la captación de colesterol en los

macrófagos está altamente aumentada, en perjuicio de su salida, la acción de HDL para eliminar el colesterol acumulado, es crucial [92]. Más aún, este macrocomplejo contribuye a la homeostasis vascular por una serie de mecanismos, tales como; promover la vaso-relajación, inhibir la activación endotelial y favorecer la reparación del endotelio, a través de la activación de eNOS y la producción de NO, vía receptor SR-BI [93, 94], lo cual representa una vía de señalización clave para la migración y proliferación de las células endoteliales [95]. Además, esta interacción Apo A1/SR-BI facilita la interacción de esfingosina-1-fosfato, lípido asociado a HDL, con sus receptores S1P1, S1P2 y S1P3, activando vías de señalización vía proteína G, que también promueve migración y proliferación de células endoteliales, inhibición de la migración y la producción de ROS por parte de las células del músculo liso, e inhibición de vías de señalización pro-inflamatorias en los macrófagos [96, 97]. Sumado a esto, se le asocian funciones anti-inflamatorias, anti-oxidantes y anti-trombóticas. Por un lado, inhibe cascadas de señalización de ERK, NF- $\kappa$ B y AP-1, que llevan a la disminución en la expresión de moléculas de adhesión como VCAM-1 ICAM-1 y E-selectina, de proteínas como la proteína quimiotáctica de monocitos en las células endoteliales activadas y la liberación de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 y TNF- $\alpha$ , que llevan a la inhibición del reclutamiento de células inmunes y disminución del ambiente pro-inflamatorio [98, 99]. Por otro lado, por medio de la acción de CETP y debido a que las oxidaciones hacen más hidrofílicos los lípidos, promoviendo la migración hacia la superficie de la

LDLox, se facilita la transferencia de estos lípidos a HDL, la cual presenta en su composición enzimas antioxidantes como paraoxonasa 1, Factor acetilhidrolasa activador de plaquetas y LCAT, que reducen la oxidación de estos lípidos [100, 101], siendo paraoxonasa 1 la más estudiada para estos efectos [102]. Otras modificaciones, como la glicación, también disminuyen por acción de HDL [103]. Finalmente, se ha descrito que HDL inhibe la agregación plaquetaria [104] y síntesis de moléculas como tromboxano A2 y que, al mismo tiempo, estimula la síntesis de prostaglandinas que actúan sinérgicamente con NO, aumentando la relajación vascular, disminuyendo la activación plaquetaria y disminuyendo los factores de crecimiento que estimulan la proliferación de células del músculo liso [105].

Frente a la cantidad de funciones beneficiosas que se han asociado a la HDL, es que esta molécula es considerada anti-aterogénica. Los niveles de C-HDL plasmáticos, se han correlacionado inversamente con el riesgo de padecer un evento cardiovascular. Es así como una alta concentración de C-HDL en sangre, se considera una protección frente al riesgo de padecer un evento cardiovascular [106, 107]. Más aún, en pacientes con tratamiento para disminuir C-LDL, igualmente presenta un riesgo residual si tiene bajas concentraciones de C-HDL, ya que corresponde a un factor independiente de riesgo [108]. Así, el MINSAL presenta como un objetivo terapéutico principal en el tratamiento de pacientes dislipidémicos, la disminución de CT y C-LDL, pero también pone énfasis en metas adicionales para un tratamiento integral, que incluyen elevar

los niveles de C-HDL > 35 mg/dL en prevención primaria y C-HDL >45 mg/dL en prevención secundaria, para la disminución del riesgo cardiovascular [54].

## **5. Nuevos predictores de riesgo cardiovascular**

La búsqueda de nuevos biomarcadores para la estratificación de riesgo en la ECV está constantemente siendo analizado, con el objetivo de mejorar la predicción de un evento, los diagnósticos y/o los tratamientos a seguir [109, 110]. En este contexto, las Apos han surgido como una alternativa al colesterol asociado a Lps en la predicción del riesgo cardiovascular. Particularmente, la determinación de Apo B y Apo A1, se sugieren como marcadores de riesgo cardiovascular en una serie de estudios clínicos y epidemiológicos, con un mejor poder predictivo que C-LDL y C-HDL, respectivamente [111, 112], o a lo menos con igual o similar poder predictivo [113]. Sin embargo, es necesario desarrollar mejores métodos de cuantificación a bajo costo, con una correcta estandarización y validación tanto del método analítico como de los rangos de concentración de consenso para su implementación en determinaciones de rutina [114].

### **5.1. Apolipoproteína B**

Apo B corresponde a una proteína no intercambiable que se presenta en el humano de dos formas derivadas del mismo gen: Apo B-48, proteína

truncada, sintetizada en los enterocitos y parte fundamental de los quilomicrones y, Apo B-100, proteína completa sintetizada en los hepatocitos y mayor componente proteico de VLDL, IDL y LDL. Apo B es una proteína de 4.536 aminoácidos y un peso molecular de 550 kD, codificada a partir del gen *APOB* ubicado en el cromosoma 2p24.1, que incluye 28 exones [115]. Corresponde a una proteína monomérica altamente insoluble en soluciones acuosas y que dentro de su estructura presenta 5 dominios con motivos  $\alpha$ -hélices y láminas- $\beta$  anfipáticas que permiten una fuerte asociación con lípidos [116]. La síntesis de esta proteína está regulada por la acción de insulina vía PI3K/AKT por múltiples mecanismos de degradación, que incluyen la degradación proteosomal, mediada por ER60, autofágica y lisosomal [117]. Cada lipoproteína presenta sólo una molécula de Apo B en su composición, que le permite su transporte hacia los tejidos extra-hepáticos por la circulación sanguínea, e interactuar con el receptor R-LDL para traspasar los lípidos de los complejos macromoleculares a las células, como se describió anteriormente.

## **5.2. Apolipoproteína A1**

Apo A1 corresponde a una proteína intercambiable, sintetizada principalmente en el hígado y en una menor proporción, en el intestino. Esta proteína se encuentra asociada a HDL, correspondiendo al 70% de su composición proteica, y está presente en menor porcentaje también en los



quilomicrones. Además, del total de su concentración plasmática, un 5-10% corresponde a Apo A1 libre de lípidos, la cual es clave para la interacción con el transportador ABCA1 y la formación de HDL [118]. Apo A1 es una proteína de 243 aminoácidos y un peso molecular de 28 kDa codificada en el gen *APOA1* del cromosoma 11q23.3 [119]. Corresponde a una molécula soluble en agua, que presenta en su estructura una región N-terminal de 44 aminoácidos y una región C-terminal que consta de 8  $\alpha$ -hélices de 22 aminoácidos cada una y 2  $\alpha$ -hélices de 11 aminoácidos cada una, los que permiten la unión a lípidos por sus características anfipáticas [118]. Se han publicado estudios que indican que moléculas como 17- $\beta$ -estradiol y genisteína, un fitoestrógeno, regulan positivamente la expresión de esta proteína, vía MAP quinasa [120]. Apo A1 corresponde a una molécula crucial para llevar a cabo las funciones anti-aterogénicas antes descritas para HDL, por su interacción con ABCA1 y SR-BI.

### **5.3. Apo B y ApoA1: predictores de riesgo cardiovascular**

La determinación de Apo B y Apo A1 para mejorar la estratificación de riesgo cardiovascular, se soporta en una serie de estudios publicados hace más de 20 años.

En el caso de Apo B, es importante destacar que debido a que cada lipoproteína presenta solo una molécula de esta proteína, su determinación sérica permite estimar el número de partículas circulantes de las lipoproteínas

que la contienen [121], a diferencia de la determinación de colesterol, que varía su concentración en cada partícula por la alta heterogeneidad de éstas [56]. Sumado a las complicación de la determinación de C-LDL en un laboratorio clínico, ya sea por las limitaciones del cálculo por la fórmula de Friedewald, o las dificultades de implementar una medición directa de C-LDL, la Apo B se presenta como un alternativa y una opción más precisa para la determinación de riesgo cardiovascular [122]. Existe gran cantidad de estudios poblacionales que comparan la determinación de Apo B con otros parámetros lipídicos, principalmente con C-LDL y colesterol no HDL (C-no HDL), para la determinación de riesgo cardiovascular, los cuales indican que Apo B sería un buen marcador de riesgo y mejor que el colesterol asociado a estas partículas [123-126]. Más aún, en individuos dislipidémicos, la Apo B aumentada sería un marcador de riesgo más apropiado que C-LDL, lo cual se refleja en que estos individuos presentarían un mayor perfil de riesgo, asociado a mayor obesidad abdominal, resistencia a la insulina y/o C-HDL disminuido [127, 128]. Además, se describe una relación directa entre la disminución de Apo B y la disminución del volumen de las placas ateroscleróticas [129]. Aunque también existen revisiones que sostienen que la Apo B sería un buen marcador, pero que falta investigación y consensos para su implementación, poniéndola por debajo de parámetros como C-no HDL [130], mientras que otros grupos proponen sumarla al panel de lípidos de rutina para evaluar pacientes con riesgo [131]. En relación a los objetivos terapéuticos, pacientes con tratamientos farmacológicos para

disminuir los niveles de colesterol, presentaron una reducción en los valores de Apo B, pero esta disminución no permitió mejorar la predicción de riesgo cardiovascular sobre la predicción dada por la determinación de C-LDL y C-no HDL [132].

Apo A1 por su parte, cobra gran relevancia por su acción protectora del endotelio, ya que en todas las funciones anti-aterogénicas descritas para HDL, esta proteína juega un rol crucial. Más aún, se plantea como un marcador de riesgo independiente sobre todo para individuos estratificados con bajo riesgo de ECV [133]. Incluso, se ha propuesto a la Apo A1 como un mejor marcador de riesgo que C-HDL, C-LDL e inclusive que Apo B en una población de ancianos, estudio realizado en Suecia, publicado el año 2006 [134]. En la mayoría de estos estudios se demuestra que el uso en conjunto de estas dos apolipoproteínas, en la forma de relación Apo B/Apo A1, presentaría un mayor poder predictivo, ya que reflejaría el equilibrio de colesterol entre lípidos aterogénicos y no aterogénicos [135]. En relación a la disminución de la progresión de la enfermedad en individuos en tratamiento con estatinas, los niveles de Apo A1 aumentados se relacionan inversamente con la formación de la placa [136]. Más aún, debido a la función fisiológica de esta proteína, existe una gran cantidad de trabajos que propone el uso de miméticos de Apo A1 como tratamiento para la aterosclerosis [137-140]. En la actualidad existe, gran cantidad de miméticos en estudio, dentro de los que destaca el mimético D-4F [141, 142]. El tratamiento planteado, incluso se presenta como uso en conjunto

con estatinas, con lo cual también ha presentado resultados prometedores [143].

El uso en conjunto de estas dos apolipoproteínas ha sido ampliamente estudiado para distintas poblaciones, mostrándose como relación más fuertemente asociada al riesgo cardiovascular [111]. Se describen relaciones directas entre el aumento de CIMT con los niveles séricos aumentados de Apo B, disminuidos de Apo A1, y la relación Apo B/Apo A1 aumentada de forma significativa en población adulta sana [144] o la asociación de estos parámetros con el incremento de la rigidez arterial en población con síndrome metabólico [145]. En estudios transversales con individuos sanos, normolipémicos, se determinó esta relación Apo B/Apo A1, donde los individuos que presentaron valores elevados exhibían además un perfil aterogénico, demostrando la superioridad predictiva de esta relación en comparación con C-LDL [146, 147]. En pacientes que ya presentaron un evento cardiovascular, el aumento de la relación entre apolipoproteínas también estaría fuertemente asociado al riesgo relativo de infarto agudo al miocardio [148]. Por otro lado, en estudios longitudinales, con un seguimiento de 13 años de hombres sanos, se determinó que la relación Apo B/Apo A1 es un factor independiente de predicción de riesgo de infarto agudo al miocardio, presentando gran poder predictivo en esta población [149]. En otro estudio de seguimiento a niñas desde los 9 a los 19 años, se determinó una asociación positiva entre el aumento de la relación Apo B/Apo A1 con el aumento del IMC, TG y síndrome metabólico, presentando un

enfoque para la prevención primaria de ECV [150]. Inclusive la relación Apo B/Apo A1 se ha asociado a la evaluación de estenosis coronaria en pacientes con ECV [151] y con el riesgo de accidentes cerebrovasculares en individuos mayores de 70 años [152]. Más aún, investigadores han demostrado que la relación Apo B/Apo A1 es significativamente mejor predictor de riesgo que relaciones que asocian las determinaciones de colesterol (TG/HDL, C-LDL/C-HDL, no C-HDL/C-HDL) [153]. Uno de los estudios longitudinales más grandes con respecto a estos parámetros corresponde a AMORIS (Apolipoprotein-related Mortality Risk), a cargo de Walldius *et al.*, en el cual se investigó Apo B y Apo A1 como factores de riesgo para infarto agudo al miocardio con resultado de muerte, en una población mayor a 120 mil individuos mayores de 40 años, con un seguimiento promedio de 98 meses. Este estudio demostró la elevada sensibilidad y especificidad de estos parámetros en relación al colesterol asociado a LDL y HDL [154-156].

## **6. Determinación de riesgo de enfermedad cardiovascular en niños y adolescentes**

La pesquisa de parámetros que determinen riesgo cardiovascular a temprana edad cobra gran relevancia, al considerar que el proceso aterosclerótico se inicia de forma prematura. Es así como se han documentado diversos estudios que enfocan su trabajo en poblaciones jóvenes. Estos estudios van desde demostrar los efectos beneficiosos de la actividad física en

niños para la prevención de un futuro evento cardiovascular [157, 158], hasta la pesquisa de los distintos factores de riesgo a temprana edad, siendo la prevalencia de obesidad uno de los mayormente estudiados, ya que predispone a un incremento del riesgo de morbilidad y mortalidad por ECV en la vida adulta [159, 160]. Más aún, en las pautas propuestas por el grupo de expertos en salud cardiovascular de niños y adolescentes del *National Heart Lung and Blood Institute* (NHLBI) [32], donde se discute sobre la salud cardiovascular y la disminución de riesgo en niños y adolescentes, se exponen varias propuestas para estos efectos, destacando la importancia del mayor riesgo de ECV futura en niños y adolescentes que presentan historia familiar de ECV precoz y planteando la necesidad de pesquisar la presencia de dislipidemias en forma temprana, proponiendo un cribado universal a los 10 años de edad. Además, se indica que se debe incluir dentro de las determinaciones del perfil lipídico, las concentraciones de Apo B y Apo A1 para una mejor estimación de riesgo. Para ello, el grupo de expertos definió los rangos de referencia de lípidos, colesterol en lipoproteínas y apolipoproteínas para niños y adolescentes (Tabla 3).

Es importante destacar que frente a las recomendaciones del grupo de expertos mencionadas, existen estudios que han relacionado el perfil lipídico con la antecedentes familiares de ECV precoz en niños y adolescentes sin otros factores de riesgo asociados, los cuales presentaron concentraciones plasmáticas de Apo B significativamente aumentadas y concentraciones plasmáticas de Apo A1 significativamente disminuidas en relación a una

población control sin estos antecedentes, destacando que no se pudo determinar significancia en ningún otro parámetro lipídico cuantificado, lo cual reafirma lo planteado por los expertos del NHLBI [161, 162].

**Tabla 3. Rangos de concentraciones plasmáticas aceptable, límite y alto para lípidos, lipoproteínas y apolipoproteínas definidos por NHLBI.** Fuente: [32].

<b>Categoría</b>	<b>Aceptable</b>	<b>Límite</b>	<b>Alto</b>
<b>Colesterol total</b> (mg/dL)	< 170	170 - 199	≥ 200
<b>LDL-C</b> (mg/dL)	< 110	110 - 129	≥ 130
<b>No C-HDL</b> (mg/dL)	< 120	120 - 144	≥ 145
<b>Apo B</b> (mg/dL)	< 90	90 - 109	≥ 110
<b>TG</b> (mg/dL)			
0-9 años	< 75	75 - 99	≥ 100
10-19 años	< 90	90 - 129	≥ 130
<b>Categoría</b>	<b>Aceptable</b>	<b>Límite</b>	<b>Alto</b>
<b>HDL-C</b> (mg/dL)	> 45	40 - 45	< 40
<b>Apo A1</b> (mg/dL)	> 120	115 - 120	< 115

## 7. Métodos de cuantificación de Apolipoproteínas

La cuantificación de Apo B y Apo A1 se presenta como una mejora en la estratificación de riesgo cardiovascular de la población. Es por esto, que en el año 1989, la *International Federation of Clinical Chemistry* (IFCC) realizó la primera reunión en conjunto con un grupo de expertos, para la discusión de problemas en la determinación inmunoquímica de estas proteínas, con el objetivo de proporcionar un protocolo de consenso para su estandarización

[163]. A pesar de ello, a la fecha los métodos analíticos para la determinación de Apo B y Apo A1 en suero o plasma, han presentado complicaciones para su estandarización, validación y su implementación en el laboratorio asistencial. Los métodos utilizados para estas cuantificaciones son en su mayoría de naturaleza inmunoquímica e incluyen: inmunodifusión radial, radioinmunoensayos, electroinmunoensayos, inmunoturbidimetría, inmunonefelometría y ensayos de inmunoabsorción asociados a enzimas (ELISA), siendo los tres últimos, los más utilizados.

La base de los ensayos de inmunoquímica son las reacciones inmunológicas, los cuales han sido ampliamente utilizados para el reconocimiento específico de proteínas de forma cualitativa como cuantitativa [164]. Existen dos tipos de anticuerpos (Acs), ambos utilizados para diagnóstico clínico: 1) Acs tipo policlonal, que corresponde a una mezcla de inmunoglobulinas producidas a partir de múltiples clones de células B para un antígeno específico, que reaccionan con distintos epitopes de éste; 2) Acs tipo monoclonales, correspondientes a inmunoglobulinas producidas por un clon de célula B que reconoce con un epitope único de este antígeno [165]. El uso de estos Acs presenta ventajas y desventajas: los Acs policlonales presenta una mayor afinidad, tolerancia a los cambios en el antígeno, mayor robustez de los resultados y un menor costo de producción; sin embargo, la reproducibilidad y la especificidad que le proporciona al ensayo baja. Por otro lado, los anticuerpos monoclonales presentan una alta especificidad y reproducibilidad, y



a pesar de que su costo de producción es mayor, la obtención se realiza a partir de líneas celulares inmortales, por lo cual es posible la obtención ilimitada de anticuerpos de las mismas características; a pesar de esto, su mayor inconveniente es la poca tolerancia a los cambios en el antígeno [166]. El balance entre estos aspectos para cada tipo de anticuerpo, en relación al objetivo del ensayo, determinará cuál es el mejor a utilizar. En la actualidad, la mayoría de los ensayos para la determinación de Apo A1 y Apo B corresponde a métodos nefelométricos y turbidimétricos que utilizan anticuerpos policlonales. En este trabajo se propone el uso de anticuerpos de tipo monoclonal en inmunoensayos para la determinación de estas proteínas, como un mejor método de cuantificación que los anteriores, con la finalidad de mejorar la cuantificación de estas Apos y utilizarlas en la población definida para este estudio.

## PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Apo B y Apo A1 se proponen como marcadores para la estratificación de riesgo cardiovascular superiores a las determinaciones de lípidos asociados a lipoproteínas. Las determinaciones de estas Apos se han relacionado con factores de riesgo no modificables como la historia familiar de enfermedad cardiovascular precoz, que sumado al valor de la detección temprana de riesgo cardiovascular, se presentan como un importante foco de estudio para determinar el riesgo cardiovascular de nuestra población.

En la actualidad, se desconocen las concentraciones séricas de Apo A1 y Apo B en niños y adolescentes con antecedente familiar de enfermedad cardiovascular precoz en la población chilena, y su relación con la estimación de presentar un mayor riesgo de padecer enfermedad cardiovascular. Por lo cual surge la interrogante:

¿Cómo se encontrarán las concentraciones séricas de Apo B y Apo A1 en niños y adolescentes con antecedente familiar de enfermedad cardiovascular precoz en nuestra población?

## **HIPÓTESIS**

Las concentraciones séricas de Apo B y Apo A1 se encuentran disminuidas y aumentadas, respectivamente, en niños y adolescentes con historia familiar de enfermedad cardiovascular precoz en nuestra población, lo que determina un mayor riesgo de futura enfermedad cardiovascular.

## **OBJETIVO**

Determinar las concentraciones séricas de Apo B y Apo A1 en niños y adolescentes con historia familiar de enfermedad cardiovascular precoz.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1. Estandarizar y validar un método inmunoenzimático para la cuantificación de Apo B y Apo A1 sérica.**

En el primer objetivo se obtuvo, purificó y caracterizó anticuerpos monoclonales (AcMs) para Apo B y Apo A1 a partir de hibridomas producidos en el mismo laboratorio, estableciendo las condiciones que permitieron estandarizar y validar el mejor método inmunoenzimático para la cuantificación sérica de estas proteínas.

**2. Cuantificar Apo B y Apo A1 sérica en los niños y adolescentes de 2 a 19 años, que presenten antecedentes familiar de enfermedad cardiovascular precoz y en una población control de niños y adolescentes.**

En este objetivo se utilizarán los inmunoensayos estandarizados y validados en el primer objetivo para cuantificar Apo B y Apo A1 en una población de niños y adolescentes de entre 2 a 19 años que presentan antecedentes del padre o la madre con un evento cardiovascular precoz. Estos resultados serán comparados con una población de niños y adolescentes de iguales edades sin esta condición.

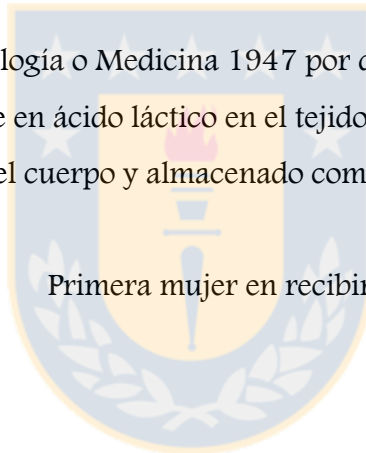
**3. Analizar y correlacionar las concentraciones obtenidas de Apo B y Apo A1 con parámetros clínicos, antropométricos y bioquímicos, y determinar su contribución como marcadores de riesgo cardiovascular a temprana edad.**

El último objetivo consistió en la evaluación estadística de los datos obtenidos tanto de la población en estudio como en la población control, analizando y correlacionando todos los parámetros conocidos de ambas poblaciones con el fin de estimar diferencias significativas que permitan determinar la contribución de Apo B y Apo A1 como marcador de riesgo cardiovascular temprano para la población en estudio.

**Gerty Cori** (Praga, 1896 - 1957) Bioquímica.

Premio Nobel de Fisiología o Medicina 1947 por descubrir el mecanismo por el cual el glucógeno se convierte en ácido láctico en el tejido muscular y luego resintetizado en el cuerpo y almacenado como fuente de energía (ciclo de Cori).

Primera mujer en recibir el Nobel de Fisiología o Medicina.



## MATERIALES Y METODOS

### 1. Antígenos Apo B y Apo A1

#### 1.1. Extracción de lipoproteínas LDL/HDL

LDL nativa (LDL<sub>n</sub>) y HDL nativa (HDL<sub>n</sub>) fueron obtenidas a partir de plasma humano mediante el método de ultracentrifugación con ajuste de densidad [55]. Para ello se obtuvieron muestras de sangre venosa de voluntarios sanos, normolipémicos y normoglicémicos en ayuno, de entre 20 y 28 años de edad, procedimiento realizado en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción. Se obtuvo una muestra de 50 mL de sangre periférica en EDTA 1 mg/mL como anticoagulante, por voluntario. Las muestras fueron centrifugadas a 1.000 g x 10 min. a temperatura ambiente, para la separación del plasma. El plasma se colectó formando un *pool*, al cual se le adicionó preservante de *Alaupovic* (ácido e-aminocapróico 1M, EDTA 10%, glutatión 5%, pen/strep 10.000 U/mL), en una relación 1:100 con el plasma. El *pool* se centrifugó a 145.000 g por 20 h a 15°C, proceso en el cual se obtuvo un anillo blanquecino correspondiente a la VLDL. Extraído el anillo de VLDL, se ajustó la densidad del infranadante a 1,063 g/mL con bromuro de potasio (Kbr) según la fórmula 1, y se centrifugó bajo las mismas condiciones anteriores, para obtener un marcado anillo amarillo-anaranjado correspondiente a la LDL. El anillo se extrajo y guardó para su posterior diálisis y cuantificación. La densidad

del infranadante fue nuevamente ajustada con KBr a 1,210 g/mL (fórmula 1), centrifugando a 185.000 g x 48 h, para así obtener el anillo de HDL, el cual fue extraído, y guardado para su diálisis y cuantificación.

Las lipoproteínas obtenidas se dializaron contra 2 L de *buffer* fosfato salino (PBS) 10 mM con a lo menos 10 cambios de tampón, a 4°C. Su contenido proteico se cuantificó por el método de Peterson [167] en el caso de LDLn y por el kit comercial Pierce BCA (*Thermo Scientific*) en el caso de HDLn. Las lipoproteínas fueron almacenadas a 4°C, en oscuridad y con burbujeo de N<sub>2</sub>.

La pureza del *pool* se testeó por medio de electroforesis en gel de agarosa 1% en tampón TBE (Tris 0,1 M, ácido bórico 0,1 M, EDTA 0,002 M) para LDLn y mediante electroforesis en gel denaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12% para HDLn.

**Fórmula 1.** Cálculo de bromuro de potasio para ajuste de densidad.

$$\text{Gramos de KBr} = \frac{(\text{densidad final} - \text{densidad inicial}) \times \text{Volumen}}{1 - (\text{densidad final} \times 0,315)}$$

## **1.2. Sueros controles y estándares de apolipoproteínas**

Para el estudio se contó con los siguientes sueros comerciales:

- Suero calibrador *TruCal Apo A1/B (DiaSys)*
- Suero control *Lyphochek assayed chemistry control levels 1 (BioRad)*
- Suero control de lípidos (*BioSystems*)

Además, se utilizaron estándares comerciales de Apo A1 y Apo B comerciales obtenidos del kit ELISA *R&D*, un péptido de Apo B (residuos 4105-4215), Apo A1 purificada (donación de Dr. Laurent Martínez, laboratorio de Toulouse, Francia) y Apo A1 por delipidación de HDL<sub>n</sub> extraída en el laboratorio, según lo descrito en bibliografía. [168]

## **2. Anticuerpos monoclonales anti-Apo A1 y anti-Apo B**

### **2.1. Descongelamiento de hibridomas**

El laboratorio de Bioquímica Clínica e Inmunología, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, cuenta con un set de hibridomas productores de AcMs, producidos en proyectos anteriores y disponibles para su utilización, los cuales se mantienen congelados en tanques con nitrógeno líquido. Los viales con hibridomas productores de AcMs anti-Apo A1 y anti-Apo B, fueron retirados y se descongelados agitando suavemente en agua tibia. Luego, se centrifugaron a 160 g. x 5 min. descartándose por completo el medio



DMSO/suero fetal bovino (SFB). El *pellet* fue resuspendido y se le añadió 1 mL de medio DMEM (*Gibco*). Se tomó una alícuota y se le agregó igual volumen de azul de Coomassie para determinar la viabilidad celular mediante observación microscópica y recuento en cámara de Neubauer. Los viales que presentaron mayor porcentaje de células viables fueron transferidos a botellas para su cultivo.

## 2.2. Cultivo de hibridomas

Se cultivaron los siguientes clones y subclones: 1C11B7, 8B12, 8A4, 2C10 productores de anticuerpos para Apo A1, y 2F4(1)E7, 8G12B4, 4E9 y 7G10 para Apo B. El cultivo se realizó a 37°C de temperatura, 10% de CO<sub>2</sub> y medio de cultivo DMEM suplementado al 10% v/v de SFB, L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, Hepes 1 mM, 2-mercaptoetanol 0,5 mM, penicilina 100 U/mL y estreptomicina 100 µg/mL. Además, en el primer traspaso a frascos de cultivo desde los viales descongelados, se le adicionó “*feeder*” para estimular la proliferación y viabilidad celular.

El *feeder* corresponde a una suspensión de células de bazo de ratón (cepa BALB/c) no inmunizado, las cuales se obtuvieron extirpando el bazo de un ratón, y perfundiéndolo con medio DMEM. Posteriormente, se centrifugó a 400 g x 10 min., el *pellet* fue resuspendido en 7 a 10 mL de medio DMEM suplementado, se dejó a temperatura ambiente toda una noche para su utilización al día siguiente y dentro de las 48 h de obtenido.

### **2.3. Reactividad de anticuerpos monoclonales**

Se determinó la producción y reactividad de los AcMs en el sobrenadante de cultivo de los hibridomas por el método de ELISA indirecto, utilizando como antígenos LDLn o HDLn y Apo A1 libre, según correspondiera en cada caso, a una concentración de 10 µg/mL. Además, se usó albúmina humana 10 µg/mL como antígeno para determinar una posible reacción cruzada. En determinados casos, el volumen de sobrenadante se concentró utilizando polietilenglicol 20.000 y dializando frente a PBS 10 mM, para a continuación determinar en ellos, la producción y reactividad de los AcMs. Los hibridomas seleccionados se mantuvieron en cultivo para posteriormente ser inyectados en la cavidad peritoneal de ratones de la cepa BALB/c.

### **2.4. Determinación del isotipo de los anticuerpos monoclonales**

La determinación y/o confirmación del isotipo de los anticuerpos producidos por los clones en cultivo, se realizó utilizando un kit comercial (*ISO-2 de Sigma*). En una placa ELISA transparente y de poliestireno (*Maxisorp, Thermo Fisher Scientific*), utilizada en todos los inmunoensayos realizados, se sembró 100 µL/pocillo de LDLn o Apo A1 libre 10 µg/mL, la que se dejó sensibilizando a 4°C por toda la noche, en cámara húmeda. Se lavó 3 veces con PBS 10 mM-Tween-20 0,05%. Se sembró el sobrenadante de cultivo de cada hibridoma a testear en sextuplicado, para cada clase o subclase de

anticuerpo, adicionando 100  $\mu\text{L}$ /pocillo e incubando por 2 h a temperatura ambiente. Después de 3 lavados se agregó 100  $\mu\text{L}$ /pocillo de los correspondientes anticuerpos anti-Ig de ratón (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgA, IgM), producidos en cabra (*Sigma-Aldrich*), en el título 1/1.000, y se dejó incubando durante 30 min a temperatura ambiente. Se lavó nuevamente con PBS 10 mM-Tween-20 0,05% y se incubó por 15 min. a temperatura ambiente con 100  $\mu\text{L}$ /pocillo del conjugado anti-inmunoglobulina de cabra-HRP (*Sigma*). Se realizó el último lavado y se agregaron 100  $\mu\text{L}$ /pocillo de la solución sustrato orto-fenilendiamina (OPD) (OPD 0,04% p/v y 0,2  $\mu\text{L}/\text{mL}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 vol. en tampón fosfato/citrato pH 5) y luego de un tiempo máximo de 30 min. se detuvo la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20% v/v. La densidad óptica (D.O.) se determinó a 490 nm en el lector de placas *Synergy 2* (*BioTek*).

## **2.5. Producción de fluido ascítico**

Para la obtención de fluido ascítico, se dispuso de 5 ratones de la cepa BALB/c mayores a dos meses de edad, por cada clon o subclon. La compra de dichos animales se realizó al Instituto de Salud Pública de Chile, bajo las normativas específicas del Servicio Agrícola y Ganadero de Chile, cumpliendo con los parámetros y supervisión que exige dicha institución en sus normativas. El tratamiento y cuidado de los ratones se realizó bajo condiciones mínimamente invasivas, en las dependencias de la Facultad de Farmacia, sala

acondicionada para estos efectos. Previo a la inmunización, se inyectaron 0,5 mL de pristano por cada ratón en su cavidad peritoneal. Luego de 10 a 15 días de este procedimiento, se administraron 3 millones de células por cada ratón de los hibridomas 1C11B7, 8B12, 8A4, 2C10, 2F4(1)E7 y 8G12B4, suspendidos en 0,5 mL de suero fisiológico estéril. Transcurridos 10 a 15 días, dependiendo del clon, se obtuvo el fluido ascítico desde la cavidad peritoneal de los ratones inyectados, el cual se centrifugó a 3.000 g x 10 min. y se almacenó a -20°C. Los residuos biológicos generados fueron eliminados bajo la normativa del plan de manejo de residuos y sustancias peligrosas (MATPEL) de la Universidad de Concepción.

## **2.6. Precipitación de globulinas**

La precipitación de globulinas a partir de fluido ascítico se realizó con una solución saturada de sulfato de amonio ( $(\text{NH}_2)_2\text{SO}_4$ ) pH 7,0. Para esto, se calculó el volumen necesario de sulfato de amonio, según el volumen de fluido ascítico obtenido, para obtener una saturación del 45%, a partir de la fórmula 2. El sulfato de amonio se agregó gota a gota al fluido ascítico, el cual se mantuvo con agitación magnética constante en un recipiente con hielo. Luego de agregar el total de volumen de sulfato de amonio, el sistema se mantuvo en las mismas condiciones durante 2 h, para asegurar la precipitación completa de las globulinas presentes y, posteriormente, se dejó en reposo a 4°C, por toda la

noche. El precipitado obtenido se centrifugó a 3.000 g x 30 min. y se resuspendió en PBS 10 mM. Finalmente, se dializó la solución contra el mismo tampón durante 24 h a 4°C y se almacenó a -80°C. Las globulinas fueron cuantificadas por kit *DC™ (detergent compatible) protein assay (BioRad)* basado en el método de Lowry modificado.

**Fórmula 2.** Cálculo del volumen de sulfato de amonio para la precipitación de globulinas.

$$Vol (NH_2)_2SO_4 = \frac{\% Saturación\ final - \% Saturación\ inicial}{100 - \% Saturación\ final} \times Volumen_{liquido\ ascitico}$$

## 2.7. Purificación de los anticuerpos monoclonales

La purificación de los AcMs se realizó a partir de las globulinas precipitadas del líquido ascítico, mediante cromatografía de afinidad. Se utilizó una resina de agarosa-proteína G (*Thermo Scientific*), la cual presenta una elevada fuerza de interacción con anticuerpos de ratón de isotipo IgG<sub>1</sub>. En una pequeña jeringa plástica, se preparó la columna con la resina y tampón de unión (fosfato de sodio 0,01 M, cloruro de sodio 0,15 M, pH 7,0), se equilibró con 10 volúmenes del tampón y se dejó a flujo constante. Para la purificación, se sembró un volumen de globulinas calculado según la concentración de globulinas y la capacidad máxima de retención de la resina (20 mg/mL). Se lavó la columna con el mismo tampón de unión, colectando fracciones de 1mL y se

midió la D.O. a 280 nm. El procedimiento se realizó hasta que las fracciones llegaron a una D.O inferior a 0,05. Luego, se realizó un cambio de pH para eluir el anticuerpo con el tampón de elución (glicina 0,1 M, pH 3,0). Se siguieron colectando las fracciones, las cuales se neutralizaron con una gota de *buffer* Tris (Tris 1M, pH 8,0). Finalmente se formó un *pool* con las fracciones de mayor D.O. (> 0,8), las cuales se dializaron frente a PBS 10 mM por 24 h a 4°C. La cuantificación del anticuerpo puro se realizó con el kit *DC™ protein assay* (*BioRad*). El anticuerpo puro fue almacenado en alícuotas a -20°C.

## **2.8. Conjugación de anticuerpos con biotina**

Se dializó 1 mL (1 mg/mL) de anticuerpo contra 1 L de solución bicarbonato 0,1 M durante 24 h a 4°C. Luego, se adicionaron 10 µL de solución fresca de biotina 0,05 M en DMSO, lo que se incubó a temperatura ambiente con agitación constante por 1 h. Finalmente, se dializó la solución contra 2 L de PBS 10 mM durante 24 h a 4°C. Para su almacenamiento, se adicionó igual volumen de glicerol y se guardó a -20°C.

## **2.9. Titulación de anticuerpos monoclonales**

El título de cada uno de los anticuerpos se determinó mediante la técnica de ELISA indirecto. La placa de ELISA fue sensibilizada con 100 µL/pocillo de los antígenos LDLn, Apo A1 libre, HDLn o albúmina humana, a una

concentración de 10 µg/mL en PBS 10 mM, durante toda la noche a 4°C. Se lavó con tampón PBS 10 mM-Tween-20 0,05% por 5 min., tres veces, proceso que se repitió posterior a cada incubación. Se bloqueó la placa con 100 µL/pocillo de albúmina de suero bovino (BSA) 1% p/v en PBS 10 mM, durante 1 h. a 37°C. Posterior a los lavados, se adicionaron 100 µL/pocillo del anticuerpo en 8 diluciones seriadas, por duplicado cada una, y se incubó a 37°C por 1 h 20 min., seguido de los lavados correspondientes. Luego, se adicionaron 100 µL/pocillo de conjugado anti-inmunoglobulina G (IgG) de ratón Fc específico asociado a peroxidasa en el título 1/50.000 (*Sigma*) o avidina-HRP (*eBioscience*) en un título 1/1.000 para los anticuerpos conjugados con biotina, ambos se incubaron por 1 hora a 37°C. Luego se repitieron los lavados, se adicionaron 100 µL/pocillo de tampón sustrato OPD/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se incubó a 37°C por 20 min. La reacción se detuvo con una gota de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20% v/v y las lecturas de DO se realizaron a 490 nm en el lector de placas *Synergy 2* (*BioTek*).

### **3. Caracterización de AcMs anti-Apo B y anti-Apo A1 para estandarización de inmunoensayos**

#### **3.1. ELISA Sandwich para determinar reactividad de AcMs anti-Apo B**

Se sensibilizó una placa de ELISA con 100 µL/pocillo del clon 8G12B4 como anticuerpo de captura, a una concentración de 10 µg/mL para realizar una

curva de calibración, o en 4 concentraciones de 1,25 a 20  $\mu\text{g/mL}$  para la determinación de interacciones inespecíficas entre los AcMs de captura y de revelado utilizados. Esto se incubó a  $4^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche. Los lavados se realizaron 3 veces con PBS 10 mM-Tween-20 0,05%, 5 min. cada uno, lo cual se repite posterior a cada incubación. Se bloqueó la placa con 100  $\mu\text{L/mL}$  de Ovoalbúmina (OVA) 1% p/v en PBS 10 mM y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  por 1 h. Luego, se sembraron 100  $\mu\text{L/pocillo}$  de LDLn desde 0 - 10  $\mu\text{g/mL}$  para la curva de calibración y se incubó durante 1 h 20 min. a  $37^{\circ}\text{C}$ . Este paso no se realiza en el ELISA para determinar interacciones inespecíficas entre ambos anticuerpos. Posteriormente, se adicionó 100  $\mu\text{L/pocillo}$  del anticuerpo de revelado, clon 2F4(1)E7 conjugado con biotina en el título 1/500 para la curva, y en los títulos 1/500, 1/1.000 y 1/2.000 para la determinación de interacciones inespecíficas y se incubó durante 1 h a  $37^{\circ}\text{C}$ . Luego, se sembraron 100  $\mu\text{L/pocillo}$  de avidina-HRP (*eBioscience*) en un título 1/1.000 por 1 h a  $37^{\circ}\text{C}$ . Finalmente, se adicionaron 100  $\mu\text{L/pocillo}$  de sustrato OPD/ $\text{H}_2\text{O}_2$ , se dejó a temperatura ambiente por 20 min., la reacción se detuvo con una gota de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  20% v/v y se detectó la D.O. a 490 nm, en el lector de placas *Synergy 2 (BioTek)*.

### **3.2. ELISA de competencia para evaluar la reactividad de anticuerpos 8B12 y 8A4**

Se sensibilizaron dos placas de ELISA con 100  $\mu\text{L/pocillo}$  de Apo A1 libre 10  $\mu\text{g/mL}$ , las que se incubaron a  $4^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche. Los lavados de la



placa se realizaron 3 lavados, la primera placa se lavó con PBS 10 mM-Tween-20 0,05%, para condiciones denaturantes, y la segunda con PBS 10 mM, para condiciones no denaturantes, ambas por 5 min cada uno, lo cual se repite posterior a cada incubación. Ambas placas fueron bloqueadas con caseína 1% p/v en PBS 10 mM, durante 1 h a 37°C. En paralelo se prepararon soluciones antígeno/anticuerpo con una dilución constante de anticuerpo, con 8B12 y 8A4 ambos en el título 1/250, y concentraciones de HDL 0 - 0,8 - 1,6 – 3,1 – 6,3 – 12,5 – 25 - 50 µg/mL para cada AcM, en presencia y en ausencia de tween-20, las que fueron incubadas a 37°C durante 1 h, Luego se sembraron en la placa 100 µL/pocillo de cada solución, para su respectiva condición, y se incubaron durante 1 h. 20 min. a 37°C. Luego se adicionaron 100 µL/pocillo de conjugado anti-IgG de ratón Fc específico asociado a peroxidasa en el título 1/50.000 (*Sigma*). Finalmente, se adicionaron 100 µL/pocillo del sustrato OPD/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se incubó a 37°C por 20 min. La reacción se detuvo con una gota de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20% v/v y se detectó la D.O a 490 nm en el lector de placas *Synergy 2 (BioTek)*.

### **3.3. ELISA sandwich para la determinación de la reactividad del anticuerpo 2C10**

Se sensibilizó una placa de ELISA con 100 µL/pocillo del anticuerpo de captura, clon 2C10, a concentraciones 2 – 4 – 8 – 16 µg/mL, para realizar con cada concentración una curva de calibración. La placa se mantuvo a 4°C

durante toda la noche. Los lavados se realizaron 3 veces con PBS 10 mM-Tween-20 0,05%, 5 min. cada uno, lo cual se repite posterior a cada incubación. Se bloqueó la placa con 100  $\mu$ L/mL de BSA 1% p/v en PBS 10 mM, lo que se incubó a 37°C por 1 h. Luego, se sembraron 100  $\mu$ L/pocillo de Apo A1 libre en 8 concentraciones de 0 – 12,5  $\mu$ g/mL, para cada concentración de 2C10, y se incubó durante 1 h. 20 min. a 37°C. Posteriormente, se adicionaron 100  $\mu$ L/pocillo del anticuerpo de revelado, clon 1C11B7, conjugado con biotina, en el título 1/1.000 y se dejó durante 1 hora a 37°C. Luego, se sembraron 100  $\mu$ L/pocillo de avidina-HRP (*eBioscience*) en un título 1/1.000 y se incubó por 1 h a 37°C. Finalmente, se adicionaron 100  $\mu$ L/pocillo del sustrato OPD/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se mantuvo a 37°C por 20 min y la reacción se detuvo con una gota de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20% v/v. La D.O se leyó a 490 nm en el lector de placas *Synergy 2 (BioTek)*.

#### **4. Estandarización de las curvas de calibración para Apo A1 y Apo B**

##### **4.1. ELISA sandwich para la cuantificación de Apo A1**

Se sensibilizó una placa de ELISA con 100  $\mu$ L/pocillo de anticuerpo de captura, clon 2C10, a una concentración de 2  $\mu$ g/mL, la que se incubó a 4°C durante toda la noche. Los lavados se realizaron 3 veces con PBS 10 mM-Tween-20 0,05%, 5 min. cada uno, lo cual se repite posterior a cada incubación. Se bloqueó la placa con 100  $\mu$ L/mL de BSA 1% p/v en PBS 10 mM, lo que se incubó a 37°C por 1 h. Luego, se sembraron 100  $\mu$ L/pocillo del calibrador

*TruCal* en concentraciones de Apo A1 0 - 6,3 - 9,4 - 12,5 - 18,8 – 25 - 37,5 - 50 ng/mL y se incubaron durante 1 h. 20 min. a 37°C. Posteriormente, se incubaron 100 µL/pocillo de anticuerpo de revelado, clon 1C11B7 conjugado con biotina, en el título 1/4.000 durante 1 hora a 37°C. Luego, se sembraron 100 µL/pocillo de avidina-HRP (*eBioscience*) en un título 1/1.000 y se dejó por 1 h a 37°C. Finalmente, se adicionaron 100 µL/pocillo de sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (*Thermo Scientific*) y se incubó por 20 min. a temperatura ambiente, reacción que se detuvo con 100 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M. Se detectó a 450 nm, en el lector de placas *Synergy 2* (*BioTek*).

#### **4.2. ELISA de inhibición competitiva para cuantificación de Apo B**

Se sensibilizó una placa de ELISA con 100 µL/pocillo de antígeno *TruCal* a una concentración de Apo B de 10 µg/mL, la que se incubó a 4°C durante toda la noche. De forma paralela se prepararon soluciones antígeno/anticuerpo para generar la competencia, con una concentración constante de anticuerpo, clon 2F4, en el título 1/500 y suero calibrador *TruCal* en concentraciones de Apo B de 0 - 2,4 - 9,8 - 39,1 - 156,3 – 625 – 2.500 ng/mL, las cuales también fueron incubadas toda la noche, a temperatura ambiente. Los lavados de la placa se realizaron 3 veces con PBS 10 mM-Tween-20 0,05%, 5 min. cada uno, lo cual se repite posterior a cada incubación. Se sembraron 100 µL/pocillo de cada solución y se incubaron durante 1 h. 20 min. a 37°C. Luego se incubaron

por 1 h 100  $\mu\text{L}$ /pocillo de avidina-HRP (*eBioscience*) en un título 1/1.000. Finalmente, se adicionaron 100  $\mu\text{L}$ /pocillo de sustrato TMB/ $\text{H}_2\text{O}_2$  (*Thermo Scientific*) y se incubó por 20 min. a temperatura ambiente, reacción que se detuvo con 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2M. y se detectó a 450 nm, en el lector de placas *Synergy 2* (*BioTek*). Este mismo procedimiento, se realizó con el péptido de Apo B y LDLn, para *TruCal* en condiciones denaturantes y para la cuantificación de apo B en muestras de suero.

## 5. Validación de los inmunoensayos

Para la validación de las curvas estándar, se evaluaron los siguientes parámetros de calidad:

### 5.1. Selectividad

Es el grado en que el método puede cuantificar el analito en presencia de interferentes (diferentes matrices). Se evaluó determinando muestras y/o estándares de concentración conocida, sembrados a una misma concentración, y comparando la concentración obtenida con la real sembrada y las diferencias entre las distintas matrices. Las matrices utilizadas para la validación del método para cuantificación de Apo B fueron: Estándar Apo B (R&D), LDLn aislada de plasma, Suero control de lípidos (Biosystems), Suero control Lyphochek nivel 1 (BioRad); las matrices para el método de cuantificación de

Apo A1 fueron: Apo A1 libre (laboratorio de Bioquímica Clínica e Inmunología), Apo A1 libre (donación de Dr. Laurent Martínez, laboratorio de Toulouse, Francia) y Suero control Lyphochek nivel 1 (*BioRad*).

## 5.2. Linealidad

La linealidad es la capacidad del método para dar respuesta proporcional a la cantidad de analito a determinar. Se comprobó realizando la gráfica concentración v/s D.O. en un rango amplio de concentraciones del estándar para determinar el rango de concentración lineal, posteriormente determinar la ecuación del mejor ajuste, y el coeficiente de determinación de la regresión ( $R^2$ ), el cual está definido como óptimo cuando el valor es  $\geq 0,98$ .

## 5.3. Precisión intraensayo

Corresponde a la repetibilidad del ensayo, la cual se evaluó tanto para cada una de las concentraciones de la curva de calibración como para muestras de concentración conocida. En el caso de la curva, se determinaron 9 réplicas de cada uno de los puntos, en un mismo ensayo. Para el suero control, se realizaron 3 concentraciones distintas: baja, media y alta (8 - 15 - 40 ng/mL respectivamente), a partir de un mismo *stock* inicial (*BioRad*), preparadas de forma independiente, y se determinaron 20 repeticiones de cada una, en un mismo ensayo. En cada caso, se presenta la media, desviación estándar (DE) y

coeficiente de variación (CV). Se considera aceptable un CV menor a 10% [169].

#### **5.4. Precisión interensayo**

Se define como la variación obtenida en determinaciones realizadas en condiciones diferentes, lo cual se evaluó tanto para la curva de calibración como para muestras de concentración conocida. La curva se evaluó en 10 ensayos independientes, en días diferentes, determinando cada punto por duplicado. El suero control se determinó en 10 ensayos independientes, en días diferentes, en las mismas 3 concentraciones: alta, media y baja, sembrando cada una en octuplicado. Para ambos casos, se presenta la media, DE y CV. Se consideró un CV aceptable menor a 20% [169].

#### **5.5. Exactitud**

Corresponde a la capacidad del método de dar un resultado lo más próximo al verdadero. Se evaluó con 3 muestras de concentración conocida, igual que en la precisión interensayo, en 10 ensayos independientes. Para esto se determinó el sesgo y su evaluación mediante el test t-Student, además, el porcentaje de recuperación de dichas muestras, expresado según la fórmula 3, donde se consideró un rango aceptable entre 90-110%. Además, se realizó una correlación interclase por el método de *Bland-Altman* en un grupo de muestras

determinadas por el ELISA de competencia estandarizado para cuantificar Apo B y por un kit comercial para cuantificación de Apo B (*R&D*), donde se determinó el nivel de fiabilidad según el coeficiente de correlación interclase (CCI): < 0,4 baja fiabilidad, 0,4 – 0,75 fiabilidad entre regular y buena, y >0,75 fiabilidad excelente [170].

**Fórmula 3.** Porcentaje de recuperación.

$$\% \text{ de recuperación} = \frac{\text{valor obtenido}}{\text{valor esperado}} \times 100$$

## 6. Reclutamiento de sujetos de estudio

El estudio presentó un diseño de tipo descriptivo de corte transversal. El grupo de estudio correspondió a niños y adolescentes de edades entre 2 y 18 años, que presenten antecedentes de historia familiar de enfermedad cardiovascular precoz demostrada, la cual se define como infarto agudo al miocardio y/o revascularización coronaria percutánea o quirúrgica en hombres < 55 años y mujeres < 60 años.

El grupo de estudio comprendió 108 niños y adolescentes ( $10,8 \pm 3,7$  años), los cuales fueron reclutados en el Centro Cardiovascular, Hospital Guillermo Grant Benavente, Concepción. El grupo control incluyó de 46 individuos ( $10,5 \pm 2,1$  años) definido como individuos que no presentan

antecedentes familiares de enfermedad cardiovascular precoz, los cuales fueron reclutados en la Escuela Palestina, sector Palomares, Concepción. El reclutamiento se realizó previa autorización por medio de la firma de un consentimiento informado de los padres o tutores para los menores de 18 años y un asentimiento informado de estos menores y/o autorización propia de los jóvenes mayores de 18 años, con la firma del consentimiento informado (anexo 1-3). Todo el estudio fue aprobado por el Comité Ético-Científico del Servicio de Salud Concepción (anexo 4).

## **7. Cuantificación de muestras de suero**

Se realizó toma de muestras sanguíneas de los niños y adolescentes de la población de estudio y control, con 8 - 12 h de ayuno. Se cuantificó CT, C-HDL y TG (Respons 920, Diasys). Se calculó C-LDL por fórmula de Friedewald, la razón TG/HDL y C-no HDL por diferencia de CT y C-HDL. Apo A1 ELISA sandwich estandarizado y validado en el estudio.

En conjunto con estos parámetros, se evaluó el estado nutricional (peso, talla, IMC), CC y presión arterial. Esta evaluación fue realizada por Médico Endocrinólogo Pediatra y Residentes Becarios de Pediatría, pertenecientes al Dpto. de Pediatría, Facultad de Medicina, Universidad de Concepción.



## **8. Métodos estadísticos**

Los resultados fueron presentados como estadística descriptiva con valor promedio y DE para variables continuas. La prevalencia se expresó en porcentaje. Las comparaciones entre grupo se realizaron con prueba t-Student para las variables paramétricas, y Mann-Whitney para las variables no paramétricas. Se utilizó el test de Pearson para realizar la correlación entre variables, y test de Bland-Altman para correlación interclase. Se consideró un valor  $p < 0,05$  como significativo. Los análisis estadísticos fueron realizados en conjunto con la Dra. Katia Sáez, Dpto. Estadística, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Concepción.

## **9. Eliminación de residuos peligrosos.**

Todos los residuos peligrosos generados durante la realización del presente estudio fueron eliminados bajo la normativa del plan de manejo de residuos y sustancias peligrosas (MATPEL) de la Universidad de Concepción.

**Françoise Barré-Sinoussi** (París, 1947), Bioquímica.

Premio Nobel de Medicina y Fisiología 2008 por el descubrimiento del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

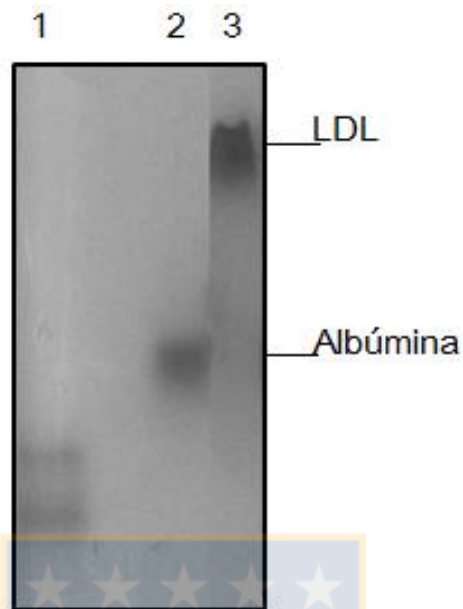


## RESULTADOS

### 1. Obtención de LDLn y HDLn a partir de plasma humano

Las lipoproteínas LDLn y HDLn fueron obtenidas mediante el método de ultracentrifugación con ajuste de densidad como se describe en materiales y métodos. La pureza de LDLn fue confirmada mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (Figura 3). Se utilizó una muestra de albúmina humana (67 kD) como control, proteína correspondiente al principal contaminante de esta técnica. En el gel, se observa una banda ancha en la parte superior de éste correspondiente a la LDL y la ausencia de albúmina o de otra proteína en la preparación analizada. La banda de LDLn se presenta con la forma característica de migración (carril 3), que se contrapone a la banda ancha, difusa, y cercana a albúmina que se describe para LDLox, lo cual sugiere que el proceso de aislamiento desde plasma no oxidado de manera importante la muestra y que las condiciones de almacenamiento, permiten mantener esta condición.

El proceso de purificación y delipidación de la HDLn se realizó en el contexto de otros proyectos en desarrollo y fue proporcionada ya apta para su uso.



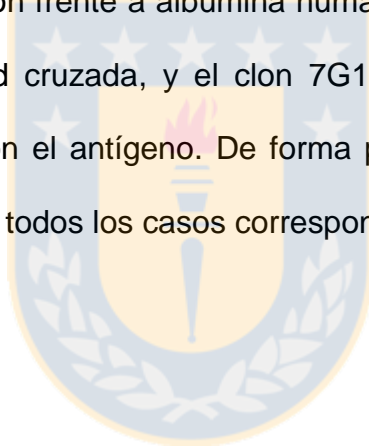
**Figura 3. Verificación de la pureza de LDL nativa.** La obtención de LDLn se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa 1%. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Albúmina humana. Carril 3: muestra de LDLn. Fuente: Elaboración propia.

## **2. Obtención y caracterización de anticuerpos monoclonales anti-Apo B y anti-Apo A1**

### **2.1. Reactividad de sobrenadantes de cultivo de hibridomas**

Con el objetivo de estandarizar un inmunoensayo para Apo A1 y para Apo B, se seleccionaron 4 hibridomas productores de AcMs anti-Apo A1 y 4 hibridomas productores de AcMs anti-Apo B. Los clones seleccionados para Apo A1 fueron: 1C11B7, 8B12, 8A4 y 2C10. Los clones seleccionados para Apo B fueron: 2F4(1)E7, 8G12B4, 4E9 y 7G10. Los hibridomas de estos 8 clones

fueron cultivados en condiciones óptimas, según lo descrito en materiales y métodos, y se testeó en el sobrenadante de cultivo la reactividad específica de los AcMs y su posible reacción cruzada con albúmina humana, por corresponder a la proteína presente mayoritariamente en el plasma. Los cuatro clones seleccionados para Apo A1 reaccionaron positivamente con el antígeno y no presentaron reactividad cruzada. Los clones seleccionados para Apo B presentaron reacciones variadas: 2F4(1)E7 y 8G12B4 reconocieron el antígeno y no mostraron reacción frente a albúmina humana; el clon 4E9 fue descartado por su alta reactividad cruzada, y el clon 7G10 descartado por su baja/nula reacción específica con el antígeno. De forma paralela se testeó el isotipo de cada clon, el cual para todos los casos correspondió a IgG<sub>1</sub>. (Tabla 4).



**Tabla 4. Reactividad de los sobrenadantes de cultivo de los clones seleccionados para producción de anticuerpos monoclonales anti-Apo A1 y anti-Apo B.** Fuente: Elaboración propia.

Sobrenadantes de cultivo	Reacción antígeno	Reacción albúmina humana	Isotipo
<b>Clones anti-Apo A1</b>	<b>HDL/Apo A1</b>		
1C11B7	+	-	IgG1
8B12	+	-	IgG1
8A4	+	-	IgG1
2C10	+++	-	IgG1
<b>Clones anti-Apo B</b>	<b>LDL</b>		
2F4(1)E7	+	-	IgG1
8G12B4	+	-	IgG1
4E9	-	+++	IgG1
7G10	-	-	IgG1

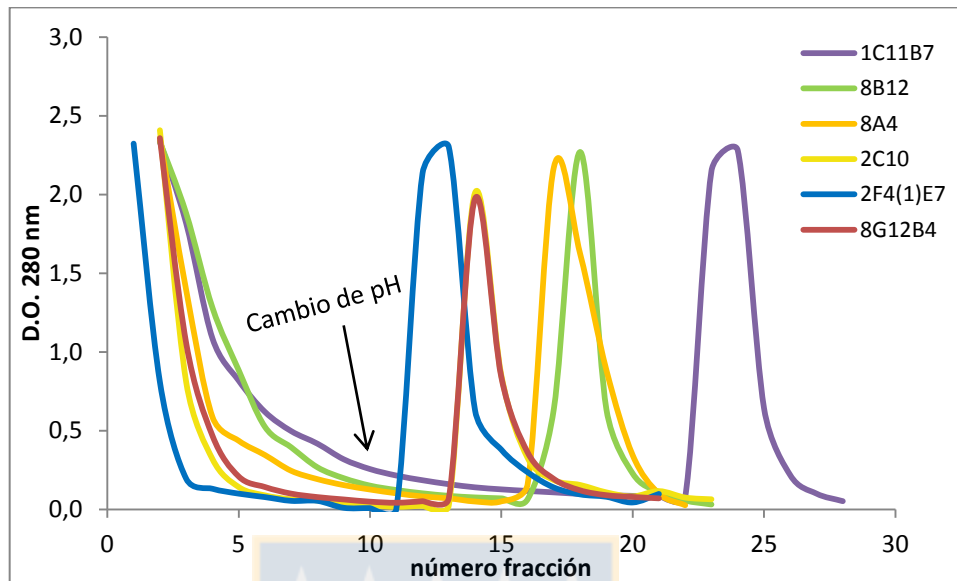
## 2.2. Purificación de AcMs.

Los seis clones de hibridomas seleccionados se cultivaron hasta llegar a un recuento celular suficientes para la administración en los ratones de la cepa BALB/c, obteniéndose, 10 – 15 días posterior a la inmunización, los volúmenes de fluido ascítico descritos en la tabla 5 para cada clon. A partir de estos fluidos ascíticos se realizó la precipitación de globulinas y desde éstas, la purificación de los AcMs, por medio de cromatografía de afinidad con agarosa-proteína G. Los cromatogramas obtenidos muestran un primer *peak* de D.O. correspondientes a las globulinas a descartar y un segundo *peak*, a las globulinas de interés (Figura 4). Las fracciones de este último *peak* colectan los anticuerpos purificados, los cuales fueron concentrados, cuantificados y

almacenados. Los volúmenes y concentraciones de cada uno de los pasos del proceso de obtención y purificación se muestran en la tabla 5. Cabe destacar que no se realizó la purificación completa del volumen de globulinas, sólo el suficiente para obtener el *stock* necesario de AcMs para el trabajo planteado.

**Tabla 5. Obtención y purificación de AcMs.** Se presentan los volúmenes y concentraciones de cada etapa del proceso de obtención y purificación para los 6 AcMs seleccionado. Fuente: Elaboración propia.

Clones	Volumen fluido Ascítico (mL)	Volumen Globulinas (mL)	Concentración Globulinas (mg/mL)	Volumen Ac puro (mL)	Concentración Ac puro (mg/mL)
1C11B7	15	9	33,2	9	1,4
8B12	5	6,5	30,1	8	1,2
8A4	15	7,5	16,1	10	1,0
2C10	25	15	11,5	7	1,6
2F4(1)E7	27	10	26,7	9	1,3
8G12B4	21	15	9,8	5	1,5



**Figura 4. Cromatogramas de la purificación de los anticuerpos monoclonales.** Para cada AcM purificado se muestra uno de los perfiles cromatográficos obtenidos de una alícuota del *pool* total de globulinas, La purificación se realizó utilizando agarosa-proteína G. Fuente: Elaboración propia.

### 2.3. Titulación de AcMs purificados

Los AcMs obtenidos se titularon frente a dos conformaciones de Apo A1: libre y en HDL<sub>n</sub>, o frente a LDL<sub>n</sub>, según correspondiera. En el caso de los AcMs anti-Apo A1, 1C11B7, 8B12 y 8A4 presentaron igual título para ambos antígenos, correspondientes a 1/63.000, 1/8.000 y 1/4.000, respectivamente. El clon 2C10 sólo se tituló frente a Apo A1, presentando un título de 1/3.000 (Tabla 6, Figura 5A). El AcM 1C11B7 presentó el título mayor, que corresponde con lo descrito y caracterizado con anterioridad en el laboratorio para este clon. En base a esto último, se determinó utilizar este clon como anticuerpo de revelado

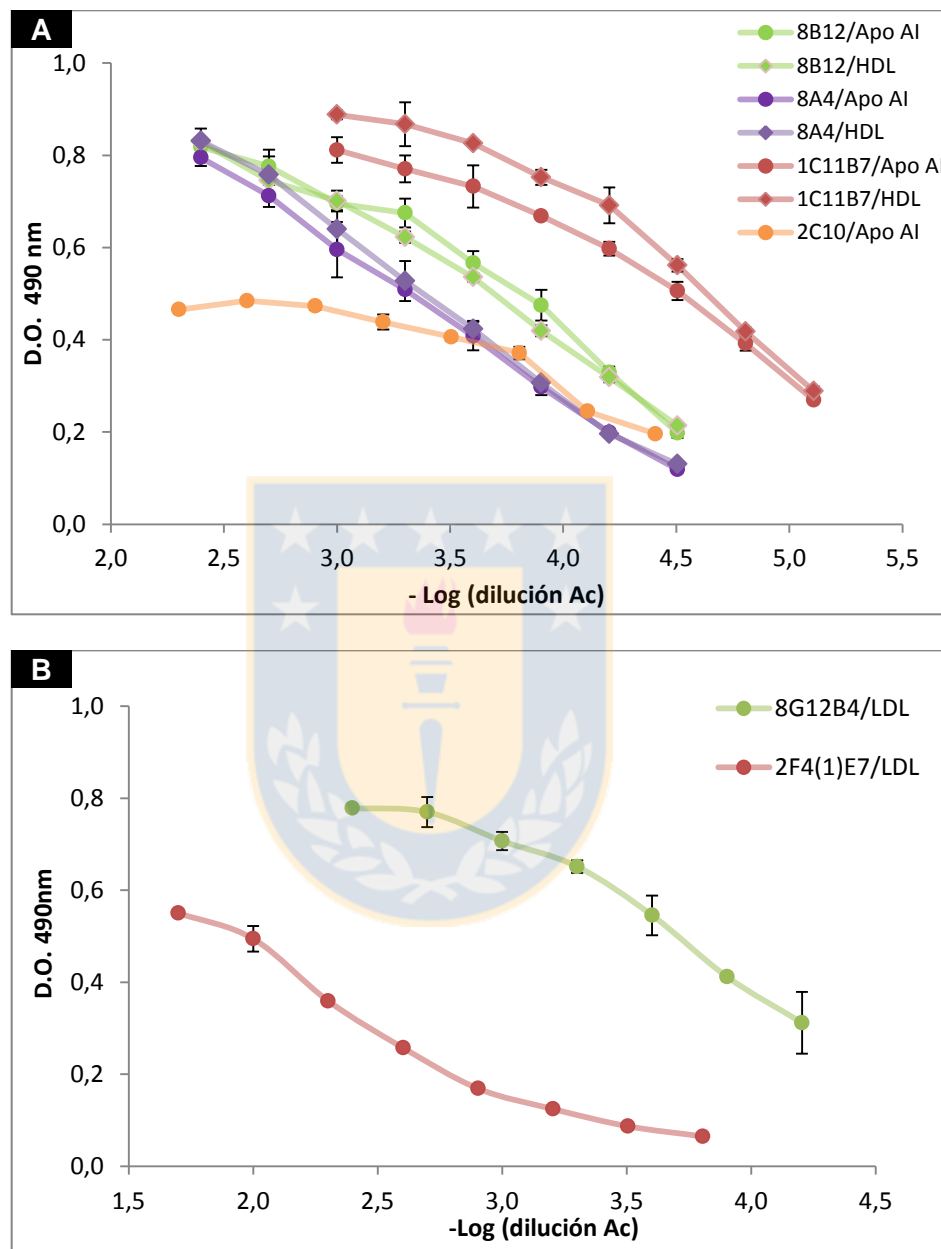


para la estandarización del ELISA sandwich para la cuantificación de Apo A1. Por lo tanto, los AcMs 8B12, 8A4 y 2C10 se testearon como posibles anticuerpos de captura.

Los AcMs anti-Apo B 8G12B4 y 2F4(1)E7 presentaron un título de 1/8.000 y 1/400 frente a LDL, respectivamente (Tabla 6, Figura 5B). En el caso de los AcMs anti-Apo B, ambos se testearon tanto para utilizar como Ac de captura y de revelado.

**Tabla 6. Títulos obtenidos para los anticuerpos monoclonales seleccionados.** Se presentan los títulos de los 6 AcMs seleccionados frente a Apo A1 libre, HDL o LDL, según corresponde. Fuente: Elaboración propia.

Clon	Título Apo A1 libre	Título HDL	Título LDLn
1C11B7	1/63.000	1/63.000	-
8A4	1/4.000	1/4.000	-
8B12	1/8.000	1/8.000	-
2C10	1/3.000	-	-
8G12B4	-	-	1/8.000
2F4(1)E7	-	-	1/400



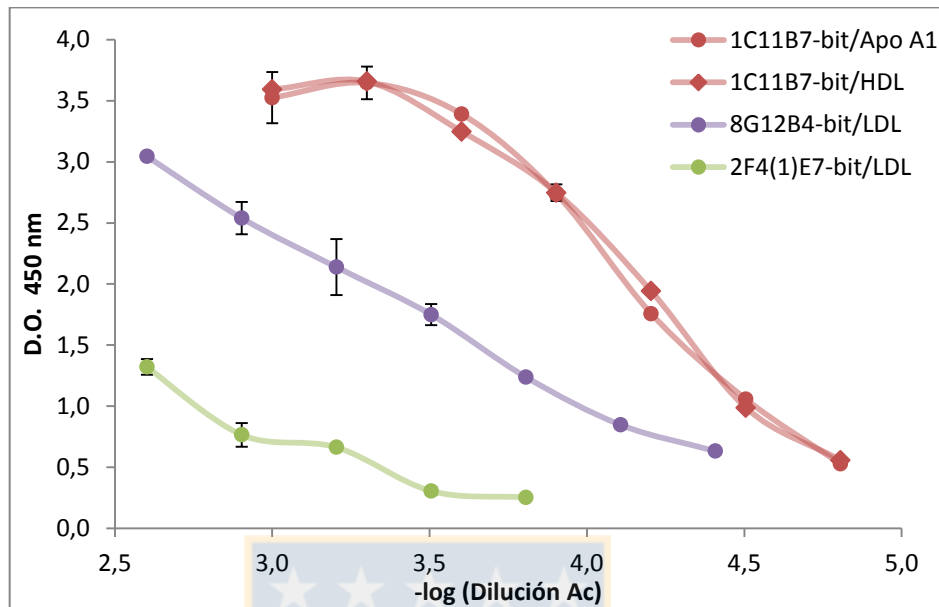
**Figura 5. Curvas de titulación para anticuerpos monoclonales.** Los AcMs fueron titulados frente a distintos antígenos por ELISA indirecto. (A) Curvas de titulación de AcMs 8B12, 8A4, 1C11B7 frente a Apo A1 libre y HDL y AcM 2C10 frente a Apo A1. (B) Curvas de titulación de AcMs 8G12B4 y 2F4(1)E7 frente a LDLn. (n = 1 en duplicado) Fuente: Elaboración propia.

## 2.4. Conjugación de AcMs con biotina

Los anticuerpos de revelado deben ser conjugados con moléculas que posteriormente permitan generar una señal detectable. Los AcMs 1C11B7, 8G12B4 y 2F4(1)E7 por tanto, fueron conjugados con biotina (bit), molécula de pequeño tamaño (244,31 g/mol), lo cual permite la unión de numerosas moléculas a un solo Ac. Sumando a ello, su alta afinidad con estreptavidina, que a su vez puede estar conjugada con peroxidasa, permite la amplificación de la señal detectada. Posterior a la biotinilación, se determinaron los títulos para estos anticuerpos conjugados: 1/4.000 para 1C11B7-bit frente a Apo A1 libre y HDL, 1/6.000 para 8G12B4-bit y 1/400 para 2F4(1)E7-bit, ambos frente a LDL. (Figura 6, Tabla 7).

**Tabla 7. Títulos obtenidos para los AcMs biotinilados.** Fuente: Elaboración propia.

Clon	Título Apo A1 libre	Título HDL	Título LDL
1C11B7-bit	1/4.000	1/4.000	-
8G12B4-bit	-	-	1/6.000
2F4(1)E7-bit	-	-	1/400

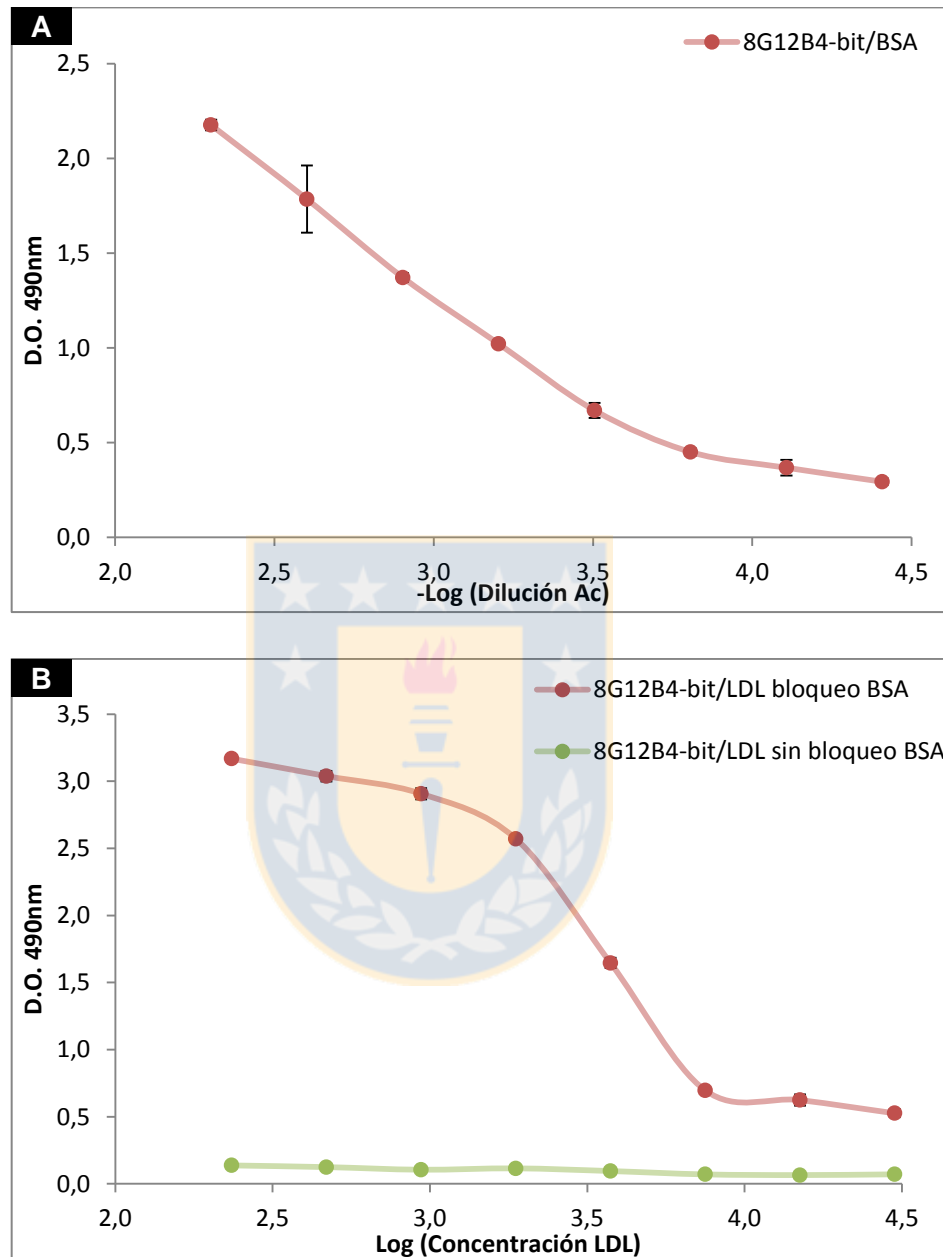


**Figura 6. Curvas de titulación para anticuerpos monoclonales conjugados con biotina.** Los AcMs biotinilados fueron titulados frente a distintos antígenos por ELISA indirecto. Se presentan las curvas de titulación de AcM 1C11B7-bit frente a Apo A1 libre y HDL y las curvas de titulación de los AcMs 8G12B4-bit y 2F4(1)E7-bit frente a LDL. (n = 1 en duplicado). Fuente: Elaboración propia.

El control negativo sin antígeno de la curva de titulación para 8G12B4-bit presentó reacción con una D.O.  $\approx$  2,5. Debido a esto, se testeó la posible reactividad cruzada del Ac con la proteína de bloqueo BSA y se confirmó la reacción específica con LDLn. Para esto, se realizó una titulación de 8G12B4-bit frente a BSA (Figura 7A) y una curva de concentración de LDLn de 8 puntos, hasta 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , con y sin bloqueo de BSA. (Figura 7B). La reacción del Ac contra BSA dio positiva, con una D.O máxima obtenida  $>$  2,0. La reacción de la curva de concentraciones con LDLn al estar presente BSA también presentó una alta D.O. ( $>$  3,0), pero al testear la curva de concentración de LDLn, sin la

presencia de la proteína de bloqueo, el AcM presento muy baja reacción con el antígeno ( $D.O < 0,2$ ). Con lo cual se concluye que el AcM al ser conjugado con biotina, exacerbó una reacción inespecífica con BSA y, más aún, perdió la capacidad de reaccionar específicamente con la proteína de interés.

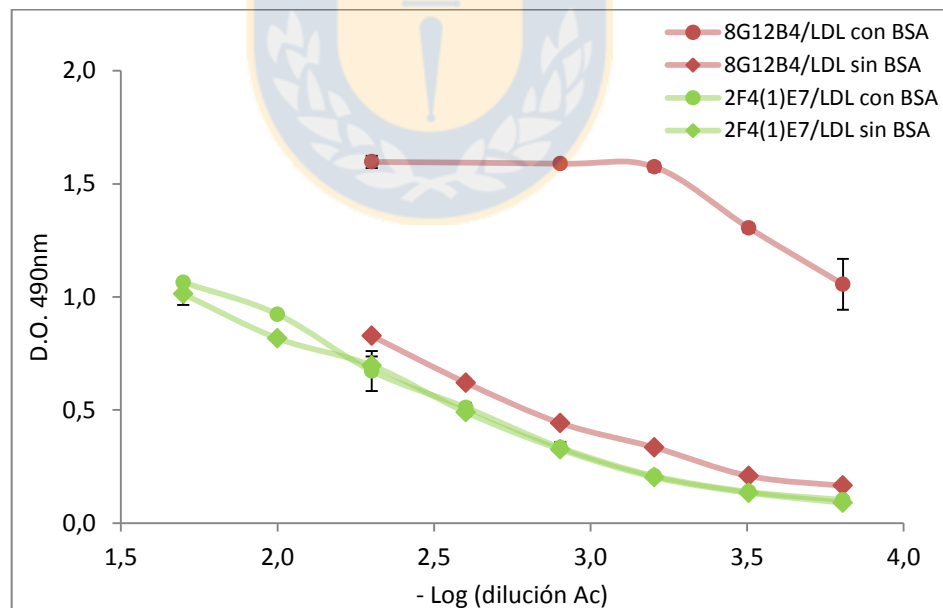




**Figura 7. Ensayos de reactividad cruzada del conjugado 8G12B4-bit con BSA y LDLn. (A)** Titulación 8G12B4-bit contra BSA. (n = 1 en duplicado) **(B)** Curvas de concentración de LDLn con y sin proteína de bloqueo BSA, AcM 8G12B4-bit en título 1/4.000. (n = 1 en duplicado). Fuente: Elaboración propia.

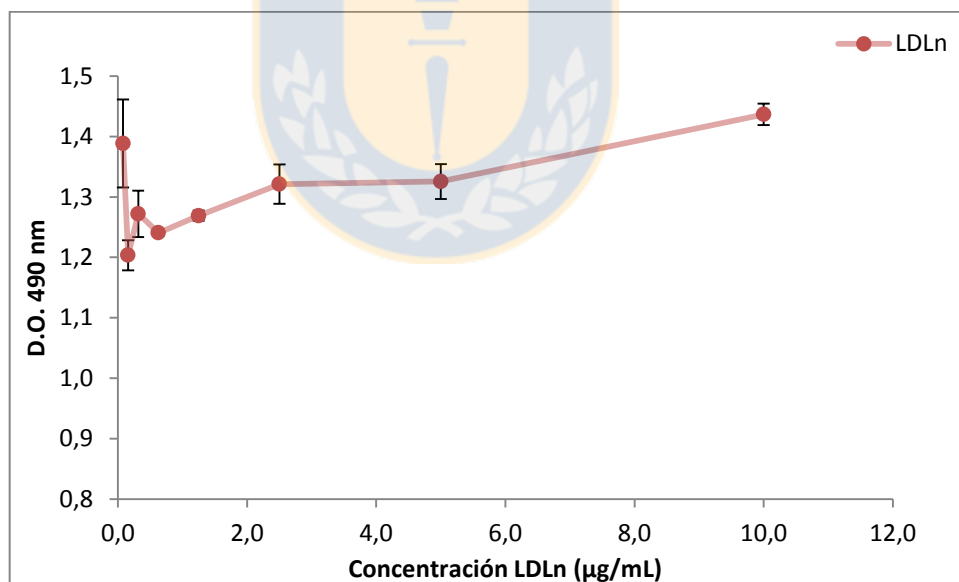
## 2.5. Reactividad de los AcMs 8G12B4 y 2F4(1)E7 anti-Apo B

Con el fin de corroborar la reacción inespecífica del AcM 8G12B4 frente a BSA, se realizó una nueva titulación de 8G12B4 sin biotinar, con y sin proteína de bloqueo. Se corrobora la reacción específica de AcM 8G12B4 con LDL, pero también se ve exacerbada esta reacción en presencia de BSA (figura 8) Por lo cual, se confirma que el Ac presenta reactividad cruzada con la proteína de bloqueo. El AcM 2F4(1)E7 también se testeó con y sin proteína de bloqueo, para confirmación de su reactividad, el que no mostró interferencia de BSA en la reacción específica de LDLn (Figura 8).



**Figura 8. Titulación AcMs anti-Apo B en presencia y ausencia de la proteína de bloqueo BSA.** Se titularon los AcMs 8G12B4 y 2F4(1)E7 contra LDLn, ambos con y sin proteína bloqueo. (n = 1 en duplicado). Fuente: Elaboración propia.

Con estos resultados se descarta 8G12B4 como anticuerpo de revelado, pero considerando que presenta reacción con LDLn y que no hay reacción cruzada con albúmina humana, la cual fue confirmada y negativa (tabla 4), se considera como Ac de captura, cambiando la proteína de bloqueo. Por ello, se realizó una curva con distintas concentraciones de LDL utilizando 8G12B4 como Ac de captura, 2F4(1)E7-bit como Ac de revelado y la OVA como proteína de bloqueo. El ELISA tipo sandwich propuesto no presentó una relación D.O. concentración dependiente, ya que para todas las concentraciones de LDL testeadas, la D.O. obtenida fue pareja y superior a 1,0 (Figura 9).



**Figura 9. Testeo del anticuerpo monoclonal 8G12B4 como anticuerpo de captura y de 2F4(1)E7-bit como anticuerpo de revelado.** Se realizó ELISA sandwich con curva de concentraciones de LDL desde 0 – 10 µg/mL, OVA 1% PBS como proteína de bloqueo, 10 µg/mL 8G12B4 como Ac de captura y 2F4(1)E7-bit título 1/500 como Ac de revelado. Fuente: Elaboración propia.



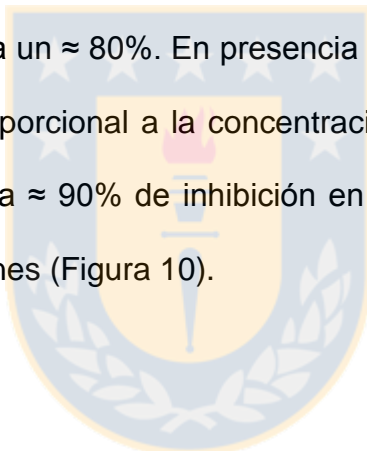
Debido a que el control sin antígeno presentó una alta D.O., se testearon distintas concentraciones de 8G12B4 como Ac de captura y de los títulos a utilizar de 2F4(1)E7-bit, para determinar si se estaba produciendo reacciones inespecíficas por exceso de Ac. A una concentración de 1,25 µg/mL de AcM 8G12 y un título de 1/2.000 para el AcM 2F4(1)E7-bit se logró disminuir la D.O. a  $\approx 0,4$ . (Tabla 8). Sin embargo, este resultado que sigue siendo poco óptimo como blanco para una posible curva de calibración. La sumatoria de todos estos resultados, determinó descartar el AcM 8G12B4 para el resto del estudio. En consecuencia, se decidió estandarizar un ELISA de inhibición competitiva con el AcM 2F4(1)E7-bit.

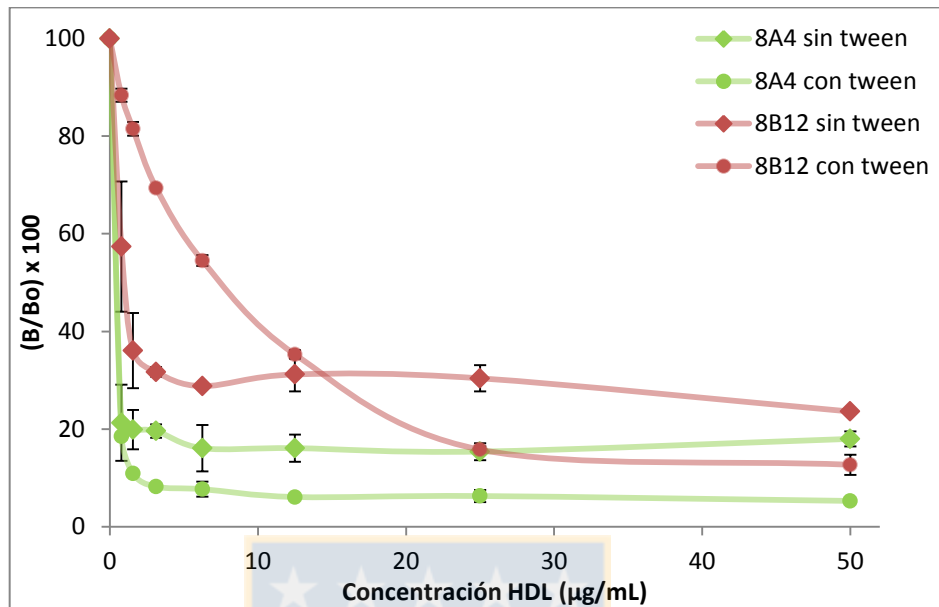
**Tabla 8. Reacción de los anticuerpos monoclonales 8G12B4 y 2F4(1)E7-bit en ausencia de antígeno.** Fuente: Elaboración propia.

Dilución de Ac revelado 2F4(1)E7-bit	Concentraciones de Ac de captura 8G12				
	20 µg/mL	10 µg/mL	5 µg/mL	2,5 µg/mL	1,25 µg/mL
1/500	0,744	0,621	0,548	0,428	0,394
1/1.000	0,482	0,425	0,393	0,380	0,441
1 /2.000	0,445	0,414	0,452	0,406	0,423

## 2.6. Reactividad de los AcMs 8B12, 8A4 y 2C10 anti-Apo A1

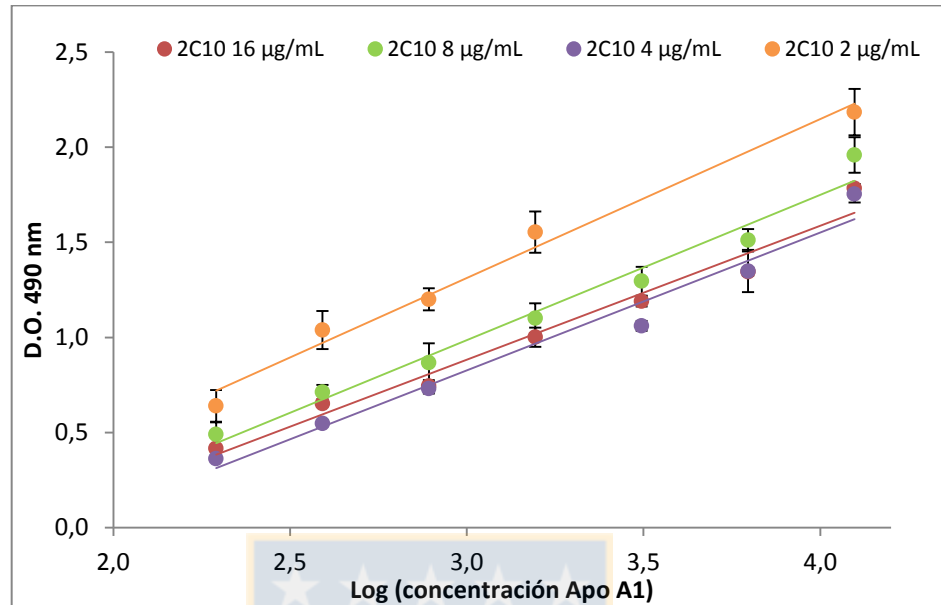
Se estudió la reactividad de 8B12, 8A4 y 2C10 como anticuerpos de captura. Los clones 8B12 y 8A4 se caracterizaron mediante un ELISA de inhibición competitiva en ausencia y presencia de tween y utilizando HDL<sub>n</sub> como antígeno competidor y Apo A1 libre como antígeno unido a la placa. Para ambos AcMs se observa una alta inhibición por la HDL en solución, particularmente, la inhibición de 8B12 en ausencia de tween llegó hasta un  $\approx$  70% y la de 8A4, hasta un  $\approx$  80%. En presencia de tween, la inhibición de 8B12 aumenta en forma proporcional a la concentración, la que alcanzó un 90%. El anticuerpo 8A4 alcanza  $\approx$  90% de inhibición en presencia de tween desde las primeras concentraciones (Figura 10).





**Figura 10. Inhibición de los AcMs 8B12 y 8A4 por HDL, en presencia y ausencia de tween.** 8B12 y 8A4 se utilizaron en el título 1/250. Se presenta la gráfica de concentraciones con la relación porcentual (B/Bo), donde B = D.O. obtenida para cada concentración de HDL y Bo = D.O. en ausencia de HDL. Fuente: Elaboración propia.

Por otro lado, el anticuerpo 2C10 fue caracterizado utilizando un ELISA sandwich con 1C11B7-bit como anticuerpo de revelado. Se realizaron 4 curvas con 8 concentraciones de Apo A1 libre (0 - 12,5 µg/mL), cada una con una concentración diferente de AcM 2C10 (Figura 11). En los 4 casos se obtuvieron curvas lineales, por lo cual se determinó utilizar la concentración más baja testada (2 µg/mL) para la sensibilización del inmunoensayo a estandarizar, que presentó además la mayor D.O. de las 4 curvas realizadas.



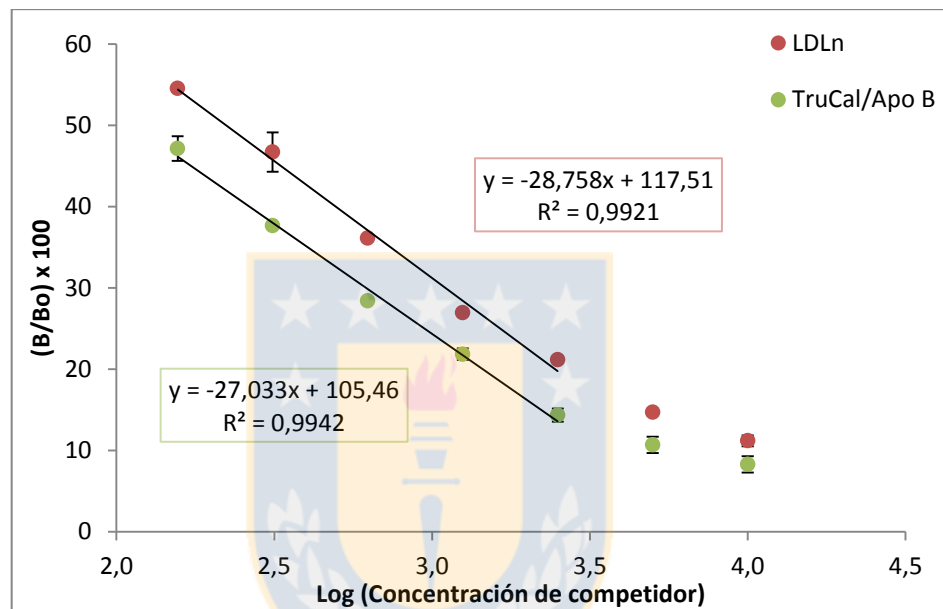
**Figura 11. Determinación de la concentración de 2C10 como anticuerpo de captura.** Se realizaron 4 curvas de Apo A1, con concentraciones de 0 - 12,5 µg/mL cada una. En cada caso, se sensibilizó con una concentración distinta de AcM 2C10. Se utilizó el AcM 1C11B7-bit como Ac de revelado título, 1/1.000. Fuente: Elaboración propia.

### 3. Estandarización de las curvas de calibración para la cuantificación de Apo B y Apo A1

#### 3.1. Estandarización de la curva de calibración para cuantificación de Apo B por ELISA de inhibición competitiva

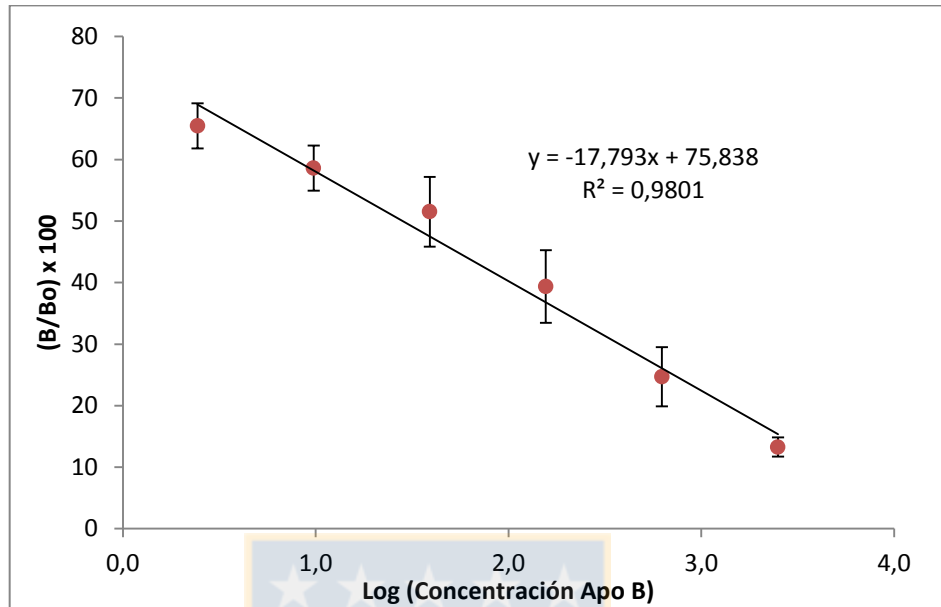
Se realizaron dos curvas de calibración en un amplio rango de concentraciones de 0 – 10 µg/mL, con LDLn y suero calibrador *TruCal*, para determinar el rango lineal y la mejor curva para cuantificación de Apo B por

ELISA de inhibición competitiva. Para ambos antígenos se obtuvo un rango lineal entre 0 - 2.500 ng/mL, llegando con esta concentración a un 79% de inhibición con LDL y a un 86% de inhibición con *TruCal* (Figura 12).



**Figura 12. Determinación del rango lineal de la curva de calibración para la cuantificación de Apo B por ELISA de inhibición competitiva.** Se realizaron dos curvas de calibración con los antígenos LDLn y suero calibrador *TruCal*, en un rango de concentraciones desde 0 - 10  $\mu\text{g/mL}$ . El AcM 2F4(1)E7-bit se utilizó en el título 1/500. La gráfica presentada muestra el logaritmo de las concentraciones con la relación porcentual (B/Bo), donde B = D.O. obtenida en cada concentración de antígeno y Bo = D.O. en ausencia de antígeno. Fuente: Elaboración propia.

Considerando que LDLn es obtenida en nuestro laboratorio, su tiempo estimado de almacenamiento en óptimas condiciones es 30 – 45 días; además cada nuevo *pool* aislado, presento una alta variabilidad de la reacción con el anticuerpo utilizado, en contraste Apo B en *TruCal*, suero calibrador comercial, presentó mayor estabilidad, reacción menos variable, y una linealidad óptima como curva de calibración. Por lo tanto, se determinó realizar la estandarización del inmunoensayo con este suero calibrador. Se realizó una curva de calibración de 7 puntos de concentración de suero calibrador *TruCal*, entre 0 – 2.500 ng/mL y se sensibilizó la placa con 10 µg/mL de este mismo calibrador. Las soluciones a competir con las 7 concentraciones de Apo B (*TruCal*) y el AcM 2F4(1)E7-bit en dilución constante título 1/500 se mantuvieron toda la noche a temperatura ambiente. La estreptavidina-HRP se utilizó en su título comercial 1/1.000 y se reveló la reacción con sustrato TMB cuyá absorbancia se determinó a 450 nm. La curva final obtenida se presenta en la figura 13.

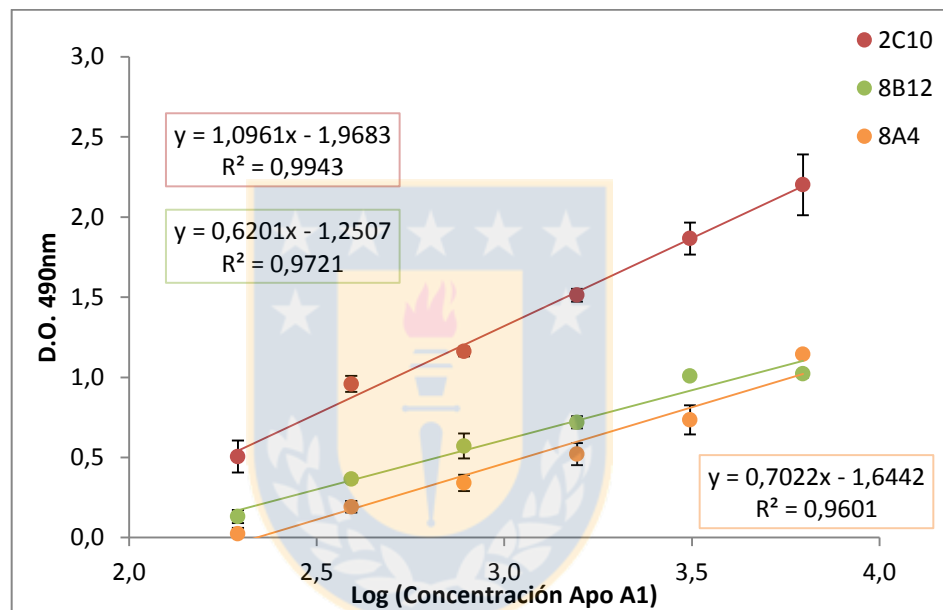


**Figura 13. Curva de calibración para cuantificación de Apo B por ELISA de inhibición competitiva.** Se presenta la curva de calibración óptima obtenida. La placa fue sensibilizada con 10  $\mu\text{g/mL}$  de suero calibrador *TruCal*. Las soluciones competidoras con concentraciones de 0 – 2.500 ng/mL de Apo B (*TruCal*) y AcM 2F4(1)E7-bit en título constante, 1/500. Las determinaciones de D.O. óptica se realizaron a 450 nm. La gráfica presentada muestra el logaritmo de las concentraciones con la relación porcentual (B/Bo), donde B = D.O. obtenida en cada concentración de antígeno y Bo = D.O. en ausencia de antígeno (n =3 ensayos en duplicado). Fuente: Elaboración propia.

### 3.2. Estandarización de la curva de calibración para cuantificación de Apo A1 por ELISA tipo sandwich

Se realizaron curvas de calibración en un amplio rango de concentración (0 – 6.250 ng/mL), utilizando suero calibrador *TruCal*. Para obtener la curva, se linealizó mediante el logaritmo de las concentraciones y se graficó con las D.O. obtenidas (Figura 14). Se puede observar que las 3 curvas presentan linealidad,

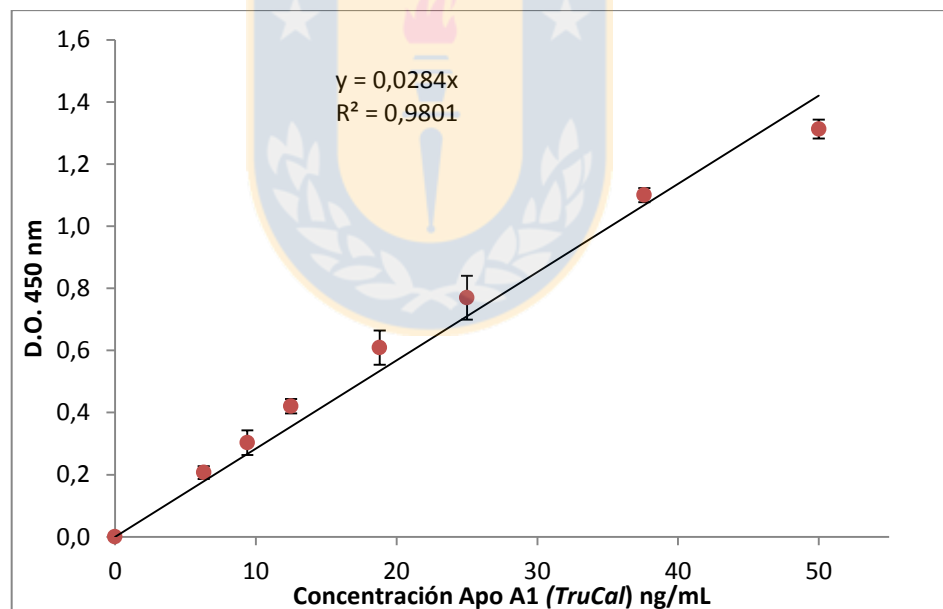
no obstante la mejor correlación corresponde a la curva realizada con el AcM 2C10 ( $R^2 = 0,9943$ ), que además presentó la mayor pendiente, lo que se relaciona con una mayor sensibilidad. Por ello se utilizó este AcM como Ac de captura para la estandarización de la curva.



**Figura 14. Determinación del rango lineal de la curva de calibración para la cuantificación de Apo A1 por ELISA sandwich.** Se realizaron curvas con los tres posibles AcMs de captura: 8B12 (20  $\mu\text{g/mL}$ ), 8A4 (10  $\mu\text{g/mL}$ ) y 2C10 (2  $\mu\text{g/mL}$ ) con el suero calibrador *TruCal*, en un rango de concentraciones de 0 – 6.250 ng/mL de Apo A1. El conjugado 1C11B7-bit se utilizó en el título 1/1.000. La gráfica se presenta como función logarítmica de la concentración v/s D.O., la cual se determinó a 490 nm. Curva 2C10 n = 3 ensayos en duplicado. Curvas con 8B12 y 8A4 n= 1 ensayo en duplicado. Fuente: Elaboración propia.



Con el fin de optimizar el rango de concentración y que este permita una proporcionalidad directa entre la concentración y la D.O. se utilizó un nuevo sustrato de mayor sensibilidad y de esta forma se disminuyó el rango de concentraciones de la curva. Así, se estandarizó la siguiente curva de calibración para cuantificar Apo A1: 2 µg/mL de AcM 2C10, bloqueo con BSA 1% PBS, curva de 8 concentraciones de *TruCal* entre 0 - 50 ng/mL, 1C11B7-bit título 1/4.000 como Ac de revelado, estreptavidina-HRP en un título 1/1.000 y sustrato TMB. La curva final obtenida se presenta en la figura 15.



**Figura 15. Estandarización de la curva de calibración para cuantificación de Apo A1 por ELISA sandwich.** Se presenta la curva de calibración óptima obtenida. La placa fue sensibilizada con 2 µg/mL de AcM 2C10, bloqueo con BSA 1% p/v PBS 10 mM, suero calibrador *TruCal* en concentración de Apo A1 0 - 50 ng/mL y 1C11B7-bit como Ac de revelado 1/4.000 (n =3 ensayos en duplicado). Fuente: Elaboración propia.

#### **4. Validación de métodos para la cuantificación de Apo B y Apo A1 séricas**

##### **4.1. Validación del método de ELISA de inhibición competitiva para cuantificación de Apo B sérica**

Para la validación del método fue necesario comprobar los parámetros de selectividad, linealidad, precisión intraensayo e interensayo y exactitud.

La selectividad, correspondiente a la determinación del antígeno en presencia de diversas matrices, se evaluó con distintos sueros y/o patrones de concentración conocida de Apo B. Para esto, se utilizó LDLn, Suero control *Lyphocheck* nivel 1 (*BioRad*), suero control de lípidos (*Biosystems*) y un estándar de Apo B (*R&D*). Las 4 presentaciones de Apo B fueron sembradas en la placa a una concentración de 300 ng/mL y fueron cuantificadas por el método de ELISA estandarizado. Para el análisis de varianza fue necesario aplicar una transformación a logaritmo natural (Ln) a los datos obtenidos, ya que éstos presentaron una dispersión que les impedía cumplir con una homogeneidad de varianza. De esta forma se observa que existen diferencias significativas del estándar de Apo B con el suero control *Lyphocheck* y el suero control de lípidos, pero no con LDL. A su vez, el suero control *Lyphocheck*, suero control de lípidos y LDL no presentan diferencias significativas entre ellos (Tabla 9).

Debido a que los resultados obtenidos para las 4 matrices testeadas en el análisis de selectividad presentaron una alta variabilidad, se complementó el análisis, evaluando la exactitud y la precisión de los datos. Para realizar esto, nuevamente fue necesario transformar los datos a Ln. De esta forma se obtuvo una diferencia significativa entre el valor de concentración obtenido en relación al valor real esperado (300 ng/mL), con un sesgo negativo para el estándar de Apo B y la LDLn, y con un sesgo positivo para los sueros control *Lyphocheck* y control de lípidos. En relación a los CV obtenidos, en los cuatro casos sobrepasan el del rango aceptable ( $> 20\%$ ) (Tabla 10).

**Tabla 9. Evaluación de la selectividad del método ELISA de inhibición competitiva para cuantificación de Apo B.** Apo B se determinó en 4 matrices diferentes, utilizando el inmunoensayo estandarizado. Se presentan los promedios de concentración y DE en cada caso. Medias con letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) según test de Tuckey ( $n = 3$ ). Fuente: Elaboración propia.

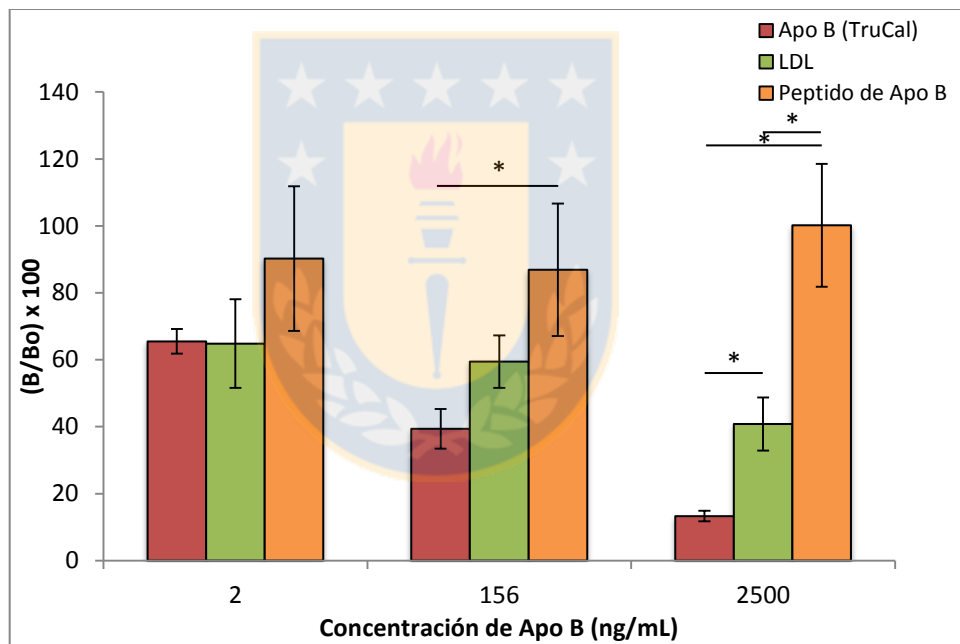
Controles (300 ng/mL)	Concentración (ng/mL) (Prom. $\pm$ DE)
Estándar Apo B (R&D)	17 $\pm$ 14 <sup>a</sup>
LDLn aislada de plasma	130 $\pm$ 103 <sup>b</sup>
Suero control de lípidos ( <i>Biosystems</i> )	644 $\pm$ 789 <sup>b</sup>
Suero control <i>Lyphocheck</i> nivel 1 ( <i>BioRad</i> )	125 $\pm$ 688 <sup>ab</sup>

**Tabla 10. Evaluación de la exactitud y precisión de las determinaciones de selectividad del método de ELISA de inhibición competitiva para cuantificación de Apo B.** Se presenta promedio de concentración, DE y CV en cada caso. Medias con (\*) son significativamente diferentes al valor real sembrado 300 ng/mL ( $p < 0,05$ ) según test t-Student ( $n = 3$ ). Fuente: Elaboración propia.

Controles (300 ng/mL)	Concentración (ng/mL) (Prom. $\pm$ DE)	CV
Estándar Apo B (R&D)	17 $\pm$ 14*	83
LDL <sub>n</sub> aislada de plasma	130 $\pm$ 103*	79
suero control de lipidos (biosystems)	644 $\pm$ 789*	123
Suero control Lyphochek nivel 1 ( <i>BioRad</i> )	125 $\pm$ 688*	55

Se realizó un ELISA de inhibición competitiva para comparar la inhibición de tres matrices diferentes, en tres concentraciones cada una, y así corroborar nuevamente la variabilidad que presenta la reacción antígeno-anticuerpo, es decir, la interacción del Ac con la Apo B en 3 distintas preparaciones. Para esto se utilizó un péptido de Apo B (4105 a 4215 residuos), LDL<sub>n</sub> y el suero calibrador *TruCal*, en las concentraciones 2, 156 y 2.500 ng/mL de Apo B, cada uno (Figura 16). En relación a la concentración menor, no se obtuvo diferencias significativas entre las tres presentaciones de Apo B testeadas, pero sí se observa una tendencia a una menor inhibición por el péptido de Apo B, en relación a LDL y *TruCal*. Con respecto a la concentración media, se observa una tendencia tanto del péptido de Apo B como de LDL de generar una menor inhibición en relación a *TruCal*; aún así, la diferencia se hace significativa sólo en el caso del péptido de Apo B con respecto al calibrador. Para la

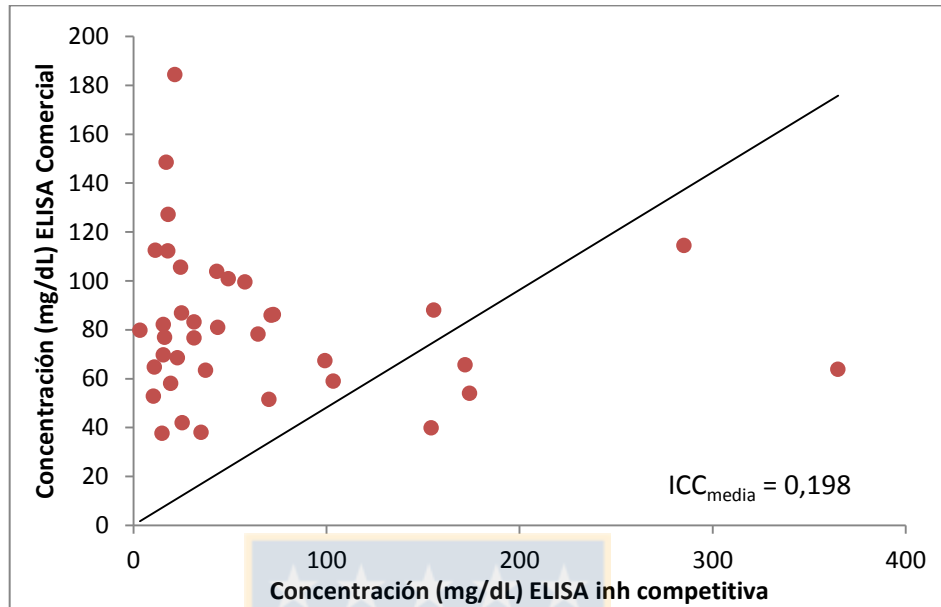
concentración mayor, se observa diferencias significativas entre las tres presentaciones de antígeno, donde el péptido de Apo B presenta una inhibición nula (0%), seguido de LDL con un 59%, y finalmente *TruCal* con un 87%. Con estos resultados se puede concluir diferencias importantes de inhibición para distintos antígenos, las cuales aumentan significativamente al aumentar la concentración de éstos.



**Figura 16. Comparación de inhibición de tres matrices diferentes en tres concentraciones de Apo B.** Se realizó ELISA de inhibición competitiva con tres concentraciones (2, 156, 2500 ng/mL) de un péptido de Apo B (4105 – 4215 residuos), LDLn y *TruCal*. \*p < 0,05 según test de Tukey (n = 3 ensayos en duplicado). Fuente: Elaboración propia.

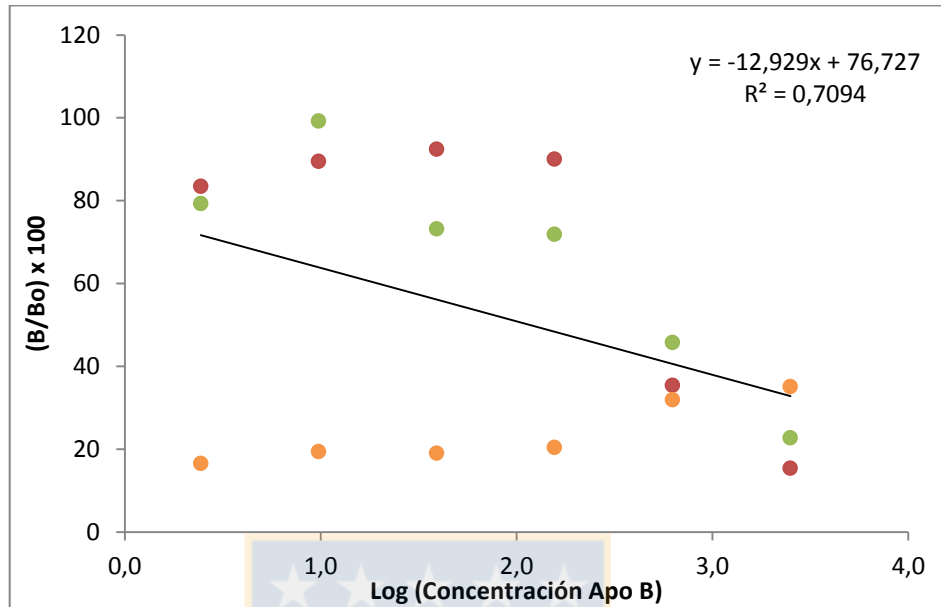
Se evaluó la exactitud del método, determinando el CCI, que mide el grado de acuerdo o consistencia entre las medidas cuya varianza, en este caso, es atribuida al uso de dos instrumentos de medida sobre una misma muestra. Para ello se cuantificaron 37 muestras de suero mediante un ELISA comercial para cuantificación de Apo B (*R&D*) y el ELISA de inhibición competitiva estandarizado para la cuantificación de Apo B. El CCI determinado para las medidas individuales corresponde a 0,090 y el CCI para las medidas promedio es de 0,198 (Figura 17). Estos resultados representan la baja exactitud del método en relación al ELISA comercial y dan cuenta de lo poco fiable que serían los resultados obtenidos con este inmunoensayo.





**Figura 17. Relación de la concentración de Apo B en muestras cuantificadas por ELISA estandarizado y ELISA comercial.** Se cuantificó Apo B en 37 muestras de suero por ELISA estandarizado y ELISA comercial (*R&D*). La gráfica representa concentraciones obtenidas en mg/dL. El CCI se determinó en base al método de Bland y Altman. Fuente: Elaboración propia.

Finalmente, considerando abarcar todas las posibilidades para el realizar el inmunoensayo, se probaron condición no denaturantes (sin tween-20) para la realizar las curva de inhibición. Este cambio no fue favorable para la curva, ya que no fue posible establecer el rango lineal obtenido en presencia de tween-20, por lo cual fue descartado como opción (Figura 18).



**Figura 18. ELISA de inhibición competitiva para cuantificación de Apo B en condiciones no denaturantes.** Las soluciones competidoras se prepararon en ausencia de tween-20, el resto del inmunoensayo se realizó en las mismas condiciones estandarizadas anteriormente. La gráfica presentada muestra el logaritmo de las concentraciones v/s la relación porcentual (B/Bo), donde B = D.O. obtenida en cada concentración de Antígeno y Bo = D.O. en ausencia de Antígeno (n =3, cada color representa un valor). Fuente: Elaboración propia.

Con estos resultados, se concluye que existe una reacción antígeno-específica del AcM 2F4(1)E7, pero que se ve afectada de forma significativa frente a las distintas matrices y presentaciones del antígeno, lo que sumando a la baja fiabilidad que presentan los resultados obtenidos al comparar con un método comercial, hace imposible poder estandarizar el método de ELISA de inhibición competitiva para la cuantificación de Apo B con los AcMs a disposición.



## 4.2. Validación del método de ELISA sandwich para cuantificación de Apo A1

La selectividad del ELISA sandwich estandarizado se evaluó determinando la concentración de Apo A1 en tres presentaciones diferentes: Apo A1 libre obtenida de la delipidación de HDL en laboratorio de Bioquímica Clínica e inmunología, Apo A1 libre obtenida en laboratorio de Laurent Martinez, toulouse, Francia, y Suero control *Lyphochek* nivel 1 (*BioRad*), sembrados a una concentración de 25 ng/mL. Así, se obtuvo que el suero control *Lyphochek* no presentó diferencias significativas con HDL delipidada ni con el patrón de Apo A1. HDL delipidada por su parte, fue significativamente diferente con el patrón de Apo A1 (Tabla 11). Para complementar el análisis de selectividad se evaluó exactitud y precisión de los resultados obtenidos. Así, se determinó que no existen diferencias significativas entre el valor teórico y el valor obtenido en el caso del suero control *Lyphochek* y del patrón de Apo A1; por el contrario, para HDL delipidada el valor obtenido fue significativamente diferente al valor real sembrado. Por otro lado, la precisión de estas determinaciones, en todos los casos, está dentro del rango aceptable (< 20%) (Tabla 12).

**Tabla 11. Evaluación de la selectividad del método ELISA sandwich para cuantificación de Apo A1.** Apo A1 se determinó en 3 matrices diferentes, utilizando el inmunoensayo estandarizado. Se presentan los promedios de concentración y DE en cada caso. Medias con letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) según test de Tuckey ( $n = 3$ ). Fuente: Elaboración propia.

Controles (25 ng/mL)	Concentración (ng/mL) (Prom. $\pm$ DE)
Apo A1 libre (Lab. Bq, clínica e inmunología)	21 $\pm$ 1,5 <sup>a</sup>
Apo A1 libre (Lab. Francia)	26 $\pm$ 2,5 <sup>b</sup>
Suero control <i>Lyphochek</i> nivel 1 ( <i>BioRad</i> ),	25 $\pm$ 1,0 <sup>ab</sup>

**Tabla 12. Evaluación de la exactitud y precisión de las determinaciones de selectividad del ELISA sandwich para cuantificación de Apo A1.** Se presenta el promedio de concentración, DE y CV en cada caso. Medias con (\*) son significativamente diferentes al valor real sembrado 25 ng/mL ( $p < 0,05$ ) según test t-Student ( $n = 3$ ). Fuente: Elaboración propia.

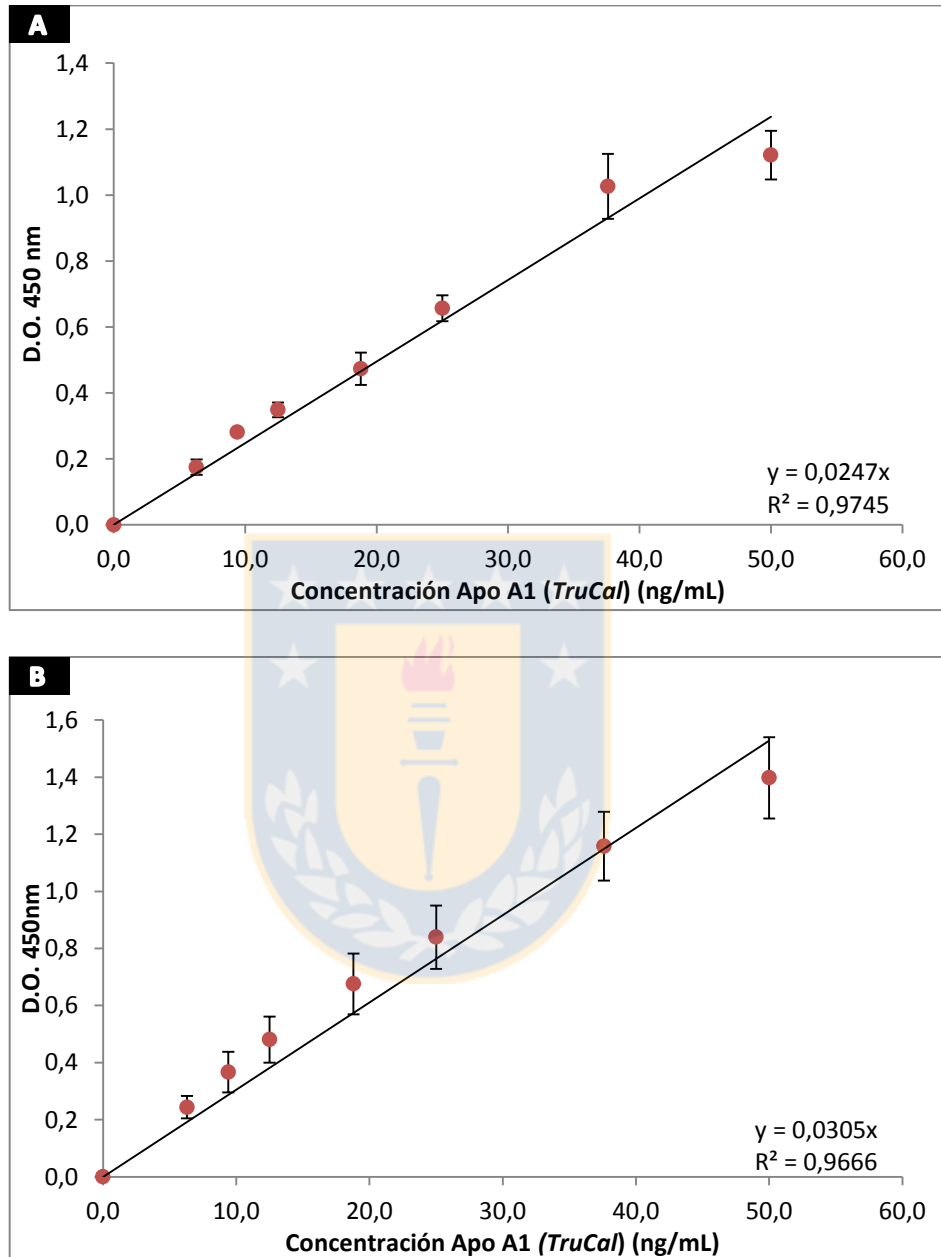
Controles (25 ng/mL)	Concentración (ng/mL) (Prom. $\pm$ DE)	CV
Apo A1 libre (Lab. Bq, clínica e inmunología)	21 $\pm$ 1,5*	7,4
Apo A1 libre (Lab. Francia)	26 $\pm$ 2,5	9,6
Suero control <i>Lyphochek</i> nivel 1 ( <i>BioRad</i> ),	25 $\pm$ 1,0	4,0

La precisión del ELISA se evaluó mediante los coeficientes de variación intraensayo e interensayo. En cada caso, se determinó la variación de la curva de calibración para las 7 concentraciones de la curva de calibración y del suero control (*BioRad*) en tres concentraciones diferentes (8, 15 y 40 ng/mL). El coeficiente de variación intraensayo para las concentraciones de la curva de calibración se encontró entre 3,3 y 9,6% y el coeficiente de variación

interensayo entre 10,2 y 19,4% (Tabla 13, Figura 19). En el caso de los controles, la evaluación de precisión intraensayos presentó CV de 4,0, 7,5 y 5,7% e interensayos de 15,3, 16,5 y 11,6% para las concentraciones 8, 15 y 40 ng/mL (*BioRad*), respectivamente (Tabla 14). Los valores de CV para la precisión intraensayo aceptables corresponde a 10% y los CV de precisión interensayo aceptables corresponde a 20%, por lo cual, tanto para las concentraciones de la curva de calibración como para los tres controles evaluados, la precisión intraensayo e interensayo se mueven dentro del rango aceptable. Por lo tanto, el método cumple con el criterio de aceptabilidad requerido.

**Tabla 13. Evaluación de precisión intraensayo e interensayo de las concentraciones de la curva de calibración para cuantificación de Apo A1.** Se presenta promedio de D.O. y CV para cada caso. Precisión intraensayo (n= 9), precisión interensayo (n= 10). Fuente: Elaboración propia.

Concentración Apo A1 ( <i>Truca</i> ) ng/mL	Precisión intraensayo		Precisión interensayo	
	D.O. promedio	CV (%)	D.O. promedio	CV (%)
50	1,121	6,6	1,398	10,2
37,6	1,026	9,6	1,158	10,4
25	0,657	6,0	0,839	13,2
18,8	0,485	8,1	0,676	15,7
12,5	0,349	6,4	0,481	16,9
9,4	0,281	3,3	0,367	19,4
6,3	0,181	8,9	0,244	16,2
0	0		0	



**Figura 19. Evaluación de precisión intraensayo e interensayo para las concentraciones de la curva de calibración para la cuantificación de Apo A1.** Se presenta el promedio y las DE.para cada punto. (A) Precisión intraensayo (n= 9). (B). Precisión interensayo (n= 10). Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 14. Evaluación de precisión intraensayo e interensayo de un suero control de concentración conocida para ELISA sandwich para la cuantificación de Apo A1.** Se evaluó la precisión intraensayo e interensayo con tres concentraciones de suero control (*BioRad*) 8 ng/mL (1), 15 ng/mL (2) y 40 ng/ml (3). Se presenta promedio de la concentración y CV para cada ensayo. Fuente: Elaboración propia.

Muestra	Precisión intraensayo			Precisión interensayo		
	1	2	3	1	2	3
Número de repeticiones	20	20	20	10	10	10
Concentración promedio (ng/mL)	9	21	33	8,1	15,8	35,1
CV(%)	4,0	7,5	5,7	15,3	16,5	11,6

La exactitud del método se evaluó en las mismas concentraciones que la precisión, pero en relación sólo a las determinaciones realizadas en un suero control (*BioRad*). Para ello se evaluaron las concentraciones del suero obtenidas en 10 ensayos independientes, se calcularon los porcentajes de recuperación y la diferencia entre la concentración esperada y la concentración obtenida. Los porcentajes de recuperación de las concentraciones 8 y 15 ng/mL se presentan dentro del rango (90 – 110%) con un 101 y 105%, respectivamente, y no mostraron diferencias significativas entre las concentraciones esperadas y obtenidas. La concentración mayor, 40 ng/mL, presentó un porcentaje de recuperación 2 puntos por debajo del rango óptimo aceptable, 88%, lo cual se ratifica con la diferencia significativa obtenida al aplicar el test t-Student entre el valor obtenido y el valor real (Tabla 15). Considerando estos resultados, se concluye que el ELISA sandwich

estandarizado, en general, cumple con los criterios de aceptabilidad para exactitud, considerando que el rango óptimo a utilizar sea a concentraciones menores de 40 ng/mL.

**Tabla 15. Evaluación de la exactitud para el método de ELISA sandwich para la cuantificación de Apo A1.** Se presenta la concentración obtenida, concentración esperada y porcentaje de recuperación. Medias con (\*) son significativamente diferentes la concentración esperada ( $p < 0,05$ ) según test t-Student. Fuente: Elaboración propia.

EXACTITUD			
n	10	10	10
Concentración esperada (ng/mL)	8	15	40
Concentración obtenida (ng/mL)	8,1	15,8	35,1*
% de recuperación	101	105	88

El parámetro de linealidad fue evaluado en la fase de estandarización del método al determinar el rango lineal de la curva de calibración (Figura 15). Se obtiene un  $R^2 = 0,9801$ , el cual cumple con el criterio óptimo de aceptabilidad.

En conclusión, los parámetros de calidad determinados se mueven dentro de los rangos aceptables para cada uno de ellos. El método testeado se cataloga como aceptable para su uso en la cuantificación de Apo A1 sérica, pero teniendo en cuenta las consideraciones descritas anteriormente.

## 5. Cuantificación de Apo A1 sérica en muestras de niños y adolescentes con antecedentes familiares de ECV precoz

Las características clínico-antropométricas de la población de estudio (niños y adolescentes con antecedentes familiares de ECV precoz) y de la población control (sin esta historia familiar) se presentan en la tabla 16. Se observa que no existen diferencias significativas en la edad, peso, talla, presión arterial o IMC entre ambos grupos. Los valores CC y IMC-Z score, por otro lado, se presentan disminuidos significativamente en el grupo de estudio, en relación al control.

**Tabla 16. Características clínico-antropométricas de la población de estudio y la población control.** Se presenta media y DE (\*) Son medias significativamente diferentes entre sí ( $p < 0,05$ ) según test t-Student para variables paramétricas y test Mann-Whitney para variables no paramétricas. Fuente: Elaboración propia.

	Grupo Control n = 46	Grupo de Estudio n = 108	
Variable	media $\pm$ DE	media $\pm$ DE	valor p
Edad	10,5 $\pm$ 2,1	10,8 $\pm$ 3,7	0,3758
Peso (kg)	47,5 $\pm$ 15,2	46,1 $\pm$ 17,5	0,6404
Talla (cm)	143,1 $\pm$ 12,8	144,4 $\pm$ 20,3	0,1795
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	22,6 $\pm$ 4,5	21,2 $\pm$ 4,2	0,0649
IMC-Z score	1,3 $\pm$ 0,9	0,9 $\pm$ 1,1	0,0321*
CC (cm)	78,6 $\pm$ 13,2	72,1 $\pm$ 14,6	0,0127*
PAS (mmHg)	108,8 $\pm$ 13,2	107,2 $\pm$ 10,3	0,4737
PAD (mmHg)	65,9 $\pm$ 6,7	66,5 $\pm$ 8,5	0,6814

Las determinaciones del perfil lipídico para ambos grupos, incluyendo Apo A1 cuantificada por el método estandarizado y validado, se presenta en la tabla 17 y 18. Se observa que el 20% de la población en estudio presentó CT elevado ( $> 200$  mg/dL) versus el 7% del grupo control, lo cual muestra una tendencia de valores aumentados, pero que no alcanzan diferencia estadística. El 12% del grupo de estudio muestra un elevado valor de C-LDL ( $>130$  mg/dL), comparado con un 0% del grupo control. Nuevamente se presenta una tendencia del grupo de estudio, pero ésta no es reflejada significativamente en los promedios obtenidos. C-HDL se presenta significativamente disminuido en el grupo de estudio, con un 28% de los valores disminuidos ( $< 40$  mg/dL) versus el 9% del grupo control. Los TG mostraron valores elevados ( $>130$  mg/dL) con una prevalencia de 37% versus 13%, entre el grupo de estudio y el grupo control respectivamente, aumentado de forma significativa. Con respecto a C-no HDL, se encontraron valores aumentados significativamente en el grupo de estudio, correspondiendo a un 20% de los casos, en relación a un 2% del grupo control. La relación TG/C-HDL se encuentra significativamente elevada, con un 27% de prevalencia en el grupo de estudio versus un 9% en el grupo control.

En relación a Apo A1, no presentó diferencias significativas entre ambos grupos; sin embargo se observa una prevalencia de valores  $<120$  mg/dL en la población de estudio de un 13% versus un 2% en la población control. Además, se realizó una comparación categorizando por sexos, donde se puede observar una disminución significativa de Apo A1 en el caso de las mujeres del grupo de



estudio versus el grupo control, diferencias que no se presenta en los hombres. (Tabla 18). En general, la prevalencia de dislipidemias, considerando uno o más parámetros alterados del perfil lipídico, fue de 55% para la población en estudio versus un 22% para el control (Tabla 19).

**Tabla 17. Perfil lipídico de la población de estudio y la población control.** Se presenta media y DE. (\*) Son medias significativamente diferentes entre sí ( $p < 0,05$ ) según test t-Student para variables paramétricas y test Mann-Whitney para variables no paramétricas. Fuente: Elaboración propia.

	Grupo Control n = 46	Grupo de Estudio n = 108	
Variable	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Valor p
CT (mg/dL)	152 $\pm$ 28	166 $\pm$ 58	0,3444
C-HDL (mg/dL)	55 $\pm$ 10	47 $\pm$ 12	0,0007*
C-LDL (mg/dL)	81 $\pm$ 23	96 $\pm$ 54	0,2016
TG (mg/dL)	84 $\pm$ 45	112 $\pm$ 66	0,0016*
C-No HDL	97 $\pm$ 27	119 $\pm$ 55	0,029*
TG/C-HDL	1,7 $\pm$ 1,2	2,7 $\pm$ 2,1	0,0001*
Apo A1 (mg/dL)	165 $\pm$ 23	157 $\pm$ 34	0,11

CT: colesterol total; C-HDL: colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad; C-LDL: colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad; TG: triglicéridos; C-no HDL: colesterol no HDL.

**Tabla 18. Prevalencias de parámetros alterados en el perfil lipídico en población de estudio y la población control.** Se presenta porcentajes (%) de parámetros alterados en relación al rango de referencia. Fuente: Elaboración propia.

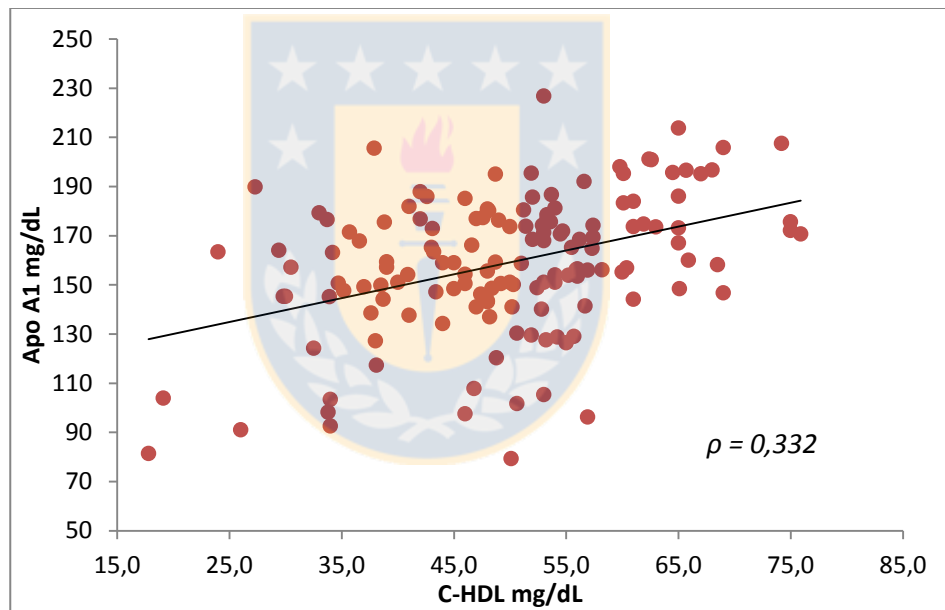
Variable	Grupo Control n = 46	Grupo de Estudio n = 108	Rango de referencia
CT	6,5%	20%	> 200 mg/dL
C-HDL	9%	28%	< 40 mg/dL
C-LDL	0%	12%	>130 mg/dL
TG	13%	37%	>130 mg/dL
C-No HDL	2%	20%	> 145 mg/dL
TG/C-HDL	9%	27%	> 3
Apo A1	2,2%	13%	<120 mg/dL
Dislipidemias	22%	55%	1 o más parámetros alterados

CT: colesterol total; C-HDL: colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad; C-LDL: colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad; TG: triglicéridos; C-no HDL: colesterol no HDL.

**Tabla 19. Determinación de Apo A1 en población de estudio y población control, según sexo.** Se presenta media y DE (\*) Son medias significativamente diferentes entre sí ( $p < 0,05$ ) según test t-Student. Grupo control: mujeres (n = 22) y hombre (n = 23). Grupo de estudio: mujeres (n = 54) y hombre (n = 48). Fuente: Elaboración propia.

	Grupo Control	Grupo de Estudio	
Sexo	media $\pm$ DE (mg/dL)	media $\pm$ DE (mg/dL)	valor p
Mujeres	167 $\pm$ 23	151 $\pm$ 31	0,0502*
Hombres	164 $\pm$ 23	165 $\pm$ 35	0,8463

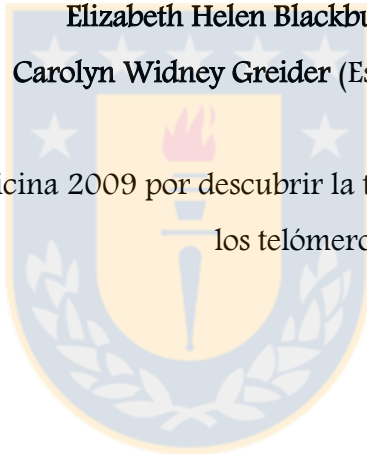
Para complementar los resultados obtenidos, se determinó el grado de asociación de los valores de Apo A1 con los de C-HDL de ambas poblaciones, por medio de la evaluación de correlación por el método de Pearson. El coeficiente de correlación ( $\rho$ ) obtenido corresponde a 0,332, el cual demuestra una débil asociación de los datos, considerando una correlación perfecta el valor 1, y una correlación nula el valor 0.



**Figura 20. Correlación entre valores de HDL y Apo A1.** Se determinó la correlación lineal entre HDL y Apo A1 por el test de Pearson para el conjunto de valores de la población control y estudio. Fuente: Elaboración propia.

**Elizabeth Helen Blackburn** (Australia, 1948), Bioquímica.  
**Carolyn Widney Greider** (Estados Unidos, 1961), Bioquímica.

Premio Nobel de Medicina 2009 por descubrir la telomerasa, una enzima que forma los telómeros durante la duplicación del ADN.



## DISCUSIÓN

Estadísticas presentadas por la OMS el año 2015 y por la Encuesta Nacional de Salud, realizada por el MINSAL el año 2010, demuestran que la ECV, tanto a nivel mundial como en nuestro país, corresponde a la primera causa de mortalidad por ENT [2, 4].

La disfunción endotelial, desequilibrio en la homeostasis del endotelio vascular, se relaciona con el inicio de la aterosclerosis, proceso inflamatorio crónico que lleva a la oclusión parcial o total de las arterias, y que puede terminar en un evento isquémico [10]. Este proceso es favorecido por una serie de factores de riesgo, definiendo a la ECV como una patología multifactorial [6].

Los factores de riesgo convencionales, aquéllos que están altamente estudiados y asociados al aumento de la prevalencia de ECV, son clasificados como no modificables y modificables. Dentro de los primeros, se encuentra el antecedente de ECV prematura en un familiar de primer grado, factor de riesgo independiente que implica una carga genética para el individuo inherente a éste, proporcionándole un riesgo cardiovascular base y catalogando esta población como de mayor riesgo que una que no presenta este factor [37]. Poblaciones con este factor de riesgo, por tanto, son foco de mayor estudio y se hace más necesaria la pesquisa temprana de otros factores de riesgo asociados a estas personas.

Dentro de los parámetros a determinar para el cálculo de riesgo cardiovascular de un individuo están el C-LDL, asociándole a un rol aterogénico, y C-HDL, con una función protectora del endotelio, las cuales se cuantifican de forma rutinaria como parte de perfil lipídico, permitiendo predecir el riesgo cardiovascular del individuo [54]. A pesar, de que estas determinaciones proporcionan información para estratificar al individuo con bajo, moderado o alto riesgo, existe una parte de la población que a pesar de presentar un bajo riesgo, determinado por las concentraciones de colesterol séricas, llegan a presentar algún evento cardiovascular a lo largo de su vida. Por esta razón existe una constante búsqueda de nuevos biomarcadores para mejorar la predicción de este riesgo. Así, Apo B y Apo A1, proteínas presentes en los complejos macromoleculares LDL y HDL, respectivamente, surgen como una alternativa o a lo menos un complemento, a las determinación de C-LDL y C-HDL, con un mayor poder predictivo [111, 112].

La pesquisa de factores de riesgo cardiovascular a temprana edad, por el prematura inicio de la ECV, y la utilización de nuevos biomarcadores en complemento con los marcadores convencionales, mejorarían la predicción de un evento cardiovascular, los diagnósticos y/o el posible tratamiento a seguir. Así, el grupo de expertos en salud cardiovascular del NHLBI, proponen un cribado a niños de 10 años para pesquisa de dislipidemias, sumando a las determinaciones de perfil lipídico la cuantificación de Apo B y Apo A1, y

destacando el riesgo de poblaciones con historia familiar de ECV precoz, como individuos de mayor cuidado [32].

A la fecha, los laboratorios clínicos no tienen implementadas técnicas para la cuantificación de Apo B y Apo A1 de forma rutinaria, lo que impide incluir estas determinaciones al resto de los parámetros convencionales para la predicción de riesgo cardiovascular. Sumado a esto, las herramientas más utilizadas para la cuantificación de estas apolipoproteínas (nefelometría y turbidimetría), presentan una baja sensibilidad y especificidad relacionadas con las características propias de la técnica y por la utilización de anticuerpos policlonales. Es por esto que la implementación de inmunoensayos, caracterizados por un alto grado de sensibilidad y detectabilidad *per se*, sumado a la sensibilidad y especificidad dada por el uso de anticuerpos monoclonales anti Apo B y Apo A1, permitiría mejorar significativamente el método de cuantificación de estas apolipoproteínas.

Por lo anterior, en este trabajo se planteó estandarizar y validar dos inmunoensayos para cuantificar Apo B y Apo A1, con AcMs, para utilizarlos posteriormente en una población de niños y adolescentes que presenta antecedente de ECV precoz, determinando cómo se encuentran los valores de estas apolipoproteínas en una población chilena con este factor de riesgo asociado.

Para poder estandarizar y validar los inmunoensayos propuestos, fue fundamental obtener y seleccionar los AcMs adecuados para ello, proceso que se llevó a cabo a partir de un *stock* acotado de hibridomas disponibles en el laboratorio. Cuatro hibridomas productores de AcMs anti Apo A1 y cuatro anti Apo B, fueron cultivados para posteriormente ser expandidos en la cavidad peritoneal de ratones de la cepa BALB/c. Entre los ocho hibridomas disponibles, se evidenció la baja respuesta antígeno-específica del clon anti-Apo B, 7G10, y la reacción cruzada con albúmina humana de clon anti-Apo B, 4E9, lo cual los descartó para su expansión.

Tradicionalmente el proceso de expansión clonal se ha realizado en ratones de la cepa BALB/c por su gran capacidad para producir tumores líquidos en la cavidad peritoneal, cuyos volúmenes pueden estar entre 2 y 10 mL/ratón, concentrando la producción de los AcMs requeridos [171]. La variación tanto del volumen del líquido ascítico como de la concentración final del AcM obtenido, tiene directa relación con la variabilidad biológica propia de los animales utilizados y de la reacción con los clones inyectados. Es así como de los 6 clones expandidos, en las mismas condiciones y cantidad de ratones inmunizados, se obtuvieron volúmenes totales de líquido ascítico entre 5 – 27 mL. A pesar de la gran diferencia entre estos volúmenes, a partir de todos fue posible obtener las cantidades suficientes de AcMs para el trabajo posterior.



Para la obtención de los AcMs es fundamental realizar un proceso de purificación acucioso, ya que el uso de ratones para la expansión clonal implica una acumulación de restos biológicos en el líquido ascítico obtenido y de otras moléculas propias de un organismo. El proceso de purificación se realizó mediante dos etapas, la primera para aislar las globulinas presentes en el líquido ascítico, por precipitación con sulfato de amonio saturado [172], y la segunda para obtener el AcM puro, mediante cromatografía de afinidad, utilizando la resina agarosa-proteína G, altamente afín al isotipo IgG<sub>1</sub> de los AcMs producidos [173]. La precipitación de globulinas se llevó a cabo con el volumen total del fluido ascítico y la cromatografía de afinidad se realizó con 4 a 5 alícuotas de 600 – 800 µL de globulinas, dependiendo del clon y suficientes para realizar todo el trabajo a desarrollar en este proyecto. Las globulinas no utilizadas se guardaron en las condiciones adecuadas (- 80°C) pudiendo ser purificadas por el mismo método en el momento requerido. Las concentraciones obtenidas de los 6 AcMs purificados fueron todas superiores a 1 mg/mL (1 -1,6 mg/mL), lo cual fue óptimo para el trabajo realizado y para su buen almacenamiento.

Con el fin de optimizar las concentraciones de trabajo, nivel de afinidad, reducir el ruido y/o uniones inespecíficas del ensayo, se realizó la titulación de los AcMs por ELISA indirecto [174]. El título de cada anticuerpo, que por definición corresponde a la mitad de D.O máxima, se muestra en las tablas 6 y 7, pero las diluciones utilizadas en el proceso se ajustaron según las curvas de

titulación (figura 5) en relación a los requerimientos del experimento. Los títulos obtenidos se pueden ver afectados por cambio de *stock* de los reactivos, es por eso que una nueva obtención de LDLn, HDLn, o nuevo suero control, requirió realizar una nueva titulación de los anticuerpos de trabajo.

Los AcMs anti Apo A1, se titularon frente a HDL y frente a Apo A1 libre, obteniendo igual reacción de cada anticuerpo contra ambos antígenos. Este resultado sugiere que los anticuerpos producidos pueden ser utilizados para la determinación de Apo A1 total, ya que no existe una discriminación de reacción frente a estas dos presentaciones de antígeno, considerando que aunque el mayor porcentaje de Apo A1 en circulación se encuentra asociado a lípidos, entre el 5-10% del total de Apo A1 se encuentra libre de lípidos [175]. Los AcMs anti-Apo B, por su parte, se titularon solo frente a LDLn, ya que Apo B por su naturaleza altamente hidrofóbica, no se presenta libre de lípidos en circulación [116].

El AcM anti Apo A1, 1C11B7, y ambos AcMs anti Apo B, 8G12B4 y 2F4(1)E7, para ser utilizados como Ac de revelado necesitaron una “etiqueta” capaz de generar una señal. Este debe cumplir con mantener la inmunoreactividad del mismo y la capacidad de generar señal de la molécula con la que fue conjugado, además de mantener una unión estable. Para este marcaje se utilizó biotina, particularmente ésteres de N-hidroxisulfosuccinimida (NHS) de biotina, que reaccionan con los grupos aminos no protonados de IgG,

asociándose hasta 10 moléculas de biotina por molécula de IgG [176]. Esta molécula presenta alta afinidad con streptoavidina y avidina ( $K_d = 10^{-15}$ ) [177], las cuales, previa conjugación con una enzima, permite generar la señal y la amplificación de la misma, por la capacidad de unir hasta 4 moléculas de biotina. Los tres Ac conjugados presentaron un título menor al determinado sin conjugar, pero una D.O. significativamente mayor y, por ende, amplificación de la señal.

El clon 8G12B4 presentó una reacción inespecífica con la proteína de bloqueo, BSA, que se evidenció cuando éste fue conjugado con biotina y en el ELISA sandwich con el otro AcM anti-Apo B, 2F4(1)E7, al presentar una elevada lectura de D.O. en ausencia de antígeno. A pesar de intentar sopesar estos problemas, con el uso de otras proteínas de bloqueo o probando distintas concentraciones y/o títulos para disminuir las interacciones inespecíficas, esto no fue posible, y el AcM fue descartado como Ac de captura o revelado en la estandarización del inmunoensayo. Debido a que solo se contaba con 2 AcMs anti-Apo B, se hizo necesario cambiar el tipo de inmunoensayo, llevando a la estandarización de un ELISA de competencia, utilizando solo el AcM 2F4(1)E7-bit. Este tipo de inmunoensayo es altamente utilizado en la clínica, pero, en general, la sensibilidad y detectabilidad de estos ensayos es inferior a la de un ELISA sandwich [169]. A pesar de esto, frente a las nuevas condiciones, se presentó como la mejor opción a utilizar.

Uno de los puntos clave a considerar en la estandarización del ELISA de competencia para cuantificar Apo B, correspondió a la variabilidad en la reacción de los AcMs contra distintos *stocks* de LDLn. La LDLn es altamente susceptible a modificaciones, principalmente a oxidación, por lo cual es recomendable almacenarla en presencia de nitrógeno, en oscuridad, y por un tiempo no superior a 1 mes y medio. Por esta razón, por cada nueva preparación de LDLn, fue necesario volver a titular los AcMs anti-Apo B. La reacción obtenida con cada nuevo *pool* de LDLn, fue altamente variable, desde una reactividad muy baja (D.O. < 0,4) a una moderada y alta (D.O.> 2,0), en relación a una misma dilución del AcM. La utilización de un suero calibrador (*TruCal*), mostró una variabilidad en la reactividad que fue mucho menor, lo cual dio consistencia a los resultados y permitió estandarizar la curva de calibración.

En relación a los AcMs anti-Apo A1: 8B12, 8A4 y 2C10, los tres se caracterizaron para ser utilizados como Acs de captura, siendo posible con todos ellos obtener una curva de calibración en un amplio rango de concentraciones, previa linearización por medio de logaritmo, para un ELISA tipo sandwich. En todos los casos, 1C11B7-bit se utilizó como Ac de revelado. De las tres curvas obtenidas, la mejor correlación lineal y la mayor sensibilidad fue dada por el AcM 2C10, estandarizando la curva de calibración con este Ac. Se disminuyeron las concentraciones del rango de la curva de calibración permitiendo una relación directa concentración/D.O., y se cambió el sustrato OPD a TMB, ya que el segundo está altamente descrito que presenta una

mayor sensibilidad que el primero [178], lo que permitió determinar bajas concentraciones y obtener una curva de calibración en el rango de 0 – 50 ng/mL, con lecturas de D.O. mayores a 1.0 para las concentraciones superiores.

La validación de los métodos, que se realizó en base a la Guía de Técnicas Inmunoenzimáticas de Ochoa *et al.* 2012 y la Guía de Aspectos Generales sobre la Validación de Métodos del ISP, 2010, es un paso fundamental para asegurar que los resultados obtenidos con la técnica o método estandarizado son confiables. Para realizar esto, fue necesario determinar un plan de validación que contempla definir el método, establecer los parámetros a evaluar, las pruebas experimentales y los criterios de aceptabilidad [179]. En el caso de los inmunoensayos estandarizados se determinó evaluarlos parámetros de selectividad, linealidad, precisión intraensayo e interensayo y exactitud.

El ELISA de competencia estandarizado para la cuantificación de Apo B no logró cumplir con los criterios de aceptabilidad propuesto para cada parámetro, siendo la variabilidad de los resultados obtenidos y del comportamiento frente a las diferentes matrices el principal impedimento. En relación a la selectividad (Tabla 9), el estándar de Apo B, presentó diferencias significativas con LDL y el suero control de lípidos, pero no con el suero control *BioRad*. Asimismo, LDL, suero control de lípidos y suero control *BioRad*, no

presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Este resultado por sí solo, no representa grandes diferencias de comportamiento entre las distintas matrices, pero al analizar el nivel de variabilidad de los datos se determinó un CV entre el 55 y 123%, y una diferencia altamente significativa, en las 4 matrices utilizadas, entre el valor real sembrado (300 ng/mL) y el valor obtenido con la técnica. Este nivel de variabilidad entre las matrices, complementado con las diferencias significativas encontradas en los porcentajes de inhibición de 3 matrices diferentes (figura 16), y la baja correlación entre el método evaluado y un método comercial utilizado (figura 18), demuestran la baja aplicabilidad que logra el método estandarizado. En consecuencia, el ELISA para cuantificación de Apo B se encuentra limitado, y se descarta su utilización para cuantificar Apo B en la población de estudio, por no cumplir con las características básicas que permitirían obtener resultados confiables.

El ELISA sandwich para cuantificación de Apo A1, cumplió con los criterios de aceptabilidad propuestos para cada parámetro evaluado, validando su uso para la cuantificación de Apo A1 en la población de niños y adolescentes en estudio. A pesar que en la evaluación de la selectividad, la Apo A1 libre obtenida en nuestro laboratorio mostró diferencias significativas entre la Apo A1 libre (Francia) y el valor real (25 ng/mL), es necesario considerar que esta proteína fue obtenida en el laboratorio, a partir de diferentes *pools* de HDL de donantes sanos, por lo cual existe una variabilidad biológica intrínseca de la

muestra, y no ha pasado por un control de calidad externo que la valide como un suero control *per se*. Aún así, no presenta diferencias estadísticamente significativas con el suero control *BioRad*, el cual sí corresponde a un suero control sometido a normas estrictas de control de calidad por el fabricante y altamente utilizado en la clínica. En relación a la exactitud, determinada con suero control *BioRad* en tres concentraciones distintas catalogadas como baja, media y alta (8,15 y 40 ng/mL), se aplicó el test t-Student y se determinó el porcentaje de recuperación. La concentración mayor obtenida presentó diferencias significativas con la concentración real sembrada y un porcentaje de recuperación dos puntos por debajo del rango aceptable, determinando un sesgo negativo de las determinaciones en este nivel de la curva. Frente a este resultado, y considerando que la concentración baja y media cumplen con el criterio de aceptabilidad para exactitud, se determinó limitar el rango de la curva para la cuantificación de las muestras, cuidando utilizar diluciones que permitan una determinación por debajo de 40 ng/mL. Los parámetros de precisión intraensayo, precisión interensayo y linealidad no presentaron inconvenientes para cumplir con los criterios de aceptabilidad propuestos para cada uno.

En relación al estudio poblacional, se reclutaron 108 niños y adolescentes con antecedente de ECV precoz, definida como un infarto agudo al miocardio y/o revascularización coronaria percutánea o quirúrgica en hombres < 55 años y mujeres < 60 años, para el estudio del perfil lipídico, incluyendo la cuantificación de Apo A1, y 46 niños y adolescentes sin este

antecedente, como grupo control. Para la caracterización de ambos grupos se determinaron parámetros clínico-antropométricos, de los cuales: la CC, determinación asociada a la acumulación de grasa a nivel abdominal y el IMC-Z score, correspondiente a la normalización del IMC en base a la desviación estándar Z, la cual es constante en una población independiente del estado nutricional del individuo [180], fueron significativamente menores en el grupo de estudio con relación al control. Debido a que el único parámetro de inclusión de grupo de estudio correspondió a la historia familiar, y viceversa, el único parámetro de exclusión del grupo control fue el antecedente de ECV precoz, sumando a que la única variable que se controló fue el rango etario de las poblaciones (2 y 18 años), es esperable que no existiera una total coincidencia en los parámetros de caracterización de los grupos. Considerando la categorización de las poblaciones en relación al estado nutricional, el 60,8% de la población control presentó sobrepeso u obesidad y sólo un 47,6% de la población de estudio presentó esta condición, lo que se corresponde con las diferencias encontradas en relación a la CC y el IMC-Z score.

La determinación de los parámetros lipídicos de las poblaciones, demostró que todas las categorías del grupo de estudio presentaron mayor porcentaje de valores alterados en relación con el grupo control, según los rangos de referencia. Aunque no en todos los casos esto se reflejó en una diferencia estadísticamente significativa (CT, C-LDL y Apo A1). Así el grupo de estudio presentó un 55% de prevalencia de dislipidemias versus un 22% del



grupo control. Este resultado suma otro factor de riesgo de ECV a más de la mitad de la población, que ya presenta como riesgo base la historia familiar de ECV prematura. La pesquisa de estos valores alterados permite que a los niños y adolescentes afectados se les proporcione un tratamiento en base a estilos de vida saludable, según los requerimientos del paciente, para revertir el riesgo de futura ECV.

La concentración de Apo A1, como se mencionó, no presentó diferencias significativas en el análisis comparativo del grupo en estudio y del grupo control, pero sí se encontró una prevalencia de valores  $< 120$  mg/dL en un 13% en relación a un 2,2% de la población control. Más aún, al categorizar la población según sexo, las mujeres del grupo de estudio presentaron una evidente disminución de los valores de Apo A1, los cuales alcanzan una diferencia estadísticamente significativa, en relación al grupo de control, no así en el sexo masculino, donde se obtuvieron valores prácticamente idénticos entre las dos poblaciones. Esto sugiere la posibilidad de que la prevalencia de dislipidemias o la historia familiar de ECV precoz, podrían afectar los valores de Apo A1 asociados a las mujeres, no así a los hombres. En relación a la correlación determinada entre HDL y Apo A1, esta se clasificó como débil ( $\rho = 0,332$ ), resultado que se puede deber a la heterogeneidad de las moléculas de HDL y el porcentaje de Apo A1 libre en circulación (5-10%). A pesar que se encontró una prevalencia mayor de valores alterados en el grupo de estudio, estos resultados no permiten por sí solos predecir un riesgo de futura ECV, ni se presenta como

una mejora sustancial por sobre los resultados obtenidos con el resto de los parámetros del perfil lipídico. Sin embargo, la importancia de estos resultados se relaciona con conocer los valores de Apo A1 en niños y adolescentes con antecedente de ECV precoz, de los cuales no existen estudios previos en la población chilena. Aunque no fue posible evaluar las concentraciones de Apo B en esta población con nuestros AcMs anti-Apo B, y no disponíamos de otro ensayo para ello, la determinación de estos valores sería un gran aporte para una posible de determinación del riesgo de estos individuos, ya que este parámetro permitiría obtener la relación Apo B/Apo A1, la cual se ha descrito permite mejores aproximaciones que ambas apolipoproteínas en forma individual [155].

En conclusión, el conocimiento de los valores de Apo A1 determinados para niños y adolescentes con historia familiar de ECV precoz en una población chilena, en conjunto con los parámetros de su perfil lipídico, demostraron diferencias sustanciales en relación a una población que no presenta este riesgo base, lo cual expone el estado metabólico de esta población, una mayor susceptibilidad de ésta a presentar dislipidemias, y por ende, un mayor riesgo de un futuro evento cardiovascular, permitiendo tomar medidas para proporcionarles un tratamiento en base a un estilo de vida saludable.

## REFERENCIAS

1. OMS. *Nota informativa; ¿Qué son las enfermedades cardiovasculares?* [cited 2018 Marzo]; Available from: [http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/about\\_cvd/es/](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/about_cvd/es/).
2. OMS, *global status report on noncommunicable diseases*. 2014.
3. OMS, *Global Health Estimates 2015 Summary Tables*. . 2015.
4. MINSAL, *Encuesta nacional de Salud ENS Chile 2009-2010*. 2010.
5. MINSAL, *Indicadores básicos de salud Chile 2011*.
6. MINSAL, *Implementación de enfoque de riesgo en el programa de salud cardiovascular*. 2009.
7. asociados, M.y.e., *Primer reporte de vigilancia de enfermedades no transmisibles 2011*.
8. MINSAL, *Guía Clínica: Diabetes mellitus tipo 2*. 2010.
9. MINSAL, *Guía Clínica: Hipertensión arterial primaria o esencial en personas de 15 años y más*. 2010.
10. Lahoz, C. and J.M. Mostaza, *La aterosclerosis como enfermedad sistémica*. revista española de cardiología 2007. **60** (2): p. 184 - 195.
11. Wadley, A.J., J.J. Veldhuyzen van Zanten, and S. Aldred, *The interactions of oxidative stress and inflammation with vascular dysfunction in ageing: the vascular health triad*. Age 2013. **35**(3): p. 705 - 18.
12. Aird, W.C., *Endothelium and haemostasis*. Hamostaseologie, 2015. **35**(1): p. 11 - 6.
13. Strijdom, H. and A. Lochner, *Cardiac endothelium: More than just a barrier*. SAHeart, 2009. **6**(3): p. 174 - 185.
14. Triggle, C.R., et al., *The endothelium: influencing vascular smooth muscle in many ways*. Can J Physiol Pharmacol, 2012. **90**(6): p. 713 - 38.
15. Lacza, Z., et al., *Mitochondrial nitric oxide synthase is not eNOS, nNOS or iNOS*. Free Radical Biology and Medicine, 2003. **35**(10): p. 1217 - 1228.
16. Forstermann, U. and W.C. Sessa, *Nitric oxide synthases: regulation and function*. Eur Heart J, 2012. **33**(7): p. 829 - 37, 837a - 837d.

17. Pober, J.S., W. Min, and J.R. Bradley, *Mechanisms of endothelial dysfunction, injury, and death*. Annu Rev Pathol, 2009. **4**: p. 71 - 95.
18. Favero, G., et al., *Endothelium and its alterations in cardiovascular diseases: life style intervention*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 801896.
19. Mudau, M., et al., *Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis*. Cardiovasc J Afr, 2012. **23**(4): p. 222 - 31.
20. Liao, J.K., *Linking endothelial dysfunction with endothelial cell activation*. J Clin Invest, 2013. **123**(2): p. 540 - 1.
21. Cahill, P.A. and E.M. Redmond, *Vascular endothelium - Gatekeeper of vessel health*. Atherosclerosis, 2016. **248**: p. 97 - 109.
22. Ross, R., *Atherosclerosis - An inflammatory disease* The New England Journal of Medicine, 1999. **340**(2): p. 115 - 126.
23. Park, K.H. and W.J. Park, *Endothelial Dysfunction: Clinical Implications in Cardiovascular Disease and Therapeutic Approaches*. J Korean Med Sci, 2015. **30**(9): p. 1213 - 25.
24. Herbert C. Stary, M., et al., *A Definition of Initial, Fatty Streak, and Intermediate Lesions of Atherosclerosis*. Circulation, 1994. **89**(5): p. 2462 - 2478.
25. Ezquerro, E.A., A.A. Barrero, and E.A. Barrero, *Estratificación del riesgo cardiovascular: importancia y aplicaciones*. Rev Esp Cardiol Supl., 2012. **12**(C): p. 8-11.
26. Perk, J., et al., *European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts)*. Eur Heart J, 2012. **33**(13): p. 1635 - 701.
27. Grundy, S.M., et al., *Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines*. Circulation, 2004. **110**(2): p. 227 - 39.
28. Mahmood, S.S., et al., *The Framingham Heart Study and the epidemiology of cardiovascular disease: a historical perspective*. The Lancet, 2014. **383**(9921): p. 999 - 1008.
29. Icaza, G., et al., *Estimación de riesgo de enfermedad coronaria mediante la función de Framingham adaptada para la población chilena*. Revista Medica de Chile 2009. **137**(1273 - 1282).

30. F, D.S.K., et al., *Estratificación de riesgo cardiovascular en la población chilena* Rev. Med. Clin. Condes 2012. **23**(6): p. 657 - 665.
31. MINSAL, *Enfoque de riesgo para la prevención de enfermedades cardiovasculares* 2014.
32. Membership, E.P., *Expert Panel on Integrated Guidelines for Cardiovascular Health and Risk Reduction in Children and Adolescents Summary Report*. 2012, National Heart, Lung, and Blood Institute. p. 1 - 73.
33. Ana Morales, M., CGC, et al., *Family History: An Essential Tool for Cardiovascular Genetic Medicine*. Congestive heart failure, 2008. **14**(1): p. 37 - 45.
34. Scheuner, M.T., P.W. Yoon, and M.J. Khoury, *Contribution of Mendelian disorders to common chronic disease: opportunities for recognition, intervention, and prevention*. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2004. **125C**(1): p. 50 - 65.
35. Ho, E., et al., *Genetic analysis in cardiovascular disease: a clinical perspective*. Cardiol Rev, 2011. **19**(2): p. 81 - 9.
36. Luirink, I.K., B.A. Hutten, and A. Wiegman, *Optimizing Treatment of Familial Hypercholesterolemia in Children and Adolescents*. Curr Cardiol Rep, 2015. **17**(9): p. 629.
37. Steven Shea, M., et al., *Family History as an Independent Risk Factor for Coronary Artery Disease*. the American College of Cardiology, 1984. **4**(4): p. 793 - 801.
38. Silberberg, J.S., et al., *Risk Associated with Various Definitions of Family History of Coronary Heart Disease*. American Journal of Epidemiology, 1998. **147**(12): p. 1133-9.
39. Howard D. Sesso, S., MPH, et al., *Maternal and paternal history of myocardial infarction and risk of cardiovascular disease in men and women*. Circulation, 2001. **104**: p. 393 - 398.
40. De Sutter, J., *Screening of family members of patients with premature coronary heart disease Results from the EUROASPIRE II family survey*. European Heart Journal, 2003. **24**(3): p. 249 - 257.
41. Nasir, K., et al., *Family history of premature coronary heart disease and coronary artery calcification: Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA)*. Circulation, 2007. **116**(6): p. 619 - 26.
42. Weijmans, M., et al., *Paternal or maternal history of cardiovascular disease and the risk of cardiovascular disease in offspring. A systematic review and meta-analysis*. Int J Cardiol, 2015. **179**: p. 409 - 16.

43. Gronewold, J., et al., *Coronary artery calcification, intima-media thickness, and ankle-brachial index are complementary stroke predictors*. *Stroke*, 2014. **45**(9): p. 2702 - 9.
44. Wang, T.J., et al., *Carotid intima-media thickness is associated with premature parental coronary heart disease: the Framingham Heart Study*. *Circulation*, 2003. **108**(5): p. 572 - 6.
45. Nasir, K., et al., *Coronary artery calcification and family history of premature coronary heart disease: sibling history is more strongly associated than parental history*. *Circulation*, 2004. **110**(15): p. 2150 - 6.
46. Barra, S., et al., *Early increase of carotid intima-media thickness in children with parental history of premature myocardial infarction*. *Heart*, 2009. **95**(8): p. 642 - 5.
47. S. Cuomo, et al., *Increased carotid intima-media thickness in children-adolescents, and young adults with a parental history of premature myocardial infarction*. *European Heart Journal*, 2002. **23**: p. 1345 - 1350.
48. Vercoza, A.M., et al., *Cardiovascular risk factors and carotid intima-media thickness in asymptomatic children*. *Pediatr Cardiol*, 2009. **30**(8): p. 1055 - 60.
49. Murali, A., et al., *Comparison of Carotid Intima Media Thickness in Children of Patients with and without Premature Coronary Artery Disease*. *J Clin Diagn Res*, 2016. **10**(12): p. OC29 - OC31.
50. Florido, R., et al., *Physical Activity, Parental History of Premature Coronary Heart Disease, and Incident Atherosclerotic Cardiovascular Disease in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study*. *J Am Heart Assoc*, 2016. **5**(9): p. 1 - 11.
51. Dallongeville, J., et al., *Association between the metabolic syndrome and parental history of premature cardiovascular disease*. *Eur Heart J*, 2006. **27**(6): p. 722 - 8.
52. Glowinska, B., M. Urban, and A. Koput, *Cardiovascular risk factors in children with obesity, hypertension and diabetes: lipoprotein(a) levels and body mass index correlate with family history of cardiovascular disease*. *Eur J Pediatr*, 2002. **161**(10): p. 511 - 8.
53. Soca, P.E.M., *Dislipidemias*. ACIMED, 2009. **20**(6): p. 265 - 273.
54. MINSAL, *Normas tecnicas: Dislipidemias*. 2000.
55. Havel, R.J., H.A. Eder, and J.H. Bragdon, *The Distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum*. *J Clin Invest.* , 1955. **34** (9): p. 1345 - 1353.

56. Jonas, A., *Lipoprotein structure*, in *Biochemistry of Lipids. Lipoproteins and Membranes (4° edition)*. 2002, Elsevier. p. 483 - 504.
57. Morita, S.-y., *Metabolism and modification of apolipoprotein B-containing lipoproteins involved in dyslipidemia and atherosclerosis*. Biol. Pharm. Bull, 2016. **39** (1 ): p. 1 - 24.
58. Nelson, D.L., M.M. Cox, and C. Cuchillo, *Lehninger principios de bioquímica*. 2009: Omega.
59. Kenneth R Feingold, M. and M. Carl Grunfeld, PhD, *Introduction to lipids and lipoproteins*, C.G. De Groot LJ, Dungan K, et al., editors., Editor. 2015, MDText.com, Inc., South Dartmouth (MA).
60. Pujol, M.C., *Mecanismos básicos. Absorción y excreción de colesterol y otros esteroides*. Clin Invest Arterioscl., 2014. **26** (1): p. 41 - 47.
61. Hussain, M.M., *Intestinal lipid absorption and lipoprotein formation*. Curr Opin Lipidol, 2014. **25**(3): p. 200 - 6.
62. Siddiqi, C.M.M.a.S., *Control of chylomicron export from the intestine*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2016. **310**: p. G659 – G668.
63. Mansbach, C.M. and S.A. Siddiqi, *The biogenesis of chylomicrons*. Annu Rev Physiol, 2010. **72**: p. 315 - 33.
64. Hussain, M.M., et al., *Multiple functions of microsomal triglyceride transfer protein*. Nutrition & Metabolism, 2012. **9**(14): p. 1 - 16.
65. Dash, S., et al., *New Insights into the Regulation of Chylomicron Production*. Annu Rev Nutr, 2015. **35**: p. 265 - 94.
66. Phillips, M.C., *Apolipoprotein E isoforms and lipoprotein metabolism*. IUBMB Life, 2014. **66**(9): p. 616 - 23.
67. van der Wulp, M.Y.M., H.J. Verkade, and A.K. Groen, *Regulation of cholesterol homeostasis*. Molecular and Cellular Endocrinology, 2013. **368**(1-2): p. 1 - 16.
68. Mason, T.M., *The role of factors that regulate the synthesis and secretion of very-low-density lipoprotein by hepatocytes*. Critical reviews in clinical laboratory sciences, 1998. **35** (6): p. 461 – 487
69. Kang, S. and R.A. Davis, *Cholesterol and hepatic lipoprotein assembly and secretion* Biochimica et biophysica Acta, 2000. **1529**: p. 223 - 230.
70. Goldstein, J.L. and M.S. Brown, *The LDL receptor and the regulation of cellular cholesterol metabolism*. J. Cell Set. Suppl. , 1985. **3**: p. 131 - 137.

71. Goldstein, J.L. and M.S. Brown, *The LDL Receptor*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2009. **29**(4): p. 431 - 438.
72. Kulkarni, K.R., et al., *Quantification of HDL2 and HDL3 cholesterol by the Vertical Auto Profile-II (VAP-II) methodology*. Journal of Lipid Research, 1997. **38**: p. 2353 - 2364.
73. Kontush, A., *Small, Dense HDL Particles Exert Potent Protection of Atherogenic LDL Against Oxidative Stress*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2003. **23**(10): p. 1881 - 1888.
74. Favari, E., et al., *Small Discoidal Pre- $\beta$ 1 HDL Particles Are Efficient Acceptors of Cell Cholesterol via ABCA1 and ABCG1*. Biochemistry, 2009. **48**(46): p. 11067 - 11074.
75. O'Connell, B.J. and J. Genest, *High-Density Lipoproteins and Endothelial Function*. Circulation, 2001. **104**(16): p. 1978 - 1983.
76. Wang, S. and J.D. Smith, *ABCA1 and nascent HDL biogenesis*. Biofactors, 2014. **40**(6): p. 547 - 54.
77. Saeedi, R., M. Li, and J. Frohlich, *A review on lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency*. Clin Biochem, 2015. **48**(7-8): p. 472 - 5.
78. Yvan-Charvet, L., N. Wang, and A.R. Tall, *Role of HDL, ABCA1, and ABCG1 transporters in cholesterol efflux and immune responses*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(2): p. 139 - 43.
79. Papalea, G.A., et al., *Extracellular hydrophobic regions in scavenger receptor BI play a key role in mediating HDL-cholesterol transport*. Arch Biochem Biophys., 2010 **496** (2): p. 132 - 139.
80. Reaven, E., et al., *Expression of scavenger receptor class B type 1 (SR-BI) promotes microvillar channel formation and selective cholesteryl ester transport in a heterologous reconstituted system*. PNAS, 2001. **98** (4): p. 1613 - 1618.
81. Bruce, C., J. Roland A. Chouinard, and A.R. Tall, *Plasma lipid transfer proteins, high-density lipoproteins, and reverse cholesterol transport*. Annu. Rev. Nutr., 1998. **18**: p. 297 - 330.
82. Hunt, J.A. and Z. Lu, *Cholesteryl ester transfer protein (CETP) Inhibitors*. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2009. **9**(5): p. 419 - 427.
83. Besler, C., T.F. Luscher, and U. Landmesser, *Molecular mechanisms of vascular effects of High-density lipoprotein: alterations in cardiovascular disease*. EMBO Mol Med, 2012. **4**(4): p. 251 - 68.



84. Ira Tabas, M., PhD, M. Kevin Jon Williams, and M. Jan Borén, PhD, *Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis*. *Circulation*, 2007. **116** p. 1832 - 1844.
85. Salvayre, R., A. Negre-Salvayre, and C. Camar, *Oxidative theory of atherosclerosis and antioxidants*. *Biochimie*, 2016 **215**: p. 281 - 296.
86. Di Pietro, N., G. Formoso, and A. Pandolfi, *Physiology and pathophysiology of oxLDL uptake by vascular wall cells in atherosclerosis*. *Vascular Pharmacology*, 2016. **84**: p. 1 - 7.
87. Pirillo, A., G.D. Norata, and A.L. Catapano, *LOX-1, OxLDL, and atherosclerosis*. *Mediators Inflamm*, 2013. **2013**: p. 152786.
88. Yu, X.-H., et al., *Foam cells in atherosclerosis*. *Clinica Chimica Acta*, 2013. **424**: p. 245 - 252.
89. Moore, K.J. and I. Tabas, *Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis*. *Cell*, 2011. **145**(3): p. 341 - 55.
90. Maiolino, G., et al., *The role of oxidized low-density lipoproteins in atherosclerosis: the myths and the facts*. *Mediators Inflamm*, 2013. **2013**: p. 714653.
91. Ivanova, E.A., et al., *Small Dense Low-Density Lipoprotein as Biomarker for Atherosclerotic Diseases*. *Oxid Med Cell Longev*, 2017. **2017**: p. 1273042.
92. Yamamoto, S., I. Narita, and K. Kotani, *The macrophage and its related cholesterol efflux as a HDL function index in atherosclerosis*. *Clin Chim Acta*, 2016. **457**: p. 117 - 22.
93. Yuhanna, I.S., et al., *High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-B1 activates endothelial nitric oxide synthase*. *Nature Medicine*, 2001. **7** (7): p. 853 - 857.
94. Mineo, C., *HDL Stimulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase A Novel Mechanism of HDL Action*. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 2003. **13**(6): p. 226 - 231.
95. Seetharam, D., et al., *High-density lipoprotein promotes endothelial cell migration and reendothelialization via scavenger receptor-B type I*. *Circ Res*, 2006. **98**(1): p. 63 - 72.
96. Calabresi, L., et al., *HDL and atherosclerosis: Insights from inherited HDL disorders*. *Biochim Biophys Acta*, 2015. **1851**(1): p. 13 - 18.

97. Poti, F., M. Simoni, and J.R. Nofer, *Atheroprotective role of high-density lipoprotein (HDL)-associated sphingosine-1-phosphate (S1P)*. Cardiovasc Res, 2014. **103**(3): p. 395 - 404.
98. Tabet, F. and K.A. Rye, *High-density lipoproteins, inflammation and oxidative stress*. Clin Sci (Lond), 2009. **116**(2): p. 87 - 98.
99. Barter, P.J., et al., *Antiinflammatory properties of HDL*. Circ Res, 2004. **95**(8): p. 764 - 72.
100. Soran, H., J.D. Schofield, and P.N. Durrington, *Antioxidant properties of HDL*. Front Pharmacol, 2015. **6**: p. 222.
101. Soran, H., et al., *How HDL protects LDL against atherogenic modification: paraoxonase 1 and other dramatis personae*. Curr Opin Lipidol, 2015. **26**(4): p. 247 - 56.
102. Kowalska, K., E. Socha, and H. Milnerowicz, *Review: The Role of Paraoxonase in Cardiovascular Diseases*. Annals of Clinical & Laboratory Science, 2015. **45**(2): p. 226 - 233.
103. Younis, N.N., et al., *High-density lipoprotein impedes glycation of low-density lipoprotein*. Diab Vasc Dis Res, 2013. **10**(2): p. 152 - 60.
104. Nofer, J.R., M.F. Brodde, and B.E. Kehrel, *High-density lipoproteins, platelets and the pathogenesis of atherosclerosis*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2010. **37**(7): p. 726 - 35.
105. Mineo, C., et al., *Endothelial and antithrombotic actions of HDL*. Circ Res, 2006. **98**(11): p. 1352 - 64.
106. Tavia Gordon, et al., *High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham study*. The American Journal of Medicine, 1977. **62**: p. 707 - 714.
107. Reina, S.A., et al., *HDL cholesterol and stroke risk: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2015. **243**(1): p. 314 - 9.
108. Barter, P., *HDL-C: Role as a risk modifier*. Atherosclerosis Supplements, 2011. **12**(3): p. 267 - 270.
109. Cahill, L.E., et al., *New and Emerging Biomarkers in Cardiovascular Disease*. Curr Diab Rep, 2015. **15**(11): p. 88.
110. Holten, T.C.v., et al., *Circulating Biomarkers for Predicting Cardiovascular Disease Risk; a Systematic Review and Comprehensive Overview of Meta-Analyses*. PLoS ONE 2013. **8** (4): p. e62080.

111. Schmidt, C. and G. Bergström, *Apolipoprotein B and Apolipoprotein A-I in Vascular Risk Prediction – A Review*. Current Pharmaceutical Design, 2014. **20**: p. 6289 - 6298.
112. Walldius, G. and I. Jungner, *Is there a better marker of cardiovascular risk than LDL cholesterol? Apolipoproteins B and A-I--new risk factors and targets for therapy*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2007. **17**(8): p. 565 - 71.
113. Benderly, M., V. Boyko, and U. Goldbourt, *Apolipoproteins and long-term prognosis in coronary heart disease patients*. Am Heart J, 2009. **157**(1): p. 103 - 110.
114. Neyla de Lima Albuquerque, M., A. da Silva Diniz, and I. Kruze Grande de Arruda, *Apolipoproteins and their association with cardiometabolic risk biomarkers in adolescents*. Nutrición hospitalaria 2015. **32**(6): p. 2674 - 2683.
115. Benn, M., *Apolipoprotein B levels, APOB alleles, and risk of ischemic cardiovascular disease in the general population, a review*. Atherosclerosis, 2009. **206**(1): p. 17 - 30.
116. Segrest, J.P., et al., *Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins*. J. Lipid Res. , 2001. **42** p. 1346 – 1367.
117. Haas, M.E., A.D. Attie, and S.B. Biddinger, *The regulation of ApoB metabolism by insulin*. Trends Endocrinol Metab, 2013. **24**(8): p. 391 - 7.
118. Davidson, W.S. and T.B. Thompson, *The structure of apolipoprotein A-I in high density lipoproteins*. J Biol Chem, 2007. **282**(31): p. 22249 - 53.
119. Bairova, T.A., et al., *Association of Apolipoprotein A1 Gene Polymorphisms with Serum Lipid Spectrum in Adolescents in East Siberia*. Bull Exp Biol Med, 2015. **160**(2): p. 267 - 70.
120. Lamon-Fava, S. and D. Micherone, *Regulation of apoA-I gene expression: mechanism of action of estrogen and genistein*. Journal of Lipid Research, 2004. **45**(1): p. 106-112.
121. Master, S.R. and D.J. Rader, *Beyond LDL cholesterol in assessing cardiovascular risk: apo B or LDL-P?* Clinical Chemistry, 2013. **59**(5): p. 723-725.
122. Contois, J.H., G.R. Warnick, and A.D. Sniderman, *Reliability of low-density lipoprotein cholesterol, non-high-density lipoprotein cholesterol, and apolipoprotein B measurement*. J Clin Lipidol, 2011. **5**(4): p. 264 - 72.
123. Holewijn, S., et al., *Apolipoprotein B, non-HDL cholesterol and LDL cholesterol for identifying individuals at increased cardiovascular risk*. J Intern Med, 2010. **268**(6): p. 567 - 77.

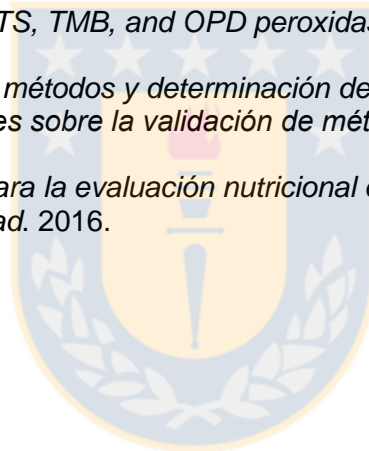
124. Pischon, T., et al., *Non-high-density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein B in the prediction of coronary heart disease in men*. *Circulation*, 2005. **112**(22): p. 3375 - 83.
125. Steffen, B.T., et al., *Apolipoprotein B is associated with carotid atherosclerosis progression independent of individual cholesterol measures in a 9-year prospective study of Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis participants*. *J Clin Lipidol*, 2017. **11**(5): p. 1181 - 1191 e1.
126. Jennifer L. Ennis, M. and M. William C. Cromwell, *Clinical utility of low-density lipoprotein particles and apolipoprotein B in patients with cardiovascular risk*. *The Journal of Family Practice* 2013. **62**(7): p. 1 - 8.
127. Vaverkova, H., et al., *Apolipoprotein B versus LDL-cholesterol: Association with other risk factors for atherosclerosis*. *Clin Biochem*, 2009. **42**(12): p. 1246 - 51.
128. Boumaiza, I., et al., *Apolipoprotein B and non-high-density lipoprotein cholesterol are better risk markers for coronary artery disease than low-density lipoprotein cholesterol in hypertriglyceridemic metabolic syndrome patients*. *Metab Syndr Relat Disord*, 2010. **8**(6): p. 515 - 22.
129. Masson, W., et al., *Association between LDL-C, Non HDL-C, and apolipoprotein B levels with coronary plaque regression*. *Arq Bras Cardiol*, 2015. **105**(1): p. 11 - 9.
130. Ramjee, V., L.S. Sperling, and T.A. Jacobson, *Non-high-density lipoprotein cholesterol versus apolipoprotein B in cardiovascular risk stratification: do the math*. *J Am Coll Cardiol*, 2011. **58**(5): p. 457 - 63.
131. Contois, J.H., et al., *Apolipoprotein B and cardiovascular disease risk: position statement from the AACC Lipoproteins and Vascular Diseases Division Working Group on Best Practices*. *Clinical Chemistry*, 2009. **55**(3): p. 407 - 419.
132. Robinson, J.G., S. Wang, and T.A. Jacobson, *Meta-analysis of comparison of effectiveness of lowering apolipoprotein B versus low-density lipoprotein cholesterol and nonhigh-density lipoprotein cholesterol for cardiovascular risk reduction in randomized trials*. *Am J Cardiol*, 2012. **110**(10): p. 1468 - 76.
133. Francis, M.C. and J.J. Frohlich, *Coronary artery disease in patients at low risk — apolipoprotein A1 as an independent risk factor*. *Atherosclerosis* 2001. **155**: p. 165 - 170.
134. Gösta Flörvall, S.B., and Anders Larsson, *Apolipoprotein A1 Is a Stronger Prognostic Marker Than Are HDL and LDL Cholesterol for Cardiovascular Disease and Mortality in Elderly Men*. *Journal of Gerontology: Biological sciences* 2006. **61A**(12): p. 1262 - 1266.

135. Walldius, G. and I. Jungner, *Apolipoprotein A-I versus HDL cholesterol in the prediction of risk for myocardial infarction and stroke*. *Current Opinion in Cardiology* 2007. **22**: p. 359 – 367.
136. Mani, P., et al., *Relation of high-density lipoprotein cholesterol:apolipoprotein a-I ratio to progression of coronary atherosclerosis in statin-treated patients*. *Am J Cardiol*, 2014. **114**(5): p. 681 - 5.
137. Smith, J.D., *Apolipoprotein A-I and its mimetics for the treatment of atherosclerosis*. *Curr Opin investig Drugs*, 2010. **11**(9): p. 989 – 996.
138. Getz, G.S. and C.A. Reardon, *Apolipoprotein A-I and A-I mimetic peptides: a role in atherosclerosis*. *J Inflamm Res*, 2011. **4**: p. 83 - 92.
139. Leman, L.J., B.E. Maryanoff, and M.R. Ghadiri, *Molecules that mimic apolipoprotein A-I: potential agents for treating atherosclerosis*. *J Med Chem*, 2014. **57**(6): p. 2169 - 96.
140. Uehara, Y., G. Chiesa, and K. Saku, *High-Density Lipoprotein-Targeted Therapy and Apolipoprotein A-I Mimetic Peptides*. *Circ J*, 2015. **79**(12): p. 2523 - 8.
141. Brian J. Van Lenten, P., et al., *Apolipoprotein A-I mimetic peptides*. *Curr Atheroscler Rep*, 2009. **11**(1): p. 52 - 57.
142. Sherman, C.B., S.J. Peterson, and W.H. Frishman, *Apolipoprotein A-I mimetic peptides: a potential new therapy for the prevention of atherosclerosis*. *Cardiol Rev*, 2010. **18**(3): p. 141 - 7.
143. Navab, M., et al., *Apolipoprotein A-I mimetic peptides and their role in atherosclerosis prevention*. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2006. **3**(10): p. 540 - 7.
144. Huang, F., et al., *Both serum apolipoprotein B and the apolipoprotein B/apolipoprotein A-I ratio are associated with carotid intima-media thickness*. *PLoS One*, 2013. **8**(1): p. e54628.
145. Kim, M.K., et al., *Association between Apolipoprotein B/Apolipoprotein A-1 and arterial stiffness in metabolic syndrome*. *Clin Chim Acta*, 2014. **437**: p. 115 - 9.
146. Carnevale Schianca, G.P., et al., *ApoB/apoA-I ratio is better than LDL-C in detecting cardiovascular risk*. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2011. **21**(6): p. 406 - 11.
147. Kaneva, A.M., et al., *The apolipoprotein B/apolipoprotein A-I ratio as a potential marker of plasma atherogenicity*. *Dis Markers*, 2015. **2015**: p. 591454.

148. Parish, S., et al., *The joint effects of apolipoprotein B, apolipoprotein A1, LDL cholesterol, and HDL cholesterol on risk: 3510 cases of acute myocardial infarction and 9805 controls*. Eur Heart J, 2009. **30**(17): p. 2137 - 46.
149. Schmidt, C. and G. Bergstrom, *Apolipoprotein B/apolipoprotein A-I ratio and apolipoprotein B: long-term predictors of myocardial infarction in initially healthy middle-aged men--a 13-year follow-up*. Angiology, 2014. **65**(10): p. 901 - 5.
150. Morrison, J.A., et al., *Determinants of ApoB, ApoA1, and the ApoB/ApoA1 ratio in healthy schoolgirls, prospectively studied from mean ages 10 to 19 years: the Cincinnati National Growth and Health Study*. Metabolism, 2012. **61**(10): p. 1377 - 87.
151. Song, Y., et al., *The apoB100/apoA1 ratio is independently associated with the severity of coronary heart disease: a cross sectional study in patients undergoing coronary angiography*. Lipids Health Dis, 2015. **14**(150): p. 1 - 9.
152. Kostapanos, M.S., et al., *Apolipoprotein B-to-A1 ratio as a predictor of acute ischemic nonembolic stroke in elderly subjects*. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2010. **19**(6): p. 497 - 502.
153. Sniderman, A.D., et al., *Errors that result from using the TC/HDL C ratio rather than the apoB/apoA-I ratio to identify the lipoprotein-related risk of vascular disease*. J Intern Med, 2006. **259**(5): p. 455 - 61.
154. Walldius, G., et al., *High apolipoprotein B, low apolipoprotein A-I, and improvement in the prediction of fatal myocardial infarction (AMORIS study): a prospective study*. The Lancet, 2001. **358**(9298): p. 2026 - 2033.
155. Walldius, G., et al., *The apoB/apoA-I ratio is better than the cholesterol ratios to estimate the balance between plasma proatherogenic and antiatherogenic lipoproteins and to predict coronary risk*. Clin Chem Lab Med, 2004. **42**(12): p. 1355 - 63.
156. Walldius, G. and I. Jungner, *The apoB/apoA-I ratio: a strong, new risk factor for cardiovascular disease and a target for lipid-lowering therapy--a review of the evidence*. J Intern Med, 2006. **259**(5): p. 493 - 519.
157. Jiménez-Pavón, D., et al., *Physical activity and clustered cardiovascular disease risk factors in young children: a cross-sectional study (the IDEFICS study)*. BMC Medicine 2013 **11**(172): p. 1 - 11.
158. Andersen, L.B., et al., *Physical activity and cardiovascular risk factors in children*. British Journal of Sports Medicine, 2011. **45**(11): p. 871 - 876.
159. Araújo, J. and E. Ramos, *Paediatric obesity and cardiovascular risk factors – A life course approach*. Porto Biomedical Journal, 2017. **2**(4): p. 102-110.

160. Cote, A.T., et al., *Childhood obesity and cardiovascular dysfunction*. J Am Coll Cardiol, 2013. **62**(15): p. 1309 -19.
161. Y Beigel, et al., *Coronary risk factors in children of parents with premature coronary artery disease*. Acta Paediatrica, 1993. **82**: p. 162 - 165.
162. David S. Freedman, P.D., et al., *The relation of apolipoproteins A-I and B in children to parental myocardial infarction*. The new england journal of medicine 1986. **315** (12): p. 721 - 726.
163. Marcovina, S.M. and J.J. Albers, *Standardization of the immunochemical determination of apolipoproteins A-I and B: A report on the international federation of clinical chemistry meeting on standardization of apolipoprotein A-I and B measurements (Basis for Future Consensus)*. Clin. Chem. , 1989. **35**(9): p. 2009 - 2015.
164. Pascacio, R.V.C. and R.P.S. Silberman *Curso de métodos fisicoquímicos en biotecnología*. 2007.
165. Steinitz, M., *Human monoclonal antibodies: Methods and Protocols*. Methods in Molecular Biology, ed. J.M. Walker. Vol. 22. 2014: Humana Press, Totowa, NJ.
166. Abyntek. *Diferencias entre anticuerpos monoclonales y policlonales* 2017 [cited 2017 Diciembre]; Available from: <http://www.abynetek.com/diferencias-anticuerpos-monoclonales-y-policlonales/>.
167. Peterson, G.L., *A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable*. Analytical Biochemistry 1977. **83**: p. 346 - 356.
168. Mcconathy, W.J. and P. Alaupovic, *Isolation and characterization of other apolipoproteins*. Biochemistry 1976. **128**: p. 297 - 310.
169. Ochoa, C.R.F., *Técnicas inmunoenzimáticas para ensayos clínicos de vacunas y estudios inmunoepidemiológicos*. 2012, La Habana: Finlay Ediciones.
170. Prieto, L., R. Lamarca, and A. Casado, *La evaluación de la fiabilidad en las observaciones clínicas: el coeficiente de correlación intraclase*. Med Clin (Barc), 1998. **110**: p. 142-5.
171. Dasha Fuentes Morales, et al., *Estudio de los tumores sólidos desarrollados por los ratones durante la producción de anticuerpos monoclonales*. VacciMonitor, 2003. **12**(3): p. 11 - 17.
172. Grodzki, A.C. and E. Berenstein, *Antibody purification: ammonium sulfate fractionation or gel filtration*, in *Immunocytochemical Methods and Protocol: Methods in Molecular Biology*. 2010. p. 15-26.

173. Grodzki, A.C. and E. Berenstein, *Antibody purification: affinity chromatography - protein A and protein G Sepharose*. Methods Mol Biol, 2010. **588**: p. 33-41.
174. Abyntek. *Cómo titular los anticuerpos*. 2017 [cited 2018 Marzo]; Available from: <http://www.abynetek.com/como-titular-los-anticuerpos/>.
175. Jayaraman, S., G. Cavigliolo, and O. Gursky, *Folded functional lipid-poor apolipoprotein A-I obtained by heating of high-density lipoproteins: relevance to high-density lipoprotein biogenesis*. Biochem J, 2012. **442**(3): p. 703-12.
176. Wisdom, G.B., *Enzyme and biotin labeling of antibody*, in *Methods in molecular biology: Basic Protein and Peptide Protocols*, J.M.W.H.P. Inc., Editor. 1994.
177. Patricia C. Weber, et al., *Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin*. Science, 1989. **243**(4887): p. 85-88.
178. *Comparison of ABTS, TMB, and OPD peroxidase substrate systems*, KPL, Editor.
179. ISP, *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: "Aspectos generales sobre la validación de métodos"*. 2010.
180. MINSAL, *Norma para la evaluación nutricional de niños, niñas y adolescentes de 5 a 19 años de edad*. 2016.





## ANEXO 1



### Información para el contacto de posibles participantes (niños y adolescentes) y documento de consentimiento informado.



#### **Título Estudio: “Dislipidemia como Factor de Riesgo Cardiovascular en Niños y Adolescentes con Historia Familiar de Enfermedad Cardiovascular Precoz”**

**Segunda versión. Fecha: 11.06.2014.**

Estimados padres, madres y/o tutores legales:

Estamos invitando a su(s) hijo(s) a participar de este estudio para evaluar su perfil lipídico y factores de riesgo cardiovascular, por tener el antecedente familiar de enfermedad cardiovascular precoz demostrada, definida como infarto al corazón o enfermedad de los vasos sanguíneos del corazón que ha requerido tratamiento de angioplastia o bypass de la circulación coronaria antes los 55 años de edad.

Este estudio se desarrollará entre los meses de Junio y Diciembre de 2014. Su propósito es identificar la presencia de alteración de los lípidos (colesterol, triglicéridos) en su hijo. Creemos que el conocer tempranamente alteraciones clínicas y/o metabólicas relacionadas con riesgo de enfermedad cardiovascular, permite establecer oportunamente medidas que las corrijan.

Están invitados a participar niños mayores de 2 años y adolescentes hasta 20 años, con historia familiar de enfermedad cardiovascular precoz.

El estudio consiste en una evaluación médica, donde se realizará un examen clínico para evaluar peso, talla, índice de masa corporal (IMC), éste definido como peso Kg/talla cm<sup>2</sup>. Circunferencia de cintura y presión arterial. Se completarán los datos clínicos con antecedentes de obesidad, sedentarismo, tabaquismo y de Diabetes Mellitus. Este examen clínico se realizará en el Centro Médico Cardimed, ubicado en San Martín 1332, Concepción o en el Centro Médico de Diagnóstico Clínico de la Facultad de Medicina de la Universidad de Concepción (Chacabuco esquina Janequeo s/n). Una enfermera universitaria tomará sólo una muestra de sangre de para evaluar los lípidos (grasas) que permitirán conocer las concentraciones de colesterol y triglicéridos. Se guardará una pequeña cantidad de plasma, si estos exámenes se encuentran alterados, se determinarán otros exámenes relacionados con riesgo cardiovascular: Apo A-I, Apo B, que son sustancias (proteínas) que transportan los lípidos (grasas) en la sangre; y PCR ultrasensible (examen para determinar inflamación en los tejidos). Los niños y adolescentes que presenten el colesterol y/o triglicéridos alterados, con o sin presión arterial alta, alteraciones del azúcar en la sangre u obesidad serán referidos para ser controlados en el Policlínico de Endocrinología Infantil.

La toma de una muestra de sangre venosa (8 ml, equivalente a 1 ¾ cucharadita de té aproximadamente), puede producir una equimosis (pequeño moretón) y leve dolor en el sitio de punción, que generalmente no reviste problema. La realización de este procedimiento se realizará en la Unidad de Investigación del Hospital “Guillermo Grant Benavente” (San Martín 1436, Concepción

La participación en este estudio es voluntaria, no tendrá costo para usted, excepto el transporte para los traslados de la evaluación médica y toma de muestra de sangre, el que deberá cancelar el participante. Usted puede retirar a su hijo en cualquier momento, sin dar explicaciones, y ello no repercutirá en las atenciones de salud que necesite.

Toda la información derivada de su participación en este estudio será conservada bajo estricta confidencialidad y nadie ajeno al estudio podrá acceder a dicha información. Llevaremos un riguroso registro con los datos de su(s) hijo(s) y finalizado el estudio podremos entregarle a usted un completo informe. Cualquier publicación o comunicación científica de los resultados del estudio será completamente anónima.

Si usted quiere cualquier otra información sobre su participación en este estudio puede llamar a los médicos: Dra. Carol Cleveland, Dra. Sylvia Asenjo Endocrinóloga Infantil, Dra. Carolina Friz y Dr. Luis Pérez. Teléfonos de contacto: 2204852, 2204877, Dpto. Pediatría, Facultad de Medicina, Universidad de Concepción.

Ante cualquier duda sobre los derechos como participante de un estudio clínico, puede contactar a CEC Revisor: Comité Ético Científico Servicio de Salud Concepción, fono 2722745

Después de haber recibido y comprendido la información de este documento y de haber podido aclarar todas mis dudas, otorgo mi consentimiento para que mi hijo(a) participe en el estudio. “Dislipidemia como Factor de Riesgo Cardiovascular en Niños y Adolescentes con Historia Familiar de Enfermedad Cardiovascular Precoz”

Nombre del hijo (a): \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Nombre del médico: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Director del Centro o delegado: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

## ANEXO 2



### Información para el (o la) participante de edades entre 18 y 20 años y documento de consentimiento informado.



#### **Título Estudio: “Dislipidemia como Factor de Riesgo Cardiovascular en Niños y Adolescentes con Historia Familiar de Enfermedad Cardiovascular Precoz”**

**Segunda versión. Fecha: 11.06.2014.**

Estimados joven:

Le invitamos a participar de este estudio para evaluar su perfil lipídico y factores de riesgo cardiovascular por tener el antecedente familiar cercano de enfermedad cardiovascular precoz demostrada, definida como infarto al corazón o enfermedad de los vasos que sanguíneos del corazón que ha requerido tratamiento de angioplastia o bypass de la circulación coronaria antes los 55 años de edad.

Este estudio se desarrollará entre los meses de Marzo y Noviembre de 2015, participarán niños mayores de 2 años y adolescentes hasta 20 años con historia familiar de enfermedad cardiovascular precoz. Su propósito es identificar oportunamente la presencia de alteración de los lípidos (grasas)(colesterol, triglicéridos). Creemos que el conocer tempranamente alteraciones clínicas y/o metabólicas relacionadas con riesgo cardiovascular, permite establecer oportunamente medidas que las corrijan.

El estudio consiste en una evaluación médica, donde se realizará un examen clínico para evaluar peso, talla, índice de masa corporal (IMC), éste definido como peso Kg/talla cm<sup>2</sup>, circunferencia de cintura y presión arterial. Se completarán los datos clínicos con antecedentes de obesidad, sedentarismo, tabaquismo y de Diabetes Mellitus. Este examen clínico se realizará en el Centro Médico Cardimed, ubicado en San Martín 1332, Concepción o en el Centro de Diagnóstico Clínico de la Facultad de Medicina de la Universidad de Concepción (Chacabuco esquina Janequeo s/n). Una enfermera universitaria tomará sólo una muestra de sangre para evaluar los lípidos (grasas) que permitirán conocer las concentraciones de colesterol y triglicéridos. Se guardará una pequeña cantidad de plasma, si estos exámenes se encuentran alterados, se determinarán otros exámenes relacionados con riesgo cardiovascular: Apo A-I, Apo B, que son sustancias (proteínas) que transportan los lípidos (grasas) en la sangre; y PCR ultrasensible (examen para determinar inflamación en los tejidos). Los niños y adolescentes que presenten el colesterol y/o triglicéridos alterados, con o sin presión arterial alta, alteraciones del azúcar en la sangre u obesidad serán referidos para ser controlados en el Policlínico de Endocrinología Infantil.

La toma de una muestra de sangre venosa (8ml, equivalente a 1 ¼ cucharadita de té aproximadamente), puede producir una equimosis (pequeño moretón) y leve dolor en el sitio de punción, que generalmente no reviste problema. La realización de este procedimiento se realizará en la Unidad de Investigación del Hospital “Guillermo Grant Benavente” (San Martín 1436, Concepción

La participación en este estudio es voluntaria, no tendrá costo para usted, excepto los traslados al lugar de la evaluación médica y toma de muestra de sangre, transporte que deberá cancelar el participante. Usted puede retirarse en cualquier momento, sin dar explicaciones, y ello no repercutirá en las atenciones de salud que necesite.

Toda la información derivada de su participación en este estudio será conservada bajo estricta confidencialidad y nadie ajeno al estudio podrá acceder a dicha información. Llevaremos un riguroso registro con sus datos y finalizado el estudio podremos entregarle a usted un completo informe. Cualquier publicación o comunicación científica de los resultados del estudio será completamente anónima.

Si usted quiere cualquier otra información puede llamar a los médicos: Dra. Carol Cleveland, Dra. Sylvia Asenjo Endocrinóloga Infantil, Dra. Carolina Friz y Dr. Luis Pérez. Teléfonos de contacto: 2204852, 2204877, Dpto. Pediatría, Facultad de Medicina, Universidad de Concepción.

Ante cualquier duda sobre los derechos como participante de un estudio clínico, puede contactar a CEC Revisor: Comité Ético Científico Servicio de Salud Concepción, fono 2722745

Después de haber recibido y comprendido la información de este documento y de haber podido aclarar todas mis dudas, otorgo mi consentimiento para participar en el estudio.

Nombre del o la joven: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Nombre del médico: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Director del Centro o delegado: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

## ANEXO 3



### Información para el (o la) menor de 18 años participante y documento de asentimiento.



**Título Estudio: “Dislipidemia como Factor de Riesgo Cardiovascular en Niños y Adolescentes con Historia Familiar de Enfermedad Cardiovascular Precoz”**

**Segunda versión. Fecha: 11.06.2014.**

Yo, \_\_\_\_\_

**he sido invitado (a) participar en este estudio de investigación, siendo informado en que consiste, por el Dr. (o Dra.)**

\_\_\_\_\_

#### **¿Por qué se está realizando este estudio?**

Me han informado que este estudio se desarrolla para determinar las grasas de mi sangre y en el caso de estar alteradas, poder saberlo, ya que en mi familiar hay antecedentes de enfermedad al corazón.

#### **¿Qué debes hacer?**

Ir al Doctor y aceptar que me sanquen sangre para el examen de las grasas.

#### **¿Qué beneficios puedes esperar?**

En caso de estar alterados recibiré indicaciones para mejorarlos y prevenir problemas al corazón a futuro.

#### **¿Puedes negarte a participar?**

Sí, no estoy obligado a participar en este estudio. Puedes retirarte cuando lo desees y hacer cualquier pregunta en todo momento.

Si necesito cualquier otra información puedo llamar a los médicos: Dra. Carol Cleveland, Dra. Sylvia Asenjo Endocrinóloga Infantil, Dra. Carolina Friz y Dr. Luis Pérez. Teléfonos de contacto: 2204852, 2204877, Dpto. Pediatría, Facultad de Medicina, Universidad de Concepción.

CEC Revisor: Comité Ético Científico Servicio de Salud Concepción, fono 2722745

Nombre del niño o adolescente: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Nombre del padre o madre: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Nombre del médico: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Director del Centro o delegado: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_



## ANEXO 4

### Aprobación del Comité Ético Científico del Servicio de Salud Concepción



COMITE ETICO CIENTIFICO SERVICIO SALUD CONCEPCION  
COMITÉ CONSTITUIDO EN CONFORMIDAD A LA R. EX N°2444 / 14.08.2012.

CONCEPCION, 20 de Agosto de 2014

Sra  
Dra. Claudia Radojkovic Navarro  
Investigador Responsable  
Presente.

Estimada Dra. Radojkovic:


El Comité Ético Científico del Servicio de Salud Concepción, certifica que con fecha 10 de julio de 2014 aprobó el protocolo de estudio titulado: "Dislipidemia y asociación con marcadores con riesgo cardiovascular en niños y adolescentes con historia familiar de enfermedad cardiovascular precoz"

Se entrega el presente certificado, para ser presentado por usted al Concurso de Proyectos de Investigación de la Sociedad Chilena de Endocrinología y Diabetes, año 2014.

Atentamente,

  
Ing. Ricardo Saldías Cerda  
Secretario CEC -SSC



  
Dra. M. Antonia Bdegain S.  
Presidenta CEC - SSC

Distribución  
- La indicada  
- Archivo CEC