



**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE FARMACIA**

**EVALUACIÓN DE LA REACTIVIDAD DE
ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI sLOX-1
PLASMÁTICO Y SU APLICACIÓN EN
INMUNOENSAYOS
POR**

SEBASTIÁN MAURICIO GESELL HERRERA

**Trabajo de fin de carrera presentado en la Facultad de Farmacia de la
Universidad de Concepción para optar al título profesional de Químico
Farmacéutico**

**Profesor patrocinante: Msc. Alejandra María Paulina Bustos Araya, Dpto.
de Bioquímica Clínica e Inmunología.**

**Profesor Co-guía: Msc. Daniela Andrea Castillo Vidal, Dpto. de Bioquímica
Clínica e Inmunología.**

Junio, 2020

Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.



© 2020, Sebastián Mauricio Gesell Herrera

CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
RESUMEN.....	ix
1. Introducción.....	1
Aterosclerosis	2
Receptor LOX-1	6
2. Hipótesis.....	16
3. Objetivo general	16
Objetivos específicos.....	16
4. Metodología.....	17
4.1 Cultivo de hibridomas productores de anticuerpos anti sLOX-1	17
4.2 Caracterización y determinación de la reactividad de los anticuerpos anti sLOX-1.....	18
4.2.1 ELISA indirecto	18
4.2.2 ELISA de Isotipo.	19
4.2.3 Western blot.	20
4.2.4 Clonación por dilución primaria.	21
4.2.5 Selección de subclones.....	21
4.2.6 Producción de fluido ascítico.....	22
4.3 Purificación y caracterización del anticuerpo monoclonal desde fluido ascítico.....	22
4.3.1 Precipitación de globulinas desde fluido ascítico con sulfato de amonio.....	22
4.3.2 Purificación de anticuerpos por cromatografía de afinidad.	23
4.3.3 Cuantificación de anticuerpo monoclonal 6B81E10 purificado.	24

4.3.4	ELISA de titulación del anticuerpo 6B81E10.	24
4.4	Evaluación de la reactividad del anticuerpo monoclonal purificado a través de inmunoensayos.	25
4.4.1	ELISA Sandwich para la determinación de sLOX-1, mediante quimioluminiscencia.....	25
4.4.2	ELISA indirecto del anticuerpo 2C3H11-biotina y distintas concentraciones de sLOX-1.....	26
4.4.3	ELISA de titulación de los anticuerpos 6B81E10 y 2C3H11-biotina por quimioluminiscencia.	26
5.	Resultados	28
5.1	Cultivo de hibridomas productores de anticuerpos anti sLOX-1.....	28
5.2	Evaluación de la reactividad de los anticuerpos anti sLOX-1, por ELISA indirecto.	28
5.3	Determinación del isotipo de los anticuerpos anti sLOX-1	29
5.4	Evaluación de la reactividad de los anticuerpos anti sLOX-1, mediante <i>western blot</i>	30
5.5	Clonamiento del hibridoma 6B8 (I y IV) productor de anticuerpos anti sLOX-1.....	33
5.6	Evaluación de la reactividad por ELISA Indirecto de los sobrenadantes obtenidos del clonamiento.....	34
5.7	Determinación del isotipo de los subclones seleccionados.	35
5.8	Determinación de la reactividad de los subclones 6B81E10 y 6B81E12 mediante <i>western blot</i>	36
5.9	Purificación de los anticuerpos monoclonales anti sLOX-1.....	38
5.10	Titulación del anticuerpo monoclonal 6B81E10 anti sLOX-1.....	40
5.11	ELISA sandwich para determinación de sLOX-1.	41
5.12	Determinación del rango de linealidad para el anticuerpo 2C3H11-biotina. 43	
5.13	ELISA de titulación de anticuerpos mediante quimioluminiscencia ...	44
6.	Discusión.....	47

7. Conclusiones.....	59
Glosario	60
Bibliografía.....	62



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 5-1: ELISA indirecto de los sobrenadantes de cultivo de los 6 hibridomas en estudio.	29
Tabla 5-2: Determinación por ELISA indirecto de los isotipos de los anticuerpos anti sLOX-1.....	30
Tabla 5-3: Total de subclones obtenidos mediante el clonamiento por dilución límite de las células del hibriboma 6B8 (I y IV).....	34
Tabla 5-4: Reactividad de los sobrenadantes de cultivo de los clones estudiados, frente a sLOX-1.	35
Tabla 5-5: Reactividad de anticuerpos anti sLOX-1 de subclones seleccionados.	36



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: Formación de placa ateromatosa. Adaptado de Jawahar L. Mehta, 2006.	5
Figura 1-2: Modelo estructural del receptor LOX-1. Adaptado de Ogura et al, 2009.	8
Figura 1-3: Clivaje proteolítico del receptor LOX-1, formación de LOX-1 soluble. Adaptado de Navarra, et al, 2012.	12
Figura 5-1: Tinción con azul de coomasie de gel de poliacrilamida SDS-PAGE. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: sLOX-1, carril 3: albúmina humana.	31
Figura 5-2: Western blot para los clones 4D11, 6B8 y 6B8 (I y IV). Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: sLOX-1, carril 3: albúmina humana, carril 4: suero humano.	32
Figura 5-3: Western blot para los clones 6B8 (I y IV). Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: sLOX-1 (1.509 µg/mL) , carril 3: sLOX-1 (750 µg/mL), carril 4: albúmina humana, carril 5: suero humano.	37
Figura 5-4: Perfil cromatográfico de la purificación del anticuerpo monoclonal 6B81E10 por cromatografía de afinidad en Sefarosa-proteína G.	39
Figura 5-5: Curva de calibración con BSA para la cuantificación del anticuerpo monoclonal 6B81E10.	40
Figura 5-6: Curva de titulación del anticuerpo monoclonal 6B81E10 obtenida por ELISA indirecto.	41
Figura 5-7: Curva de calibración obtenida en ELISA sandwich, utilizando el sustrato SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate.	42
Figura 5-8: Curva de calibración obtenida en ELISA sandwich, utilizando el reactivo ECL Plus Western Blotting Substrate.	43
Figura 5-9: Reactividad del anticuerpo 2C3H11-biotina con distintas concentraciones de sLOX-1.	44

Figura 5-10: Curva de titulación del anticuerpo 6B81E10, por ELISA indirecto. 45

Figura 5-11: Curva de titulación del anticuerpo 2C3H11-biotina, por ELISA indirecto.46



RESUMEN

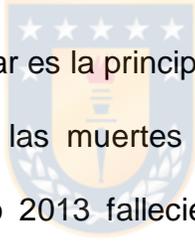
El receptor tipo lectina para la lipoproteína oxidada de baja densidad LOX-1 es el principal receptor para LDL oxidada, vinculado a la aterosclerosis y a la enfermedad cardiovascular. Es considerado un biomarcador específico para el diagnóstico de síndrome coronario agudo y etapas tempranas de enfermedad cardiovascular, y sus niveles séricos pueden ser cuantificados mediante inmunoensayos. En el presente trabajo se obtuvo un anticuerpo monoclonal específico para LOX-1 soluble (sLOX-1), el cual se seleccionó entre 6 posibles anticuerpos mediante ensayos de reactividad y especificidad de los sobrenadantes de cultivo de hibridomas productores de anticuerpos anti sLOX-1. Posteriormente, el hibridoma seleccionado fue clonado y purificado para luego realizar inmunoensayos con el fin de estudiar la reactividad ante diferentes concentraciones de sLOX-1, confirmar la especificidad por el antígeno y, por último, se realizaron inmunoensayos para estandarizar la cuantificación de sLOX-1 utilizando además otro anticuerpo monoclonal acoplado a biotina llamado 2C3H11. Este inmunoensayo podría ser utilizado en el diagnóstico de enfermedad cardiovascular y síndrome coronario agudo.

ABSTRACT

The lectin-like receptor for oxidized low-density lipoprotein LOX-1 is the main receptor for oxidized LDL, associated with atherosclerosis and cardiovascular disease. It is considered a specific biomarker for the diagnosis of acute coronary syndrome and early stages of cardiovascular disease, and its serum levels can be quantified by immunoassays. In the present work, a monoclonal antibody specific for sLOX-1 was obtained, which was selected among 6 possible antibodies by means of reactivity and specificity assays of the culture supernatants of hybridomas producing anti-sLOX-1 antibodies. Subsequently the selected hybridoma was cloned and purified to then perform immunoassays in order to study reactivity against different sLOX-1 concentrations, to confirm antigen specificity, and finally, immunoassays were conformed to standardize sLOX-1 quantification using another monoclonal antibody coupled to a biotin called 2C3H11. This immunoassay could be used in the diagnosis of cardiovascular disease and acute coronary syndrome.

1. Introducción

Las enfermedades cardiovasculares constituyen una de las causas más importantes de discapacidad y muerte prematura en todo el mundo, siendo el problema subyacente la aterosclerosis, la cual progresa asintóticamente a través de los años, de modo que cuando aparecen los síntomas generalmente a mediana edad, suele estar avanzada (OMS, 2008).



La enfermedad cardiovascular es la principal causa de muerte a nivel mundial, y se estima que un 31% de las muertes anuales corresponden a problemas cardiovasculares. En el año 2013 fallecieron 17,5 millones de personas por enfermedad cardíaca, cifra que se proyecta en un aumento de 23,6 millones para el año 2030. El ataque cerebral en 2013 fue la segunda causa de mortalidad a nivel mundial después de la enfermedad cardíaca, con un 11,8% de las muertes totales. En el año 2007, en América Latina se registraron 1,5 millones de muertes debido a estas patologías, lo cual es un problema complejo para la población ya que la mayoría de estas defunciones se dan a edades tempranas en las que las personas aún se encuentran en condiciones laborales y físicas plenas. (Benjamin et al, 2017).

En Chile, murieron 8.603 personas por accidentes cerebro-vasculares y 8.106 por enfermedades isquémicas del corazón en el año 2014 (DEIS, 2014).

Según la Encuesta Nacional de Salud 2016 - 2017, el 40,1% de la población encuestada presenta síndrome metabólico y el 25% de la población mayor a 20 años presenta un alto riesgo cardiovascular. Esto sugiere la implementación de nuevos métodos diagnósticos que permitan una evaluación temprana de la enfermedad cardiovascular y con ello planes de salud preventivos para evitar y/o disminuir la alta tasa de mortalidad y comorbilidades asociadas a esta patología (MINSAL, 2018).



Aterosclerosis

Se ha estudiado que la principal causa de la iniciación y progresión de las enfermedades cardiovasculares es la aterosclerosis. Este fenómeno comprende el endurecimiento de las arterias y la formación de lesiones fibroadiposas por depósitos anormales de lípidos y tejidos fibrosos en la capa íntima de las arterias de gran y mediano calibre, produciendo una pérdida de la elasticidad y un progresivo estrechamiento del lumen arterial (Suarez, 2001; Grossman, Porth, 2014).

La formación de la placa aterosclerótica es un proceso que puede iniciarse a temprana edad con la formación de lesiones llamadas estrías lipídicas, las cuales progresan en el transcurso del tiempo a velocidad variable dependiendo de la presencia y severidad de otros factores de riesgo (Paccot, 2014).

De los factores de riesgo más relevantes, vinculados directamente a la aterosclerosis se encuentran: antecedentes familiares, edad avanzada, tabaquismo, obesidad, hipertensión arterial, dislipidemias y diabetes mellitus (Grossman, Porth, 2014).



En el caso de las dislipidemias, elevados niveles de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y bajos niveles de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), resultan claves para la progresión y riesgo de ruptura o erosión de la placa aterosclerótica por lo que son considerados indicadores de enfermedad cardiovascular (Grossman, Porth, 2014; Childs et al, 2016).

El evento inicial de la aterogénesis es la lesión endotelial, la cual puede gatillarse por diversos estímulos nocivos para el endotelio, como lo es el aumento del flujo sanguíneo derivado de la hipertensión arterial, la generación

de sustancias reactivas de oxígeno (ROS), elevadas concentraciones de LDL y diversos compuestos glicosilados (Gimbrone, M. A., García-Cardena, 2016).

Con la lesión endotelial se produce una infiltración y acumulación de células monocíticas y partículas de LDL en el espacio subendotelial, seguido de la oxidación de las LDL dando origen a partículas de LDL oxidadas (LDLox) por las ROS que se encuentran en la capa íntima. Por otro lado, hay un aumento en la expresión de moléculas de adhesión celular ubicadas en la membrana de las células endoteliales como VCAM-1, P-selectina y E-selectina las cuales facilitan el paso de monocitos a la íntima atraídos por distintos factores quimiotácticos. Los monocitos en un ambiente inflamatorio se diferencian a macrófagos, los cuales comienzan a expresar receptores que unen y facilitan la captación de lipoproteínas modificadas, principalmente oxidadas (LDLox), entre estos receptores se encuentra el receptor tipo lectina para la lipoproteína oxidada de baja densidad (LOX-1) que reconoce a las LDLox, las internaliza y así estos macrófagos cargados de lipoproteínas oxidadas se convierten en células espumosas. Las células de espuma ubicadas en la capa íntima del endotelio producen citoquinas proinflamatorias, ROS y factores de crecimiento que estimulan la infiltración de un mayor número de macrófagos desde el torrente sanguíneo, Además, generan la migración de células de músculo liso desde la capa media, lo cual produce el aumento del tamaño de la placa aterosclerótica,

y la formación de una capa de células musculares en conjunto con una malla de colágeno y fibrina, dando paso a la llamada placa ateromatosa fibrosa (figura 1-1) (Kattor et al, 2017).

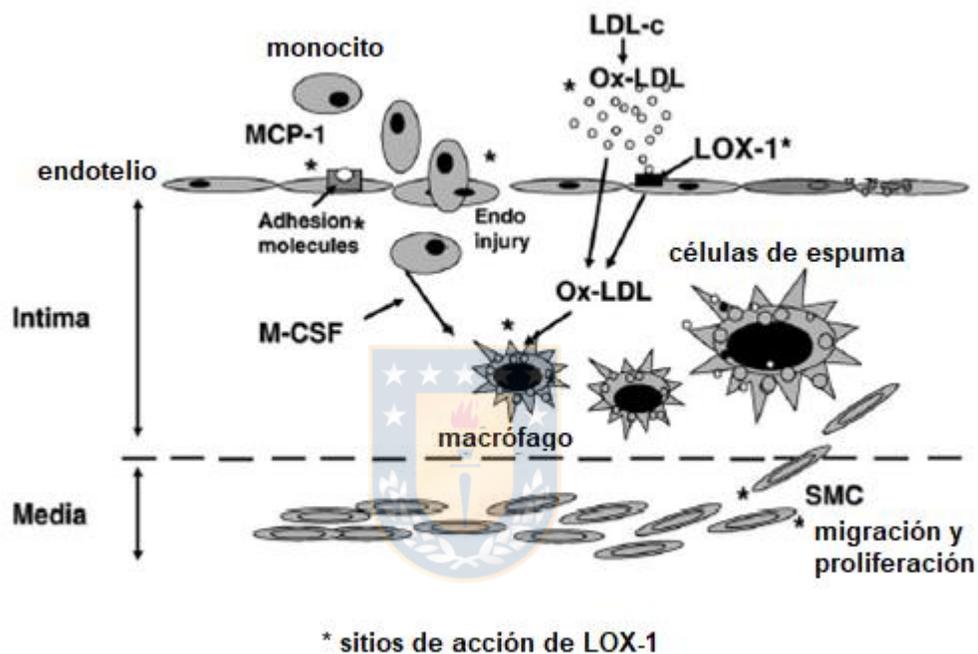


Figura 1-1: Formación de placa ateromatosa. Adaptado de Jawahar L. Mehta, 2006.

El riesgo de ruptura de la placa está dado por el tamaño del ateroma y el reclutamiento de macrófagos que dan origen a células de espuma. Estas células, que liberan citoquinas y factores de crecimiento, exacerban estas lesiones al inducir la expresión de receptores *scavenger* y metaloproteasas en las células del músculo liso que degradan la capa fibrosa de la lesión

aterosclerótica produciendo inestabilidad y probabilidad de ruptura de la placa aterosclerótica (Kattor et al, 2017; Kasper, Fauci et al, 2015).

Las placas ateroscleróticas se clasifican en estables e inestables de acuerdo al riesgo de ruptura que posean. Las placas estables se presentan de manera asintomática a menos que la estenosis producida sea mayor al 70% del lumen arterial, provocando anginas. Las placas inestables se producen con menores niveles de estenosis, pero son más vulnerables a fisuras y rupturas, por lo tanto, más propensas a complicaciones severas como tromboembólicas, anginas inestables, infarto agudo al miocardio, accidente cerebrovascular y muerte súbita (DEIS, 2014).



Receptor LOX-1

El receptor de las LDL oxidadas, LOX-1, es un tipo de receptor *scavenger* de clase E, identificado por primera vez en células endoteliales aórticas de bovino en el año 1997 por Sawamura. LOX-1 corresponde al principal receptor de LDLox y se ha demostrado su expresión en células endoteliales, células del músculo liso, macrófagos, fibroblastos, adipocitos y plaquetas (Tian et al 2019; Xu et al, 2013).

Estructuralmente, este receptor pertenece a la familia de las lectinas tipo C y corresponde a una glicoproteína de transmembrana tipo 2, conformada por 273 aminoácidos y con un peso molecular aproximado de 50 kDa (Figura 1-2) (Mehta et al, 2006).

En la estructura de LOX-1 se distinguen 4 dominios: un dominio corto N-terminal citoplasmático, un dominio transmembrana, un dominio cuello y un dominio extracelular lectina tipo C involucrado en la unión de ligandos (Pirillo, Giuseppe, 2013).



LOX-1, se presenta de manera funcional a la forma de homodímero, unido por puentes disulfuro e n Cys140 presentes en el dominio cuello (Stancel et al, 2015).

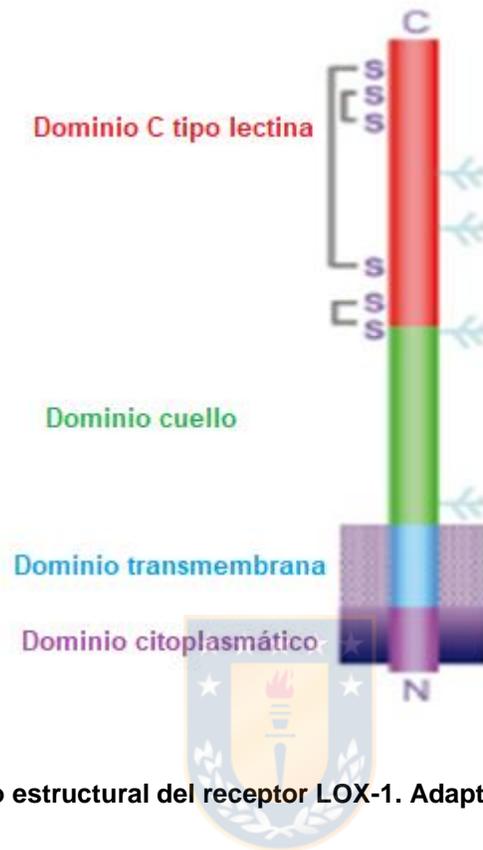


Figura 1-2: Modelo estructural del receptor LOX-1. Adaptado de Ogura et al, 2009.

En condiciones basales la expresión del receptor LOX-1 en la membrana celular es muy baja, pero puede ser inducida y aumentar su concentración por diversos estímulos proinflamatorios y proaterogénicos. En diversos estudios *in vitro*, se ha observado que la expresión de LOX-1 aumenta en presencia de estímulos inflamatorios como el factor de necrosis tumoral (TNF α), interleukina-1 (IL-1), interferón gamma (IFN γ), angiotensina 2, endotelina 1 y LDLox. Por otro lado, la expresión *in vivo* de LOX-1 se ve aumentada en condiciones patológicas en pacientes que presentan aterosclerosis, hipertensión y diabetes (Pirillo, Giuseppe, 2013).

Este receptor, LOX-1 ha sido vinculado estrechamente en los procesos de disfunción endotelial, activación de macrófagos, formación de células de espuma, procesos inflamatorios en etapas tempranas y avanzadas de la aterosclerosis, proliferación de células del músculo liso, activación de plaquetas y procesos apoptóticos celulares (Pirillo, Giuseppe, 2013).

Considerando, por lo tanto, que LOX-1 ha sido asociado a diversos procesos patológicos, este receptor ha despertado gran interés como un posible blanco terapéutico en patologías como aterosclerosis, diabetes mellitus e hipertensión (Naga et al 2017).



Desde el punto de vista farmacológico se ha observado que las terapias convencionales con aspirina, estatinas e hipoglicemiantes orales ejercen un efecto indirecto en LOX-1 al disminuir su expresión (Naga et al 2017).

En el caso de los tratamientos convencionales para la hipercolesterolemia con estatinas, la inhibición de HMG-coA reductasa genera una disminución de la producción de colesterol, lo que conlleva a su vez a una disminución de la expresión de LOX-1. Por otra parte, se ha demostrado que al utilizar estatinas

se produce la disminución de la apoptosis de células endoteliales y también la adhesión de monocitos al endotelio, lo que conlleva a la disminución de la inflamación (Xu et al, 2013).

Experimentalmente, se ha demostrado que ratas con hipertensión inducida tratadas con un inhibidor de los receptores de angiotensina II, llamado candesartan, presentaron disminución de LOX-1, debido a que la angiotensina II induce la expresión de LOX-1, lo que conlleva al aumento de la captación de LDLox en células endoteliales. Es por ello que se han relacionado a la angiotensina y LOX-1 como promotores de la apoptosis celular y disfunción celular (Mehta et al, 2006).



El proceso inflamatorio está íntimamente involucrado en la patogénesis de la aterosclerosis y en la inestabilidad de la placa aterosclerótica. En un estudio donde se utilizaron terapias antiinflamatorias con aspirina se demostró la disminución en la expresión de LOX-1 al inhibir parcialmente a las vías de señalización de LDLox que generan LOX-1 (Xu et al, 2013).

En otro estudio, donde se usaron compuestos naturales en ratas como Tanshinona II-A derivado de *Salvia miltiorrhiza* se demostró la inhibición del

receptor LOX-1 y la disminución de la captación de LDLox por macrófagos, También se demostró el efecto antiinflamatorio de la curcumina (compuesto activo de la cúrcuma) al disminuir la aterogénesis y al inhibir la unión de angiotensina 1 en los receptores de angiotensina. Con el extracto de *Ginkgo biloba*, se observó la inhibición de la expresión de moléculas de adhesión celular que promovían la generación de ROS y, por ende, de LOX-1 (Naga et al, 2017).

Anticuerpos específicos contra LOX-1 han demostrado ser útiles en la progresión de la aterosclerosis. Esto se demostró en un estudio en el cual se procedió a alimentar por 18 semanas a ratas con una dieta alta en colesterol y se comprobó que al utilizar anticuerpos anti LOX-1 se disminuyó considerablemente la generación de ROS, las injurias en la íntima, la proliferación del músculo liso, la apoptosis celular y el estrés oxidativo (Naga et al, 2017).

El receptor LOX-1 expresado en la superficie celular puede ser clivado por enzimas proteolíticas en el dominio cuello de la porción extracelular y es liberado al torrente sanguíneo como LOX-1 soluble (sLOX-1), una porción que comprende 187 aminoácidos. El clivaje de LOX-1 es mediado por

metaloproteasas como consecuencia de estímulos proinflamatorios (figura 1-3) (Sayoko et al, 2017).

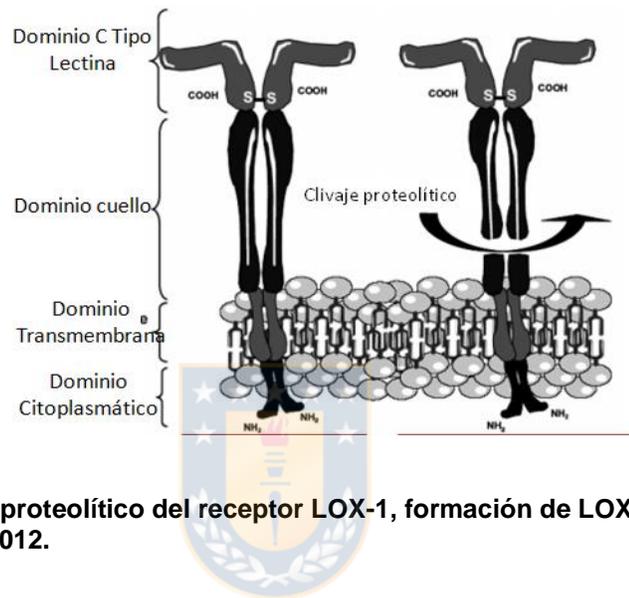
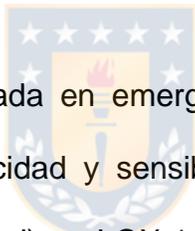


Figura 1-3: Clivaje proteolítico del receptor LOX-1, formación de LOX-1 soluble. Adaptado de Navarra, et al, 2012.

Se ha demostrado que esta fracción soluble del receptor, sLOX-1, está significativamente elevado en etapas tempranas del síndrome coronario agudo, por lo que se ha estudiado su utilidad como biomarcador de enfermedad cardiovascular y también como marcador de ruptura o de inestabilidad de la placa ateromatosa (Nobuaki et al, 2010).

En un estudio sobre sensibilidad diagnóstica y especificidad se comparó sLOX-1, proteína C reactiva de alta sensibilidad (hs-CRP), troponina T (TnT) y la

proteína cardiaca de unión a ácidos grasos (H-FABP), los cuales son utilizados recurrentemente como diagnóstico y biomarcadores de síndrome coronario agudo (SCA). Para ello se realizó un estudio en sangre periférica de pacientes extraída inmediatamente luego de haber sufrido un SCA. En el estudio se demostró que sLOX-1 tuvo mayor sensibilidad y especificidad para diagnosticar SCA y, además, sLOX-1 demostró no estar relacionado con la edad, colesterol total, triglicéridos, sexo y factores de riesgo, tales como, diabetes e hipertensión (Noriaki et al, 2010).



En una investigación realizada en emergencias de un hospital se realizó la comparación de la especificidad y sensibilidad entre el biomarcador hs-TnT (troponina de alta sensibilidad) y sLOX-1, con el fin de verificar la ventaja de utilizar este último como biomarcador diagnóstico de SCA. El biomarcador hs-TnT es muy útil para diagnosticar SCA, pero a pesar de las diversas mejoras realizadas en sus bioensayos sigue siendo imperfecto, esto debido a que se encuentra en elevadas concentraciones en otras patologías como angina aguda de pecho, tromboembolismo pulmonar y miocarditis lo que disminuye su especificidad. El estudio conllevó el análisis de muestras sanguíneas periféricas de 200 pacientes que acudieron a urgencias por síntomas torácicos asociados a SCA. El análisis mediante ELISA sandwich determinó que en etapas tempranas sLOX-1 presentaba una especificidad y selectividad de un 91,0% y 71,4%,

respectivamente mientras que hs-TnT presentó una especificidad de un 70,4% y sensibilidad de 71,0%. Además, se determinó la relación de sLOX-1 con el tiempo transcurrido hasta la toma de la muestra sanguínea, y se observó que, al transcurrir las horas, la concentración sérica de sLOX-1 va disminuyendo, pero en etapas tempranas posee una alta concentración sérica; por el contrario, se determinó que hs-TnT en etapas tempranas presenta una muy baja concentración, pero con el paso de las horas fue aumentando. Con el estudio se concluyó que sLOX-1 es más sensible y específico que hs-TnT durante las etapas tempranas (3 primeras horas), debido a esto se determinó que sLOX-1 es un biomarcador muy útil para el diagnóstico de SCA en etapas tempranas y que puede ser utilizado en conjunto con otros biomarcadores para mejorar el diagnóstico y hacerlo más efectivo (Nobuaki et al, 2011).

En Chile, la medición de biomarcadores de daño cardíaco, tales como, troponinas T y la isoenzima CK-MB son de utilidad para confirmar daño tisular, pero se requiere de un tiempo mínimo de horas para que los valores de estos biomarcadores sean perceptibles en circulación. También la Proteína C reactiva ultrasensible y Proteína C reactiva pueden verse alteradas en otros cuadros inflamatorios (MINSAL, 2010).

Actualmente, en el mercado es posible encontrar y disponer de proteínas recombinantes para sLOX-1, anticuerpos monoclonales anti sLOX-1 como también kits comerciales de ELISA tipo sandwich para la cuantificación de la proteína en suero o plasma de pacientes con riesgo cardiovascular. Sin embargo, están disponibles principalmente con fines de investigación y además el elevado costo que presentan los kits no permite la implementación en el país para su realización generalizada en el laboratorio clínico.

Por esto es necesario poder desarrollar herramientas diagnósticas que faciliten un diagnóstico temprano de la enfermedad cardiovascular, por lo que se hace necesario obtener un inmunoensayo que permita cuantificar los niveles séricos de sLOX-1, con el fin de obtener un método diagnóstico y de prevención de la aterosclerosis.

2. Hipótesis

El estudio de la reactividad de anticuerpos monoclonales dirigidos contra sLOX-1 permite disponer de una herramienta específica para la determinación de este biomarcador plasmático a través de inmunoensayos

3. Objetivo general

Obtener un anticuerpo monoclonal dirigido contra sLOX-1 para su aplicación en inmunoensayos

Objetivos específicos

1. Cultivar hibridomas productores de anticuerpos monoclonales anti sLOX-1.
2. Seleccionar un hibridoma en base a la reactividad de los anticuerpos en sobrenadante de cultivo.
3. Purificar y caracterizar el anticuerpo monoclonal desde fluido ascítico.
4. Evaluar la reactividad del anticuerpo monoclonal purificado a través de inmunoensayos.

4. Metodología

4.1 Cultivo de hibridomas productores de anticuerpos anti sLOX-1

Se trabajó con 6 clones de hibridomas productores de anticuerpos anti sLOX-1, denominados 2E2, 2B4, 4D11, 5D8, 6B8 y 6B8 (I y IV).

Estos hibridomas se retiraron de su almacenamiento en tanques de nitrógeno líquido y fueron cultivados en condiciones de 37°C y 10% de CO₂. Inicialmente para favorecer la proliferación de los hibridomas se adicionó al cultivo 1 mL de *feeder*, el cual consiste en una suspensión de células que aportan factores de crecimiento, obtenidas desde el bazo de un ratón Balb/c. Se utilizó como medio de cultivo DMEM suplementado con 10% suero fetal de bovino, L-glutamina 200 mM, aminoácidos no esenciales, HEPES 10 mM, 2-mercaptoetanol 0,05 mM y penicilina 10.000 UI/mL y estreptomycin 10.000 µg/mL.

4.2 Caracterización y determinación de la reactividad de los anticuerpos anti sLOX-1.

4.2.1 ELISA indirecto

Para determinar la reactividad de los sobrenadantes de cultivo contra sLOX-1 y albúmina, se sensibilizó una placa de ELISA con 100 μ L de sLOX-1 previamente sintetizada en el Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología o 100 μ L de albúmina a una concentración de 10 μ g/mL. La placa se dejó una noche en incubación refrigerada a 4°C. La placa se lavó 3 veces con PBS-Tween 0,05%, se bloqueó con 150 μ L de ovoalbúmina al 1% y 150 μ L de caseína 1%, se incubó por una hora a 37°C. Luego se lavó nuevamente con PBS-Tween 0,05% y se sembró 100 μ L de los sobrenadantes de cultivo que contenían los anticuerpos específicos contra sLOX-1, producidos por los hibridomas mencionados anteriormente. Se incubó durante una hora a 37°C y se sembró el anticuerpo secundario anti IgG de ratón unido a peroxidasa, el que se incubó por una hora a 37°C. Luego de lavar, se sembró el sustrato, 100 μ L de TMB con H₂O₂ y se incubó durante 15 minutos y finalmente se adicionó H₂SO₄ al 20%. La lectura de densidad óptica se realizó a 450 nm en el lector de placas *SYNERGY-HTX (BIOTEK)* (Vigliotti, 2007).

4.2.2 ELISA de Isotipo.

La determinación del isotipo de los anticuerpos presentes en los sobrenadantes, se realizó utilizando un kit comercial (ISO-2 de Sigma) el cual tiene anticuerpos dirigidos contra las distintas clases y subclases de inmunoglobulinas de ratón. Se sensibilizó una placa de ELISA con 100 μ L de sLOX-1 a una concentración de 10 μ g/mL y se incubó toda la noche a 4°C. Se lavó la placa con PBS-Tween 0,05%, se bloqueó con 100 μ L de ovoalbúmina al 1% y se dejó en incubación a temperatura ambiente por 1 hora. Luego de lavar con PBS-Tween 0,05% se sembró 100 μ L de los sobrenadantes de cultivo de los hibridomas seleccionados 4D11, 6B8 y 6B8 (I y IV) y se dejó incubando por 2 horas a temperatura ambiente. Se prepararon las soluciones de anticuerpos isotipificadores anti inmunoglobulinas producidos en cabra (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, IgM) y se sembraron 100 μ L de cada anticuerpo. Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se adicionó el anticuerpo anti IgG de cabra marcado con la enzima peroxidasa en una dilución 1/2.500 y se dejó incubando durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Se adicionó el sustrato de la enzima, se incubó por 15 minutos y finalmente se adicionó H₂SO₄ al 20% para detener la reacción. Se midió la placa a una longitud a onda de 450 nm en lector *SYNERGY-HTX (Biotek)*.

4.2.3 Western blot.

Se preparó un gel de poliacrilamida al 12%, el cual fue almacenado a 4°C durante una noche. Al día siguiente se realizó la electroforesis, se sembró el marcador de peso molecular y los antígenos: la proteína recombinante sLOX-1, albúmina humana y suero humano. La electroforesis se realizó en condiciones de 100 mV por 1 hora y 30 minutos. Uno de los geles fue teñido con azul de Coomasie durante 30 minutos y en agitación constante, el otro gel se preparó para realizar la electrotransferencia. Para ello se utilizó una cámara semihúmeda con membrana de nitrocelulosa y se aplicó 250 mA por 1 hora y 30 minutos. La membrana con las proteínas transferidas desde el gel de acrilamida se bloqueó con una solución de PBS y leche al 5% y se dejó en agitación durante 1 hora. Luego se lavó con PBS-Tween 0,05% y se añadieron los sobrenadantes de cultivo de los hibridomas sin diluir, 4D11, 6B8 y 6B8 (I y IV) en placas separadas cada uno, se dejó en incubación con agitación durante 1 hora (Vigliotti, 2007).

Luego de lavar con PBS-Tween 0,05% se añadió el anticuerpo secundario anti IgG de ratón acoplado a peroxidasa 1/3.000 y se incubó por una hora a temperatura ambiente. Finalmente se adicionó el reactivo quimioluminiscente (*Pierce ECL WesternBlottingSubstrate, Thermo Fisher Scientific*) a la membrana

y se procedió a evaluar la quimioluminiscencia con un tiempo de exposición de 7 minutos.

4.2.4 Clonación por dilución primaria.

Se preparó una suspensión celular del hibridoma seleccionado para el clonamiento, a una concentración de 160 células/mL y se realizaron diluciones con el fin de preparar suspensiones a una concentración de 40 y 10 células/mL. Estas suspensiones se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos y se incubaron a 37°C y 10% de CO₂. (Vigliotti, 2007).

4.2.5 Selección de subclones.

Aproximadamente 10 días después, cuando las células proliferaron y los sobrenadantes viraron a color amarillo se procedió a realizar testeos para seleccionar los subclones indicados para seguir estudiando. Para ello se realizó un testeo por ELISA indirecto con la metodología utilizada en el punto 2.1, luego se realizó un ELISA de isotipo con la metodología utilizada en el punto 2.2 y un Western blot con la metodología utilizada en el punto 2.3. Mediante estos procedimientos se seleccionó aquel clon que presentó mayor reactividad y especificidad contra sLOX-1. Este clon fue expandido en una botella de cultivo para su posterior almacenamiento en nitrógeno líquido.

4.2.6 Producción de fluido ascítico.

Se inyectó 0,5 mL de pristano en la cavidad peritoneal de 7 ratones hembras de la cepa BALB/c. Luego de 10 a 15 días se les administró $2,5 \times 10^6$ células de hibridoma productoras de anticuerpo anti sLOX-1 (del subclon seleccionado). Después de 10 a 15 días de supervisión de los ratones, se extrajo el fluido ascítico presente en la cavidad peritoneal, el cual se incubó por 30 minutos a 37°C , se centrifugó por 10 minutos a $3000g$ y se almacenó a -20°C .

4.3 Purificación y caracterización del anticuerpo monoclonal desde fluido ascítico.

4.3.1 Precipitación de globulinas desde fluido ascítico con sulfato de amonio.



Se preparo una solución saturada de sulfato de amonio $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ de pH 7,0. Luego se determinó el volumen de solución de sulfato de amonio que se debió utilizar para obtener una saturación del 45%, de acuerdo al volumen total de fluido ascítico. El volumen de la solución de sulfato de amonio se fue agregando gota a gota y se dejó en agitación durante 2 horas en hielo. Posteriormente, se dejó toda la noche en reposo a 4°C . Se centrifugó a $3.000g$ por 30 minutos a 4°C y el precipitado fue suspendido en un volumen mínimo de PBS (Vigliotti, 2007).

Las globulinas obtenidas fueron dializadas 3 veces con 1 L de PBS 10mM por 24 horas a 4°C y finalmente fueron cuantificadas por el método de Lowry modificado utilizando el kit *Pierce™ BCA ProteinAssay (Thermoscientific®)*.

4.3.2 Purificación de anticuerpos por cromatografía de afinidad.

Para este procedimiento se utilizó una columna de agarosa con proteína G la cual posee una gran afinidad por la región Fc de los anticuerpos. Se comenzó la estabilización con buffer de unión pH 7,0 hasta regular el flujo, luego se sembraron las globulinas obtenidas considerando la capacidad de retención de la columna, que corresponde aproximadamente a 20 mg de IgG por mL de gel y se adicionó buffer de unión. Se recolectaron fracciones de 1,0 mL en tubos eppendorf, a las cuales se les midió la densidad óptica (D.O) a 280 nm en el espectrofotómetro UV-1601 (*SHIMADZU*). Cuando el valor obtenido fue menor a 0,05 se cambió el buffer unión por el buffer de elución de glicina 0,1M pH 3,0 para así obtener los anticuerpos anti sLOX-1, los que fueron neutralizados con gotas de Tris 1M de pH 8,0. Se hizo un *pool* con las fracciones de anticuerpos que presentaron mayor densidad óptica y se concentraron utilizando tubos Centricon, centrifugando por 45 minutos a 4500g a 4°C. Finalmente el anticuerpo concentrado se dializó en tampón PBS 10 mM a 4°C en agitación (Vigliotti, 2007).

4.3.3 Cuantificación de anticuerpo monoclonal 6B81E10 purificado.

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo con el kit estándar *Pierce™ BCA protein Assay kit, Thermo Scientific* (método de Lowry modificado), el cual presenta un reactivo A y un reactivo B. Este método se basa en la unión del enlace peptídico de las proteínas con iones cobre en medio alcalino, luego el cobre reacciona con el BCA (ácido bicinconínico) formando un complejo color púrpura. Para la cuantificación, se realizó una curva de calibración de 0-1.500 µg/mL a partir de una solución de BSA 2 mg/mL y diluciones seriadas de las muestras a cuantificar. A 25 µL de la muestra y estándares de la curva de calibración, se les adicionó 200 µL de la mezcla de reactivo A+B, se dejó incubando en oscuridad por 30 minutos a 37°C y luego se leyó la densidad óptica en un lector de microplacas a una longitud de onda de 562nm (Vigliotti, 2007).

4.3.4 ELISA de titulación del anticuerpo 6B81E10.

Para la titulación del anticuerpo 6B81E10 se realizó un ELISA indirecto mediante el procedimiento descrito en el punto 2.1. Como anticuerpo primario se utilizaron diluciones seriadas del anticuerpo a titular 6B81E10 y como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo anti-inmunoglobulina de ratón conjugado con peroxidasa en dilución 1/10.000 (Vigliotti, 2007).

4.4 Evaluación de la reactividad del anticuerpo monoclonal purificado a través de inmunoensayos.

4.4.1 ELISA Sandwich para la determinación de sLOX-1, mediante quimioluminiscencia

Se utilizó una placa de ELISA de color blanco, la cual se sensibilizó con el anticuerpo de captura el 6B81E10, a una concentración de 20 µg/mL y se dejó toda la noche a 4°C. La placa se lavó con PBS-Tween 0,05%, se sembró 100 µL de ovoalbúmina al 1% y se dejó incubando por 1 hora a 37 °C. Como curva de calibrado se realizaron diluciones seriadas del antígeno sLOX-1 (0-5 µg/mL), se sembraron y dejaron en incubación durante 1 hora a 37°C. Posterior al lavado de la placa, se utilizó como anticuerpo de revelado el anticuerpo monoclonal 2C3H11 anti sLOX-1 conjugado a biotina (dilución 1/1.500), obtenido previamente en el Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología. Se incubó por una hora a 37°C. Luego se preparó una solución del conjugado estreptavidina-peroxidasa 1/1.000 y se incubó por 30 minutos a 37°C. Luego de lavar, se trabajó con 2 sustratos quimioluminiscentes diferentes, *ECL Plus Western Blotting Substrate (ThermoFisher)* y el *Super Signal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (ThermoFisher)*. Se adicionaron a la placa, se esperó la reacción por un periodo de 3 minutos y se leyeron las unidades relativas de luz (RLU) en el fotómetro *SYNERGY-HTX (Biotek)* a una longitud de onda de excitación y emisión de 460 y 440 nm, respectivamente.

4.4.2 ELISA indirecto del anticuerpo 2C3H11-biotina y distintas concentraciones de sLOX-1.

Se sensibilizó la placa blanca de ELISA, con el antígeno sLOX-1 a distintas concentraciones desde 0,04 a 5 µg/mL y se dejó incubar durante una noche a 4°C. Se lavó la placa con PBS-Tween 0,05% y se bloqueó con 100 µL de ovoalbúmina 1%, dejándose en incubación a 37°C por 1 hora. Se procedió a lavar la placa, se adicionó 100 µL del anticuerpo 2C3H11-biotilado en un título de 1/1.500 y se incubó durante 1 hora a 37°C. Luego de lavar se sembró la estreptavidina-peroxidasa en 2 diluciones diferentes 1/1.000 y 1/500 y se dejó 30 minutos incubando a 37°C. La placa se lavó y finalmente luego de agregar el sustrato, *BM Chemiluminescence ELISA Substrate, Roche*, se realizó la lectura de la placa a una longitud de onda de 460 nm.

4.4.3 ELISA de titulación de los anticuerpos 6B81E10 y 2C3H11-biotina por quimioluminiscencia.

Se sembró el antígeno sLOX-1 en la placa de ELISA de plástico blanco en concentraciones de 5 y 10 µg/mL y se dejó incubando durante toda la noche en cámara húmeda a 4°C. Se lavó la placa con PBS-Tween 0,05% y se sembró 100 µL de ovoalbúmina al 1%, dejándose en incubación una hora a 37°C. Se prepararon diluciones seriadas de los anticuerpos 6B81E10 (1/100 a 1/12.800) y 2C3H11-biotina (1/800 a 1/6.400), se sembró en los pocillos y se dejó incubando la placa durante 1 hora a 37°C. Luego de lavar la placa, se sembró

el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (1/10.000) en los pocillos donde se sembraron las diluciones del anticuerpo 6B81E10 y el conjugado estreptavidina-peroxidasa (1/1.000) en el caso del 2C3H11-biotina. La placa se incubó a 37°C por una hora y luego de lavarla se le adicionó el sustrato quimioluminiscente (*BM Chemiluminescence ELISA Substrate, Roche*), se esperó la reacción por un periodo de 3 minutos y se leyeron las unidades relativas de luz (RLU) en el fotómetro *SYNERGY-HTX (Biotek)* a una longitud de onda de excitación y emisión de 460 y 440 nm respectivamente.



5. Resultados

5.1 Cultivo de hibridomas productores de anticuerpos anti sLOX-1.

Se retiraron del almacenamiento en nitrógeno líquido y cultivaron los hibridomas productores de anticuerpos anti sLOX-1 denominados: 2E2, 2B4, 4D11, 5D8, 6B8 y 6B8 (I y IV) en medio de cultivo DMEM suplementado. Se logró el crecimiento de todos los clones para evaluar su reactividad contra la proteína recombinante sLOX-1.

5.2 Evaluación de la reactividad de los anticuerpos anti sLOX-1, por ELISA indirecto.

Se evaluó la reactividad de los anticuerpos anti sLOX-1, presentes en los sobrenadantes de cultivo de los clones de hibridomas 2E2, 2B4, 4D11, 5D8, 6B8 y 6B8 (I y IV), por medio de un ELISA indirecto, utilizando sLOX-1 como el antígeno específico y albúmina humana, para evaluar posible reactividad cruzada con esta proteína, la más abundante en el suero. Además, se utilizaron 2 proteínas de bloqueo: ovoalbúmina y caseína. El resultado de este ELISA se muestra en la Tabla 5-1.

Tabla 5-1: ELISA indirecto de los sobrenadantes de cultivo de los 6 hibridomas en estudio.

Clon	D.O. de sLOX-1/caseína	D.O. de sLOX-1/ovoalbúmina	D.O. de albúmina/caseína	D.O. de albúmina/ovoalbúmina
2B4	0,30	0,34	0,07	0,19
2E2	0,13	0,17	0,10	0,17
4D11	0,51	0,66	0,08	0,20
5D8	0,41	0,54	0,09	0,16
6B8	0,48	0,62	0,09	0,18
6B8(IyIV)	0,48	0,63	0,10	0,18

De los resultados que se muestran en la tabla, se determinó que los anticuerpos producidos por los hibridomas fueron específicos para sLOX-1 y presentaron una baja reactividad con la albúmina humana. Considerando los valores de D.O. obtenidos se decidió continuar trabajando con los clones 4D11, 6B8 y 6B8(I y IV) debido a su mayor respuesta, además se decidió seguir utilizando el bloqueante de ovoalbúmina ya que se registró una mayor D.O con él.

5.3 Determinación del isotipo de los anticuerpos anti sLOX-1

Se determinó el isotipo de los anticuerpos anti sLOX-1, producidos por los hibridomas seleccionados, 4D11, 6B8 y 6B8 (I y IV), mediante ELISA indirecto, para lo cual se utilizaron anticuerpos isotipificadores anti IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA e IgM (Tabla 5-2).

Tabla 5-2: Determinación por ELISA indirecto de los isotipos de los anticuerpos anti sLOX-1.

Clon	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgA	IgM
4D11	0,258	0,238	0,861	0,220	0,258	0,096
6B8	1,14	0,267	0,243	0,228	0,23	0,185
6B8(I y IV)	1,11	0,294	0,255	0,241	0,251	0,219

Según los resultados obtenidos de las lecturas de D.O, se determinó que los clones 6B8 y 6B8 (I y IV) eran productores de anticuerpos de isotipo IgG1 y que para el clon 4D11 era de isotipo IgG2b.

5.4 Evaluación de la reactividad de los anticuerpos anti sLOX-1, mediante *western blot*.

Se determinó mediante *western blot* la reactividad de los anticuerpos producidos por los hibridomas 4D11, 6B8 y 6B8 (I y IV) ante los antígenos sLOX-1 y albúmina humana. Primero se realizó una electroforesis *SDS-PAGE* y en el gel se sembraron los antígenos: sLOX-1 y albúmina humana (Figura 5-1).

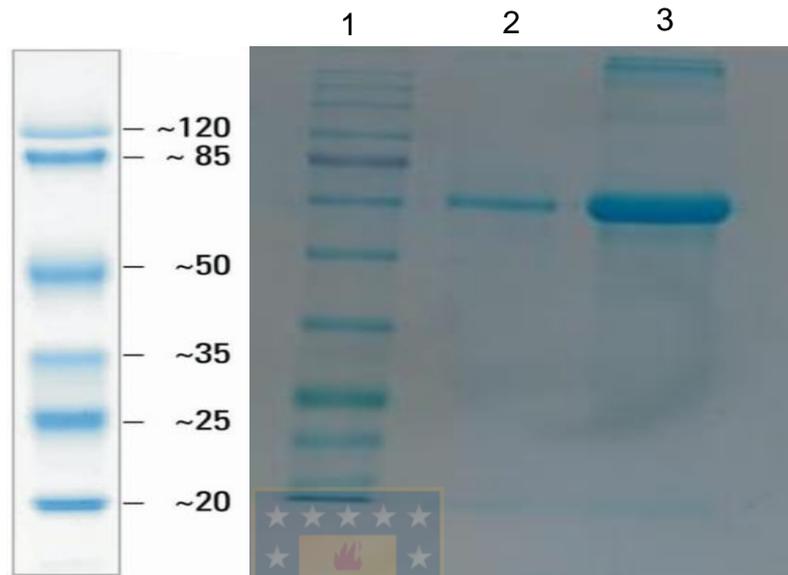


Figura 5-1: Tinción con azul de coomasie de gel de poliacrilamida SDS-PAGE. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: sLOX-1, carril 3: albúmina humana.

El gel obtenido fue teñido con azul de Coomassie y se puede observar que la banda del carril 2 correspondiente a sLOX-1 tiene un peso molecular cercano a 70 kDa. Si bien la fracción soluble de LOX-1 tiene un peso molecular aproximado de 35 kDa, podría explicarse por la forma dimérica de la proteína. En el carril 3 se observa una banda de mayor intensidad de señal que corresponde a la albúmina con un peso molecular de 67 kDa.

Luego de realizar la transferencia y revelar las membranas (figura 5-2), se observa que el anticuerpo 4D11 el cual fue testeado también con suero humano además de albúmina humana y sLOX-1, reconoce a sLOX-1 y la albúmina humana, por lo que no se le considera específico para sLOX-1, además presenta reactividad ante alguna proteína de la banda de suero humano. Sin embargo, los anticuerpos 6B8 y 6B8 (I y IV) reconocen específicamente a la proteína recombinante sLOX-1. Al tomar en cuenta los resultados de ELISA indirecto y los del *western blot* se seleccionó el clon 6B8 (I y IV) para continuar con el estudio.

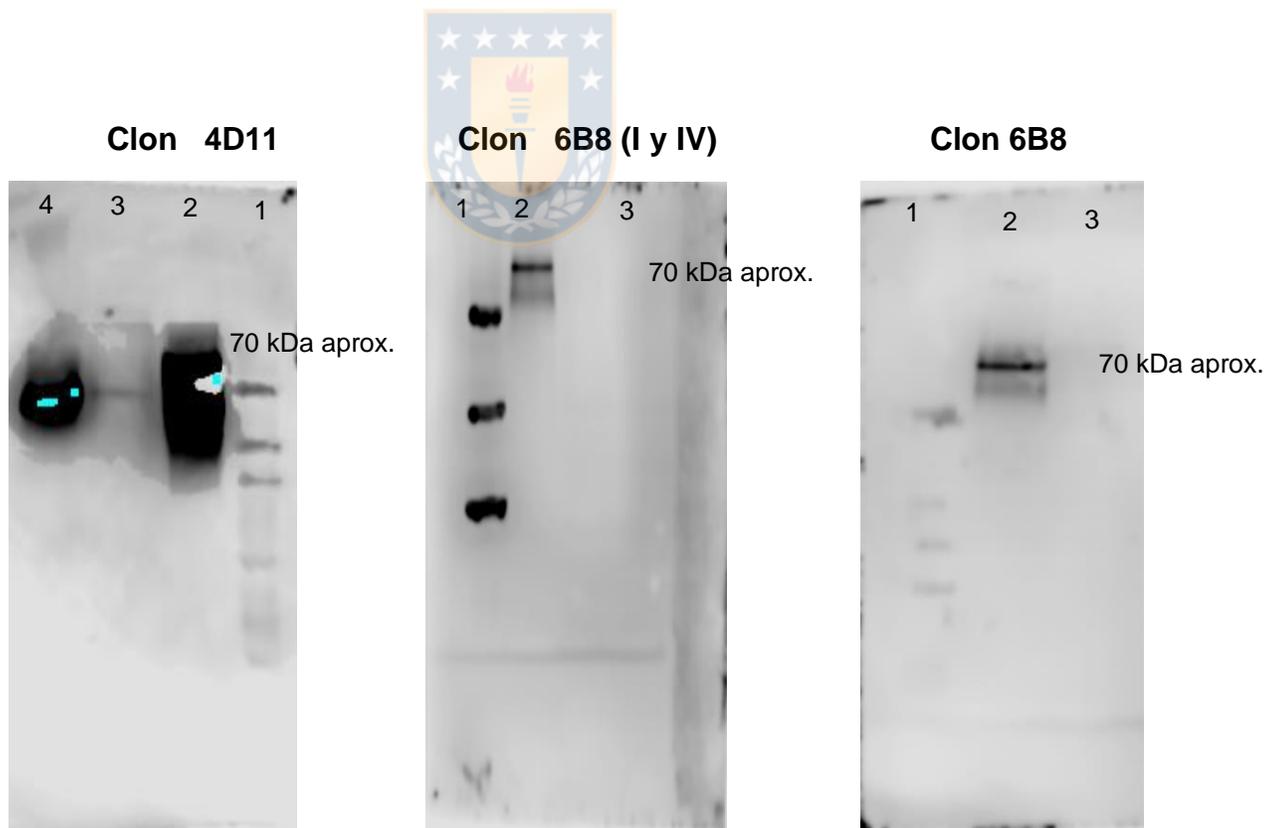


Figura 5-2: Western blot para los clones 4D11, 6B8 y 6B8 (I y IV). Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: sLOX-1, carril 3: albúmina humana, carril 4: suero humano.

5.5 Clonamiento del hibridoma 6B8 (I y IV) productor de anticuerpos anti sLOX-1.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el estudio de reactividad con sLOX-1, se procedió a realizar el clonamiento del hibridoma 6B8 (I y IV), con el fin de asegurar que los anticuerpos producidos provengan de un único clon.

El clon 6B8 (I y IV) fue descongelado y traspasado a un frasco de cultivo de 50 mL con medio DMEM completo donde además se le adicionó *feeder* para estimular la proliferación de las células. Se dejó en cultivo por 48 horas, pasado este tiempo se determinó la viabilidad celular y se realizó un recuento celular. Se prepararon suspensiones celulares de 160, 40 y 10 células/mL del clon y se sembraron 100 μ L por pocillo en placas de 96 pocillos. Luego de 10-15 días de proliferación, los sobrenadantes de cultivo se tornaron de color amarillo por acidificación del medio y se inició el *screening* o testeo de los hibridomas, utilizando la técnica de ELISA indirecto. La tabla 5-3 muestra el total de subclones obtenidos. Aquellos clones que resultaron positivos para sLOX-1 (mayor reactividad), fueron traspasados a placas de mayor volumen y a los cuales además se les confirmó el isotipo del anticuerpo producido por las células de hibridoma.

Tabla 5-3: Total de subclones obtenidos mediante el clonamiento por dilución límite de las células del hibriboma 6B8 (I y IV).

Placa de cultivo	Subclones
4 y 16 células por pocillo	2A12, 2B7, 2C6, 2E8, 2E9, 2E10, 2F11, 2H2, 2H3, 2H7, 2H8
1 célula por pocillo	1A8, 1A10, 1B2, 1B3, 1B9, 1B11, 1C5, 1C7, 1D3, 1D4, 1D10, 1E3, 1E4, 1E7, 1E10, 1E11, 1E12, 1F5, 1F6, 1G4, 1G6, 1G11

5.6 Evaluación de la reactividad por ELISA Indirecto de los sobrenadantes obtenidos del clonamiento.

Se realizó un ELISA indirecto para determinar la reactividad de los anticuerpos anti sLOX-1 presentes en los sobrenadantes de los subclones obtenidos. Se utilizó como antígeno la proteína recombinante sLOX-1 (10µg/mL) y la ovoalbúmina 1% como bloqueante. En la tabla 5-4 se observan aquellos subclones que presentaron mayor reactividad (D.O a 450nm) en el ELISA indirecto.

Tabla 5-4: Reactividad de los sobrenadantes de cultivo de los clones estudiados, frente a sLOX-1.

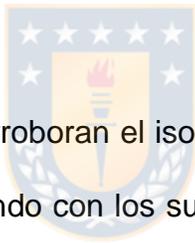
Subclones 6B8(I y 4)	D.O 450nm
1C5	0,884
1E7	0,784
1E10	0,922
1E12	0,999
1G4	0,787
2E8	0,865
2E9	0,879
2H8	0,884

5.7 Determinación del isotipo de los subclones seleccionados.

A los subclones productores de anticuerpos anti sLOX-1 que se muestran en la tabla 5-5, se les realizó la determinación del isotipo mediante ELISA indirecto.

Tabla 5-5: Reactividad de anticuerpos anti sLOX-1 de subclones seleccionados.

Subclones 6B8(I y 4)	D.O 450nm (IgG1)
1C5	0,884
1E7	0,784
1E10	0,922
1E12	0,999
1G4	0,787
2E8	0,865
2E9	0,879
2H8	0,884



Los resultados obtenidos corroboran el isotipo IgG1 de los 8 clones estudiados. Se decidió continuar trabajando con los subclones 6B81E10 y 6B81E12 debido a la mayor densidad óptica obtenida en la determinación de isotipo mediante ELISA indirecto, las cuales fueron de 0,922 y 0,999, respectivamente.

5.8 Determinación de la reactividad de los subclones 6B81E10 y 6B81E12 mediante *western blot*.

Con los dos clones seleccionados: 6B81E10 y 6B81E12 se realizó un *western blot* para determinar su reactividad y de acuerdo a este parámetro seleccionar uno de ellos para seguir estudiando.

Se utilizaron los antígenos sLOX-1, albúmina humana y suero humano. Los resultados obtenidos mediante el revelado de la membrana demostraron que el clon 6B81E12 presentó reacción cruzada con la albúmina humana y suero humano, mientras que el clon 6B81E10 mostró reactividad solo en los carriles donde se sembró el antígeno sLOX-1 indicando una mayor especificidad por parte de este clon, por lo cual fue seleccionado para continuar con los ensayos posteriores. En la figura 5-3 se observa el revelado de la membrana del subclon 6B81E10 con el que se siguió trabajando.

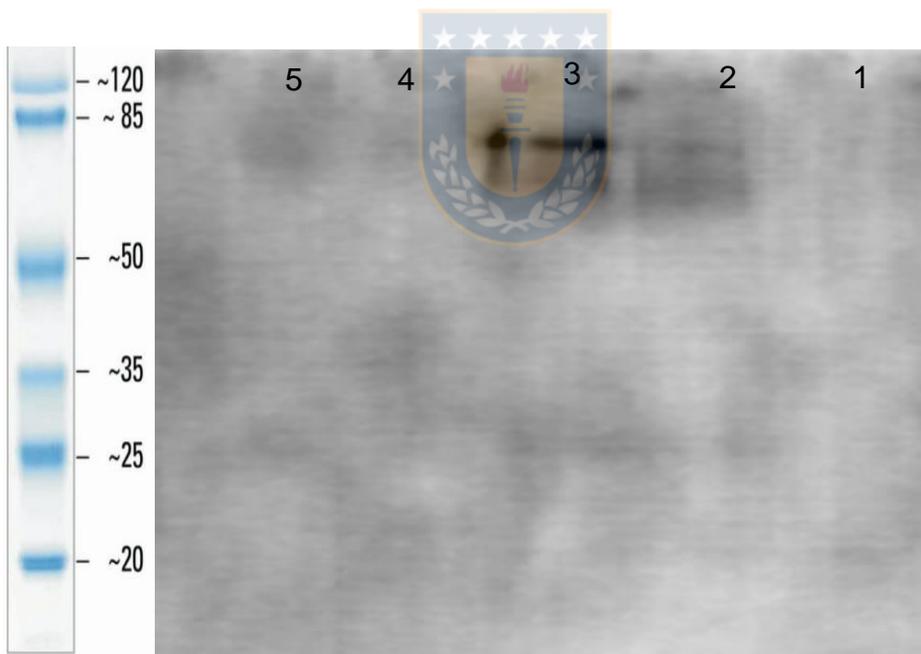


Figura 5-3: Western blot para el clon 6B8 (I y IV). Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: sLOX-1 (1.509 µg/mL), carril 3: sLOX-1 (750 µg/mL), carril 4: albúmina humana, carril 5: suero humano.

5.9 Purificación de los anticuerpos monoclonales anti sLOX-1.

El subclon 6B81E10 fue cultivado y expandido en botellas de cultivo para ser inyectado en la cavidad peritoneal de ratones BALB/c previamente pristaneados, para la producción de fluido ascítico. Después de 10 a 15 días de administrar las células, se obtuvo un volumen de 16,3 mL de fluido ascítico, luego se precipitaron las globulinas con una solución sobresaturada de sulfato de amonio como se describe en Materiales y Métodos, las que fueron cuantificadas por el método de Lowry, obteniéndose una concentración de 10,3 mg/mL.



La purificación de los anticuerpos a partir de las globulinas se realizó por cromatografía de afinidad utilizando Sefarosa-proteína G, como se describe en la Metodología. La figura 5-4 muestra el perfil de elución del anticuerpo monoclonal 6B81E10, obtenido por la medición de la densidad óptica a 280nm de las fracciones eluidas. El primer *peak* corresponde a las globulinas que no se unieron a la proteína G y el segundo *peak* corresponde a la IgG purificada, luego del cambio de pH con tampón glicina.

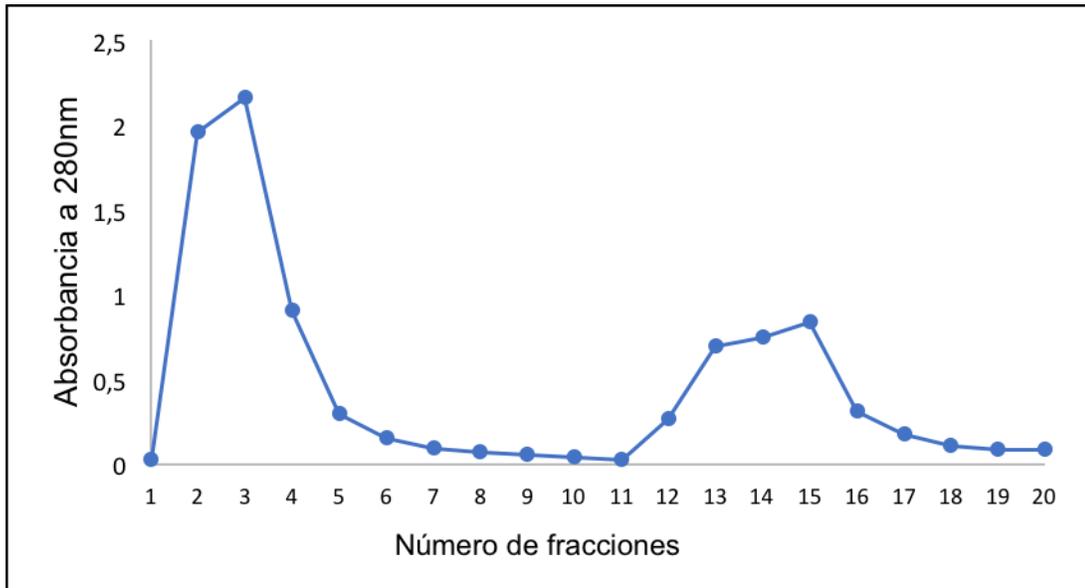


Figura 5-4: Perfil cromatográfico de la purificación del anticuerpo monoclonal 6B81E10 por cromatografía de afinidad en Sefarosa-proteína G.



Se recolectaron todas las fracciones del segundo *peak* eluidas de la columna y se dializaron durante 24 horas a 4°C en tampón PBS 10mM. Luego el anticuerpo purificado fue concentrado y cuantificado por el método de Lowry modificado obteniéndose una concentración de anticuerpo de 1,73 mg/mL (Figura 5-5).

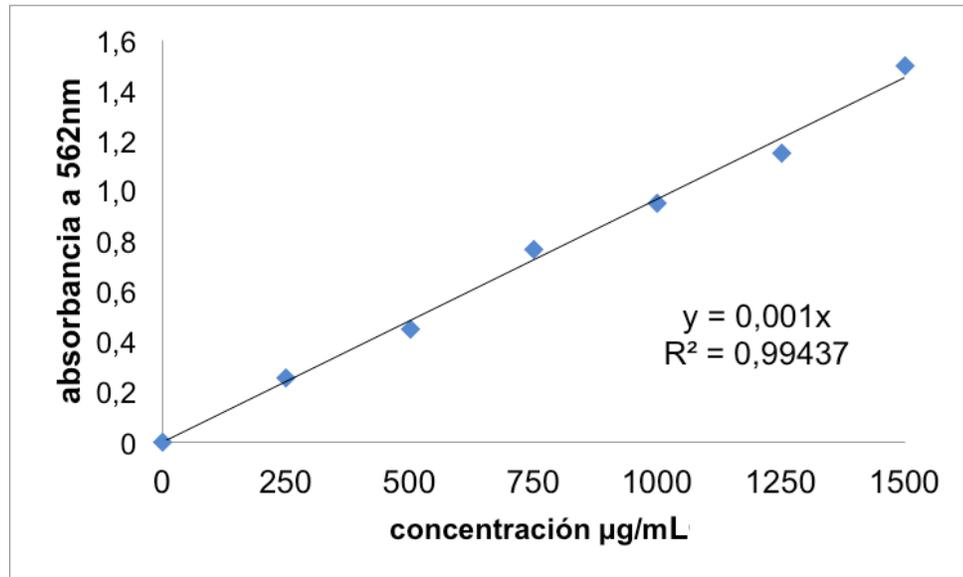


Figura 5-5: Curva de calibración con BSA para la cuantificación del anticuerpo monoclonal 6B81E10.



5.10 Titulación del anticuerpo monoclonal 6B81E10 anti sLOX-1

Con el objetivo de caracterizar el anticuerpo el anticuerpo 6B81E10 purificado, se tituló contra sLOX-1, a través de un ELISA indirecto. Este presentó un título de 1/800. En la figura 5-6 se observa la curva de titulación.

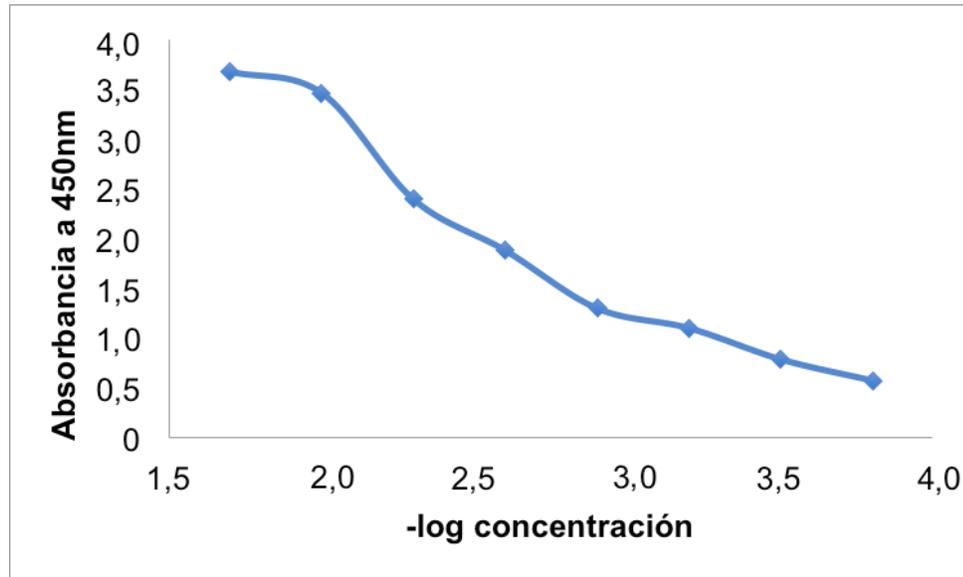


Figura 5-6: Curva de titulación del anticuerpo monoclonal 6B81E10 obtenida por ELISA indirecto.



5.11 ELISA sandwich para determinación de sLOX-1.

Se realizó un ELISA sandwich, utilizando la quimioluminiscencia como técnica de medición. Se utilizó como anticuerpo de captura 6B81E10 a una concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$, y ovoalbúmina al 1% como proteína bloqueante. Se preparó una curva de calibración utilizando diluciones seriadas de sLOX-1 en un rango de concentración entre 0,08 y 2,5 $\mu\text{g/mL}$. Como anticuerpo de revelado se utilizó el conjugado 2C3H11-biotina en un título de 1/1.500 y se probaron 2 sustratos quimioluminiscentes diferentes, con el fin de identificar cuál de los 2 reactivos otorgaba mayor sensibilidad y señal para la

cuantificación de sLOX-1. Las figuras 5-7 y 5-8 muestran las curvas de calibración obtenidas al utilizar los diferentes reactivos.

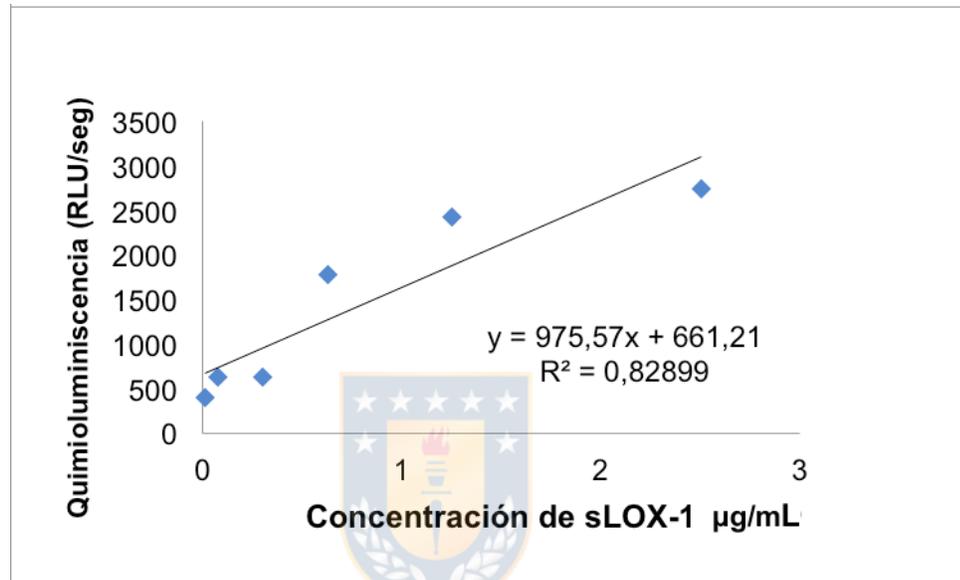


Figura 5-7: Curva de calibración obtenida en ELISA sandwich, utilizando el sustrato SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate.

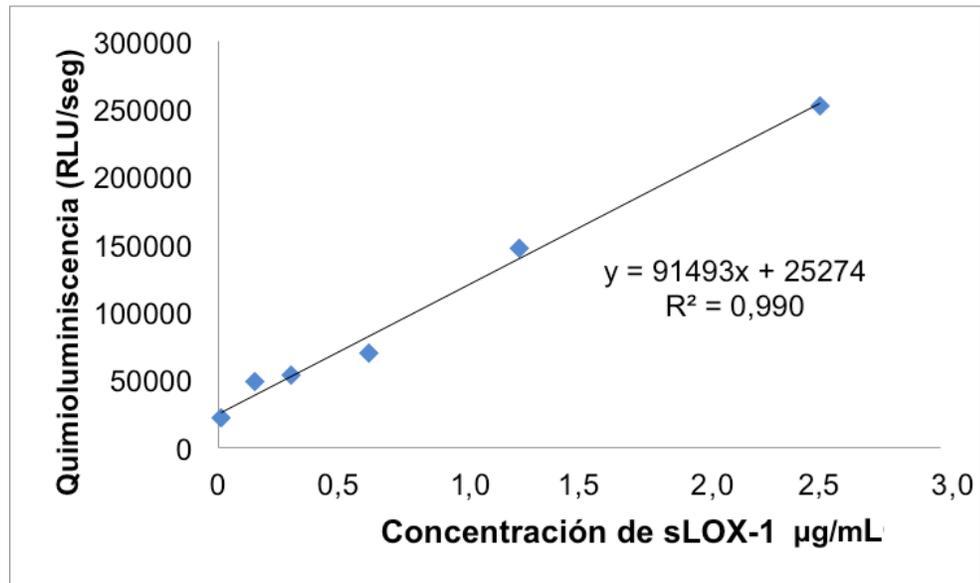


Figura 5-8: Curva de calibración obtenida en ELISA sandwich, utilizando el reactivo ECL Plus Western Blotting Substrate.

De los gráficos presentados, se observa que al utilizar el sustrato ECL plus (Figura 5-8) se obtiene una mayor lectura de luminiscencia y una mayor linealidad con un $R^2=0,990$ en comparación con el sustrato *SuperSignal* con un $R^2=0,829$, a las concentraciones de sLOX-1 utilizadas (0,08-2,5 µg/mL).

5.12 Determinación del rango de linealidad para el anticuerpo 2C3H11-biotina.

Considerando que el anticuerpo monoclonal 2C3H11 fue utilizado como anticuerpo de revelado en el ELISA sandwich, se realizó un ELISA indirecto utilizando quimioluminiscencia, con el objetivo de evaluar la capacidad del anticuerpo de reaccionar con diferentes concentraciones de sLOX-1. Se prepararon diluciones seriadas de la proteína recombinante sLOX-1 de 0 a 5

$\mu\text{g/mL}$. Se utilizó como anticuerpo primario el 2C3H11-biotina en un título de 1/1.500 y se ensayaron 2 diluciones del conjugado estreptavidina-peroxidasa (1/500 y 1/1.000). Se demostró una linealidad entre la proteína recombinante y el anticuerpo 2C3H11-biotina en el rango de concentraciones de 0,3 a 5 $\mu\text{g/mL}$ de sLOX-1 y al utilizar el conjugado 1/500 (Figura 5-9).

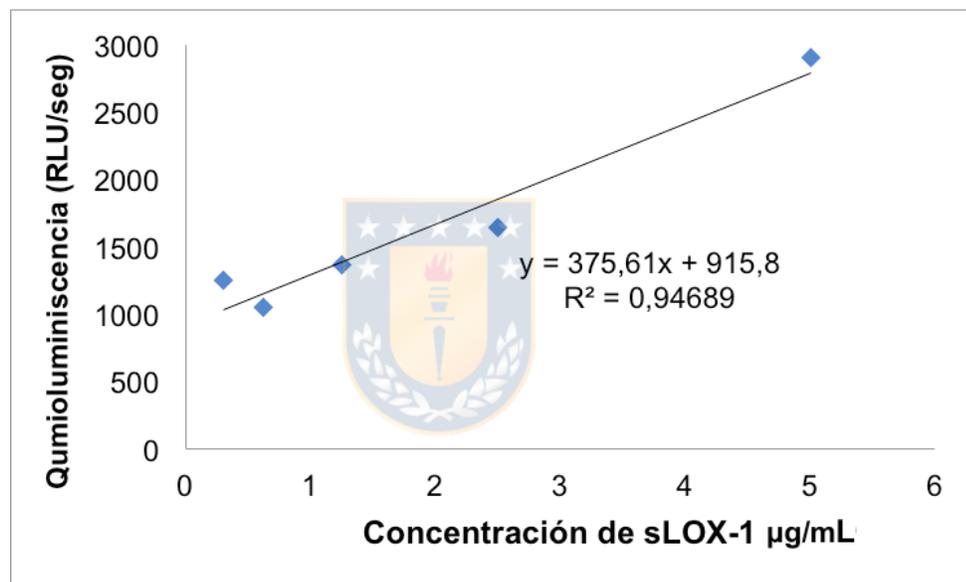


Figura 5-9: Reactividad del anticuerpo 2C3H11-biotina con distintas concentraciones de sLOX-1.

5.13 ELISA de titulación de anticuerpos mediante quimioluminiscencia

Los anticuerpos 6B81E10 y 2C3H11-biotina, se titularon contra sLOX-1 (5 y 10 $\mu\text{g/mL}$) por ELISA indirecto, utilizando quimioluminiscencia como técnica de detección de la señal. Ambos anticuerpos fueron titulados utilizando un tercer

sustrato luminiscente diferente, indicado específicamente para la técnica de ELISA: *BM Chemiluminescence ELISA Substrate, Roche*, ya que los sustratos anteriormente empleados si bien generaban una reacción luminiscente, estaban especificados como sustratos para *western blot*. Se prepararon diluciones seriadas de los anticuerpos, de 1/100 a 1/12.800 para 6B81E10 y de 1/800 a 1/6.400 para el conjugado 2C3H11-biotina. En el caso del anticuerpo 6B81E10 se obtuvo un título de 1/800, manteniendo el título obtenido por la técnica colorimétrica, mientras que el anticuerpo 2C3H11-biotina alcanzó un título de 1/1.600. Se graficaron las curvas utilizando 5µg/mL de sLOX-1, ya que no hubo diferencia al utilizar 5 o 10µg/mL de antígeno. En la figura 5-10 y 5-11 se observan las curvas de titulación obtenidas utilizando 5µg/mL de sLOX-1.

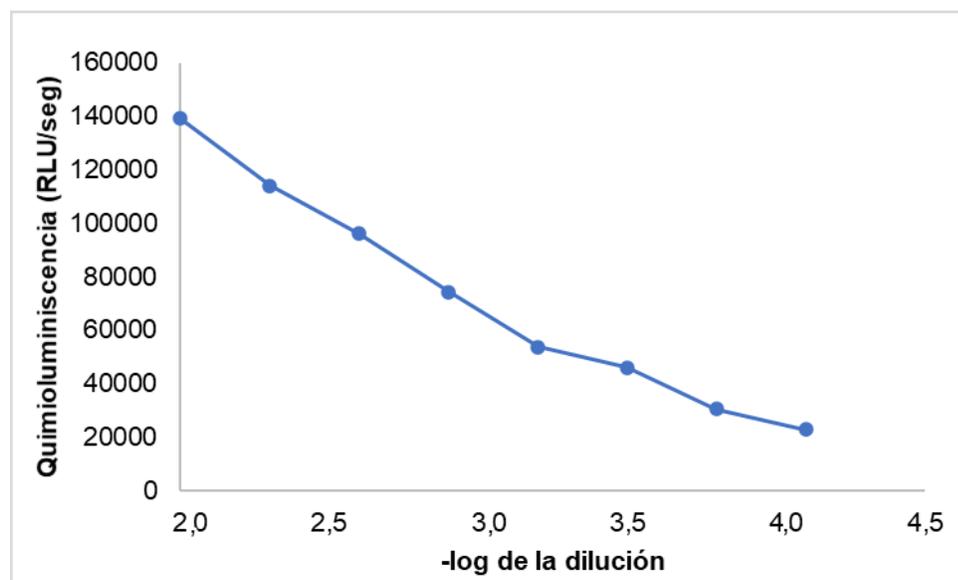


Figura 5-10: Curva de titulación del anticuerpo 6B81E10, por ELISA indirecto.

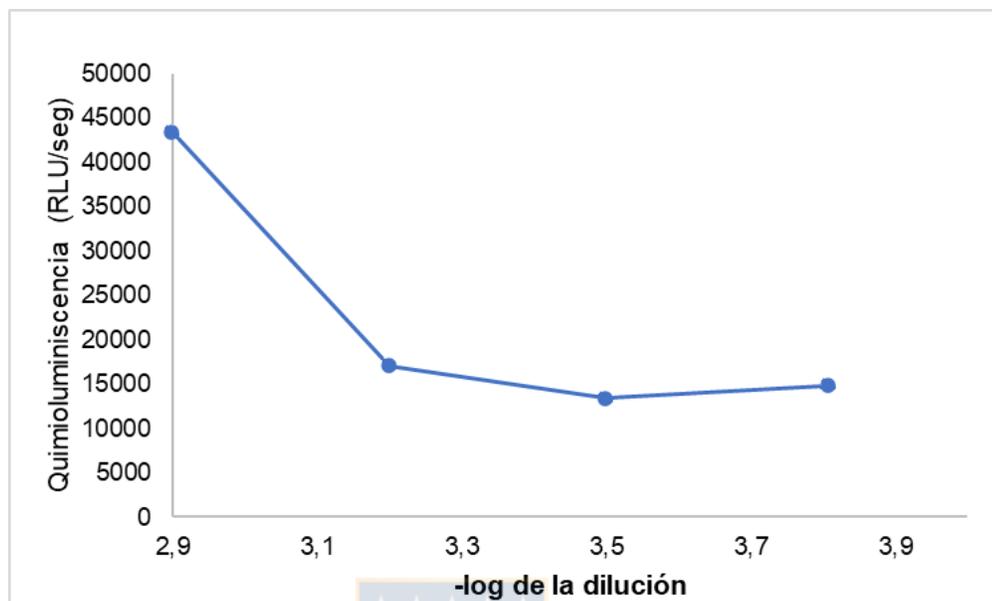


Figura 5-11: Curva de titulación del anticuerpo 2C3H11-biotina, por ELISA indirecto.



6. Discusión.

El síndrome coronario agudo es causado por la ruptura de las placas ateromatosas seguido de la formación de trombos, un anticuerpo que pudiera predecir la inestabilidad de la placa ateromatosa o la ruptura de esta podría ser de utilidad en el diagnóstico de SCA (Falk,1995).

Algunos biomarcadores como TnT y h-FABP son utilizados en SCA, pero estos no se encuentran elevados en etapas tempranas cuando aún no se ha producido daño isquémico evidente, incluso si el daño isquémico es mínimo, estos biomarcadores pueden seguir siendo significativamente menores con el paso de las horas. En el caso de hs-CRP es un biomarcador de alta sensibilidad, pero no es específico de daño miocárdico, debido a estas limitaciones es que sLOX-1 puede ser de utilidad como biomarcador para la prevención de aterosclerosis y SCA. (Panteghini, 2004).

Nos centramos en el receptor LOX-1 porque que se expresa en células endoteliales, células del músculo liso, macrófagos, fibroblastos, adipocitos y plaquetas, se relacionó directamente con patologías cardiovasculares y

aterosclerosis, además LOX-1 es clivado desde la membrana celular de células endoteliales haciéndolo detectable mediante inmunoensayos para el diagnóstico de enfermedad cardiovascular (Tian et al 2019; Xu et al, 2013).

Con el fin de desarrollar herramientas de diagnóstico temprano y de prevención de la enfermedad cardiovascular, se estudiaron anticuerpos monoclonales dirigidos contra sLOX-1 para obtener en un futuro un inmunoensayo que permita cuantificar los niveles séricos de sLOX-1.



Para este propósito se comenzó incubando 6 hibridomas productores de anticuerpos anti sLOX-1 denominados 2E2, 2B4, 4D11, 5D8, 6B8 y 6B8 (I y IV), el incubar varios clones de hibridomas distintos proporciono al estudio anticuerpos anti sLOX-1 variados los cuales fueron testeados posteriormente para seleccionar el anticuerpo producido con las características más idóneas para seguir estudiando.

Para la incubación de los hibridomas se utilizó un medio de cultivo y una cámara de cultivo que proveyeran de las condiciones ideales en las que los hibridomas proliferaran óptimamente. Esto se pudo comprobar al observar mediante microscopía cada cultivo de hibridomas.

La determinación de la reactividad de los sobrenadantes de cultivo de cada hibridoma se realizó con la técnica de ELISA indirecto, se utilizó como antígenos sLOX-1 y albúmina humana, con el fin de determinar si los anticuerpos de los hibridomas tenían reacción cruzada con la albúmina, la cual se encuentra en gran concentración en el suero, se decidió estudiar además los bloqueantes ovoalbúmina y caseína. Con los resultados obtenidos que se muestran en la tabla número 5-1, se determinó que los anticuerpos producidos por los hibridomas fueron específicos para sLOX-1, los testeos con albúmina humana presentaron una baja reactividad al compararlos con los valores obtenidos al usar sLOX-1 como antígeno. Considerando los valores de D.O. obtenidos se decidió continuar trabajando con los clones que poseían la mayor respuesta, los cuales fueron: 4D11 (0,66), 6B8 (0,62) y 6B8(I y IV) (0,63). Se decidió utilizar como bloqueante a ovoalbúmina debido a los valores de D.O. más elevados en comparación a los obtenidos con el uso de caseína.

A estos tres hibridomas seleccionados previamente se les identificó el isotipo de los anticuerpos que producían mediante ELISA indirecto, los resultados obtenidos en la tabla número 5-2 demuestran que los anticuerpos producidos por los hibridomas eran en el caso de 6B8 y 6B8 (I y IV) del isotipo IgG1 con

D.O. de 1,14 y 1,11 respectivamente y en el caso del clon 4D11 del isotipo IgG2b con D.O. de 0,861.

Mediante la técnica de *western blot* se corroboró la reactividad y especificidad de los anticuerpos producidos por los hibridomas. El gel teñido con azul de coomassie se encuentra en la figura número 5-1, en esta se observa en la banda número dos a sLOX-1, esta se encuentra alrededor de los 70 kDa, si bien la fracción soluble de LOX-1 tiene un peso molecular cercano a 35 kDa, esta diferencia puede explicarse ya que sLOX-1 se presenta en dímeros alcanzando un peso de 70 kDa aproximadamente. En el carril 3 se observa una banda de mayor intensidad de señal que corresponde a la albúmina con un peso molecular de 67 kDa.

La transferencia y el revelado de las membranas se encuentra en la figura número 5-2, en ella se observa que el anticuerpo 4D11 el cual fue testeado también con suero humano además de albúmina humana y sLOX-1, reconoce a sLOX-1 y a albúmina humana, además se observa que en el carril donde se sembró suero humano hay una respuesta exacerbada ante alguna proteína, esta podría ser albúmina u otra proteína presente en el suero humano. Sin embargo, los anticuerpos 6B8 y 6B8 (I y IV) reconocen específicamente a la proteína recombinante sLOX-1, al comparar los resultados obtenidos entre los

clones 6B8(I y IV) y 6B8, se escogió el 6B8(I y IV) debido a la mayor reacción en el *western blot* y al comparar los resultados obtenidos también en el ELISA indirecto en el cual se determinó la reactividad de los anticuerpos producidos por los hibridomas.

La clonación por el método de dilución límite del hibridoma 6B8 (I y IV) se realizó con el fin de asegurar que los anticuerpos producidos provengan de un único clon. Para esto se realizaron diluciones de la suspensión de hibridomas del clon 6B8 (I y IV) para que en cada pocillo de la placa de cultivo utilizada se encontraran solo 16, 4 y 1 célula por pocillo, los pocillos de 16 y 4 células sirvieron como control y para realizar un seguimiento de la proliferación celular, mientras que de los pocillos con solo una célula se seleccionaría uno que sería utilizado para seguir con los estudios futuros. Se realizó un seguimiento de cada pocillo mediante microscopio óptico y macroscópicamente utilizando un espejo con aumento, los sobrenadantes de cultivo se tornaban de color amarillo debido a la acidificación del medio.

Para escoger el subclon con el cual se seguiría trabajando se realizó ELISA indirecto con subclones escogidos de acuerdo a parámetros de proliferación celular, rapidez de crecimiento y color del sobrenadante de cada placa. Los resultados de la tabla número 5-4 muestran la reactividad ante sLOX-1. de los anticuerpos producidos por estos subclones que obtuvieron los mayores

resultados a 450 nm, los subclones que obtuvieron la mayor D.O fueron los llamados 6B81E10 (0,922) y 6B81E12 (0,999), la determinación del isotipo de los anticuerpos producidos por los hibridomas dio como resultado que todos producían anticuerpos IgG1 y nuevamente los subclones 6B81E10 y 6B81E12 poseían los mayores valores de D.O., por ello fueron escogidos estos dos para realizar un *western blot* con el fin de confirmar la reactividad y la especificidad ante sLOX.1

Los resultados del *western blot* de la figura número 5-3 corresponden al revelado de la membrana de nitrocelulosa de los anticuerpos producidos por el subclon 6B81E10, en esta se observa que el anticuerpo fue específico para sLOX-1 proveniente de distintas concentraciones (1.509 µg/mL y 750 µg/mL), mientras que en los carriles de albúmina y suero humano no se observa ninguna reacción. En el caso del subclon 6B81E12 se observó reacción ante la proteína albúmina humana y ante alguna proteína del suero humano utilizado, por ende, se decidió seguir trabajando con el subclon 6B81E10.

La producción de fluido ascítico se realizó en ratones BALB/c hembras, porque los hibridomas provienen de una fusión celular con mielomas de la misma cepa, así se evita un posible problema de histocompatibilidad al producir el líquido ascítico; se prefieren las ratas hembras puesto que los machos son más agresivos entre ellos, y se quiere evitar que se hagan daños durante las 2

semanas aproximadamente en que se obtiene el líquido ascítico (Schelling M., 1995).

En la purificación de anticuerpos mediante cromatografía de afinidad se utilizó una columna de agarosa con proteína G reactiva debido a que los anticuerpos de clase IgG1 poseen una alta afinidad a esta columna uniéndose a ella mediante enlaces no covalentes (Vigliotti, 2007). Las fracciones de anticuerpos purificados fueron neutralizadas con Tris 1M de pH 8,0 para darles un medio adecuado, estos anticuerpos se cuantificaron obteniéndose una concentración de 1,73 mg/mL.



El título del anticuerpo al estudiarlo con diluciones seriadas del anticuerpo contra sLOX-1 a través de un ELISA indirecto fue de 1/800, lo que indica que esta es la dilución a utilizar para que los resultados sean fidedignos, además esto permite no malgastar el anticuerpo, disminuir el *background* y la presencia de falsos negativos e interferencias.

Se realizó un ELISA sandwich en el que se utilizó como anticuerpo de captura 6B81E10 y como anticuerpo de revelado el conjugado 2C3H11-biotina en título 1/1.500 con el fin de comparar los resultados obtenidos utilizando dos sustratos quimioluminiscentes diferentes. Se observa según la figura 5-6 y 5-7 que con el uso del reactivo quimioluminiscente *ECL Plus Western Blotting Substrate* se

obtuvieron mayores lecturas de luminiscencia y mayor linealidad de la curva de calibración con un $R^2 = 0,990$, mientras que utilizando el reactivo quimioluminiscente *SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate* se obtuvo una curva de calibración con un $R^2=0,829$.

Considerando que se utilizó el anticuerpo 2C3H11-biotina para el ELISA sandwich como anticuerpo de revelado se realizó un ELISA indirecto para evaluar la capacidad del anticuerpo de reaccionar a diferentes concentraciones de antígeno sLOX-1. Según los resultados de la figura 5-9 se demostró que el anticuerpo 2C3H11-biotina se comportó de manera lineal ante la proteína sLOX-1, esto quiere decir que a mayor concentración de antígeno se obtendrán mayores respuestas del anticuerpo biotilado.

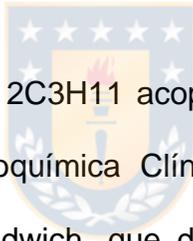
Al utilizar un sustrato específico para ELISA llamado *BM Chemiluminescence ELISA Substrate, Roche* en un ELISA de titulación del anticuerpo 6B81E10 y 2C3H11-biotina resulto en títulos de 1/800 y 1/1.600 respectivamente, el uso de este sustrato distinto fue debido a que los anteriores eran específicos para *western blot* y este se agotó durante la investigación y se pidió nuevamente al distribuidor.

Nakamura M. en el año 2010 generó anticuerpos monoclonales anti sLOX-1 y desarrolló un inmunoensayo para detectar sLOX-1 en suero humano. Para ello

primero generó LOX-1-biotina con estreptavidina marcada con europio y también anticuerpos anti sLOX-1 con el fin de amplificar la señal obtenida. Realizó la titulación de estos anticuerpos producidos por los hibridomas mediante un inmunoensayo de fluorescencia de resolución en tiempo (TR-FIA) y sus resultados fueron positivos, los anticuerpos no solo reconocieron LOX-1 sino que también sLOX-1. Luego preparó un ELISA sándwich para la determinación de sLOX-1 con anticuerpos acoplados a biotina, los mejores resultados los obtuvo al utilizar los anticuerpos 6B11 de captura y 1A7-biotina como anticuerpo de revelado por lo que procedió a utilizar estos anticuerpos para un inmunoensayo de ELISA sándwich para la detección de sLOX-1 en suero humano. Utilizó al anticuerpo 1A7 como captura y a 6B11 como anticuerpo de revelado, además se acoplo a la enzima fosfatasa alcalina (ALP) para aumentar la señal obtenida. Los resultados obtenidos luego de realizar el ensayo con 26 muestras de suero recolectadas de sujetos normales (11 hombres y 15 mujeres, de 28 a 57 años) fue positivo ya que las concentraciones de sLOX-1 en todas las muestras tenían una media de 191 (\pm 89) pg/mL. El inmunoensayo propuesto fue suficientemente sensible para medir los niveles de sLOX-1 en sueros humanos normales (Nakamura, 2010).

El trabajo realizado en esta tesis permitió la obtención de un anticuerpo anti sLOX-1, el cual es el principal receptor de LDLox y también está vinculado

estrechamente a la patogénesis de la aterosclerosis y otras patologías. El anticuerpo obtenido desde el subclon 6B81E10 demostró ser específico ante sLOX-1 mediante western blot y ELISA indirecto al no reaccionar con otras proteínas del suero humano y tampoco con la albúmina humana, lo cual es importante debido a la gran concentración de esta en plasma. El anticuerpo además demostró a través de ensayos de ELISA indirecto y ELISA sandwich presentar una reacción directamente proporcional a distintas concentraciones de sLOX-1.



La utilización del anticuerpo 2C3H11 acoplado a biotina obtenido previamente en el Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología permitió realizar estudios de ELISA tipo sandwich, que dieron resultados positivos y lineales hasta concentraciones de 0,08 $\mu\text{g/mL}$. Los rangos de concentración de sLOX-1 en suero de personas con SCA fluctúan entre 1,0 ng/mL hasta los 14,0 ng/mL (Hayashida, Kume, et al; 2005). Al comparar nuestros resultados con los de Nakamura podemos concluir que los resultados del ELISA sándwich realizado no serían de gran utilidad para un futuro inmunoensayo de detección de sLOX-1 en suero de pacientes, en el caso del ELISA sándwich de Nakamura detecta concentraciones de hasta 0,5 ng/mL .

Una de las causas que puede deberse a que no se alcancen mayores rangos de detección puede ser que no se utilizó un sustrato específico para ELISA ya que se agotó y se utilizó un sustrato para *western blot*. Cuando llego el sustrato específico para ELISA no se realizó un ELISA sándwich para ver los resultados con este sustrato quimioluminiscente sino que se realizó una titulación de cada anticuerpo por sí solo. Debido a esto no se debe descartar el uso futuro de este anticuerpo ya que puede arrojar resultados esperanzadores con el sustrato adecuado, también para mejorar los rangos de detección del antígeno se puede experimentar utilizando diferentes reactivos como el bloqueante de ovoalbúmina o utilizar enzimas diferentes acopladas a anticuerpos, también puede utilizarse un antígeno sLOX-1 de otra fuente a la que se utilizó, por ejemplo, utilizar proteína sLOX-1 más reciente o sin tantos procesos de descongelación.

Actualmente, existen kits de ELISA para la cuantificación de sLOX-1, en su mayoría tipo sandwich pero tienen un alto costo monetario y principalmente son utilizados en investigación. Por ello con los resultados del anticuerpo específico ante sLOX-1 obtenido en este trabajo, llamado 6B81E10, en los distintos inmunoensayos realizados, avalan un futuro estudio para la aplicación en un inmunoensayo para la cuantificación de la proteína sLOX-1, que una vez validado podría utilizarse en el laboratorio clínico.

En este contexto, debido a la alta prevalencia de enfermedades cardiovasculares en nuestro país, se hace necesario un inmunoensayo que permita ser una herramienta diagnóstica en pacientes con riesgo cardiovascular para mejorar el pronóstico de la enfermedad cardiovascular.



7. Conclusiones.

En el presente trabajo se logró la obtención de un anticuerpo anti sLOX-1 desde un subclon llamado 6B81E10 proveniente del hibridoma 6B8 (I y IV).

Los estudios de reactividad a través de ELISA indirecto y Western blot demostraron que el anticuerpo obtenido es específico para sLOX-1.

El anticuerpo 6B81E10 podría utilizarse en un ELISA sandwich para la cuantificación de sLOX-1 en plasma.



Glosario

Aterosclerosis: Síndrome caracterizado por el depósito de lípidos en la íntima de las paredes arteriales.

Anticuerpo: Molécula (proteína) responsable del reconocimiento y eliminación (neutralización) específica de antígenos.

Antígeno: molécula que al introducirse en el organismo induce en este una respuesta inmunitaria, provocando la formación de anticuerpos.

Biomarcador: Indicador de interacción entre un sistema biológico y un agente de tipo químico, físico o biológico, la cual es evaluada como una respuesta funcional o fisiológica, que ocurre a nivel celular o molecular y además está asociada con la probabilidad del desarrollo de una enfermedad.

D.O.: Densidad óptica.

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

Feeder: Células que proporcionan factores secretados, matriz extracelular y contacto celular para ayudar al crecimiento celular en el medio de cultivo.

HDL: Lipoproteína de alta densidad.

Hibridoma: Línea celular híbrida obtenida mediante la fusión de un linfocito B productor de anticuerpo, con una línea celular de mieloma (linfocito B canceroso) que no produce una inmunoglobulina propia.

LDL: Lipoproteína de baja densidad.

Metaloproteasas: enzima que genera proteólisis.

PBS: Tampón fosfato Salino.

Proteína recombinante: Proteína que se obtiene al expresar un gen clonado en una especie o línea celular distinta a la célula original.



Bibliografía

Benjamin E., Blama M., Chiuve S. Et al, (2017). Resumen de estadística de 2017 Enfermedad del corazón y ataque cerebral, *American Heart Association*, 1-6.

Childs B. G., Baker D., WijshakeT., et al. (2016). *Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis*. *Science*, 354(6311), 472-477.

MINSAL, (2014). Estadísticas de natalidad y mortalidad en Chile, año 2014, Ministerio de Salud de Chile.

Falk E, P. K. Fuster V. (1995), *Coronary plaque disruption*, *Circulation*, ed 92(657-671).

Gimbrone Jr, M. A., García-Cardena, G. (2016). *Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis*. *Circulation research*, 118(4), 620-636.

Grossman S., Porth C. M. (2014), Trastornos del flujo sanguíneo en la circulación sistémica, Sheila Grossman, Carol Mattson Porth, (9a. ed.), Porth fisiopatología (pp 1380-1380), Barcelona: Wolters Kluwer.

Hayashida K., Kume N., Murase T., et al. (2005). *Serum soluble lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 levels are elevated in acute coronary síndrome*, *Circulation* (112-6). 812-818.

Kattoor A. J., Pothineni N., Palagiri D., et al. (2017). *Oxidative stress in atherosclerosis. Current atherosclerosis reports*, 19(11), 42.

Kasper D., Fauci A., et al. (2015), Patogenia, prevención y tratamiento de la aterosclerosis (19 eds), Harrison. Principios de Medicina Interna, New York, McGraw-Hill.

Mehta, J. L., Chen J., Hermonat P. et al. (2006). *Lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1): a critical player in the development of atherosclerosis and related disorders. Cardiovascular research*, 69(1), 36-45.

MINSAL. (2010). Guía clínica infarto agudo al miocardio con supra desnivel del segmento ST., MINSAL.



MINSAL, (2018). Encuesta Nacional de salud 2016–2017, segundos resultados, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Naga K. P., et al. (2017). *LOX -1 in Atherosclerosis and Myocardial ischemia. Journal of the American college of cardiology*, (69). 2760-2768.

Nobuaki K., Kume N., Shinada T. et al. (2011). *Soluble Lectin-Like Oxidized LDL Receptor-1 and High-Sensitivity Troponin T as Diagnostic Biomarkers for Acute Coronary Syndrome. Circulation Journal*. (75). 2862-2871.

Noriaki K., Mitsuoka H., Hayashida K. et al. (2010). *Soluble lectin-like oxidized LDL receptor-1 (sLOX-1) as a sensitive and specific biomarker for acute coronary syndrome- Comparison with other biomarkers. Journal of Cardiology*. (56-2). 159-165.

OMS, (2008), prevención de las enfermedades cardiovasculares: guía de bolsillo para las estimaciones y el manejo del riesgo cardiovascular, Ginebra: ONU

Panteghini M. (2004), *Role and importance of biochemical markers in clinical cardiology*, European Heart Journal, Volume 25, 1187–1196.

Paccot M., (2014), Consenso MINSAL Chile 2014 enfoque de riesgo para la prevención de enfermedades cardiovasculares, Escobar M.C., Rozas M.F, Srur A, Santiago: MINSAL

Pirillo A., Giuseppe D. N., Alberico L. (2013). *Lox-1, OxLDL, and atherosclerosis. Mediator of inflammation*, 2013,1-12

Sayoko O., Sato Y., Kakino A. et al. (2009). *LOX-1 The multifunctional Receptor underlying cardiovascular dysfunction. Circulation Journal. 73, 1993-1999.*

Suarez J. (2001). Fisiopatología de la aterosclerosis, primera parte. Revista Costarricense de Cardiología, 3(2), 54-63.

Schelling M., *Methods of Immunization to Enhance the Immune Response to Specific Antigens In Vitro.* (9-15).

Stancel N., Chen. C., Ke L et al. (2015). *Interplay between CRP, Atherogenic LDL, and LOX-1 and its potential role in the pathogenesis of atherosclerosis. Clinical Chemistry.* (62: 2), 320-327.

Tian, K., Ogura S., Little P. et al. (2019). *Targeting LOX-1 in atherosclerosis and vasculopathy: current knowledge and future perspectives. Annals of the New York Academy of Sciences*, 1443(1), 34-53.

Vigliotti B. (2007), Cromatografía de afinidad e inmuoafinidad, Manual de métodos Inmunológicos, (29-37).

Xu, S., Ogura S., Chen J., et al. (2013). *LOX-1 in atherosclerosis: biological functions and pharmacological modifiers. Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(16), 2859-2872.

