



**Universidad de Concepción
Facultad Farmacia
Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología**

Caracterización funcional de la variante D47N del receptor de lipoproteína de baja densidad y su correlación con los niveles de colesterol LDL en plasma de personas portadoras de Hipercolesterolemia Familiar

POR CATALINA ANGÉLICA MARTÍNEZ OLEA

Proyecto de tesis a la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción para optar al grado académico de Magíster en Bioquímica Clínica e Inmunología

Profesor Patrocinante y Guía: Dra. Andrea Sánchez R.
Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

Marzo, 2025
Concepción, Chile

AGRADECIMIENTOS

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	8
INTRODUCCION.....	10
ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR.....	10
DISLIPIDEMIAS Y FACTORES DE RIESGO.....	11
LDL Y ATEROSCLEROSIS.....	16
HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR COMO FACTOR DE RIESGO	17
FISIOPATOLOGÍA DE HF.....	19
DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE HF	23
GENÉTICA Y DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE HF	25
VARIANTES DE SIGNIFICANCIA INCIERTA Y CRITERIOS DE ACMG	26
HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR EN CHILE	28
VARIANTE c.139G>A, p.Asp47Asn DEL LDLR	29
PROBLEMA.....	32
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	33
HIPÓTESIS.....	33
OBJETIVO	34
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
1. Aspectos bioéticos y de bioseguridad	35
2. Consentimiento y asentimiento informado	35
3. Aislamiento de células desde sangre periférica y cultivo celular.....	37
3.1 Purificación de monocitos de sangre periférica	37
3.2 Cultivo y diferenciación de células CD14+.....	38
4. Citometría de flujo	39
4.1 Cuantificación del LDLR	39
5. Inmunocitoquímica	40
5.1 Localización subcelular del LDLR	40
6. Transporte de LDL.....	42
6.1 Obtención de LDL	42
6.2 Ensayos de transporte	44
6.3 Ensayos de competencia.....	45
7. Análisis estadístico.....	45

8. Análisis de correlación de características funcionales del LDLR-D47N y niveles de LDL	46
RESULTADOS	47
1. Marcadores de linaje macrófago.....	47
2. Expresión del LDLR	49
3. Localización del LDLR en pacientes portadores de la variante D47N	52
4. Evaluación de la internalización de la molécula de LDL medida por el LDLR en monocitos diferenciados macrófagos derivado de pacientes portades de la variante D47N	58
4.2 Estandarización de ensayos de transporte del LDLR.....	58
4.2 Ensayos de transporte LDLR en pacientes portadores de variante D47N-LDLR 62	
5. Correlación entre características funcionales del LDLR y los niveles plasmáticos de colesterol LDL en pacientes portadores de la variante D47N ...	64
DISCUSIÓN	69
Modelo propuesto N°1:	74
Macrófagos como modelo de estudio funcional ex vivo en variantes de HF	75
Modelo propuesto N°2:	78
CONCLUSIONES Y PROYECCIONES	80
ANEXOS	82
Anexo 1: Autorización comité Ético-Científico	82
Anexo 2: Manejo de residuos.....	84
Anexo 3: Modelo de consentimiento informado pacientes con Hipercolesterolemia que presentan la variante D47N	85
Anexo 4: Modelo de consentimiento informado personas que no poseen Hipercolesterolemia Familiar	86
Anexo 5: Modelo de consentimiento informado para padres	87
Anexo 6: Modelo de asentimiento informado	88
BIBLIOGRAFÍA.....	89

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Criterios de la Red de Clínicas de Lípidos Holandesas.....	23
Tabla 2. Criterios de inclusión y exclusión utilizados para incluir la población de estudio.....	35
Tabla 3. Criterios de inclusión y exclusión utilizados para incluir la población de control.....	36
Tabla 4. Matriz de correlación entre variables clínicas (CT Y LDL) y ensayos funcionales (Expresión del LDLR, colocalización LDLR-calreticulina, LDLR-clatrina y LDLR-Lamp).....	67
Tabla 5. Análisis comparativo de la caracterización funcional de la mutación de clase 3 del LDLR en macrófagos y otros modelos celulares tradicionales.....	77

ÍNDICE DE ILUSTACIONES

Figura 1. Homeostasis celular del colesterol.	12
Figura 2. Progresión de la aterosclerosis.....	14
Figura 3. Transporte intracelular del LDLR.....	19
Figura 4. Clasificación de mutaciones del gen de LDLR asociadas a Hipercolesterolemia Familiar.....	21
Figura 5. Diagrama de flujo de métodos de biología celular y molecular utilizadas en experimentos <i>ex vivo</i> e <i>in vitro</i> para caracterizar funcionalmente mutaciones asociadas al LDLR.....	26
Figura 6. Variantes más frecuentes del LDLR asociadas a HF en la región del Biobío.....	29
Figura 7. Determinación de linaje celular macrófagos intermedios.....	47
Figura 8. Determinación de rangos de corte para cuantificación de expresión LDLR.....	49
Figura 9. Determinación de expresión LDLR en macrófagos derivados de PBMC de personas <i>wild-type</i> y pacientes portadores de la variante D47N de HF.....	51
Figura 10. Inmunocitoquímica de colocalización del LDLR y marcador de retículo Calreticulina en macrófagos.....	53
Figura 11. Inmunocitoquímica de colocalización del LDLR y marcador de vesículas recubiertas de clatrina en macrófagos.....	54
Figura 12. Inmunocitoquímica de colocalización del LDLR y marcador lisosomal Lamp1 en macrófagos.....	56
Figura 13. Ensayo de incorporación de LDL marcado.....	58

Figura 14. Transporte y competencia de LDL en macrófagos en personas <i>wild-type</i>	60
Figura 15. Transporte de LDL en macrófagos de pacientes portadores de la variante D47N.....	62
Figura 16. Dendograma de análisis de conglomerados.....	64
Figura 17. Análisis de Componentes Principales.....	65
Figura 18. Caracterización funcional <i>ex vivo</i> de la variante D47N.....	73
Figura 19. Diagrama de flujo de métodos de biología celular y molecular para caracterizar funcionalmente mutaciones de clase 3 asociadas al LDLR.....	78

RESUMEN

La Hipercolesterolemia Familiar (HF) es una alteración genética autosómica dominante caracterizada por elevados niveles plasmáticos de colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL) desde muy temprana edad, lo cual se asocia a un alto riesgo de desarrollo de enfermedades cardiovasculares (ECV) prematuras. Estas mutaciones se vinculan a genes que codifican para PCSK9, apolipoproteína B y, > 80% al gen del receptor de LDL (LDLR). Un estudio de pesquisa de HF en la región del Biobío, se relevó la segunda variante más frecuente, p.Asp47Asn (D47N) del LDLR, la cual clasifica como una variante de patogenicidad incierta. Sin embargo, se ha descrito una alteración significativa en niveles de colesterol en sangre de pacientes portadores, lo que les confiere mayor riesgo de desarrollo de ECV precoz, haciendo necesario determinar cómo la presencia de esta variante afecta la función del LDLR.

Por esta razón, el presente estudio propuso contribuir a establecer la patogenicidad de la variante D47N por medio de ensayos funcionales *ex vivo* con células proveniente de pacientes. Para ello, técnicas de Biología Celular y Molecular se emplearon en macrófagos derivados de monocitos obtenidos de sangre venosa de portadores de la variante. De esta caracterización se obtuvieron diferencias significativas frente al control *wild-type*, también presentó características similares a mutaciones de clase 3, sugiriendo que se podría estar en presencia de una variante patogénica.

ABSTRACT

Familial Hypercholesterolemia (FH) is an autosomal dominant genetic disorder characterized by elevated plasma levels of low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) from a very early age, which is associated with a high risk of developing premature cardiovascular diseases (CVD). These mutations are linked to genes encoding PCSK9, apolipoprotein B, and >80% to the LDL receptor (LDLR) gene. A FH screening study in the Biobío region revealed the second most frequent variant, p.Asp47Asn (D47N) of the LDLR, which is classified as a variant of uncertain pathogenicity. However, a significant alteration in cholesterol levels in the blood of carrier patients has been described, conferring a higher risk of early CVD development, making it necessary to determine how the presence of this variant affects LDLR function.

For this reason, the present study proposed to contribute to establishing the pathogenicity of the D47N variant through *ex vivo* functional assays with cells from patients. To this end, Cellular and Molecular Biology techniques were employed in macrophages derived from monocytes obtained from venous blood of variant carriers. This characterization yielded significant differences compared to the wild-type control, also presenting characteristics similar to class 3 mutations, suggesting that we could be in the presence of a pathogenic variant.

INTRODUCCION

ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son un grupo de trastornos que afectan al corazón y los vasos sanguíneos. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), estas enfermedades son la principal causa de muerte en el mundo, tanto en hombres como en mujeres. En Chile, las ECV son un problema de salud pública por su alta prevalencia; Constituye la primera causa de muerte con una tasa cercana al 30%, generando cerca de 30.0000 muertes anuales, con una incidencia que va en aumento [1] [2]. Una causa frecuente de ECV es la aterosclerosis, un proceso inflamatorio crónico que se desarrolla a lo largo de los años generalmente de manera asintomática, produciendo placas ateromatosas por acumulación de lípidos en las paredes de grandes vasos sanguíneos, lo que disminuye el diámetro del lumen arterial y engrosa la pared, obstruyendo vasos sanguíneos, lo que podría generar una isquemia [3] [4].

Las ECV poseen factores de riesgos, se pueden clasificar en modificables, como lo son: la mala alimentación, el hábito tabáquico, una baja actividad física, entre otros, y los no modificables, los cuales se asocian a la edad del individuo, sexo, historial familiar y factores genéticos. Siendo el último factor, transmisible a la descendencia, confiriendo un mayor riesgo de eventos cardiovasculares, al ser heredado. [5].

DISLIPIDEMIAS Y FACTORES DE RIESGO

El hígado es el órgano donde se realiza mayoritariamente la síntesis, secreción y eliminación de colesterol, por lo que es considerado el principal sitio de control de la homeostasis de lípidos [7]. A nivel de los hepatocitos se regula el transporte de lípidos hacia los tejidos extrahepáticos según sea el requerimiento. La distribución se realiza por medio de lipoproteínas de diferentes densidades, como lo son la VLDL, IDL y LDL. La Apo B, sintetizada en el retículo endoplasmático (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 [8]. La composición de VLDL varía según la cantidad de lípidos en la célula, modificando su tamaño sin aumentar el número de partículas liberadas [9]. Las VLDL son secretadas a circulación, donde los triglicéridos asociados son hidrolizados por acción de la lipoprotein lipasa (LPL), liberando ácidos grasos libres (FFAs), 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 LDLR, proceso similar a la remoción de los quilomicrones remanentes [10]. Los triglicéridos de las IDL que permanecen en circulación siguen siendo hidrolizados y las apolipoproteínas intercambiables presentes en IDL son traspasadas a otras lipoproteínas, proceso que finalmente genera las LDL.

Las LDL son complejos formados por lípidos y proteínas, altamente enriquecidas en colesterol y que presentan la partícula de Apo B100 en su estructura. El tamaño y densidad de las LDL depende del contenido de colesterol presente [10]. La LDL circulante interacciona por medio de Apo B100 con el receptor de LDL (LDLR), presente en la superficie de la mayoría de las células de mamíferos. El LDLR es sintetizado en el RE y es llevado a la superficie celular donde interacciona con Apo B100 y endocita el LDL [11]. El colesterol intracelular liberado es utilizado para distintos procesos celulares, también activa mecanismos regulatorios para mantener los niveles de colesterol requeridos por la célula. Entre estos mecanismos encontramos la inhibición de la actividad de la enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa) [12], la cual, es mediada por la proteína de unión al elemento regulador de esteroides (SREBP), suprimiendo el gen que transcribe a la HMG-CoA reductasa, permitiendo acelerar la degradación y como consecuencia la producción de LDL endógeno (**Figura 1**) [12]. Siendo esta disminución, capaz de inhibir la transcripción del LDLR, manteniendo los niveles de colesterol dentro de un rango fisiológico [12].

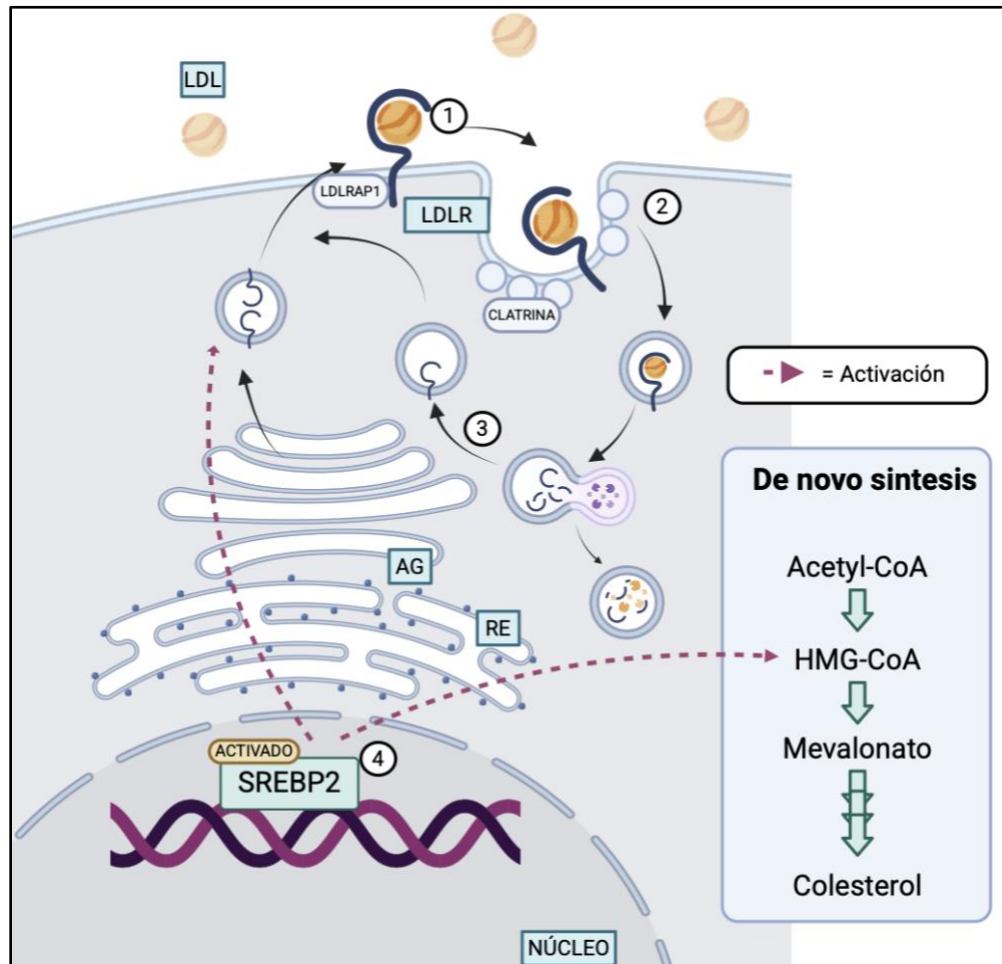


Figura 1: Homeostasis celular del colesterol. (1) El receptor de LDL (LDLR) en la superficie celular se une a las partículas de LDL, (2) formando un complejo que es internalizado mediante vesículas de clatrina, interaccionando con LDLRAP1. (3) Dentro de la célula, el colesterol LDL se libera y el LDLR se recicla (4). La regulación de la síntesis de colesterol depende de la proteína SREBP: cuando los niveles de colesterol son bajos, SREBP activa la producción de enzimas para sintetizar colesterol; cuando los niveles son altos, SREBP se inactiva, reduciendo la producción de colesterol. LDL: lipoproteína de baja densidad; LDLR: receptor de

LDL, AG: aparato de Golgi; RE: retículo endoplásmico; SREBP: proteína de unión a elementos reguladores de esteroides. Extraído y modificado de [53].

Los lípidos plasmáticos (triglicéridos, ésteres de colesterol, fosfolípidos y colesterol libre), son insolubles en medios acuosos como la sangre, de tal forma que deben ser empaquetados en partículas de lipoproteína para su transporte [13]. Cerca del 70% del colesterol está unido a lipoproteínas plasmáticas en forma de ésteres de colesterol. Cuando existen niveles anormales de estos lípidos plasmáticos en relación con valores de referencia, es cuando se está en presencia de una dislipidemia, la cual se caracteriza por aumentar significativamente el riesgo de enfermedad cardiovascular (ECV) por diferentes mecanismos relacionados: (1) Aterosclerosis, la cual corresponde a un proceso inflamatorio de tipo crónico que conlleva la acumulación progresiva de colesterol en el subendotelio, generando el engrosamiento de la capa íntima y media (**Figura 2**) [14]. Suele iniciar a temprana edad de forma subclínica y sin presentación de sintomatología aparente [15]. Esta patología puede ser generada por altos niveles de LDL, bajas concentraciones de c-HDL y/o triglicéridos elevados. (2) Oxidación e inflamación, lo cual proviene de altos niveles de LDL oxidada, las cuales son propensas a la endocitosis mediada por receptores de macrófagos en las paredes arteriales, generando células espumosas. Los altos niveles de triglicéridos también son un componente importante, ya que, favorece la producción de moléculas inflamatorias, aumentando la inflamación crónica en las arterias. (3) Disfunción endotelial, lo que puede ser provocado por niveles anormales de lipoproteínas, las cuales dañan las células

endoteliales que recubren las arterias, alterando su función vasodilatadora y aumentando la permeabilidad vascular [16].

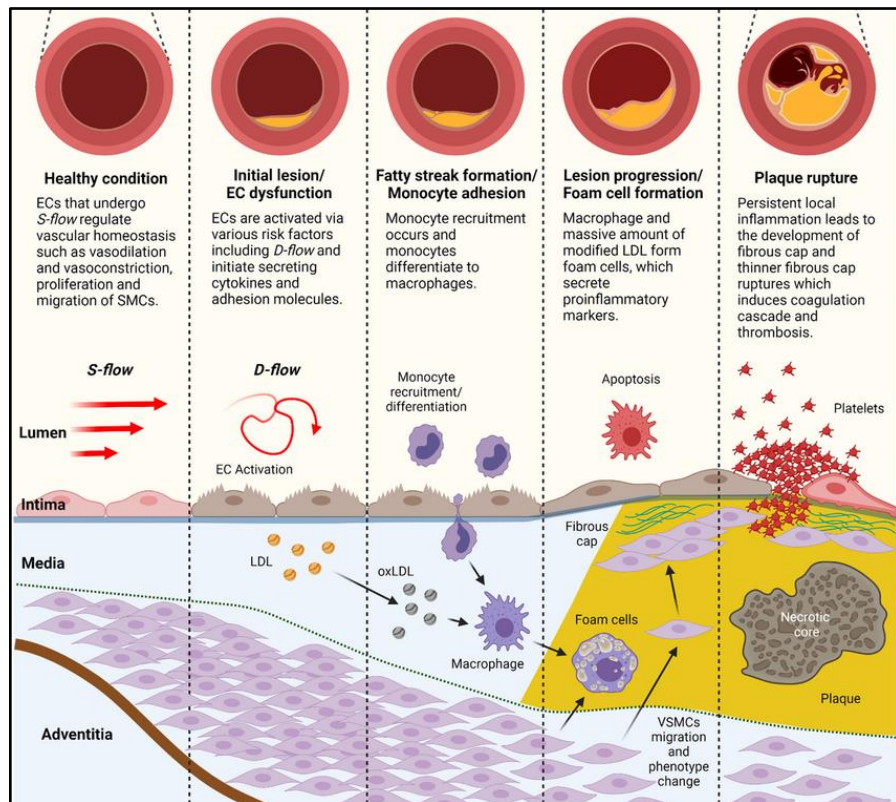


Figura 2: Progresión de la aterosclerosis. Al inicio de la disfunción endotelial, se activan células endoteliales (EC) por varios factores de riesgo cardiovascular, como la hipertensión, la hiperlipidemia, la diabetes, el tabaquismo y la alteración del flujo que se encuentra en los puntos de ramificación de las arterias. Las EC activadas expresan moléculas de adhesión y citoquinas que reclutan monocitos que se diferencian en macrófagos, los cuales endocitan LDL oxidadas, dando lugar a la

formación de células de espuma que secreta moléculas proinflamatorias. El estado de inflamación persistente conduce al desarrollo de una capa fibrosa y rupturas más delgadas de la capa fibrosa que inducen la cascada de coagulación y trombosis. Flujo D: flujo perturbado; EC: célula endotelial; LDL: lipoproteína de baja densidad; oxLDL: LDL oxidada; flujo S: flujo estable; VSMC: célula muscular lisa vascular [54].

LDL Y ATEROSCLEROSIS

Expresión de moléculas de adhesión y señales quimioatrayentes producto de disfunción endotelial, es lo que lleva a un aumento de permeabilidad hacia el espacio subendotelial de macromoléculas como LDL, la cual es retenida por la unión de apolipoproteína B (Apo B) a los proteoglicanos en la matriz extracelular [17]. En este lugar, la LDL es altamente susceptible a modificaciones, generándose una oxidación progresiva de la LDL nativa a LDL mínimamente oxidada y, finalmente, a LDL oxidada (LDLox) [18]. LDLox promueve el proceso aterosclerótico por una serie de mecanismos y su efecto es mediado por distintos receptores *scavenger*, los cuales poseen rol en la patogénesis de la enfermedad, cobrando mayor importancia en placas inestables. Los lípidos son almacenados como colesterol esterificado en vesículas citoplasmáticas, por acción de ACAT en el RE, la excesiva entrada y almacenamiento resulta en la formación de células de espuma y la sobrecarga del RE produce estrés celular lo que conduce a apoptosis, que en conjunto contribuye

al núcleo necrótico de la placa **[19, 20]**, aumentado el riesgo de padecer un evento cardiovascular **[21]**.

Elevadas concentraciones séricas de LDL, se presentan como un factor de riesgo de alta importancia en el área clínica, siendo este mismo 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 LDL están propuestas como objetivos terapéuticos, según el número y tipo de factores de riesgo presentes, teniendo siempre como meta disminuir la concentración de colesterol, con el fin de minimizar el riesgo de ECV del paciente **[22]**.

HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR COMO FACTOR DE RIESGO

La HF es una enfermedad de origen genético, asociado con mutaciones en genes que poseen relación directa con el metabolismo de los lípidos. Entre ellos, destaca el gen del LDLR, el cual en su forma patológica es traducido en receptores de membrana celular ausentes o disfuncionales **[6]**; el gen de Apo B, que puede presentar una alteración que modifica la unión al LDLR **[23]**; el gen de la PCSK9 (proteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9), el cual regula la densidad de LDLR en la superficie celular, a través de un aumento de la degradación lisosomal de este

receptor. La actividad aumentada de PCSK9 trae como consecuencia una disminución del número de receptores en la membrana plasmática [24].

La HF puede expresarse en su forma más agresiva, la homocigota (HFHo), donde se heredan los dos alelos mutados de una misma variante. La HFHo presenta una prevalencia estimada de 1 cada 450.000 personas, y se asocia a un proceso de aterosclerosis severa y diseminada en todos los grandes lechos arteriales: carotídeo, coronario, femoral e ilíaco, la cual suele ser clínicamente significativa a edades tempranas (cerca de los 20 años) [25, 26]. Por otro lado, se puede heredar la forma heterocigota de HF (HFHe), en la cual se hereda sólo un alelo mutado por parte de los progenitores. La HFHe presenta una prevalencia estimada de 1 cada 313 persona, y se caracteriza por poseer un 50% de los receptores normofuncionales, existiendo la posibilidad de crear una aterosclerosis severa antes de los 50 años si el fenotipo es muy agresivo [27, 28].

La OMS estima que globalmente existen alrededor de 14 a 34 millones de habitantes con HF, reconociendo que es una enfermedad no diagnosticada o subdiagnosticada en muchos países [29]. En Iberoamérica existe una población aproximadamente de 650 millones de habitantes, estimándose que existen más de 2,5 millones de personas portadoras de esta patología [30, 31]. En Chile, la prevalencia de HF no ha sido determinada por estudios epidemiológicos, sin embargo, reportes de distintas poblaciones de América latina [31, 32] han indicado que se puede estimar una prevalencia de 1 en 220 individuos, lo cual sugiere que existen alrededor de 80.000 casos de HFHe, más de 50 casos de HFHo en nuestro

país. Se sabe que la presencia de esta enfermedad favorece el desarrollo de ECV prematura que puede producir infartos a temprana edad, sin embargo, su diagnóstico y tratamiento precoz y oportuno produce una marcada reducción del riesgo cardiovascular, incluso llegando a ser similar al de la población general [33, 34, 30].

FISIOPATOLOGÍA DE HF

Cuando el LDL se une al receptor, se produce una invaginación de la membrana plasmática, la cual se cierra y fusiona, formando una vesícula intracelular recubierta de clatrina, transportando el complejo LDLR/LDL al interior de la célula. En el endosoma, y por medio de un cambio de pH, se produce un cambio conformacional en el receptor, liberando la molécula de LDL. Luego, el LDLR libre vuelve a la superficie celular, donde el pH neutro favorece el retorno a su conformación original, quedando disponible para recibir otra partícula de LDL (**Figura 3**) [35].

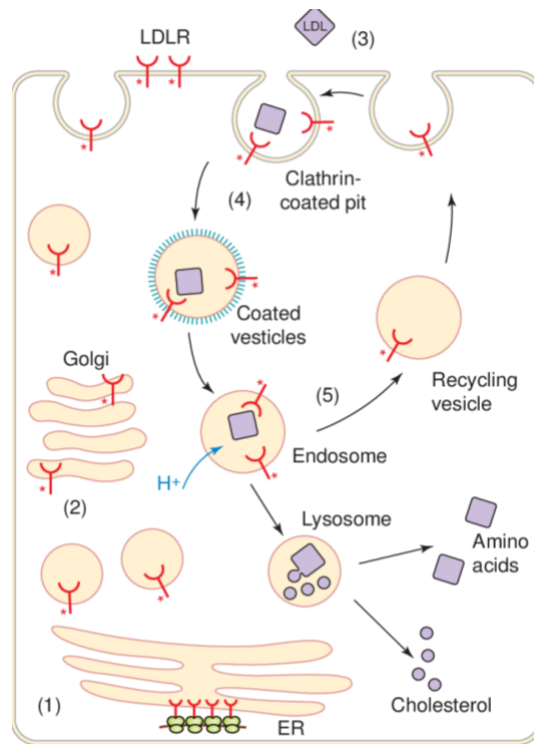


Figura 3: Transporte intracelular del LDLR. (1) Los receptores son sintetizados en los ribosomas y adoptan sus plegamientos en el retículo endoplasmático. (2) A continuación, los receptores se glicosilan en el Golgi y se transportan a la superficie celular. (3) En la membrana plasmática, los receptores se unen a los ligandos de lipoproteínas. (4) La internalización del complejo LDLR/LDL se produce a través de fosas recubiertas de clatrina, que en última instancia entregan complejos receptor-ligando a los endosomas. (5) Después de que se liberan las lipoproteínas unidas, los receptores se reciclan a la superficie celular [55].

Las mutaciones del LDLR asociadas a HF pueden afectar diferentes partes de la homeóstasis del LDL a nivel celular. Es por esto que, dada la diversa naturaleza de las mutaciones asociadas y la localización que poseen en la estructura del receptor, permitiendo que se agrupen en 5 tipos de clases de mutaciones (**Figura 4**): (a) Clase I, caracterizada por no poseer una síntesis detectable de LDLR. Esto dado por la producción de alelos nulos que impiden la producción de ARN mensajero (ARNm) o mutaciones que afectan la unión o grandes deleciones que generan un ARNm de tamaño anormal; (b) Clase II, donde existe un transporte defectuoso del LDLR entre el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, ya que las proteínas codificadas del LDLR no poseen la capacidad de adoptar la estructura tridimensional adecuada; (c) Clase 3, los alelos generan una unión defectuosa de LDL a LDLR, debido a una menor afinidad por la Apo B. Estas mutaciones afectan el correcto transporte del receptor a la membrana celular; (d) Clase IV, alelos producen un defecto en la internalización del complejo LDLR/LDL, codificando proteínas que se transportan correctamente a la membrana celular y se unen de forma normal a la LDL, pero son incapaces de localizarse en dominios de membrana de clatrina, no internalizando el LDL unido; (e) Clase V, afectan al reciclaje de LDLR, por la no disociación del complejo LDLR/LDL en el endosoma, lo que determina la degradación del complejo en el compartimiento lisosomal [36, 37].

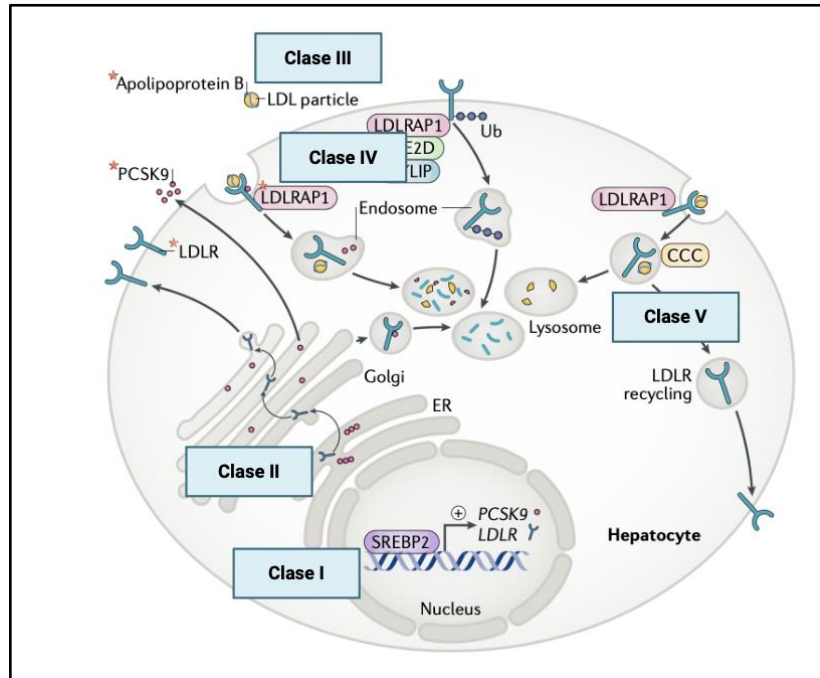


Figura 4: Clasificación de mutaciones del gen de LDLR asociadas a Hipercolesterolemia Familiar. (a) Clase I: Sin síntesis detectable del LDLR; (b) Clase II: Transporte defectuoso de LDLR hacia la membrana; (c) Clase 3: Unión deficiente a Apo B al receptor; (d) Clase IV: Defecto en la internalización LDL/LDLR, (e) Clase V: Defecto en reciclaje del LDLR. Extraído y modificado desde [36].

Las variantes genéticas en el LDLR inducen un desbalance en el catabolismo del colesterol, el cual está dado por el cambio en la estructura del LDLR funcionalidad, el cual impacta su funcionalidad, resultando en una hipercolesterolemia. Este exceso de depósito subendotelial de LDL, favorece por la permeabilidad en conjunto

con otros agentes lesivos (factores de riesgos), desencadenando una aterogénesis acelerada [38]. El LDL es susceptible a oxidación en circulación sanguínea y tejido, por medio de mecanismos enzimáticos y no enzimáticos. Cuando esto sucede se genera un proceso inflamatorio que provoca el reclutamiento de citoquinas proinflamatorias y la activación de macrófagos, generando activación endotelial [39, 40]. La disfunción endotelial favorece la infiltración y reclutamiento celular al espacio subendotelial, dando a lugar a la diferenciación de células monocitos a macrófagos, las cuales fagocitan LDL oxidado. Este proceso conduce finalmente a la transformación de macrófagos a células espumosas, las cuales constituyen la base fisiopatológica de la formación de la placa ateromatosa [41].

DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE HF

La HF se suele sospechar cuando el paciente posee altos niveles de LDL (mayor a 190 mg/dL), antecedentes familiares de dislipidemia o depósitos de colesterol a la forma de xantomas y/o arco corneal [33]. Para establecer el diagnóstico clínico de HF en un caso índice, existen 3 herramientas diferentes: el programa MedPed, Simon Broome británico y los criterios de la Red de Clínicas de Lípidos Holandesa (RCLH) (**Tabla 1**), de los cuales los últimos dos han sido validados por diagnóstico genético [33].

Los países que cuentan con programas de pesquisa para esta enfermedad utilizan RCLH para el diagnóstico clínico y/o genético de HF, el cual considera un sistema de puntuación que incluye información sobre el historial familiar del paciente, antecedentes personales, examen físico y análisis genético. En base a estos criterios se otorga el concepto de diagnóstico posible, probable o de certeza [42]. Sin embargo, la identificación de una mutación reportada como patogénica es el “*gold standard*” para el diagnóstico definitivo y certero de HF [27].

Tabla 1: Criterios de la red de clínicas de lípidos holandesas para el diagnóstico de Hipercolesterolemia Familiar

Historial Familiar	
Familiar de primer grado con enfermedad coronaria prematura (hombre < 55 años y mujer < 60 años) y/o	1
Familiar de primer grado con niveles de cLDL > 210 mg/dL Familiar de primer grado con xantomas tendinosos y/o arco corneal < 45 años Familiar < 18 años con cLDL ≥ 150 mg/dL	2
Antecedentes personales	
Paciente con enfermedad coronaria prematura (hombre < 55 años y mujer < 60 años)	2
Paciente con enfermedad cerebrovascular o arterial periférica prematura (hombre < 55 años y mujer < 60 años)	1
Examen físico	
Xantomas tendinosos	6
Arco corneal < 45 años	4
Análisis de laboratorio	
cLDL ≥ 330 mg/dL	8

cLDL 250-329 mg/dL	5
cLDL 190-249 mg/dL	3
cLDL 155-189 mg/dL	1
Análisis genético	
Mutación funcional en el gen del LDLR, APOB o PCSK9	8

GENÉTICA Y DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE HF

La HF está asociada en un menor porcentaje a mutaciones que codifican al gen de Apo B y la pro-proteína PCSK9, y más del 80% de los casos están asociados a mutaciones presentes en el gen del LDLR [43]. Con los avances de la secuenciación masiva, los genes de interés pueden ser secuenciados a un menor precio comparado con años atrás, para identificar mutaciones asociadas a la enfermedad genética. Sin embargo, uno de los principales problemas de esta tecnología es el descubrimiento de una gran cantidad de variantes sin información acerca de su patogenicidad [6]. Para sobrellevar este problema habitual en el diagnóstico de enfermedades genéticas, el Colegio Americano de Genética Médica (ACGM) propuso un algoritmo de puntuación para clasificar todas las variantes, con el fin de representar el efecto de la mutación por medio del término patogenicidad [44]. Las guías recomiendan la terminología estándar para cinco tipos de variantes en trastornos monogénicos: patogénico, probablemente patogénico, variante de significado incierto, probablemente benigno y benigno [45].

VARIANTES DE SIGNIFICANCIA INCIERTA Y CRITERIOS DE ACMG

Hasta el año 2021, se descubrieron cerca de 3.700 mutaciones del LDLR asociadas a HF [46]. Sin embargo, menos del 15% posee evidencia funcional que sustente la patogenicidad en ellas, ya que existen contradicciones al respecto o no poseen datos sólidos, lo cual representa un problema en el diagnóstico de HF [47]. Por lo tanto, determinar la patogenicidad de las variantes de HF es crucial para establecer el diagnóstico genético definitivo de HF. Es por ello que se utilizan diversos enfoques que incluyen algoritmos de predicción realizados en computadora (análisis *in silico*) y evidencia experimental *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*, para obtener información sobre los efectos que poseen estas variantes, siendo la evidencia experimental utilizada como método directo para determinar el efecto de la variante en la función biológica de la proteína [48]. En este contexto, se ha reportado una serie de aproximaciones experimentales para evaluar la actividad del LDLR, utilizando una combinación de diferentes técnicas (**Figura 5**): *western blot*, citometría de flujo e inmunocitoquímica, las cuales en conjunto permiten determinar el tipo de variante y ayudan a la comprensión del fenotipo que presentan algunos pacientes [48].

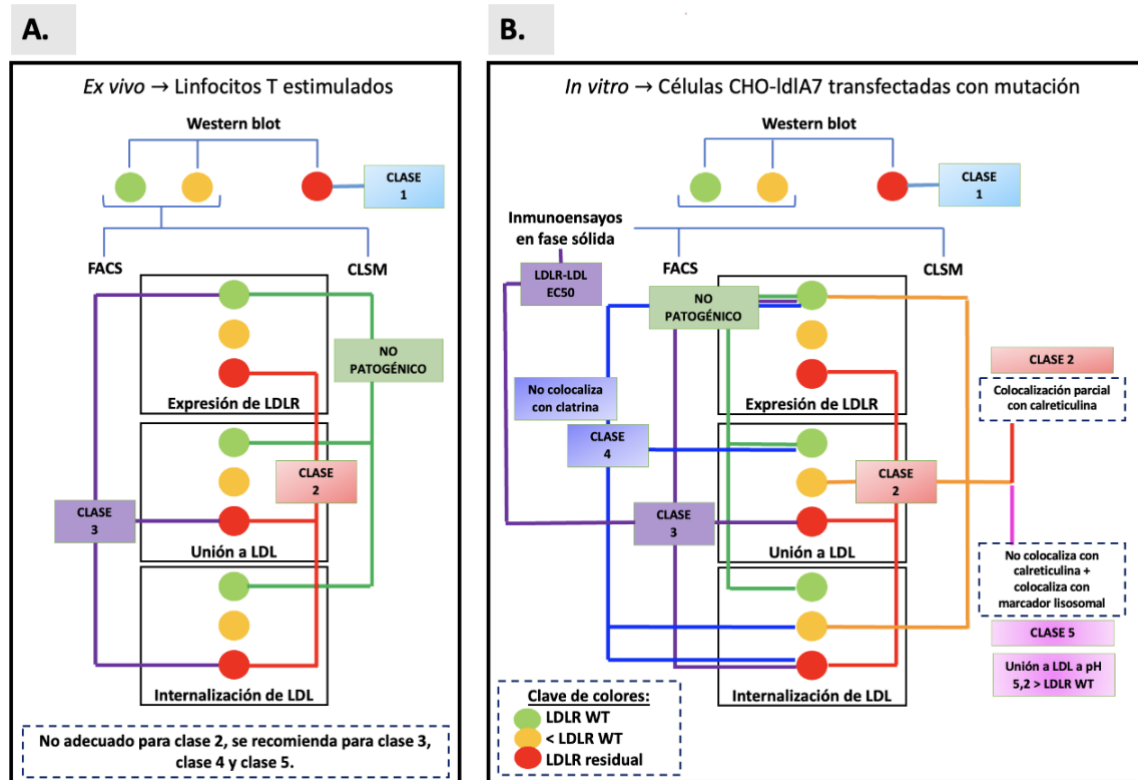


Figura 5: Diagrama de flujo de métodos de biología celular y molecular para caracterizar funcionalmente mutaciones asociadas al LDLR. (A) Ensayos funcionales *ex vivo* en células linfoцитos T estimulados para identificar variantes asociadas al LDLR, de clase 1, clase 2, clase 3 y variantes no patogénicas. (B) Ensayos funcionales *in vitro* en línea celular CHO-IIdA7 transfectada con vector que contiene la variante asociadas al LDLR, de clase 1, clase 2, clase 3, clase 4 y case 5. FACS: *Fluorescent Activated Cell Sorter*; CLSM: *Confocal laser scanning microscopy*; LDLR: Receptor de LDL; WT: *wild type*; CHO-IIdA7: Línea celular IIdA7 de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en LDLR. Extraído y modificado de [40].

HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR EN CHILE

En nuestro país, el primer caso de HF diagnosticado genéticamente, a través de la utilización de un *micro-array* de ADN, fue un paciente de origen polaco y residente en Chile, quien consultó por primera vez a los 46 años por un cuadro de Hipercolesterolemia en 1975, la cual fue atribuida a una mutación de clase II de tipo heterocigota (1705 +1G>A) en el gen del LDLR. Este paciente presentó niveles de colesterol total de 524 mg/dL y triglicéridos de 116 mg/dL [57]. En sus antecedentes familiares destacaba que su madre y abuela materna padecieron de hipercolesterolemia aislada y cardiopatía coronaria precoz (manifestación clínica antes de los 65 años). No fumaba ni bebía alcohol, tenía una vida activa, aunque sin actividad física programada y presentaba un consumo elevado de grasas saturadas. Luego de años de seguimiento del caso, el tratamiento final fue un hipolipemiante combinado con simvastatina y ezetimiba, lo que le permitió alcanzar concentraciones de LDL < 200 mg/dL, después de 30 años de evolución desde el diagnóstico clínico de su enfermedad [57]. Sin embargo en la actualidad, no existen programas establecidos para la detección de HF en nuestro país. En estos últimos años se han descrito en un conjunto de países que son parte de la Red Iberoamericana, variantes genéticas en personas portadoras de HF, permitiendo descubrir que existen mutaciones comunes entre países.

En un estudio de identificación de variantes genéticas asociadas a HF, donde participaron niños y adolescentes de la Región del Biobío, se identificaron

principalmente mutaciones asociadas al gen del LDLR y ApoE [49], siendo la alteración genética más frecuente la duplicación de exones 13-15 en el LDLR (46%), de la cual existe poca información respecto a su efecto estructural y funcional; la variante patogénica p.Ser235Cys en el LDLR (23,1%), ubicada en el dominio EGF-1 involucrada en la liberación del receptor dentro del endosoma y el reciclaje de LDLR; y la variante de significado incierto p.Asp47Asn del LDLR (30,8%), la cual es una mutación ubicada en la primera región abundante en cisteína del dominio N-terminal y estaría involucrada en el sitio de unión a ligando del receptor [50].

VARIANTE c.139G>A, p.Asp47Asn DEL LDLR

La variante c.139G>A, p.Asp47Asn (D47N) del LDLR fue primeramente descrita en la población japonesa [51], se encuentra en la primera región abundante en cisteínas (LA1) en el dominio N-terminal en la zona de unión a ligando del LDLR (**Figura 6**). Es una variante que está incluida en la base de datos ClinVar por diferentes autores y hasta el momento es clasificada de significancia incierta por la mayoría de ellos [52]. Esta es una variante que no posee evidencia de haber sido reportada anteriormente en la población Latinoamericana [27]; Sin embargo, en el año 2021 fue notificada como la segunda variante más frecuente en un estudio de pesquisa de HF en Chile [49].

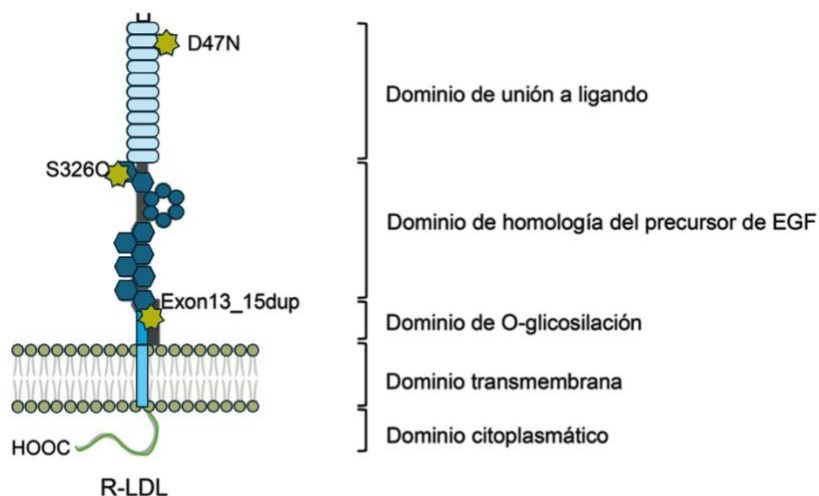


Figura 6: Variantes más frecuentes del LDLR asociadas a HF en la región del Biobío. Exón13_15dup: mutación duplicación de exones del 13-15; S236C: variante p.Ser236Cys; D47N: variante p.Asp47Asn; EGF: Factor de crecimiento epidérmico [49].

En un estudio publicado por Benito-Vicente y colaboradores en el año 2018 se investigó la capacidad de unión y captación de LDL por la variante D47N a través de estudios *in vitro* de transfección de un vector de expresión del LDLR mutado en células CHO-IIdA7. En este modelo se determinó que la unión y captación de LDL por el receptor mutado era similar al LDLR en su forma *wild-type*, por lo que llegaron a la conclusión de que se trataba de una variante de tipo no patogénica. Sin embargo, en una publicación del año 2021 se estudió el fenotipo de la variante, donde niños y adolescentes portadores presentaron valores significativamente altos de colesterol total y LDL en sangre frente a los sujetos *wild-type*. Utilizando un análisis predictivo informático de esta variante, se observó una disminución de la

capacidad de unión y de afinidad de este receptor al ligando Apo B100 y ApoE, sugiriendo que esta mutación es probablemente patogénica o patogénica [50]. Esta variante, al poseer estudios con distintas conclusiones, se considera de patogenicidad incierta (VUS).

Por lo tanto, el presente proyecto propone determinar los niveles de expresión de la variante D47N del LDLR en células humanas obtenidas desde pacientes portadores, con el fin de conocer su comportamiento *ex vivo*, para aportar información sobre su patogenicidad.

PROBLEMA

La Hipercolesterolemia Familiar (HF) es el trastorno genético más común asociado con la enfermedad coronaria prematura. En la actualidad, la identificación de variantes patogénicas permite diagnóstico clínico certero. Sin embargo, la mayoría de las variantes poseen una patogenicidad incierta; como es el caso de la variante D47N-LDLR, razón por la cual, la asignación de la patogenicidad de esta variante sigue siendo un desafío para la práctica de la genética y el diagnóstico clínico de HF. De tal forma, identificar mecanismos celulares y moleculares relacionados a la fisiopatología de esta variante en un modelo celular de macrófagos, con la implementación de ensayos *ex vivo*, aportan como una evidencia para su reclasificación. Además, determinar la correlación del fenotipo clínico de la variante D47N-LDLR con características funcionales, puede contribuir a reclasificar esta variante de significado incierto, y también aporta a un diagnóstico genético definitivo y certero de pacientes portadores de esta variante.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cómo la variante D47N en el receptor de LDL afecta la internalización del colesterol LDL, la expresión del receptor y la patogenicidad de la variante?

HIPÓTESIS

Los niveles elevados de colesterol LDL en el plasma de pacientes portadores de la variante D47N es producida por una internalización deficiente de LDL, lo que conlleva a un aumento compensatorio en la expresión del receptor, clasificando a esta variante como una mutación de tipo patogénica de clase 3.

OBJETIVO

Caracterizar funcionalmente el receptor de LDL en monocitos diferenciados a macrófagos y su correlación con los niveles de colesterol LDL en plasma de pacientes portadores de la variante D47N de Hipercolesterolemia Familiar.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar la expresión y localización del receptor de LDL en monocitos diferenciados a macrófagos en pacientes portadores de la variante D47N del LDLR.
- 2) Establecer la internalización de las LDL mediada por el receptor de LDL en monocitos diferenciados a macrófagos en pacientes portadores de la variante D47N de Hipercolesterolemia Familiar.
- 3) Determinar la correlación entre las características funcionales del LDLR que posee la variante D47N y los niveles de colesterol LDL en plasma de personas portadoras Hipercolesterolemia Familiar.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Aspectos bioéticos y de bioseguridad

Los aspectos bioéticos de este trabajo se alinearon con la Declaración de Helsinki, que regula la investigación con seres humanos, y por la Ley Chilena n°20.120. El proyecto de investigación ejecutado está revisado y aprobado por el Comité Ético-Científico del Servicio de Salud Concepción N° SEC-SSC: 22-03-14 (**Anexo1**).

En lo que compete a las normas de bioseguridad, la manipulación de muestras de sangre se realizó de acuerdo con los estándares del Instituto de Salud Pública, y la disposición de los residuos biológicos, según lo determinado por MATPEL (Plan de Manejo de Sustancias y Residuos Peligrosos) perteneciente a la Universidad de Concepción (**Anexo 2**).

2. Consentimiento y asentimiento informado

Este estudio contempló el reclutamiento de personas que cumplen los criterios de inclusión y ninguno de los criterios de exclusión detallados en las tablas 2 y 3, previa firma de consentimiento informado y/o asentimiento informado según corresponda. El grupo de estudio correspondió a niños, niñas, adolescentes y sus familiares, que fueron parte del proyecto VRID-multidisciplinario 219.072.041-M y que presentaron un puntaje de diagnóstico probable o de certeza de HF, según los criterios de RCLH.

También fueron incluidos como población control de este estudio personas normolipémicas no portadoras de HF, lo cual fue confirmado por medio de diagnóstico molecular.

Los grupos de estudio y control fueron reclutados en el laboratorio clínico Diagnomed, 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 los menores y/o autorización de los jóvenes mayores de 18 años, con firma del consentimiento informado (Anexos 3, 4, 5 y 6).

Tabla 2. Criterios de inclusión y exclusión para la selección de la población de estudio. Modificada de [25].

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
Ser parte del proyecto VRID-multidisciplinario 219.072.041-M	Negación de firma de consentimiento o asentimiento informado
Ser portador de la variante D47N asociado a HF	Poseer mutaciones compuestas o dobles asociadas a HF
	No poseer estudios genéticos

Tabla 3. Criterios de inclusión y exclusión para selección de población control.

Modificada de [25].

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
No ser portador de HF	Negación de firma de consentimiento o asentimiento informado
Poseer perfil lipídico dentro de los rangos de referencia	No poseer estudios genéticos

3. Aislamiento de células desde sangre periférica y cultivo celular

3.1 Purificación de monocitos de sangre periférica

3.1.1 Obtención de muestras

Para este estudio, el número de muestras se seleccionó por conveniencia. Personas no portadoras de HF y los portadores de la variante D47N del gen LDLR fueron reclutados desde el proyecto VRID-MUL 219.072.041-M. Se contactó a aquellos que cumplieron con los criterios de inclusión del estudio, explicándoles el propósito y solicitando su consentimiento informado. Los participantes que aceptaron fueron incluidos en la investigación. Se recopiló información sobre su edad, sexo y

patologías asociadas, y se obtuvo una muestra de 20 mL de sangre venosa para realizar cultivos celulares.

3.1.2 Obtención de células mononucleares de sangre periférica y purificación de CD14+

20 mL de sangre venosa fue diluida 1:1 con tampón fosfato salino PBS 10 mM (NaCl (137 mM), KCl (2,7 mM), Na₂HPO₄ (8,1 mM), KH₂PO₄ (1,5 mM) a pH 7,4). La capa de células mononucleares de sangre periférica (PMBC) fue obtenida adicionando el volumen de sangre diluida al medio separador (Corning®) en relación 2:1, y centrifugación a 200 x g por 20 minutos. Posteriormente, las células fueron contadas e incubadas por 5 minutos a 4°C con 80 µL de buffer CD14⁺ MicroBeads (PBS 10 mM, pH 7,2, BSA 0,5%p/v y EDTA 2 mM) por cada 10⁷ células . Transcurrido el tiempo, las células fueron lavadas con buffer CD14⁺ MicroBeads y centrifugadas a 300 x g por 10 minutos. El *pellet* obtenido fue re-suspendido en buffer CD14⁺ *MicroBeads* y pasado por columnas MACS, según instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec®), obteniendo así un *pool* de células CD14⁺.

3.2 Cultivo y diferenciación de células CD14+

Las células CD14⁺ fueron cultivadas en diferentes placas de cultivo, dependiendo el ensayo, en condiciones estándar de 37 °C y 5% CO₂ por 24 hrs, en medio de cultivo

RPMI 1640 (Gibco) suplementado al 10% v/v de suero bovino fetal (SBF), penicilina-estreptomicina y glutamina, ambas al 1% v/v.

Para la diferenciación celular, las células CD14⁺ fueron incubadas por 7 días en medio de cultivo suplementado con 25 µg/mL de factor estimulador de colonias granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (Sigma®), el cual se añadió al segundo, cuarto y sexto día de cultivo. La diferenciación celular fue evaluada a través de cambios en la morfología celular, adherencia a la placa de cultivo y los marcadores celular CD14⁺/CD16⁺ por citometría de flujo.

4. Citometría de flujo

4.1 Cuantificación del LDLR

La cuantificación del LDLR en la membrana celular se realizó mediante la técnica de citometría de flujo. Para esto, 500.000 células diferenciadas a macrófagos las cuales fueron soltadas de la placa celular por medio de la adición de la solución Gibco™ Versene (Fisher Scientific®). Los macrófagos fueron re-suspendidos en 200 µL de PBS 10 mM e incubados con 0,002 mg/mL de anticuerpo IgG de ratón anti-LDLR humano unido a BV421 (BD Biosciences®) durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Luego, las células fueron lavadas con PBS 10 mM, y fijadas con IC *Fixation Buffer* 1X (Invitrogen®). Finalmente las células fueron re-suspendidas en 300 µL de PBS 10 mM, y analizadas por citometría de flujo.

Como control positivo para el análisis, se utilizó una gota de *beads* (Miltenyi Biotec®) con 0,002 mg/mL del anticuerpo LDLR-BV421. Como marcador de linaje de macrófagos, se utilizó 4 mg/mL de anticuerpo IgG de ratón anti CD14⁺ humano APC/Cyanine7 (Biolegend®) y 2 mg/dL el anticuerpo IgG de ratón anti CD16⁺ PE/Cyanine7 (Biolegend®) en las diferentes muestras de macrófagos. Como control interno se utilizaron en cada lectura muestras de monocitos obtenidos de sangre periférica y diferenciados a macrófagos de un mismo voluntario *wild-type*.

Controles y muestras fueron analizados utilizando el equipo de citometría de flujo FORTESSA-X20 (Becton Dickinson, BD®). Para la medición de la intensidad de fluorescencia se tomaron en cuenta 10.000 eventos por muestra y los resultados fueron analizados a través del programa FlowJo (BD Biosciences). La cuantificación del LDLR de pacientes portadores de la variante D47N heterocigotos y personas *wild-type* fueron comparadas por medio de análisis estadísticos señalados posteriormente.

5. Inmunocitoquímica

5.1 Localización subcelular del LDLR

Las células CD14⁺, fueron sembradas en vidrios circulares y estimuladas por 7 días con GM-CSF tal como señalado anteriormente. Una vez transcurrida la diferenciación, los macrófagos fueron fijados con *Fixative solution* (4% formaldehído preparado en PBS) (Invitrogen[®]) por 15 minutos, permeabilizados con tampón Tris-PO₄ (Na₂HPO₄ 0,085 M, KH₂PO₄ 0,035 M, NaCl 1,2 M, Trisaminometano (HOCH₂)₃CNH₂ 0,1 M) – Tritón 0,5% v/v durante 10 minutos a temperatura ambiente y lavadas con Tris-PO₄. Posteriormente, para la detección del LDLR, las células fueron incubadas 2,0 µg/mL con el anticuerpo policlonal IgG de cabra anti-LDLR humano (R&D Systems[®]) durante toda la noche a 4°C en una cámara húmeda. Luego, las células fueron lavadas e incubadas con una dilución de 1:150 de anticuerpo 2° monoclonal IgG de bovino anti IgG de cabra (conjugado con FITC) (Jackson ImmunoResearch[®]), durante 2-3 horas a temperatura ambiente en oscuridad. Para identificar la localización del LDLR se utilizaron diferentes anticuerpos dirigidos a estructuras subcelulares: (a) retículo endoplasmático, para el cual fue utilizado 20 µg/mL del anticuerpo monoclonal de ratón IgG anti-calreticulina humana (R&D systems[®]) con una dilución de 1:150 del anticuerpo 2° monoclonal de alpaca anti IgG-ratón (Conjugado con CY5) (Jackson ImmunoResearch[®]); (b) vesículas de endocitosis cubiertas de clatrina con una dilución de 1:50 del anticuerpo monoclonal de ratón IgG anti-clatrina humana (R&D systems[®]) con una dilución de 1:1000 del anticuerpo 2° monoclonal de alpaca anti-IgG ratón (Jackson ImmunoResearch[®]) y (c) lisosoma, con 30 µg/mL de anticuerpo monoclonal IgG de ratón anti-Lamp1 humano (R&D systems[®]) con una dilución de 1:50 del anticuerpo 2° monoclonal de alpaca anti-IgG ratón (Jackson

ImmunoResearch®). Los marcadores subcelulares siguieron el mismo procedimiento de incubación que lo descrito para el LDLR. Como control negativo, fue utilizado tampón Tris-PO₄ como reemplazo de anticuerpo primario, y posteriormente fue incubado con el respectivo anticuerpo secundario.

Finalmente, una vez finalizado el marcaje con los diferentes anticuerpos, las células fueron lavadas con tampón Tris-PO₄, adheridas al portaobjetos con medio de montaje (Novus Biologicals®) y visualizadas por microscopía confocal en el microscopio multifotón espectral LSM 780 Zeiss.

El análisis de datos fue realizado por medio del *software* Zeiss Zen Lite e ImageJ, a través de la deconvolución de imágenes. La cuantificación de la colocación de marcadores subcelulares junto con el marcador del LDLR fue realizada a través del *plugin* JACOV en ImageJ. La comparación entre ambos grupos de estudios; portadores de la variante D47N heterocigotos y homocigotos, frente a personas *wild-type* fueron por medio de análisis estadísticos, tal como se menciona más adelante.

6. Transporte de LDL

6.1 Obtención de LDL

6.1.1 Reclutamiento de donantes

La purificación de LDL fue realizada a través de la donación de sangre de personas sanas, no fumadores, normopeso, normolipidémicos, que hagan deporte regularmente, con previa firma del consentimiento informado. La donación contempló un ayuno por 12 hrs y se les extrajo aproximadamente 50 mL de sangre venosa a cada donante en tubos con anticoagulante EDTA 10X (10 mg/mL).

6.1.2 Obtención de LDL

Los 50 mL sangre venosa obtenida de los donantes fue centrifugada a 1000 x g por 20 minutos, y al *pool* de plasma obtenido se le agregó Penicilina-Estreptomicina 50 U/mL (Genexpress®). Las condiciones de centrifugación fueron 146.682 x g por 20 hrs a 15°C. Finalizando el centrifugado, anillo superior fue eliminado y al infranadante se le agregó bromuro de potasio (KBr) para ajustar la densidad a 1,063 g/mL, según la **ecuación 1**:

$$g \text{ KBr} = \frac{(\rho_f - \rho_i) * V}{1 - (\rho_f * 0,315)}$$

ρ_i = densidad inicial del infranadante

ρ_f = densidad final del infranadante

V = volumen obtenido del infranadante

El infranadante ajustado con KBr fue centrifugado bajo las mismas condiciones descritas previamente, recuperando el anillo superior y parte del infranadante. Las

fracciones colectadas fueron dialisadas en PBS 10 mM por 48 hrs en oscuridad a 4°C en una membrana con poro de 10 kDa y, posteriormente, cuantificadas usando el kit Pierce™ BCA Protein Assay (ThermoFisher®). A las LDL obtenidas fue adicionado el antioxidante butilhidroxitolueno (BHT) 4,5 mM y se almacenó en refrigeración, en oscuridad.

Para la tinción con FITC, FluoReporter® FITC Protein Labeling Kit (ThermoFisher®) fue utilizado siguiendo las instrucciones del fabricante, con posterior diálisis intensiva por 48 horas en PBS 10 mM a 4°C en oscuridad.

6.2 Ensayos de transporte

200.000 células CD14⁺ previamente sembradas en vidrios estériles en placas de 24 pocillos fueron incubadas según el punto 5.1 por 4 horas en medio de cultivo delipidado, suplementado al 10% v/v de suero deficiente en lipoproteínas de plasma humano (Sigma®), penicilina-estreptomicina y glutamina, ambas al 1% v/v. Luego, las células fueron incubadas con 2,0 µg/mL de LDL-FITC a tiempos 0, 15, 30 y 60 min. Posteriormente, y previos lavados con PBS 10 mM, la membrana celular fue marcada con CF594®WGA (Biotium®) durante 10 minutos a temperatura ambiente y las células fueron fijadas con *IC Fixation Buffer 1X* (Invitrogen®). Finalmente, las células fueron permeabilizadas con Tris-PO₄ -Tritón X100 0,5 % v/v, los núcleos se tiñeron con DAPI (ThermoFisher®) y adheridas al portaobjetos con medio de montaje (Novus Biologicals®).

Los resultados fueron visualizados por microscopía confocal en el microscopio multifotón espectral LSM 780 Zeiss. El análisis de datos se realizó con los *software* ImageJ y Zeiss Zen Lite.

6.3 Ensayos de competencia

Para los ensayos de competencia, las células CD14⁺ previamente fueron sembradas e incubadas en las condiciones mencionadas en el **6.2**, utilizando distintos tiempos de incorporación (15, 30 y 60 minutos) con proporciones 1:2 y 1:4 de LDL-FITC / LDL sin marcar. Luego, todas las células fueron fijadas como mencionado en el punto **6.2** y analizadas en el microscopio multifotón espectral LSM 780 Zeiss. El análisis de datos fue realizado con los *software* ImageJ y Zeiss Zen Lite.

7. Análisis estadístico

El análisis estadístico utilizando para comparar ambos grupos de estudio en los ensayos celulares; pacientes heterocigotos portadores de la variante D47N y personas *wild-type*, fue la prueba Test-t Student para datos no pareados en experimentos de una variable, con intervalo del 95% ($p < 0,05$), en el *software* estadístico GraphPad PRISM.

8. Análisis de correlación de características funcionales del LDLR-D47N y niveles de LDL

Resultados del perfil lipídico de pacientes (HFHe y HFHo) y controles *wild-type*, localización celular por inmunocitoquímica y niveles de expresión de LDLR por citometría de flujo, fueron utilizados para realizar un análisis estadístico inferencial de la población reclutada, permitiendo un análisis descriptivo univariado. Las variables categóricas fueron representadas mediante la frecuencia y el porcentaje y las variables numéricas a través de estadísticos de tendencia central y dispersión (media, mediana, desviación estándar, percentiles). Para determinar la relación entre variables numéricas se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson (Spearman) y, en el caso de variables categóricas, fue aplicada la prueba de chi-cuadrado (prueba exacta de Fisher). Posteriormente, con el objetivo de detectar relaciones entre variables, fue realizado un análisis descriptivo multivariado a través de análisis de componentes principales y análisis de conglomerados en el software Infostat.

RESULTADOS

1. Marcadores de linaje macrófago

Con el objetivo de verificar el linaje de las células CD14⁺ aisladas desde sangre periférica y diferenciadas a macrófago M0 tipo 1 (intermedio), la técnica de citometría de flujo fue utilizada para evaluar el tamaño (FCS), granulosidad celular (SSC) y presencia de marcadores CD14⁺ y CD16⁺ (**Figura 7**), observándose que las células posterior a la estimulación, aumentan su tamaño y granularidad reflejado en un desplazamiento de la señal hacia la derecha y hacia arriba en el detector de dispersión frontal (FCS) y de dispersión lateral (SSC), respectivamente. También se apreció posterior a la purificación y estimulación, que existe solo un tipo celular (**Figura 7-A**). Al analizar la expresión de los marcadores CD14 y CD16, se observó que un 93.4% de las células estimuladas presentaron el fenotipo de células diferenciadas, frente a un 4.40% y 4.11% de expresión celular en células CD14⁺ obtenidas y PBMC aisladas de sangre periférica, respectivamente (**Figura 7-D**). Estos datos sugieren que el protocolo de cultivo celular, seguido de estimulación con GM-CSF, promueve una conversión eficiente y uniforme de monocitos CD14⁺ a un fenotipo de macrófagos intermedios CD14⁺CD16⁺.

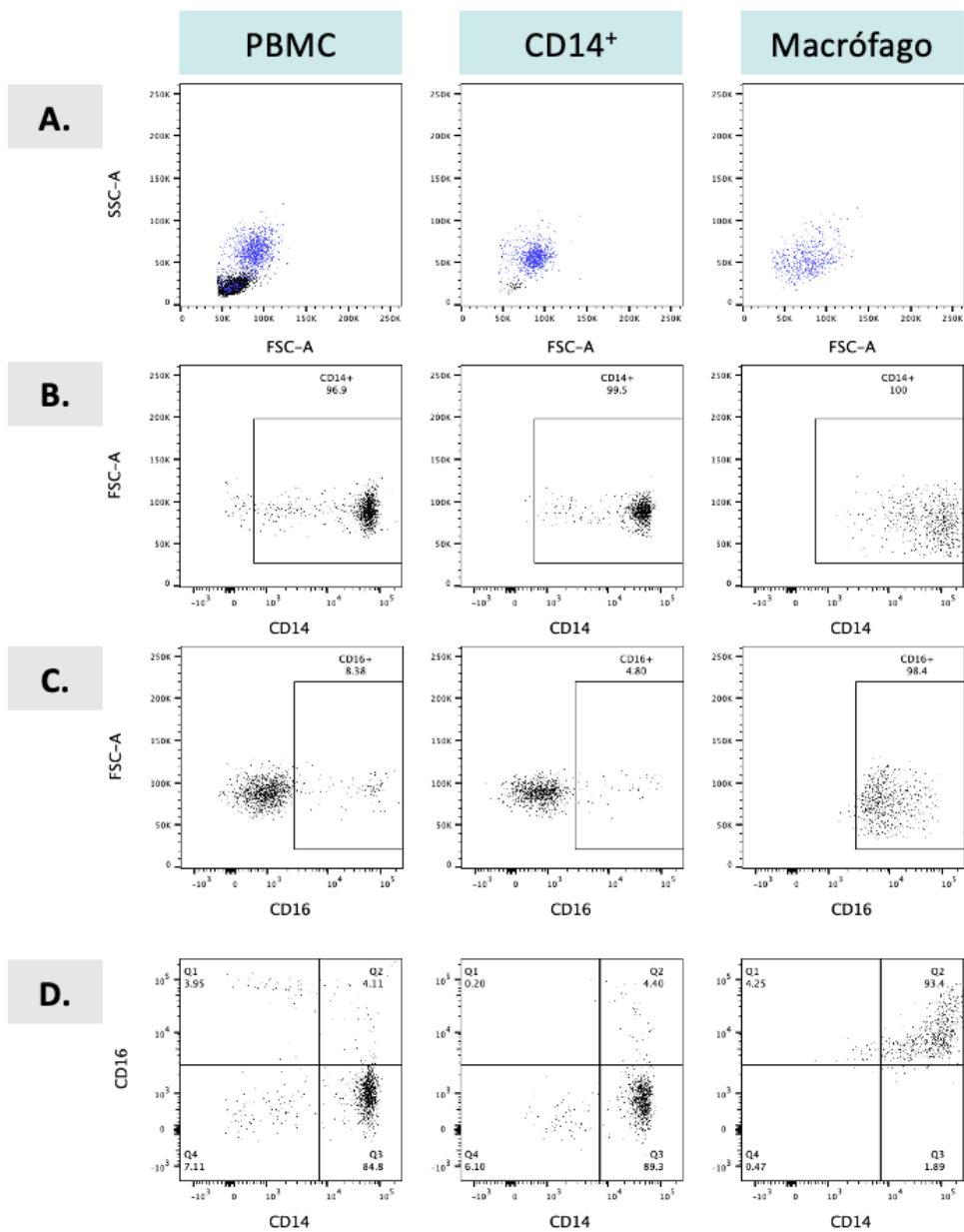


Figura 7. Determinación de linaje celular macrófagos intermedios. *Dot-plot* correspondiente al fenotipo de las muestras CD14⁺ aisladas de sangre periférica y posteriormente diferenciadas vía estimulación con GM-CSF. (A) De izquierda a derecha: *Dot-plot* representativo de dispersión frontal (FCS) y dispersión lateral

(SSC) de células PBMC; células CD14⁺ aisladas de sangre periférica; macrófagos intermedios obtenidos por estimulación con GM-CSF en células CD14⁺. En azul se observa la célula de interés y en negro otras células que pueden ser obtenidas desde sangre periférica. (B) *Dot-plot* representativo de dispersión frontal (FCS) y marcador CD14⁺ en los diferentes tipos celulares: PBMC, células CD14⁺ y macrófagos. (C) *Dot-plot* representativo de dispersión frontal (FCS) y marcador CD16⁺ en los diferentes tipos celulares: PBMC, células CD14⁺ y macrófagos. (D) *Dot-plot* representativo de marcadores CD14⁺ y CD16⁺ en los diferentes tipos celulares: PBMC, células CD14⁺ y macrófagos. GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos; PBMC: célula mononuclear de sangre periférica.

2. Expresión del LDLR

Con el objetivo de evaluar si la variante D47N del LDLR produce una modificación en los niveles de expresión del receptor en la superficie celular, la técnica de citometría de flujo fue estandarizada utilizando como control negativo una muestra wild-type sin incubación de anticuerpos (*unstained samples*), logrando establecer un valor IFM (Intensidad de fluorescencia media) negativo de $< 10^4$, representado en el histograma de color gris (**Figura 8-A**) e indicado de color negro en el *dot-plot* (**Figura 8 B-C**). Con el fin de corregir alguna superposición de fluorescencia en las muestras, Beads de compensación fueron incubados con el anticuerpo de interés

anti – LDLR humano unido a BV421, observándose que el marcaje específico del LDLR en membrana celular de los macrófagos correspondía a eventos identificados en una IMF > 10⁴ (Figura 8).

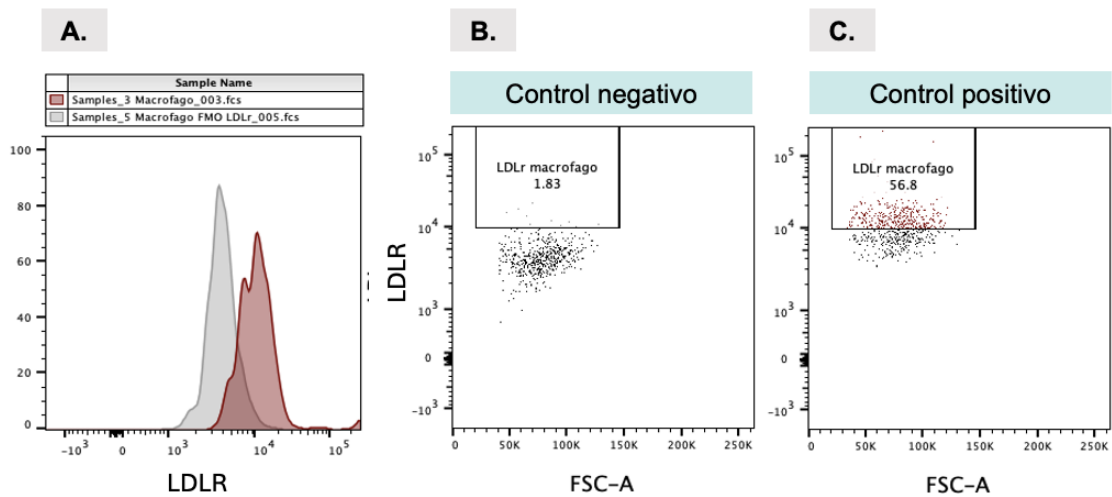


Figura 8. Determinación de rangos de corte para cuantificación de expresión LDLR. (A) Histograma representativo de los controles negativos (gris) correspondiente a muestra de macrófagos sin incubación con anticuerpo anti-LDLR humano y en rojo control positivo correspondiente a *beads* de compensación incubados con anticuerpo anti-LDLR humano. (B) *Dot-plot* representativo del control negativo correspondiente a muestra de macrófagos sin incubación con anticuerpo anti-LDLR humano (color negro) (C) *Dot-plot* representativo del control positivo correspondiente a *beads* de compensación incubados con anticuerpo anti-LDLR humano (color rojo). FSC: *Forward Scatter*; LDLR: receptor de LDL.

Se analizaron los *dot-plot* de la **figura 9**, donde el eje Y representa la intensidad de fluorescencia del LDLR, donde a mayor intensidad, existe una mayor expresión del receptor en la célula. Al evaluar los niveles de expresión del LDLR en membrana de células provenientes de portadores de la variante D47N del LDLR, fue observado un nivel de expresión significativamente superior con respecto a los controles, presentando un porcentaje promedio de $96.9\% \pm 1,7$ frente al $13.0\% \pm 1,1$ de las personas *wild-type*, respectivamente ($****p < 0,0001$) en el total de los eventos detectados dentro del cuadrante CD14⁺CD16⁺, representado el porcentaje de eventos que poseían una IMF > 10⁴ (**Figura 9-B**), indicando un aumento de la expresión en membrana del LDLR, lo cual puede estar relacionado al fenotipo clínico.

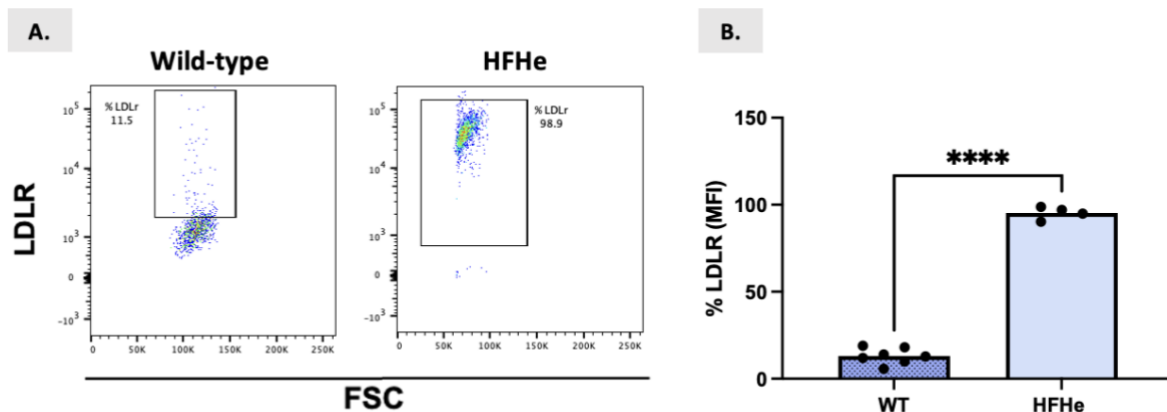


Figura 9. Determinación de expresión LDLR en macrófagos derivados de PBMC de personas *wild-type* y pacientes portadores de la variante D47N de HF. (A) Panel izquierdo, *Dot-plot* representativo correspondiente a macrófagos de muestra de persona *wild-type* (izquierda) y portador heterocigoto de la variante D47N (derecha) incubados con anticuerpo anti-LDLR humano unido a BV421 y como marcadores de linaje de macrófagos intermedios (CD14⁺ unido a APC/Cyanine7 y CD16⁺ unido a PE/Cyanine7). (B) Cuantificación de MFI del marcador del LDLR de muestras de pacientes portadores de la variante D47N en su genotipo heterocigoto HFHe (n = 4) y personas *wild-type* WT (n = 7); (*p < 0,0001). FSC: *Forward Scatter*; LDLR: receptor de LDL; LDLR-: marcaje negativo de LDLR; HF: Hipercolesterolemia Familiar; He: Heterocigoto; FSC: *Forward Scatter*.

3. Localización del LDLR en pacientes portadores de la variante D47N

Con el objetivo de evaluar el efecto de la variante D47N del LDLR en la localización celular, ensayos de microscopía confocal fueron realizados utilizando la colocalización del LDLR con marcadores intracelulares relacionados con el metabolismo del LDL: retículo endoplasmático (calreticulina), fosas de clatrina (clatrina) y lisosómico (Lamp1), observándose a través de las imágenes de microscopía confocal que la variante en su forma heterocigota en macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica de pacientes, poseen niveles de

colocalización del LDLR en el retículo endoplasmático similar a los controles ($0,66 \pm 0,07$ D47N-LDLR vs. $0.74 \pm 0,05$ wild-type, $p = 0,1332$) (**Figura 10-B**); Sin embargo, se puede observar una tendencia al aumento de la esta colocalización tanto en las muestras heterocigotas y en el representante homocigoto, lo cual podría potenciar la síntesis del receptor en presencia de la variante D47N-LDLR.

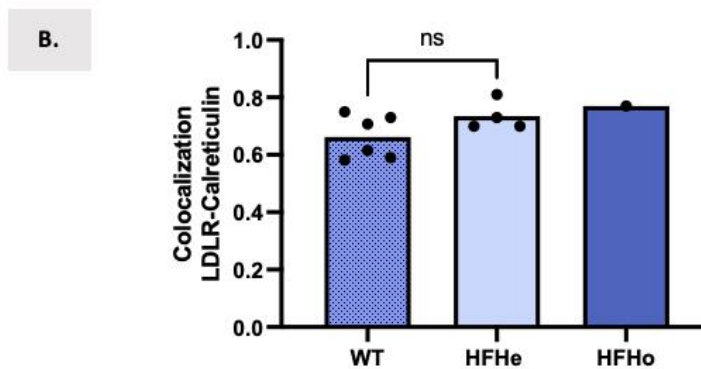
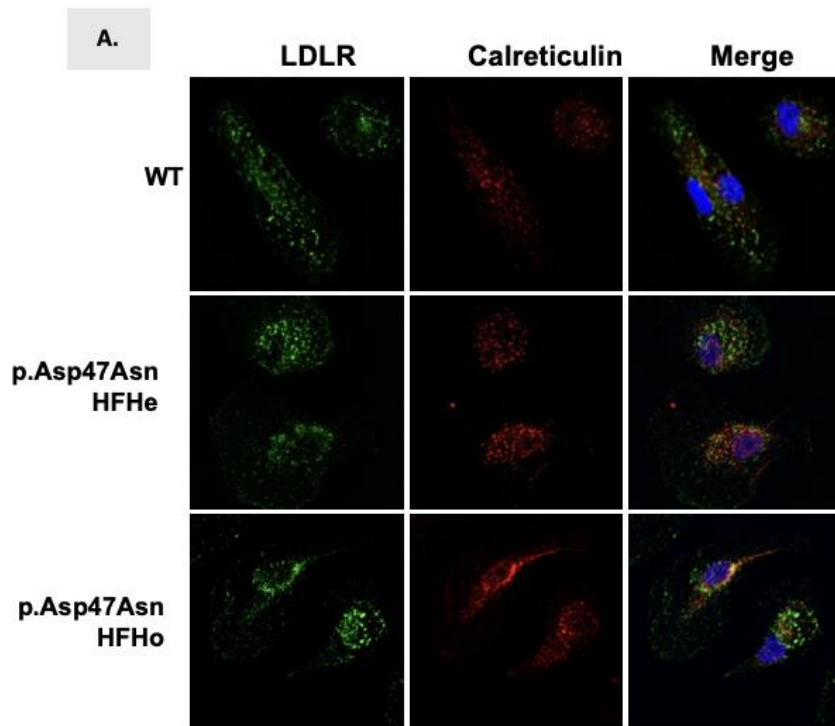
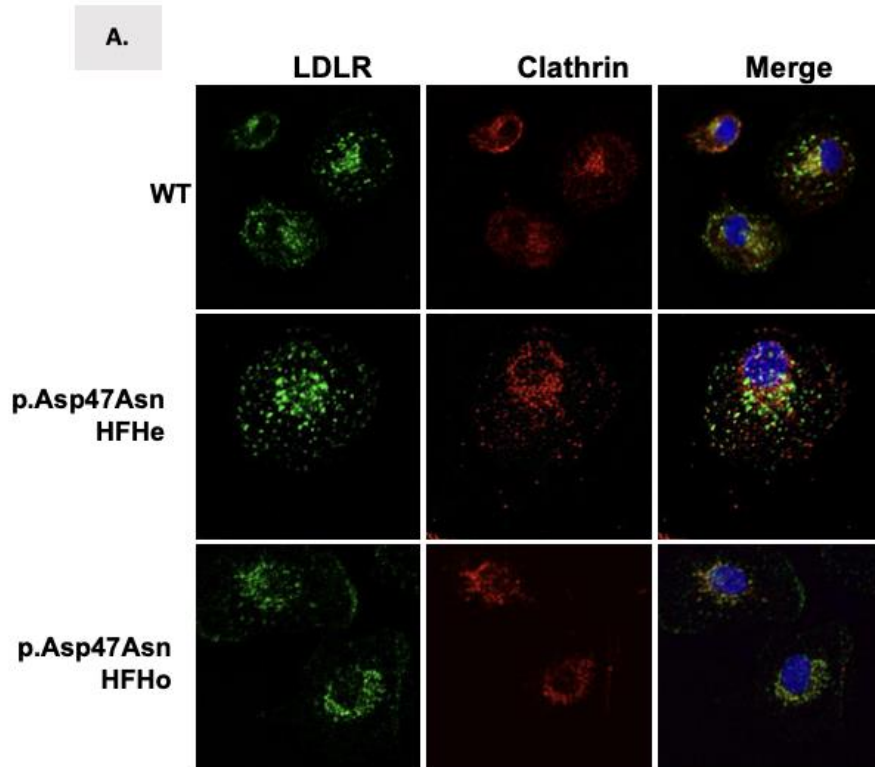


Figura 10. Inmunocitoquímica de colocalización del LDLR y marcador de retículo Calreticulina en macrófagos. (A) De izquierda a derecha: (1) Imágenes representativas en aumento 40X del genotipo wild-type como control, HFHe y HFHo; (2) marcador de LDLR con anticuerpo anti-LDLR humano en genotipo wild-type como control, HFHe y HFHo (verde); (3) marcador de retículo endoplásmico con anticuerpo anti-calreticulina humana en genotipo wild-type como control, HFHe y HFHo (rojo); (3) Colocalización (naranja) de ambos marcadores utilizados y tinción nuclear DAPI (azul). (B) Cuantificación de la colocalización del marcador del LDLR de muestras de pacientes portadores de la variante D47N con marcador de retículo endoplasmático calreticulina. Colocalización fue determinada por medio de deconvolución de imágenes y medición de correlación de Pearson por medio de ImageJ. WT: *wild-type*; HF: Hipercolesterolemia Familiar; He: Heterocigoto; Ho: Homocigoto; LDLR: receptor de LDL; *Merge*: colocalización de marcadores fluorescentes. HFHe (n = 4), HFHo (n=1), WT (n = 6).

Por otro lado, imágenes de microscopía confocal muestran que la variante en su forma heterocigota en macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica de pacientes, muestran niveles de colocalización significativamente disminuidos con clatrina en presencia de la variante ($0,8 \pm 0,05$ D47N-LDLR vs. $0,9 \pm 0,04$ wild-type, $p^* = 0,0349$) en comparación con muestras controles (**Figura 11**), observándose la misma tendencia en el representante homocigoto, lo cual potencialmente podría conducir a una menor internalización del receptor en presencia de la variante D47N-LDLR.



B.

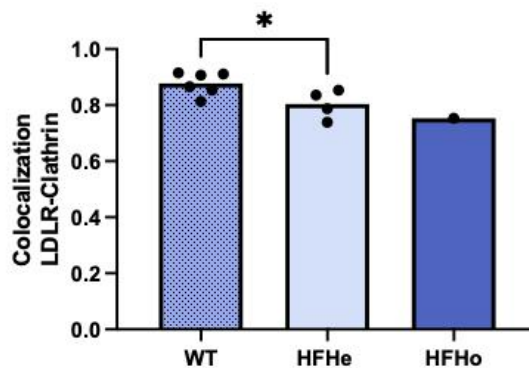
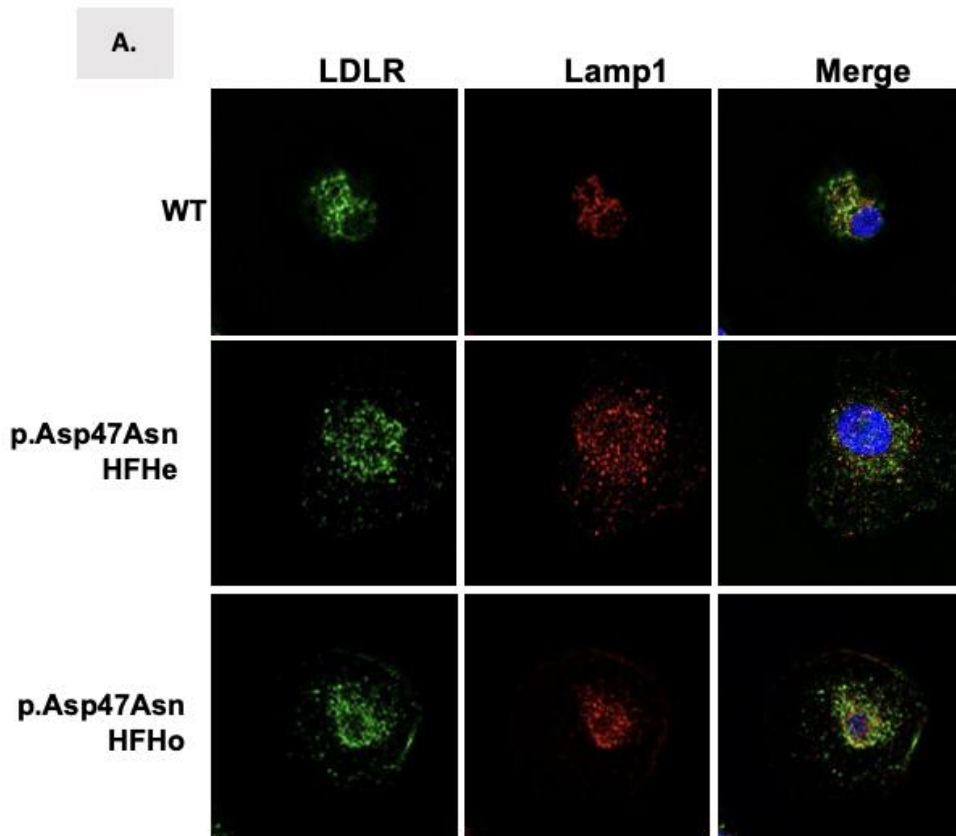


Figura 11. Inmunocitoquímica de colocalización del LDLR y marcador de vesículas recubiertas de clatrina en macrófagos. (A) De izquierda a derecha: (1) Imágenes representativas en aumento 40X del genotipo wild-type como control, HFHe y HFHo; (2) marcador de LDLR con anticuerpo anti-LDLR humano en genotipo wild-type como control, HFHe y HFHo (verde); (3) marcador de vesículas

cubiertas de clatrina con anticuerpo anti-clatrina humana en genotipo wild-type como control, HFHe y HFHo (rojo); (3) Colocalización (naranja) de ambos marcadores utilizados y tinción nuclear DAPI (azul). **(B)** Cuantificación de la colocalización del marcador del LDLR de muestras de pacientes portadores de la variante D47N con marcador de vesículas recubiertas de clatrina. Colocalización fue determinada por medio de deconvolución de imágenes y medición de correlación de Pearson por medio de ImageJ. WT: *wild-type*; HF: Hipercolesterolemia Familiar; He: Heterocigoto; Ho: Homocigoto; LDLR: receptor de LDL; *Merge*: colocalización de marcadores fluorescentes. HFHe (n = 4), HFHo (n=1), WT (n = 6). (*p = 0.0146).

Finalmente, imágenes de microscopía confocal muestran que la variante en su forma heterocigota en macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica de pacientes no mostraron diferencias significativas con el marcador lisosomal Lamp1 ($0,7 \pm 0,1$ D47N-LDLR vs. $0,8 \pm 0,05$ wild-type, $p = 0,3151$) en comparación con muestras controles **(Figura 12)**.



B.

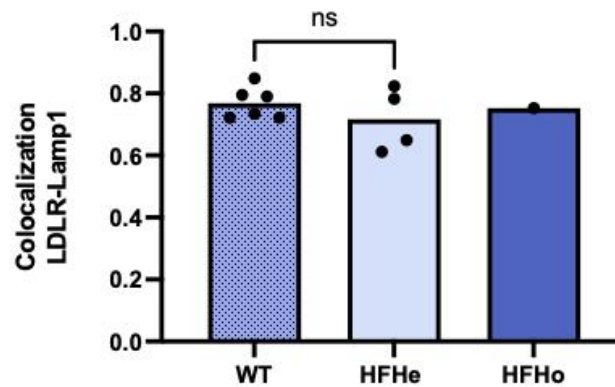


Figura 12. Inmunocitoquímica de colocalización del LDLR y marcador lisosomal Lamp1 en macrófagos. (A) De izquierda a derecha: (1) Imágenes representativas en aumento 40X del genotipo wild-type como control, HFHe y HFHo;

(2) marcador de LDLR con anticuerpo anti-LDLR humano en genotipo wild-type como control, HFHe y HFHo (verde); (3) marcador lisosomal Lamp1 con anticuerpo anti-lamp humana en genotipo wild-type como control, HFHe y HFHo (rojo); (3) Colocalización (naranja) de ambos marcadores utilizados y tinción nuclear DAPI (azul). **(B)** Cuantificación de la colocalización del marcador del LDLR de muestras de pacientes portadores de la variante D47N con marcador lisosomal. Colocalización fue determinada por medio de deconvolución de imágenes y medición de correlación de Pearson por medio de ImageJ. WT: *wild-type*; HF: Hipercolesterolemia Familiar; He: Heterocigoto; Ho: Homocigoto; LDLR: receptor de LDL; *Merge*: colocalización de marcadores fluorescentes. HFHe (n = 4), HFHo (n=1), WT (n = 6).

4. Evaluación de la internalización de la molécula de LDL medida por el LDLR en monocitos diferenciados macrófagos derivado de pacientes portades de la variante D47N

4.2 Estandarización de ensayos de transporte del LDLR

Con el objetivo de estandarizar la metodología de internalización de LDL en células CD14⁺ diferenciadas a macrófagos, 20 µg/mL de LDL fueron marcadas con las tinciones LDL-Dil (DilC18) y LDL-FITC, según como se describe en la sección Materiales y Métodos.

Al evaluar la incorporación de LDL con Dil (DiIC18) y FITC a 1 hora de incubación, se observó que la intensidad de fluorescencia media (IFM) correspondiente a LDL-FITC (**Figura 13-A**) y LDL-Dil (DiIC18) (**Figura 13-B**) fue de 8616 IFM y 4717 IFM, respectivamente; observándose una mayor de intensidad de señal para LDL-FITC., por lo que se decidió realizar los ensayos de transporte con el marcador FITC a 20µg/mL.

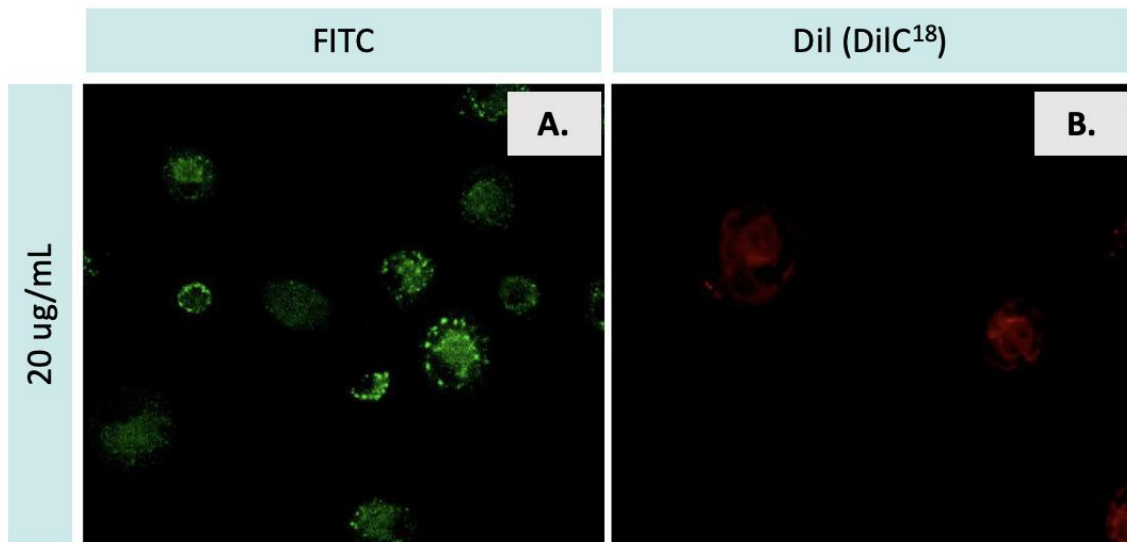


Figura 13. Ensayo de incorporación de LDL marcado. (A) Muestras de macrófagos wild-type incubados con LDL-FITC a 20µg/mL. (B) Muestras de macrófagos wild-type incubados con LDL-Dil (DiIC18) a 20µg/mL.

La incorporación de LDL a los tiempos de 0, 30 y 60 minutos fue evaluada por microscopía confocal a través de la cuantificación de la intensidad de señal asociada al LDL-FITC al interior celular (**Figura 14**), observándose que la internalización de la molécula LDL era mayor a través del tiempo y presentando diferencias significativas de los tiempos 30 minutos, el cual posee un MFI $535,7 \pm 169,5$ superior al tiempo 0 minutos (*p = 0,031) y 60 minutos, el cual posee un MFI $628,7 \pm 143,6$ superior al tiempo 0 minutos (*p = 0,0119) (**Figura 14 A-B**).

Con el objetivo de establecer la especificidad de esta incorporación a los diferentes tiempo, ensayos de competencia de LDL marcada y no marcada fueron realizados utilizando la proporción 1:4 (**Figura 14 A-B**), observándose una disminución significativa en el transporte de LDL hacia el interior celular en los diferentes tiempos, con una MFI $620,3 \pm 146,7$ vs MFI competencia $149,0 \pm 29,82$ (*p = 0.0198) y MFI $667,5 \pm 108,7$ vs MFI competencia $84,33 \pm 42,01$ (**p = 0,0072) a los tiempos de 30 y 60 minutos, respectivamente (**Figura 14-C**).

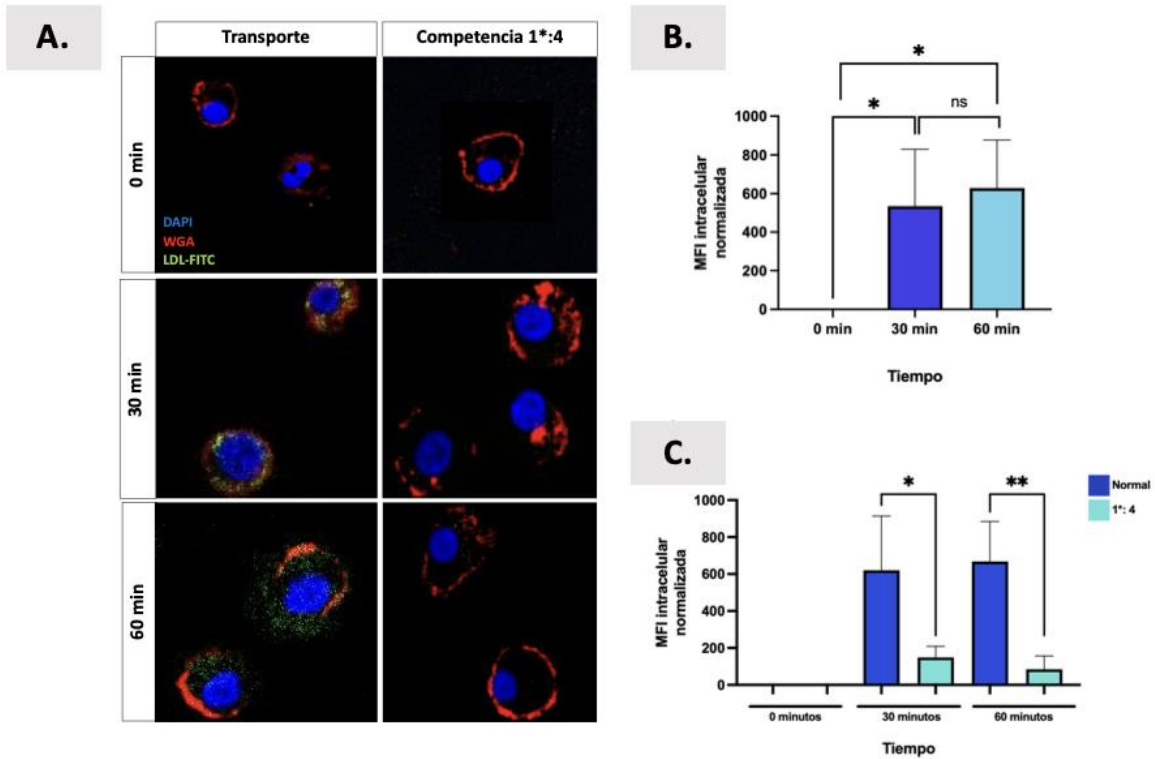


Figura 14. Transporte y competencia de LDL en macrófagos en personas *wild-type*. **(A)** Imágenes representativas del transporte (panel de la izquierda) y competencia (panel de la derecha) en macrófagos de personas *wild-type*, incubadas con LDL-FITC, núcleos marcados DAPI y membrana plasmática con WGA, a tiempos de 0, 30 y 60 minutos de incubación de LDL-FITC o LDL marcado/LDL sin marcar en proporción 1:4. **(B)** Cuantificación de internalización de LDL-FITC a 0, 30 (*p = 0,031) y 60 minutos (*p = 0,0119) fueron normalizados por el tiempo 0 minutos. **(C)** Comparación y cuantificación diferentes tiempos de incubación de LDL-FITC y ensayos de competencia LDL marcado/LDL sin marcar en proporción 1:4 a tiempo 0, 30 y 60 minutos (*p = 0.0198) (**p = 0,0072). WGA: marcaje *wheat germ*

agglutinin; WT: *wild-type*; LDL*: LDL marcada; LDL: lipoproteína de baja densidad; FITC: Isotiocianato de fluoresceína. Aumento 63X. WT (n = 4).

4.2 Ensayos de transporte LDLR en pacientes portadores de variante D47N-LDLR

Al evaluar los niveles de incorporación intracelular de LDL marcado con FITC en células provenientes de pacientes portadores de la variante D47N del LDLR, se observó un nivel de incorporación significativamente menor de LDL en el genotipo heterocigoto con respecto a las muestras *wild-type*, tanto en el tiempo 15 minutos ($443 \pm 91,4$ D47N-LDLR vs. $928 \pm 135,5$ *wild-type*, $**p = 0,0068$), 30 minutos (287 ± 105 D47N-LDLR vs. $978 \pm 77,2$ *wild-type*, $***p = 0,0002$) y 60 minutos (461 ± 179 D47N-LDLR vs. $844 \pm 201,2$ *wild-type* $*p = 0,0478$), respectivamente (**Figura 15 A-B**), observándose que las células obtenidas del paciente homocigoto presenta la misma tendencia a la disminución. Todo esto indica que existe un defecto en la función del LDLR en incorporar de LDL al interior celular cuando está en presencia de variante D47N. Por otro lado,.

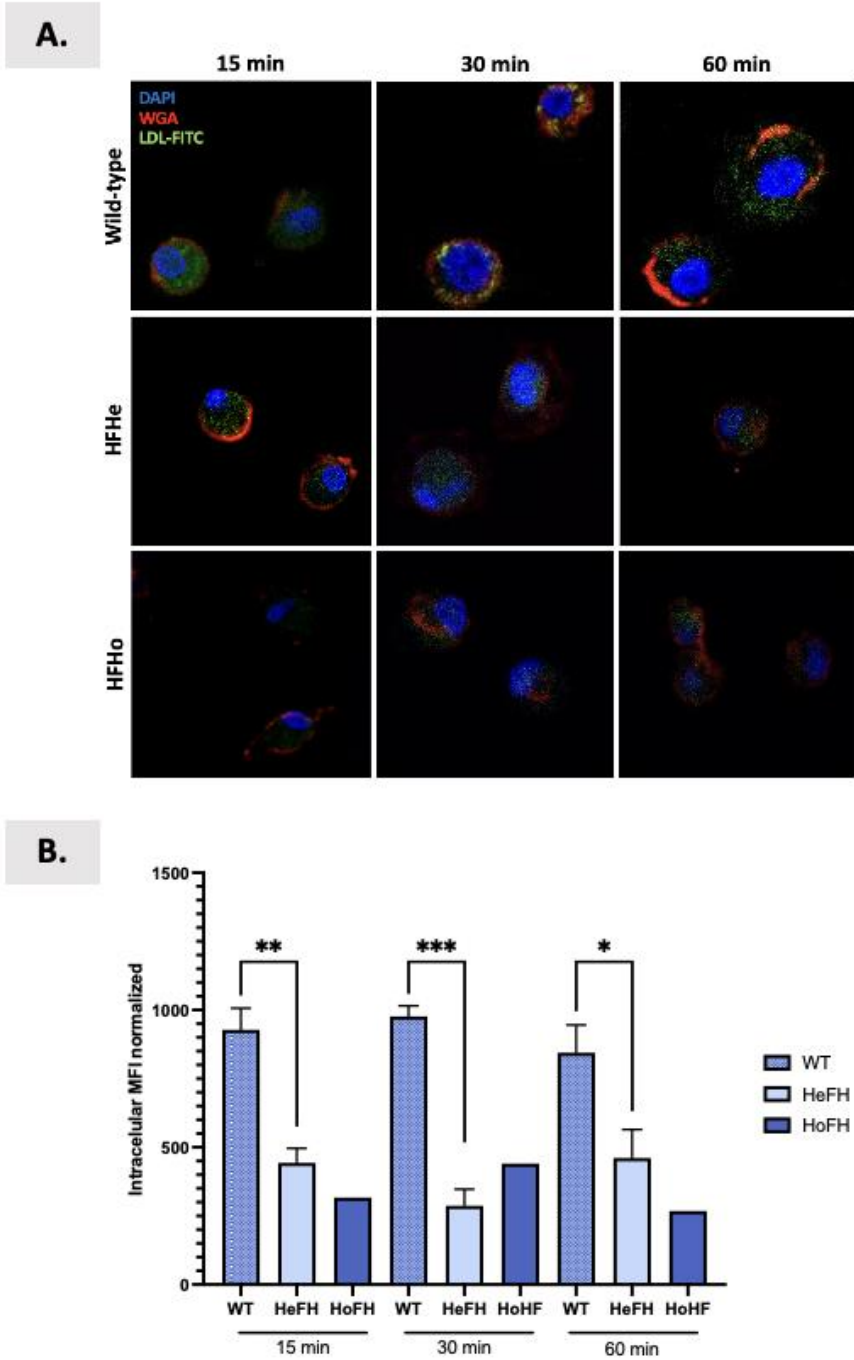


Figura 15. Transporte de LDL en macrófagos de pacientes portadores de la variante D47N. (A) De izquierda a derecha: Imágenes de transporte de LDL FITC

a diferentes tiempos (15 minutos, 20 minutos y 60 minutos) representativas en aumento 40X del genotipo wild-type como control, HFHe y HFHo; incubadas con LDL-FITC, núcleos marcados con DAPI y membrana plasmática con WGA. **(B)** Cuantificación de LDL-FITC al interior celular de células de pacientes portadores de la variante D47N. Cuantificación de la fluorescencia fue realizada a través del programa ImageJ en imágenes *stack* de 20 planos, estos resultados se normalizaron por el tiempo 0 minutos. WGA: marcaje *wheat germ agglutinin*; WT: *wild-type*; LDL: lipoproteína de baja densidad; FITC: Isotiocianato de fluoresceína. HFHe (n = 3), HFHo (n=1), WT (n = 4).

5. Correlación entre características funcionales del LDLR y los niveles plasmáticos de colesterol LDL en pacientes portadores de la variante D47N

Previo a la evaluación de la correlación entre características funcionales y niveles plasmáticos de LDL, se realizó un análisis de conglomerados para poder visualizar si los genotipos analizados en este estudio eran capaz de separarse naturalmente por sus características. El dendrograma **(Figura 16)** muestra claramente dos conglomerados principales: un conglomerado superior, representado en azul, que agrupa las muestras WT:11, WT:9, WT:10, WT:8, WT:7 y WT:6, correspondiente a muestra control *wild-type* y un conglomerado inferior, representado en rojo, que agrupa las muestras FHHo:1, FHHe:4, FHHe:3, FHHe:5 y FHHe:2, correspondiente

a muestra de portadores heterocigotos y homocigoto de la variante D47N. Con una correlación cofenética = 0,735, sugiriendo que el dendrograma representa de manera confiable las relaciones de similitud entre los datos.

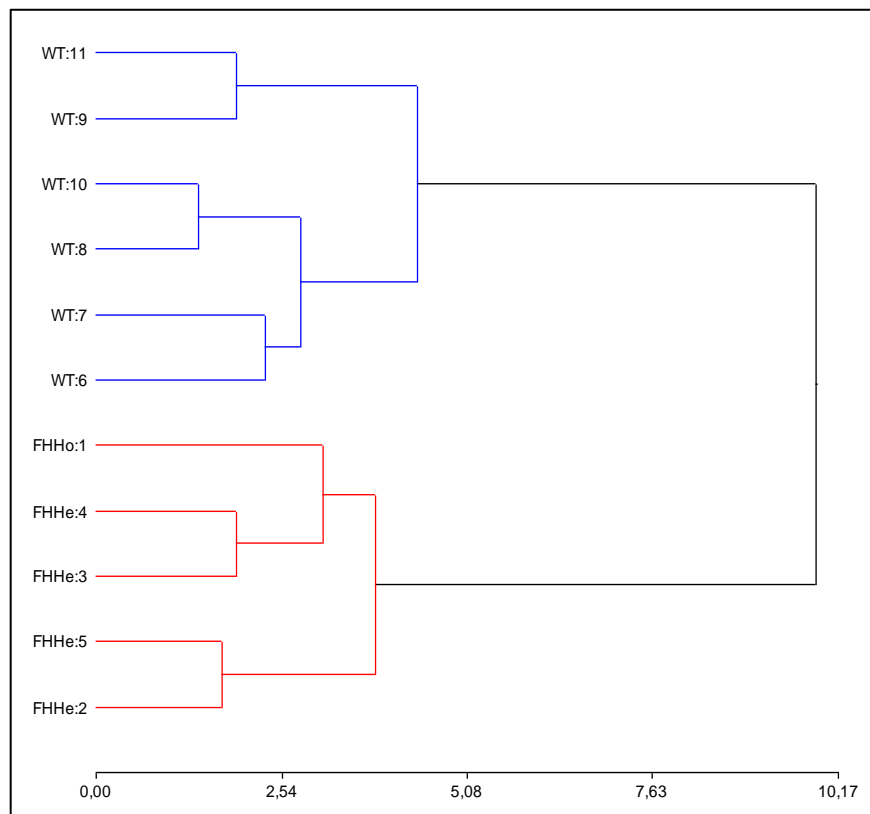


Figura 16. Dendrograma de análisis de conglomerados. Eje Vertical (Y): Muestras individuales etiquetadas como WT:11, WT:9, WT:10, WT:8, WT:7, WT:6, FHHo:1, FHHe:4, FHHe:3, FHHe:5 y FHHe:2. Eje Horizontal (X): Representación de la distancia o disimilitud entre las muestras. WT: wild-type; FHHo: genotipo homocigoto; HFHe: genotipo homocigoto. HFHe (n = 4), HFHo (n=1), WT (n = 6).

Posterior al análisis de conglomerados, se procedió a realizar el mismo análisis, pero por medio de gráfico de componentes principales (PCA) de la correlación de las 6 variables, correspondientes a características clínicas de los grupos de estudio (CT: Colesterol total, LDL: colesterol LDL) y características provenientes de los análisis funcionales mencionados en los objetivos anteriores (colocalización con calreticulina, clatrina, Lamp1 y los niveles de expresión de LDLR).

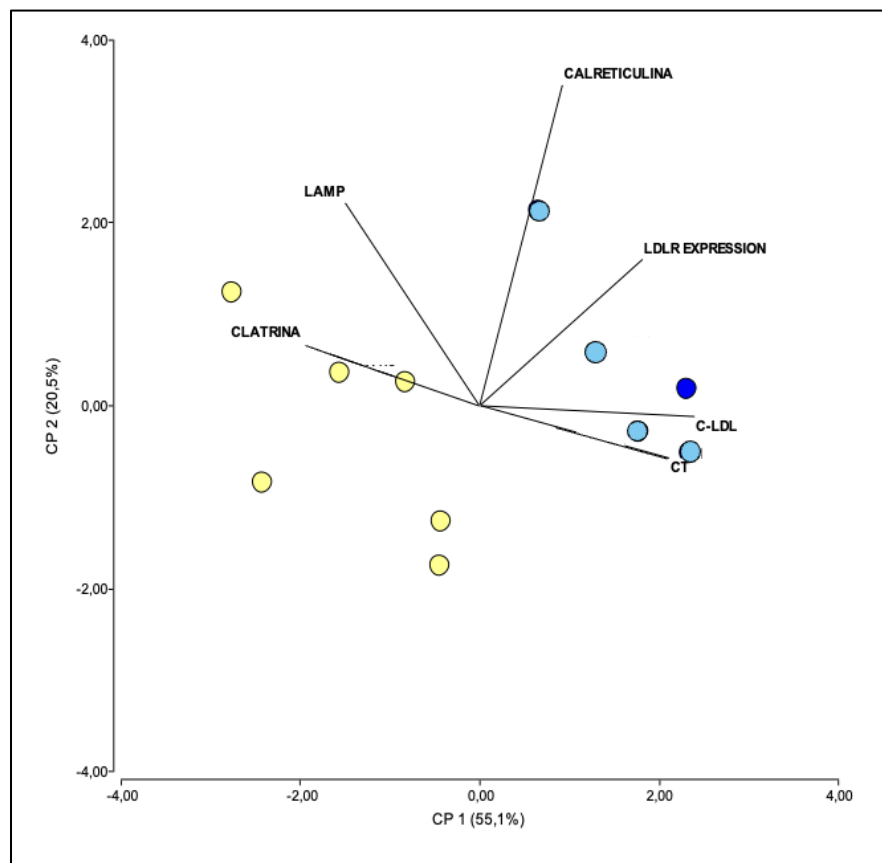


Figura 17. Análisis de Componentes Principales. Gráfico representativo de relación entre diferentes genotipos: wild-type (amarillo), HFHe (celeste) y HFHo (azul), junto

variables mencionadas anteriormente medidas en las muestras. Eje Horizontal (CP1): primer componente principal que explica el 55.1% de la varianza total en los datos. Eje Vertical (CP2): segundo componente principal (CP2), que explica el 20.5% de la varianza total. HFHe (n = 4), HFHo (n=1), WT (n = 6).

De este análisis de PCA (**Figura 17**) se observó una separación entre los genotipos *wild-type* y portadores de la variante D47N-LDLR (HFHo (azul) y HFHe (celeste)). Las muestras *wild-type* (amarillo) tienden a agruparse en la parte inferior izquierda del gráfico, mientras que las muestras HFHo y HFHe se encuentran principalmente en la parte superior derecha. Las flechas de las variables indican que las variables: expresión del LDLR y LDL contribuyen más a esta separación, apuntando hacia el grupo HFHo y HFHe, sugiriendo que estas variables tienen valores más altos en este grupo. Por otro lado, la variable clatrina apunta hacia el grupo *wild-type*, sugiriendo valores altos de esta variable en este grupo. Por lo que se puede apreciar una correlación entre los niveles de LDL, expresión de LDLR y colocación con clatrina, y el genotipo presente en una muestra.

Finalmente, por medio del gráfico PCA, se pudo obtener la matriz asociada a la correlación entre variables (**Tabla 4**), donde se observó una fuerte correlación positiva entre CT y LDL (0.94), indicando una relación muy fuerte y directa entre el colesterol total y el colesterol LDL, lo cual es esperado ya que el LDL es un componente importante del colesterol total. Por otra parte, se observó una correlación positiva moderada entre LDL y la expresión de LDLR (0,575), sugiriendo

que cuando el LDL aumenta, la expresión de LDLR también tiende a aumentar. Existe una correlación negativa moderada entre clatrina/Lamp1 y CT/LDL, lo cual sugiere que a medida que aumentan los niveles de colesterol total y LDL, los niveles de clatrina y Lamp1 tienden a disminuir. Finalmente, se obtuvieron correlaciones débiles entre calreticulina y las otras variables, indicando que la calreticulina tiene poca o ninguna relación lineal con las otras variables analizadas.

Tabla 4. Matriz de correlación entre variables clínicas (CT Y LDL) y ensayos funcionales (Expresión del LDLR, colocación LDLR-calreticulina, LDLR-clatrina y LDLR-Lamp). CT: colesterol total; LDL: colesterol LDL.

Matriz de correlación/Coeficientes						
	CT	C-LDL	CALRETICULINA	CLATRINA	LAMP-1	EXPRESIÓN DEL LDLR
CT	1					
C-LDL	0,94	1				
CALRETICULINA	0,204	0,336	1			
CLATRINA	-0,546	-0,71	-0,096	1		
LAMP	-0,437	-0,506	0,115	0,446	1	
EXPRESIÓN DEL LDLR	0,375	0,575	0,488	-0,554	-0,308	1

DISCUSIÓN

La Hipercolesterolemia Familiar es una dislipidemia primaria que presenta una gran prevalencia en población general junto con una alta probabilidad de sufrir un evento cardiovascular precoz [58, 59]. Actualmente, a través de los resultados obtenidos por secuenciación masiva en paralelo (NGS), es que constantemente se están describiendo nuevas mutaciones relacionadas con esta patología [46], muchas de ellas, sin evidencia científica que sustente la categorización de la patogenicidad correspondiente [44, 48, 52]. En este contexto, los ensayos funcionales son el mejor modelo de validación para determinar la patogenicidad de una mutación [60, 35]. Es por ello los objetivo principales del presente trabajo fue evaluar los niveles de expresión, localización subcelular del LDLR en monocitos diferenciados a macrófagos y la internalización de la molécula LDL mediada por el LDLR de la variante de significado incierto D47N asociada a Hipercolesterolemia Familiar.

La variante D47N del LDLR se localiza en la primera región abundante en cisteínas (LA1) del dominio de unión al ligando. Estudios *in silico* sugieren que esta mutación incrementa significativamente las constantes de afinidad (ΔG) y disociación (Kd), afectando la interacción LDLR- LDL [50, 52], lo cual es característico de una mutación de clase 3 [36, 61]. No obstante, dado por las limitaciones de los ensayos *in silico*, los estudios deben ser complementados con estudios funcionales.

En este contexto, análisis funcionales *in vitro* de esta variantes fueron realizados en la línea celular CHO-IIdIA7, correspondientes a una línea celular derivada de células de ovario de hámster chino deficiente en la expresión del LDLR, las cuales se transfectaron diferencialmente con un vector de la variante y el receptor nativo [52]. En este estudio, se reportó que esta variante no altera la expresión del LDLR *in vitro*, sino que es similar a la del LDLR nativo [52]. Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente trabajo mediante citometría de flujo en ensayos *ex vivo* de macrófagos de portadores de esta mutación, revelan niveles de expresión de membrana significativamente superiores en comparación con individuos de genotipo *wild-type* ($96.9\% \pm 1.7$ vs. $13.0\% \pm 1.1$, respectivamente) (Figura 9). Si bien, se espera que según los algoritmos propuestos por Di Tarento, una mutación de clase 3 posean niveles de expresión similar al receptor en su forma *wild-type* y no superior [60], esto se puede deber a que estos diagramas fueron creados bajo lo observado con metodologías *in vitro*, donde la sobreexpresión de proteínas pudiesen opacar el efecto sutil producido por proteínas con una funcionalidad moderadamente alterada. Además, el modelo estudiado en la presente tesis corresponde a un sistema fisiológico de expresión de estos receptores, donde la maquinaria celular necesaria para la completa regulación y función de este receptor se encuentran naturalmente expresados, pueden dar evidencias mucho más sensibles en cuando a niveles de expresión y funcionalidad de este receptor [65]. Por lo tanto, estos hallazgos demuestran que la variante incrementa la expresión del LDLR en la membrana celular en modelos *ex vivo*, lo cual se correlaciona con el fenotipo clínico previamente reportado (Tabla 4). Otro ensayo funcional propuesto para evaluar funcionalmente a las variantes son los ensayos de internalización de

LDL. En este contexto, los resultados obtenidos a partir de los macrófagos de pacientes portadores de esta mutación observamos que existe una internalización significativamente menor de LDL al ser comparado con muestras *wild-type* (**Figura 15**). Lo cual es lo opuesto a lo previamente reportado por Benito-Vicente, el cual a través del sistema heterólogo de expresión y citometría de flujo observó que no se altera la internalización de LDL mediada por LDLR en presencia de esta variante, ya que, su actividad *in vitro* es similar a la del LDLR nativo [52]. De forma similar a lo discutido previamente, esto puede deberse a la diferencia del modelo *ex vivo* e *in vitro* en los cuales fue analizada dicha variante. Por lo tanto, según la antecedentes obtenidos de localización celular aumentada y transporte disminuido, sugiere que correspondería a una mutación de clase 3 [60, 48, 61].

Para complementar la información funcional sobre esta variante, se realizaron estudios de localización intracelular. Para una variante de clase 3, se espera una colocalización disminuida del LDLR-clatrina en comparación con muestras *wild-type*, sin diferencias en colocalización con el retículo endoplasmático o a nivel lisosomal, sugiriendo que el defecto a niveles de la interacción LDL-LDLR no afecta la síntesis, reciclaje y eliminación del receptor a nivel intracelular [60]. Sin embargo, resultados obtenidos en el modelo de macrófagos de portadores heterocigotos de la variante D47N-LDLR, mostraron una disminución significativa de la colocalización LDLR con el marcador clatrina en comparación con *wild-type*, donde la muestra homocigota seguía la misma tendencia, lo cual sugiere que el LDLR-D47N posee un defecto en la interacción con su ligando LDL, el cual genera una internalización menor o más lenta del complejo. A pesar que la colocalización con otros marcadores

no mostraron diferencias significativas, se pudieron observar ciertas tendencias en muestras HFHe y HFHo de la variante, como es en la colocación del LDLR con el marcador de RE, lo cual se podría explicar como un aumento de síntesis del LDLR, como compensación de la baja eficiencia de la incorporación de LDL por el efecto de la variante. Lo cual tendría concordancia con el estudio realizado por citometría de flujo, el cual reveló un aumento de expresión del LDLR en portadores en comparación con muestras *wild-type* (**Figura 9**). Por otro lado, se observó la tendencia a la disminución de la colocación del LDLR con el marcador lisosomal Lamp1, lo cual podría reflejar una menor degradación del LDLR por vía lisosomal, favoreciendo el reciclaje del receptor y, por lo tanto, contribuyendo también expresión del LDLR en membrana reflejada en esta caracterización *ex vivo* en modelo de macrófago (**Modelo propuesto 1**). A partir de la evidencia obtenida mediante estos ensayos, se deduce que la variante exhibe características distintivas de una mutación de clase. En conjunto, los resultados del presente estudio permiten contribuir como una evidencia de soporte en la patogenicidad de esta variante [44].

A lo largo de los múltiples análisis realizados en esta tesis, se observó que los genotipos exhiben, en su mayoría, características distintas. Una forma de verificar si las características generan agrupaciones diferenciadas, es el uso de análisis de conglomerados. Estos análisis se han utilizado en HF como herramientas para identificación de la ascendencia genética de participantes del Biobanco del Reino Unido, donde en base a datos otorgados por la genotipificación, que eran difícil discernir a simple vista [66], se logró la separación de 3 diferentes etnias en base a características diferenciales [66]. Por lo tanto, en el contexto de esta tesis, el análisis

de conglomerados se utilizó analizar si las características funcionales y clínicas, permitían generar una separación en los genotipos en estudio (*wild-type* y los portadores de la variante D47N). Entonces, por medio de análisis de conglomerados se pudo observar una clara separación de los genotipos *wild-type* y portadores de la variante D47N (**Figura 16**), lo cual o sugiere que la variante D47N induce alteraciones funcionales robustas que permite una distinción fenotípica detectable mediante el análisis de conglomerados. La correlación cofenética de 0.735, sugiere que el dendrograma representa de manera razonable las relaciones de similitud entre las muestras, lo que refuerza la validez de la separación observada entre los genotipos.

Para visualizar cómo interactúan las distintas variables, se empleó el análisis de Componentes Principales (PCA) en cual había sido reportado previamente en estudios del perfil lipídico de pacientes con hipercolesterolemia familiar [67]. Donde este análisis permitió la revelación de anomalías en glicerolípidos y oxisteroles en estos pacientes, proporcionando información sobre alteraciones cuantitativas y cualitativas del metabolismo lipídico, los cuales son datos cruciales para comprender los mecanismos subyacentes de la enfermedad [67]. A partir de estos hallazgos y determinar si este tipo de análisis puede contribuir a la caracterización de estos pacientes, se aplicó el análisis de PCA a las variables funcionales y clínicas analizadas en esta tesis. Los resultados sugieren que la variante D47N afecta la función del LDLR en el modelo celular utilizado, caracterizándose principalmente por una baja colocalización LDLR-clatrina y altos niveles de expresión en membrana. Estas variables se correlacionan con niveles

elevados de colesterol LDL en plasma, lo que contribuye a la idea de que niveles elevados de colesterol LDL en plasma de pacientes portadores de la variante D47N, puede estar dado por una internalización deficiente de c- LDL, lo que conlleva a un aumento compensatorio en la expresión del receptor, sugiriendo la clasificación esta variante como una mutación patológica de clase 3.

Modelo propuesto N°1: Caracterización funcional *ex vivo* de la variante D47N.

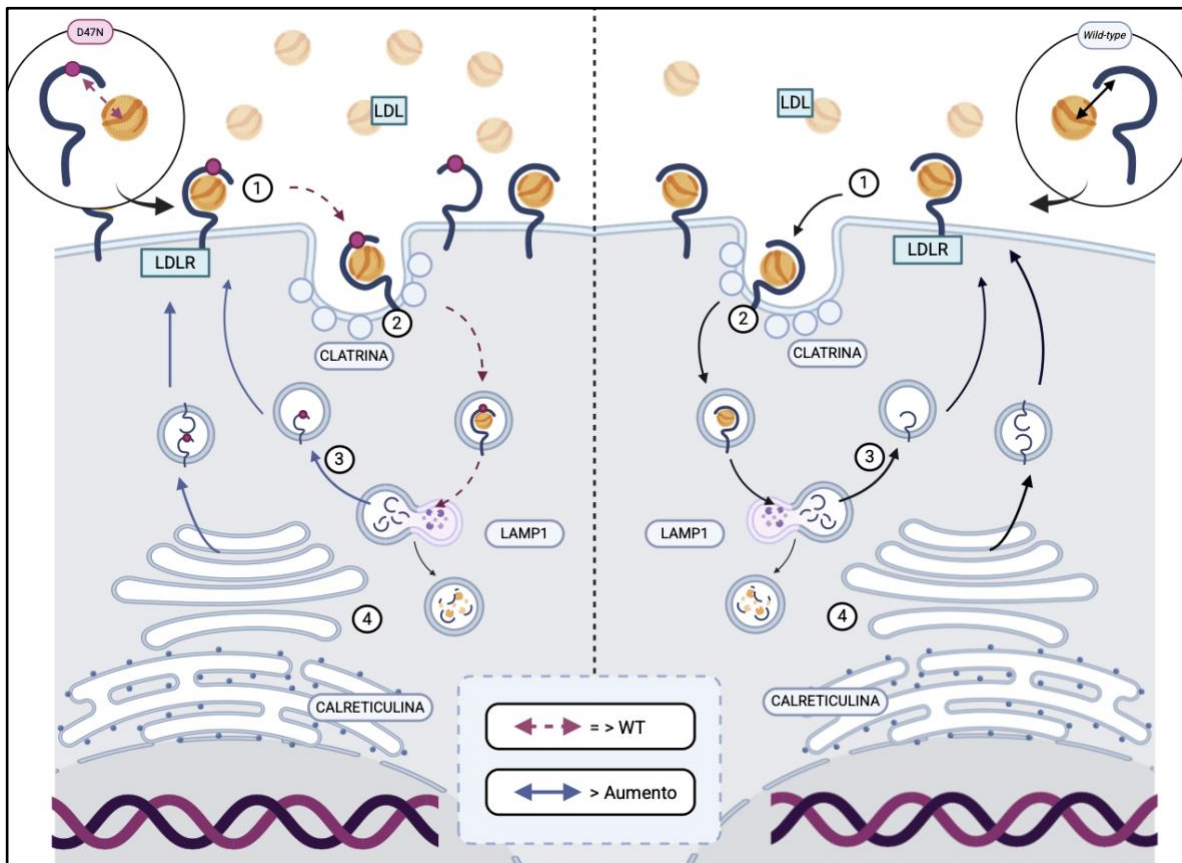


Figura 18. Caracterización funcional *ex vivo* de la variante D47N. (1) Existe una disminución en la interacción D47N-LDLR y la LDL, lo cual está dado por las

características de la variante. (2) Este defecto genera una menor o más lenta internalización del LDLR al interior celular en comparación con el *wild-type*, generando un menor reclutamiento de vesículas de clatrina. (3 y 4) Los bajos niveles de LDL intracelular promueven la síntesis y el reciclamiento del LDLR en comparación con el *wild-type*, generando un aumento en la expresión de esta proteína en la membrana plasmática celular.

Macrófagos como modelo de estudio funcional ex vivo en variantes de HF

Diversos modelos celulares han sido propuestos para contribuir a la evaluación funcional de variantes del LDLR. Existen las sugeridas para experimentos *in vitro*, como las líneas celulares transfectadas HepG2 y HEK293, las cuales son sometidas a tratamiento con 25-hidroxicolesterol para la regulación negativa del LDLR endógeno y células CHO-IIdIA7, deficiente en la expresión del receptor [60]. Por otro lado, están los modelos celulares propuestos para análisis funcionales *ex vivo* de variantes de HF del LDLR. Entre estos, el modelo más utilizado, es el de linfocitos T aislados de pacientes que son posteriormente activados, los cuales son utilizados tradicionalmente para evaluar la actividad del LDLR [57, 60, 62]. Sin embargo, este modelo presenta una serie de limitaciones, como lo son: una baja expresión del LDLR [63] y tamaño celular reducido, lo que dificulta la determinación de la localización del LDLR a nivel subcelular. No obstante, existen otros modelos celulares, que no son considerados. Entre ellos, los macrófagos los cuales pueden

ser obtenidos mediante la diferenciación de monocitos de sangre periférica de pacientes, los cuales emergen como un modelo celular alternativo ventajoso.

Los macrófagos son células que exhiben una mayor expresión del LDLR frente a otros tipos celulares, como los linfocitos [63, 65]. Estos poseen un área y tamaño celular mayor, que es más adecuado para evaluar la localización o colocalización con marcadores intracelulares, lo cual es ideal para caracterizar funcionalmente una variante [65] (Figura 10 - 13). Por otro lado, en condiciones fisiológicas, los macrófagos desempeñan un papel importante en el metabolismo del LDL, ya que expresa receptores como el LDLR [12, 55], poseen vías de señalización intracelular que regulan el eflujo de colesterol y componentes de membrana como clatrin, caveolinas y balsas lipídicas que facilitan la endocitosis y el tráfico intracelular del colesterol [64]. Siendo el principal tipo celular en circulación que aporta a la homeostasis del colesterol, buscando prevenir la acumulación excesiva que podría conducir a la aterosclerosis [64]. Sin embargo, la dualidad de este modelo, es que también participa activamente en la fisiopatología del proceso aterosclerótico, ya que, expresa receptores SR-A y CD36, los cuales son específicos en la captación de LDL oxidada [64], lo cual podría dificultar la medición sin interferentes ensayos como los de internalización de LDL. Pero, esta característica, lejos de ser una limitación, le da al macrófago una relevancia fisiopatológica valiosa, ya que, simula un entorno celular más próximo a las condiciones *in vivo*, donde la LDL nativa coexiste con formas oxidadas; este modelo podría ser excepcionalmente representativo de la complejidad del proceso aterosclerótico, reflejando la interacción que existe en diversas vías de captación de LDL, permitiendo una

aproximación más precisa a la comprensión de la enfermedad. Por lo tanto, se sugieren macrófagos como un modelo más adecuados para la realización de caracterización funcional *ex vivo* de variantes del LDLR, especialmente para aquellas que presentan un fenotipo atenuado, como es el caso de la variante D47N, donde modelos *in vitro* pueden distorsionar la evaluación del efecto real de una variante sobre el LDLR, debido a la sobreexpresión inducida del receptor, lo que compromete la interpretación precisa de los resultados. En contraste, modelos *ex vivo* como linfocitos activados, los cuales se caracterizan por una expresión basal reducida del receptor, con carencia de características como un tamaño intracelular apropiado, junto con su relevancia fisiopatológica limitada en el contexto de esta enfermedad, podría no representar una forma óptima para la evaluación precisa de variantes del LDLR con efectos sutiles.

Esta diferencia de resultado entre los modelos resalta la necesidad de reevaluar las características funcionales esperadas en variantes asociadas al LDLR. Estableciendo distinciones claras entre ensayos *ex vivo* para variantes que exhiben fenotipos agresivos y aquellos que presentan efectos más sutiles (**Modelo propuesto 2**). Esto podría aportar a la clasificación de variantes y a la contribución de un diagnóstico más certero.

Modelo propuesto N°2: Uso del modelo celular de macrófagos diferenciados desde monocitos obtenidos de pacientes para análisis funcional de mutaciones de clase 3.

Tabla 5. Análisis comparativo de la caracterización funcional de la mutación de clase 3 del LDLR en macrófagos y otros modelos celulares tradicionales.

Métodos	Caracterización funcional	Caracterización funcional de mutación de clase 3	
	LDLR <i>wild-type</i>	Modelos tradicionales	<i>Ex vivo</i> modelo de macrófagos
II. Análisis de expresión y función del LDLR			
Detección de LDLR en superficie celular	Referencia	Referencia	↑
Detección de endocitosis: LDL incubado a 37°C	Referencia	↓	↓
III. Análisis de localización de LDLR al interior celular por microscopía confocal			
Localización de LDLR-RE	Referencia	Referencia	Referencia
Localización de LDLR-clatrina	↑	↓	↓
Localización de LDLR-lisosoma	Referencia	Referencia	Referencia

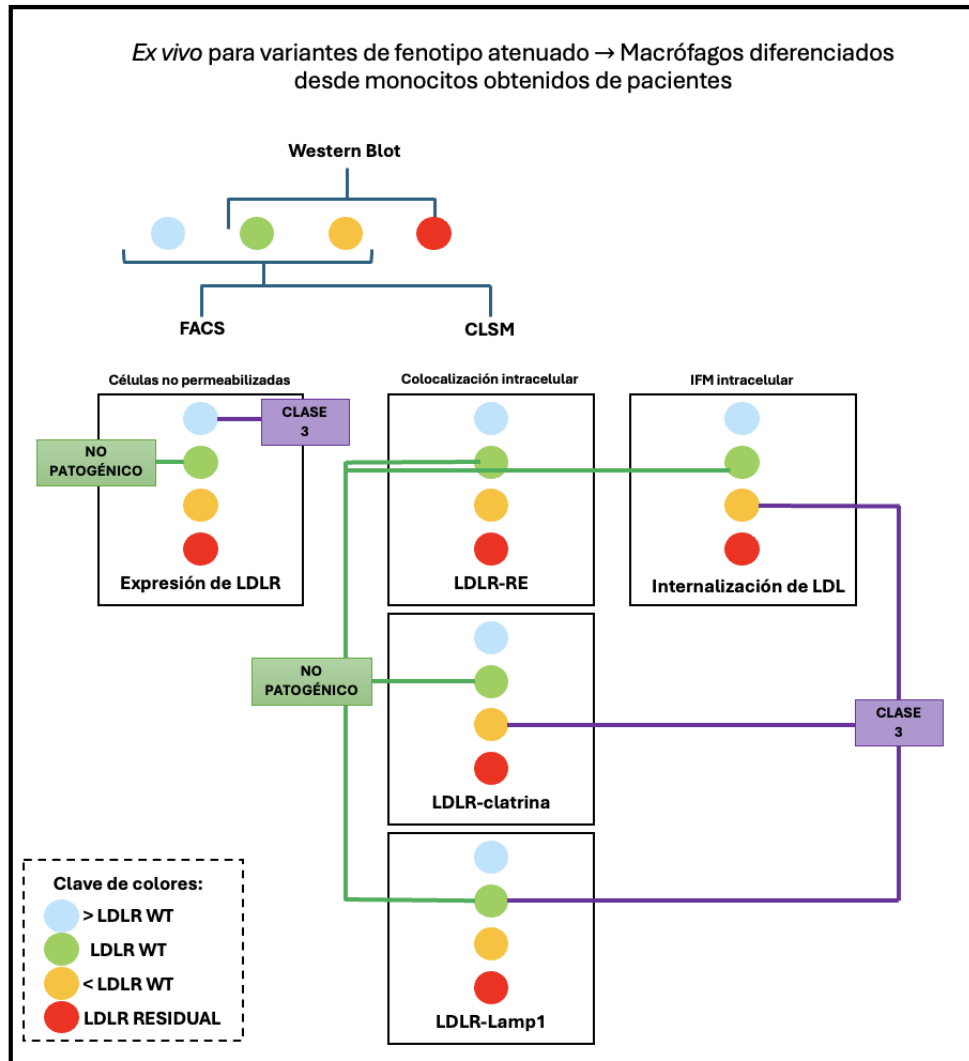


Figura 19. Diagrama de flujo de métodos de biología celular y molecular para caracterizar funcionalmente mutaciones de clase 3 asociadas al LDLR. FACS: citometría de flujo; CLSM: inmunocitoquímica; LDLR: receptor de LDL; WT: wild-type; RE: retículo endoplasmático; IFM: Intensidad de fluorescencia media.

CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

La Hipercolesterolemia Familiar es una enfermedad genética de gran relevancia clínica debido a su asociación con un alto riesgo de enfermedad cardiovascular prematura. La variante p.Asp47Asn del gen LDLR, identificada como la segunda variante más frecuente en la región del Biobío, Chile, plantea un desafío diagnóstico debido a su clasificación como variante de patogenicidad incierta.

Los resultados obtenidos en esta tesis, mediante la aplicación de ensayos funcionales *ex vivo* en macrófagos derivados de monocitos de pacientes portadores de la variante D47N, proporcionan evidencia sólida sobre el impacto funcional de esta variante en el LDLR. Se ha demostrado que la variante D47N afecta significativamente la función del LDLR, principalmente a niveles de la captación y procesamiento de LDL, que era lo esperado en base a los resultados de análisis *in silico* de esta variante. Estos hallazgos también son consistentes con la observación clínica de elevados niveles de colesterol en pacientes portadores de esta variante. Si bien, las actividades realizadas en este trabajo sugieren fuertemente que la variante D47N se trata de una mutación de clase 3, debiera ser complementado con un estudio de la determinación de la KD y ΔG por medio de metodologías no computacionales para determinar de forma robusta la interacción del LDLR con su ligando LDL, y de esta manera contribuir con una evidencia fuerte junto con los resultados obtenidos en esta tesis para poder clasificar esta variante como una mutación de clase 3, y categorizada como patogénica.

Por otra parte, la caracterización funcional esta variante realizada en este estudio contribuye a esclarecer su papel en la patogénesis de la HF. La evidencia obtenida colabora a la reclasificación de esta variante, lo que tiene implicaciones importantes para el diagnóstico genético y el manejo clínico de los pacientes con HF. Los resultados obtenidos resaltan la importancia de realizar estudios funcionales para evaluar la patogenicidad de variantes genéticas de significado incierto en la actualidad, ya que, estos hallazgos impactan directamente en un diagnóstico genético y clínico más certero, permitiendo una medicina personalizada para familias portadoras de diferentes variantes frecuentes asociadas a HF.

ANEXOS

Anexo 1: Autorización comité Ético-Científico



ACTA DE EVALUACIÓN COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO

COMITÉ CONSTITUIDO EN CONFORMIDAD A LA R. EX N°2444 / 14.08.2012
RE ACREDITADO POR LA SEREMI SALUD DEL BIOBIO EN CONFORMIDAD A LA R. EX. N° 2963/ 06.10.20

Concepción, 11 de mayo 2022

Dra. Andrea Sanchez
Investigadora Principal
Presente.

Ref: Determination of pathogenicity of genetic variants of uncertain significance associated with familial hypercholesterolemia (Determinación de la patogenicidad de variantes genéticas de significado incierto asociadas a Hipercolesterolemia Familiar) FONDECYT Iniciación 11220497
Código CEC-SSC: 22-03-14

Estimada investigadora

Junto con saludarle, nos permitimos informar a usted que el Comité Ético Científico del Servicio de Salud Concepción, en reunión mediante videollamada de fecha 10 de mayo 2022 tomó conocimiento y aprobó respuesta a observaciones planteadas por este comité en acta de revisión expedita de fecha 06 de mayo 2022, relativas al estudio de la referencia, presentado por usted.

Miembros del Comité Ético Científico que participaron en la sesión videollamada del 10 de mayo 2022:

Q: 08 / 09

Nombre y apellidos	Profesión/Institución	Cargo CEC
Claudio Bustos	Psicólogo	Integrante permanente / externo
Felipe León M.	Abogado / SSC	Integrante permanente / Abogado / Vice presidente
Nelson Pérez T.	Médico Psiquiatra / HGGB	Integrante permanente / Presidente
María Cristina Fellay	Bióloga	Integrante permanente / Representante comunidad
Catalina Márquez Z.	Químico Farmacéutico / HGGB	Integrante permanente
María A. Bidegain S.	Médico Pediatra Nefrólogo	Integrante permanente / externa
Francisco Guede R.	Kinesiólogo / UNAB	Integrante permanente / externo
Ricardo Saldías	Ingeniero comercial /HGG	Integrante permanente / Secretario

Documentos recepcionados:

- Carta respuesta al CEC
- Protocolo de estudio: Determination of pathogenicity of genetic variants of uncertain significance associated with familial hypercholesterolemia (Determinación de la patogenicidad de variantes genéticas de significado incierto asociadas a Hipercolesterolemia Familiar) FONDECYT Iniciación 11220497. Tercera versión, mayo 2022.
- Información a padres o tutores de menores portadores de mutaciones asociadas a hipercolesterolemia familiar y documento de consentimiento informado. Tercera versión, mayo 2022.
- Información al niño o adolescente portadores de mutaciones asociadas a hipercolesterolemia familiar y documento de asentimiento informado. Tercera versión, mayo 2022.
- Información al participante con mutaciones asociadas a hipercolesterolemia familiar y documento de consentimiento informado. Tercera versión, mayo 2022.
- Información al participante no portador de mutaciones asociadas a hipercolesterolemia familiar y documento de consentimiento informado. Tercera versión, mayo 2022.

EN CASO DE CUALQUIER DUDA SE LE SOLICITA CONTACTARSE CON EL CEC DEL SSC. Página 1
ESTE COMITÉ CUMPLE CON LAS GUÍAS DE BUENA PRACTICA CLINICA DEFINIDAS POR LA CONFERENCIA INTERNACIONAL DE ARMONIZACION(GCP-ICH); CON LAS LEYES CHILENAS N° 20.120 Y N° 19.628 Y CON LAS NORMAS INSTITUCIONALES DEL SERVICIO DE SALUD CONCEPCION



ACTA DE EVALUACIÓN COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO

COMITÉ CONSTITUIDO EN CONFORMIDAD A LA R. EX N°2444 / 14.08.2012
RE ACREDITADO POR LA SEREMI SALUD DEL BIOBIO EN CONFORMIDAD A LA R. EX. N° 2963/ 06.10.20


CONCLUSION: Con fecha 10 de mayo 2022, el Comité aprueba el estudio y procede a timbrar los siguientes documentos:

- Protocolo de estudio: Determination of pathogenicity of genetic variants of uncertain significance associated with familiar hypercholesterolemia (Determinación de la patogenicidad de variantes genéticas de significado incierto asociadas a Hipercolesterolemia Familiar) FONDECYT Iniciación 11220497. Tercera versión, mayo 2022.
- Información a padres o tutores de menores portadores de mutaciones asociadas a hipercolesterolemia familiar y documento de consentimiento informado. Tercera versión, mayo 2022.
- Información al niño o adolescente portadores de mutaciones asociadas a hipercolesterolemia familiar y documento de asentimiento informado. Tercera versión, mayo 2022.
- Información al participante con mutaciones asociadas a hipercolesterolemia familiar y documento de consentimiento informado. Tercera versión, mayo 2022.
- Información al participante no portador de mutaciones asociadas a hipercolesterolemia familiar y documento de consentimiento informado. Tercera versión, mayo 2022.
- Planilla datos fuentes

Además, este Comité solicita que:

1. El investigador utilice el formulario de consentimiento informado con el timbre y fecha de aprobación del comité en los pacientes que serán enrolados en su institución.
2. El Investigador responsable debe cumplir con el adecuado manejo de la información, asegurando la no utilización de datos que pueda identificar a los participantes.
3. Las enmiendas, reportes de eventos adversos y desvíos de protocolo se entreguen al comité en conjunto con una opinión personal del investigador, sobre la relevancia de ellos en el proyecto.
4. Informar a lo menos una vez al año de su estado de desarrollo, como también de cualquier publicación o presentación a congresos que de él se generen
5. La validez de esta aprobación es por un año.
6. Una vez finalizado el proyecto, el comité deberá ser informado de los resultados del estudio.
7. Conservar toda la documentación en su poder por lo menos hasta quince años cerrado el estudio
8. En toda futura correspondencia hacer referencia al número de código asignado
9. Cumplir con la normativa y protocolos de seguridad del establecimiento y/o centro de investigación.

Atentamente,


Ing. Ricardo Saldías Cerda
Secretario CEC-SSC




Dr. Nelson Pérez Terán
Presidente CEC-SSC

CC: CEC-SSC

EN CASO DE CUALQUIER DUDA SE LE SOLICITA CONTACTARSE CON EL CEC DEL SSC. Página 2
ESTE COMITÉ CUMPLE CON LAS GUÍAS DE BUENA PRACTICA CLINICA DEFINIDAS POR LA CONFERENCIA INTERNACIONAL DE ARMONIZACION(GCP-ICH); CON LAS LEYES CHILENAS N° 20.120 Y N° 19.628 Y CON LAS NORMAS INSTITUCIONALES DEL SERVICIO DE SALUD CONCEPCIÓN

Anexo 2: Manejo de residuos

Los residuos generados por esta investigación pueden ser clasificados según MATPEL en:

- Residuo biológico (tipo 1): Corresponden sólo a tejidos humanos, restos de tejidos humanos, materiales contaminados con fluidos humanos (sangre, orina) y restos de animales contaminados con bacterias o virus patógenos.
- Residuo inerte: Corresponde a material de vidrio de laboratorio, como probetas, matraces, vasos de precipitado, papel absorbente, guantes, puntas de pipetas u otros materiales plásticos, todo utilizados en forma exclusiva en los laboratorios.

Según indica MATPEL estos deben ser almacenados en una zona de almacenamiento temporal de residuos peligrosos, en un lugar de fácil acceso y que no afecte a la seguridad del laboratorio. Serán almacenados en envases proporcionados por RESPEL, se deberán etiquetar correctamente. Los residuos tipo 1 deberán ser almacenados en bolsas amarillas a temperaturas inferiores a 4°C y los residuos tipo 2 en cajas amarillas también a temperaturas inferiores a 4°C, de acuerdo con el decreto N°6 /2009 del “Reglamento de Establecimientos de Atención de Salud (REAS)”. sobre Manejo de Residuos Los residuos inertes correspondientes a vidrios deben almacenarse en contenedores de 4, 8 o 25 kg de capacidad, sin bolsa. Deben ser entregados con sus tapas originales de manera de evitar riesgos por dispersión del residuo. Se debe gestionar el retiro mensual con la unidad RESPEL por medio del llenado de formulario presente en la página web.

Anexo 3: Modelo de consentimiento informado pacientes con Hipercolesterolemia que presentan la variante D47N



HOJA DE FIRMAS DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del estudio: "Determination of pathogenicity of genetic variants of uncertain significance associated with familial hypercholesterolemia" (Determinación de la patogenicidad de variantes genéticas de significado incierto asociadas a Hipercolesterolemia Familiar).

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

Nombre del participante: _____

Firma: _____ Fecha: _____

Yo, el que suscribe, investigador responsable, confirmo que he entregado verbalmente la información necesaria acerca del estudio, que he contestado toda duda adicional y que no ejercí presión alguna para que el participante ingrese al estudio.

Declaro que procedí en completo acuerdo con los principios éticos descritos en las Directrices de GCP (Buenas Prácticas Clínicas) y otras leyes nacionales e internacionales vigentes.

Se le proporcionará al paciente una copia de esta información escrita para el participante y formulario de consentimiento firmado.

Nombre del colaborador: _____

Firma: _____ Fecha: _____

Nombre del investigador: _____

Firma: _____ Fecha: _____

Nombre del Jefe del servicio o Director del Establecimiento: _____

Firma: _____ Fecha: _____

Tercera Versión, mayo 2022:Universidad de Concepción..... Investigador responsable: Dra. Andrea Sánchez 3



Anexo 4: Modelo de consentimiento informado personas que no poseen Hipercolesterolemia Familiar



HOJA DE FIRMAS DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del estudio: "Determination of pathogenicity of genetic variants of uncertain significance associated with familial hypercholesterolemia" (Determinación de la patogenicidad de variantes genéticas de significado incierto asociadas a Hipercolesterolemia Familiar).

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

Nombre del participante: _____

Firma: _____ Fecha: _____

Yo, el que suscribe, investigador responsable, confirmo que he entregado verbalmente la información necesaria acerca del estudio, que he contestado toda duda adicional y que no ejercí presión alguna para que el participante ingrese al estudio.

Declaro que procedí en completo acuerdo con los principios éticos descritos en las Directrices de GCP (Buenas Prácticas Clínicas) y otras leyes nacionales e internacionales vigentes.

Se le proporcionará al paciente una copia de esta información escrita para el participante y formulario de consentimiento firmado.

Nombre del colaborador: _____

Firma: _____ Fecha: _____

Nombre del investigador: _____

Firma: _____ Fecha: _____

Nombre del Jefe del servicio o Director del Establecimiento: _____

Firma: _____ Fecha: _____

Tercera Versión, mayo 2022:Universidad de Concepción:..... Investigador responsable: Dra. Andrea Sánchez 3



Anexo 5: Modelo de consentimiento informado para padres



HOJA DE FIRMAS DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del estudio: Determination of pathogenicity of genetic variants of uncertain significance associated with familial hypercholesterolemia” (Determinación de la patogenicidad de variantes genéticas de significado incierto asociadas a Hipercolesterolemia Familiar)

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.

Nombre del niño o adolescente: _____ Fecha: _____

Nombre del padre o madre o tutor: _____

Firma: _____ Fecha: _____

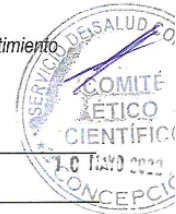
Yo, el que suscribe, investigador responsable, confirmo que he entregado verbalmente la información necesaria acerca del estudio, que he contestado toda duda adicional y que no ejercí presión alguna para que el participante ingrese al estudio.

Declaro que procedí en completo acuerdo con los principios éticos descritos en las Directrices de GCP (Buenas Prácticas Clínicas) y otras leyes nacionales e internacionales vigentes.

Se le proporcionará al paciente una copia de esta información escrita para el participante y formulario de consentimiento firmado.

Nombre del colaborador: _____

Firma: _____ Fecha: _____



Nombre del investigador: _____

Firma: _____ Fecha: _____

Nombre del Jefe del servicio o Director del Establecimiento: _____

Firma: _____ Fecha: _____

Anexo 6: Modelo de asentimiento informado



HOJA DE FIRMAS DOCUMENTO DE ASENTIMIENTO INFORMADO

Título del estudio: : "Determination of pathogenicity of genetic variants of uncertain significance associated with familial hypercholesterolemia" (Determinación de la patogenicidad de variantes genéticas de significado incierto asociadas a Hipercolesterolemia Familiar).

Nombre del niño o adolescente: _____

Firma: _____ Fecha: _____

Nombre del padre, madre o tutor: _____

Firma: _____ Fecha: _____

Nombre del Investigador Colaborador: _____

Firma: _____ Fecha: _____

Nombre del Investigador Responsable: _____

Firma: _____ Fecha: _____

Nombre del Jefe del servicio o Director del Establecimiento: _____

Firma: _____ Fecha: _____



Tercera Versión, mayo 2022: Universidad de Concepción; Investigador responsable: Dra. Andrea Sánchez 2

BIBLIOGRAFÍA

1. Bustos M, Patricia, Amigo C, Hugo, Arteaga LI, Antonio, Acosta B, Ana María, & Rona, Roberto J. (2003). Factores de riesgo de enfermedad cardiovascular en adultos jóvenes. *Revista médica de Chile*, 131(9), 973-980. <https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872003000900002>
2. Organización Panamericana de Salud (2021). Chile, dónde las medidas contra la hipertensión salvan vidas. <https://www.paho.org/es/noticias/25-8-2021-chile-donde-medidas-contra-hipertension-salvan-vidas>
3. Sarre-Alvarez, D., et al. (2018). Enfermedad cardiovascular aterosclerótica: Revisión de las escalas de riesgo y edad cardiovascular. *Med Int Méx* 34(6): 910-923. DOI:10.24245/mim.v34i6.2136
4. Bertomeu Ruiz, A., et al. (2002). La placa aterogénica: fisiopatología y consecuencias clínicas. *ELSEVIER* 40(9):394-405.
5. Lobos, J., et al. (2011). Factores de riesgo cardiovascular y atención primaria: evacuación e intervención. *ELSEVIER* 43(12):668-677. DOI: 10.1016/j.aprim.2011.10.002
6. Stoll, M., & Dell'Oca, N. (2019). Genética de la hipercolesterolemia familiar. *Revista Uruguaya de Cardiología*, 34(3), 239-259. Epub 01 de diciembre de 2019. <https://doi.org/10.29277/cardio.34.3.21>

7. Cofán, M. (2014). Mecanismos básicos. Absorción y excreción de colesterol y otros esteroides. *Clínica E Investigación En Arteriosclerosis*, 26(1), 41-47. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2013.10.008>
8. 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
9. Kang, S. and R.A. Davis, Cholesterol and hepatic lipoprotein assembly and secretion *Biochimica et biophysica Acta*, 2000. 1529: p. 223 - 230.
10. 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).
11. 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.
12. Goldstein, J.L. and M.S. Brown, The LDL Receptor. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2009. 29(4): p. 431 - 438.
13. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principios de Bioquímica*. 4ª. Edición. Editorial Omega; 2005, p. 816-829.
14. Lahoz, C. and J.M. Mostaza, La aterosclerosis como enfermedad sistémica. *revista española de cardiología* 2007. 60 (2): p. 184 - 195.

15. MINSAL, Norma para la evaluación nutricional de niños, niñas y adolescentes de 5 a 19 años de edad. 2016.
16. Blood cholesterol. National Heart, Lung, and Blood Institute. <https://www.nhlbi.nih.gov/health-topics/blood-cholesterol>. Accessed March 10, 2021.
17. 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.
18. Salvayre, R., A. Negre-Salvayre, and C. Camar, Oxidative theory of atherosclerosis and antioxidants. *Biochimie*, 2016 215: p. 281 - 296.
19. Yu, X.-H., et al., Foam cells in atherosclerosis. *Clinica Chimica Acta*, 2013. 424: p. 245 - 252.
20. Moore, K.J. and I. Tabas, Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell*, 2011. 145(3): p. 341 - 55.
21. Ivanova, E.A., et al., Small Dense Low-Density Lipoprotein as Biomarker for Atherosclerotic Diseases. *Oxid Med Cell Longev*, 2017. 2017: p. 1273042.
22. MINSAL, Normas técnicas: Dislipidemias. 2000.
23. Matías-Pérez, D., Pérez-Campos, E., & García-Montalvo, I. (2015). Una visión genética de la hipercolesterolemia familiar. *Nutrición*

2426. <https://dx.doi.org/10.3305/nh.2015.32.6.9885>

24. Ruiz, L. J. (2017). PCSK-9: papel en las hipercolesterolemias y anticuerpos monoclonales específicos inhibitorios. *Revista Colombiana de Cardiología*, 24, 4-12. <https://doi.org/10.1016/j.rccar.2017.08.021>
25. Mata, P., Alonso, R., Ruiz, A., Gonzalez-Juanatey, J. R., Badimón, L., Díaz-Díaz, J. L., Muñoz, M. T., Muñiz, O., Galve, E., Irigoyen, L., Fuentes-Jiménez, F., Dalmau, J., Pérez-Jiménez, F., & otros colaboradores (2015). Diagnóstico y tratamiento de la hipercolesterolemia familiar en España: documento de consenso [Diagnosis and treatment of familial hypercholesterolemia in Spain: consensus document]. *Atencion primaria*, 47(1), 56–65. <https://doi.org/10.1016/j.aprim.2013.12.015>
26. Raal, F.J. and R.D. Santos, Homozygous familial hypercholesterolemia: current perspectives on diagnosis and treatment. *Atherosclerosis*, 2012. 223(2): p. 262-8.
27. Wiegman A, et al. Familial hypercholesterolaemia in children and adolescents: gaining decades of life by optimizing detection and treatment. *Eur Heart J*. 2015; 36 (36): 2425-37.
28. Corral, P., (2015). Hipercolesterolemia familiar heterocigota: Revisión de las estrategias para su identificación y detección sistemática. *Insuficiencia cardíaca*, 10(3), 126-131. Recuperado en 25 de marzo de 2023, de

http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1852-38622015000300004&lng=es&tlng=es.

29. Defesche, J.C., et al., Familial hypercholesterolaemia. *Nat Rev Dis Primers*, 2017. 3: p. 17093.
30. Alves, A.C., et al., Phenotypical, Clinical, and Molecular Aspects of Adults and Children With Homozygous Familial Hypercholesterolemia in Iberoamerica. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020. 40(10): p. 2508-2515.
31. Santos RD, et al. Clinical and molecular aspects of familial hypercholesterolemia in Ibero-American countries. *J Clin Lipidol*. 2017; 11 (1): 160-6.
32. Hipercolesterolemia familiar heterocigota: diagnóstico molecular y terapia combinada. Caso clínico. *Revista Medica De Chile - REV MED CHILE*, 2007. 135.
33. Mata, P., et al., [Diagnosis and treatment of familial hypercholesterolemia in Spain: Consensus document]. *Semergen*, 2015. 41(1): p. 24-33.
34. Versmissen, J., et al., Efficacy of statins in familial hypercholesterolaemia: a long term cohort study. *BMJ*, 2008. 337: p. a2423.
35. Merchán, A., Ruiz, L. J., Campo, R., Prada, C. E., Toro, J. M., Sánchez, R., Gómez, J. E., Jaramillo, N. I., Molina, D. I., Vargas-Uricoechea, H., Sixto, S., Castro, J. M., Quintero, A. E., Coll, M., Slotkus, S., Ramírez, A., Pachajoa, H., Ávila, F. A., & Alonso K, R. (2016). Hipercolesterolemia familiar: artículo de revisión. *Revista Colombiana de Cardiología*, 23, 4-26. <https://doi.org/10.1016/j.rccar.2016.05.002>

36. Berberich, A. J., & Hegele, R. A. (2019). The complex molecular genetics of familial hypercholesterolaemia. *Nature Reviews Cardiology*, 16(1), 9-20.
37. Matías-Pérez, D., Pérez-Campos, E., & García-Montalvo, I. (2015). Una visión genética de la hipercolesterolemia familiar. *Nutrición Hospitalaria*, 32(6), 2421-2426. <https://dx.doi.org/10.3305/nh.2015.32.6.9885>
38. Bernabé, L. (2020). Determinación de la frecuencia de dislipidemia infantil por medio del cribado universal recomendado por la academia americana de pediatría. Tesis profesional. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México.
39. Tang, Y., et al., Research progress on alternative non-classical mechanisms of PCSK9 in atherosclerosis in patients with and without diabetes. *Cardiovasc Diabetol*, 2020. 19(1): p. 33
40. Tomkin, G.a.O., D., LDL as a Cause of Atherosclerosis. *The Open Atherosclerosis & Thrombosis Journal*, 2012. 5: p. 139.
41. Carvajal Carvajal, Carlos. (2017). El endotelio: estructura, función y disfunción endotelial. *Medicina Legal de Costa Rica*, 34(2), 90-100. Retrieved March 14, 2024, from http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152017000200090&lng=en&tlng=es.
42. World Health Organization. Familial Hypercholesterolemia: Report of a second WHO consultation, World Health Organisation, Human Genetics programme, Division of Non-communicable Diseases. World Health

Organization, Geneva, Switzerland (1999) (WHO publication no. WHO7HGN/FH/CONS/99.2).

43. Kastelein JJP, Reeskamp LF, Hovingh GK. Familial Hypercholesterolemia: The Most Common Monogenic Disorder in Humans. *J Am Coll Cardiol.* 2020; 75 (20): 2567-9.
44. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015 May;17(5):405-24. doi: 10.1038/gim.2015.30. Epub 2015 Mar 5. PMID: 25741868; PMCID: PMC4544753.
45. Richards CS, Bale S, Bellissimo DB, et al. ACMG recommendations for standards for interpretation and reporting of sequence variations: Revisions 2007. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics.* 2008 Apr;10(4):294-300. DOI: 10.1097/gim.0b013e31816b5cae. PMID: 18414213.
46. Hu, H., Chen, R., Hu, Y. et al. The LDLR c.501C>A is a disease-causing variant in familial hypercholesterolemia. *Lipids Health Dis* 20, 101 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12944-021-01536-3>
47. Bourbon, M., Alves, A. C., & Sijbrands, E. J. (2017). Low-density lipoprotein receptor mutational analysis in diagnosis of familial hypercholesterolemia. *Current opinion in lipidology*, 28(2), 120–129. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000404>

48. Benito-Vicente, A., Uribe, K. B., Jebari, S., Galicia-Garcia, U., Ostolaza, H., & Martin, C. (2018). Validation of LDLR Activity as a Tool to Improve Genetic Diagnosis of Familial Hypercholesterolemia: A Retrospective on Functional Characterization of LDLR Variants. *International journal of molecular sciences*, 19(6), 1676. <https://doi.org/10.3390/ijms19061676>
49. Sánchez, A., Bustos, P., Honorato, P., Sáez, K., Elim-Jannes, C., Barriga, N., Ibieta, G., Pérez, L., Alonso, R., Radojkovic, C., & Asenjo, S.. (2021). Identificación de variantes genéticas asociadas a hipercolesterolemia familiar en niños y adolescentes de la Región del Biobío, Chile. *Revista médica de Chile*, 149(9),1267-1274. <https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872021000901267>
50. Sánchez A, Bustos P, Honorato P, Burgos CF, Barriga N, Jannes CE, Sáez K, Alonso R, Asenjo S, Radojkovic C. Phenotypic characterization and predictive analysis of p.Asp47Asn LDL receptor mutation associated with Familial Hypercholesterolemia in a Chilean population. *J Clin Lipidol*. 2021 Mar-Apr;15(2):366-374.e1. doi: 10.1016/j.jacl.2021.01.002. Epub 2021 Jan 17. PMID: 33547002.
51. Varret M, et al. LDLR Database (second edition): new additions to the database and the software, and results of the first molecular analysis. *Nucleic Acids Res*. 1998; 26 (1): 248-52.
52. Benito-Vicente A, Siddiqi H, Uribe KB, Jebari S, Galicia-Garcia U, Larrea-Sebal A, Stef M, Ostolaza H, Palacios L, Martin C. p.(Asp47Asn) and p.(Thr62Met): non deleterious LDL receptor missense variants functionally

- characterized in vitro. *Sci Rep.* 2018 Nov 9;8(1):16614. doi: 10.1038/s41598-018-34715-x. PMID: 30413722; PMCID: PMC6226515
53. Gabcova-Balaziová, D., Staniková, D., Vohnout, B., Hucková, M., Staník, J., Klimes, I., Raslova, K., & Gasperikova, D. (2015). Molecular-genetic aspects of familial hypercholesterolemia. *Endocrine regulations*, 49(3), 164–181. https://doi.org/10.4149/endo_2015_03_164
54. Baek, Kyung-In & Ryu, Kitae. (2023). Role of Flow-Sensitive Endothelial Genes in Atherosclerosis and Antiatherogenic Therapeutics Development. *Journal of Cardiovascular Translational Research*. 1-15. 10.1007/s12265-023-10463-w
55. Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science (New York, N.Y.)*, 232(4746), 34–47. <https://doi.org/10.1126/science.3513311>
56. Arteaga LI, Antonio, Cuevas M, Ada, Rigotti R, Attilio, González, Francisco, Castillo, Sergio, Mata L, Pedro, & Alonso K, Rodrigo. (2007). Hipercolesterolemia familiar heterocigota: diagnóstico molecular y terapia combinada. Caso clínico. *Revista médica de Chile*, 135(2), 216-220. <https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872007000200011>
57. De Ferranti, S. D. (2015). Familial hypercholesterolemia in children and adolescents: A clinical perspective. *Journal of Clinical Lipidology*, 9(5), S11–S19. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2015.04.009>
58. Watts, G. F., Gidding, S. S., Hegele, R. A., Raal, F. J., Sturm, A. C., Jones, L. K., Santos, R. D. (2023). International Atherosclerosis Society guidance for

- implementing best practice in the care of familial hypercholesterolemia. *Nature Reviews Cardiology*, 20(12), 845–869
59. Guglielmi, V., Bellia, A., Pecchioli, S., Medea, G., Parretti, D., Lauro, D., Lapi, F. (2016). What is the actual epidemiology of familial hypercholesterolemia in Italy? Evidence from a National Primary Care Database. *International Journal of Cardiology*, 223, 701–705. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.08.269>
60. Di Tarento, M. D., D'Agostino, M. N., & Fortunato, G. (2015). Functional characterization of mutant genes associated with autosomal dominant familial hypercholesterolemia: integration and evolution of genetic diagnosis. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases: NMCD*, 25(11), 979–987. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2015.06.007>
61. Banerjee, P., Chan, K. C., Tarabocchia, M., Benito-Vicente, A., Alves, A. C., Uribe, K. B., Bourbon, M., Skiba, P. J., Pordy, R., Gipe, D. A., Gaudet, D., & Martin, C. (2019). Functional Analysis of LDLR (Low-Density Lipoprotein Receptor) Variants in Patient Lymphocytes to Assess the Effect of Evinacumab in Homozygous Familial Hypercholesterolemia Patients With a Spectrum of LDLR Activity. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 39(11), 2248–2260. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.313051>
62. Tada H, Kawashiri MA, Noguchi T, Mori M, Tsuchida M, Takata M, Nohara A, Inazu A, Kobayashi J, Yachie A, Mabuchi H, Yamagishi M. A novel method for determining functional LDL receptor activity in familial hypercholesterolemia: application of the CD3/CD28 assay in lymphocytes. *Clin Chim Acta*. 2009 Feb;400(1-2):42-7. doi: 10.1016/j.cca.2008.10.010. Epub 2008 Oct 26. PMID: 19013141.

63. Immune cell - LDLR - The Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000130164-LDLR/immune+cell>
64. Moore, K. J., & Freeman, M. W. (2006). Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 26(8), 1756-1765.
65. Schmitz, G., T. Bruning, E. Kovacs, and S. Barlage. 1993. Fluorescence flow cytometry of human leukocytes in the detection of LDL receptor defects in the differential diagnosis of hypercholesterolemia. *Arterioscler. Thromb.* 13: 1053-1065
66. Gratton, J., Humphries, S. E., & Futema, M. (2023). Prevalence of FH-Causing Variants and Impact on LDL-C Concentration in European, South Asian, and African Ancestry Groups of the UK Biobank-Brief Report. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 43(9), 1737–1742. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.123.319438>