



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

**ESTANDARIZACIÓN DE UNA METODOLOGÍA
PARA DETERMINAR LA INCORPORACIÓN DE
COLESTEROL LDL EN MACRÓFAGOS
DIFERENCIADOS DE MONOCITOS AISLADOS DE
SANGRE PERIFÉRICA**

POR CAROLINA ANDREA ALARCÓN REYES

Tesis presentada en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción
para optar al título profesional de Bioquímico

Profesor Patrocinante y Guía: Dr(a) Andrea Alejandra Sánchez Rubio
Departamento de Bioquímica e Inmunología
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

Marzo, 2024
Concepción, Chile

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

1. TABLA DE CONTENIDOS

1. TABLA DE CONTENIDOS.....	III
2. ÍNDICE DE TABLAS	IV
3. ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	V
4. RESUMEN.....	VII
5. ABSTRACT.....	IX
6. INTRODUCCIÓN	12
6.1 Enfermedades Cardiovasculares.....	12
6.2 Factores de Riesgo de las ECV	13
6.3 Hipercolesterolemia Familiar.....	14
6.4 Fisiopatología de la Hipercolesterolemia Familiar.....	16
6.5 Manifestaciones y diagnóstico de Hipercolesterolemia Familiar.....	20
6.6 Receptor LDL y mutaciones genéticas asociadas a HF	24
7. OBJETIVO GENERAL.....	28
8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
9. MATERIALES Y METODOLOGÍA	29
9.1. Aspectos bioéticos y de bioseguridad	29
9.2. Consentimiento informado.....	30
9.3. Estandarización de purificación y cultivo celular.....	31
9.3.1 Reclutamiento de muestras para el cultivo celular.....	31
9.3.2 Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y purificación de CD14 ⁺	32
9.3.3 Cultivo celular CD14 ⁺	33
9.3.4 Ensayos viabilidad en tiempo real	33
9.4. Reclutamiento de donantes extracción c-LDL.....	35
9.5. Extracción c-LDL.....	35
9.6. Tinción c-LDL.....	37

9.6.1	Dil (DiI _{C18}).....	37
9.6.2	FITC.....	38
9.7.	Ensayos de incorporación c-LDL	40
9.7.1	Optimización cultivo celular con c-LDL	40
9.7.2	Ensayos de transporte.....	42
9.8.	Procesamiento y análisis de datos <i>Incucyte</i>	42
9.9.	Microscopía confocal.....	43
9.9.1	Ensayos de transporte.....	43
9.9.2	Ensayos de competencia	44
9.10.	Análisis de datos	45
10.	RESULTADOS	46
10.1	Optimización Cultivo Celular y Viabilidad Celular Mediante Ensayos con SYTOX™Green	46
10.2	Optimización Ensayos de Transporte Intracelular de c-LDL en Célula Viva ..	49
10.3	Ensayos de Transporte en Monocitos Diferenciados a Macrófagos Usando Microscopía Confocal	59
11.	DISCUSIÓN	66
12.	CONCLUSIONES Y PROYECCIONES	72
13.	BIBLIOGRAFÍA	73
14.	GLOSARIO	79
15.	ANEXOS	81
15.1.	Anexo 1: Autorización comité Ético-Científico.....	81
15.2.	Anexo 2: Manejo de residuos.....	83
15.3.	Anexo 3: Procesamiento y análisis de datos <i>Incucyte</i>	85

2. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Criterios de inclusión y exclusión utilizados para incluir personas a este trabajo de tesis.....	30
Tabla II. Preparación de 100mL de medio de cultivo RPMI 1640 con suero SFB y LDFCS.....	34
Tabla III. Preparación del medio RPMI 1640 depletado de lípidos con c-LDL marcado.....	41
Tabla IV. Preparación del medio RPMI 1640 depletado de lípidos con c-LDL marcado y c-LDL frío.....	45
Tabla V. Representación porcentual de la intensidad de fluorescencia con respecto al control.....	57
Tabla VI. Intensidad de Fluorescencia Media para ensayos de transporte y competencia.....	65

3. ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Vía endógena y exógena del metabolismo del colesterol.....	18
Figura 2. Catabolismo del c-LDL en célula hepática.....	19
Figura 3. Manifestaciones clínicas asociadas a Hipercolesterolemia Familiar...	21
Figura 4. Criterio de la Red de Clínicas de Lípidos Holandesa (RCLH) para diagnosticar Hipercolesterolemia Familiar.....	22
Figura 5. Esquema de las clases de mutaciones asociadas a Hipercolesterolemia Familiar	25
Figura 6. Diagrama de flujo de metodologías utilizadas para caracterizar funcionalmente variantes del LDLr <i>ex vivo</i> e <i>in vitro</i>	27
Figura 7. Diagrama del flujo de trabajo para los ensayos de transporte con c-LDL marcado en célula viva.....	41
Figura 8. Diagrama del flujo de trabajo para los ensayos de transporte con c-LDL marcado en microscopía confocal.....	44
Figura 9. Optimización de la cantidad de células CD14 ⁺ a sembrar en una placa de 96 pocillos.....	47
Figura 10. Muerte celular en monocitos diferenciados a macrófagos en distintas condiciones de depletación de lípidos.....	48
Figura 11. Gráfico de intensidad de fluorescencia normalizada de c-LDL-Dil (DilC ₁₈) en monocitos diferenciados a macrófagos.....	50
Figura 12. Imágenes de los ensayos de transporte con c-LDL-Dil (DilC ₁₈) tomadas en equipo <i>Incucyte</i> S3.....	51
Figura 13. Gráfico de intensidad de fluorescencia normalizada de c-LDL-FITC en monocitos diferenciados a macrófagos.....	53
Figura 14. Fotografías de los ensayos de incorporación c-LDL-FITC tomadas en equipo <i>Incucyte</i> S3.....	54
Figura 15. Gráfico de Intensidad de fluorescencia normalizada de c-LDL-pHrodo Red en monocitos diferenciados a macrófagos.....	56
Figura 16. Fotografías de los ensayos de incorporación c-LDL-pHrodo Red tomadas en equipo <i>Incucyte</i> S3.....	58
Figura 17. Ensayo preliminar de incorporación de c-LDL marcado con Dil (DilC ₁₈) y FITC.....	60
Figura 18. Fotografías representativas de los ensayos de transporte en microscopía confocal.....	61
Figura 19. Fotografías representativas de los ensayos de competencia c-LDL marcado/c-LDL sin marcar en proporción 1:2.....	62

Figura 20. Fotografías representativas de los ensayos de competencia c-LDL marcado/c-LDL sin marcar en proporción 1:4.....	63
Figura 21. Gráfico de IFM para transporte normal, transporte 1:2 y transporte 1:4.....	64

4. RESUMEN

La Hipercolesterolemia Familiar (HF) es un trastorno hereditario que se caracteriza por niveles elevados de colesterol LDL en la sangre, lo que lleva a la manifestación temprana de enfermedad cardiovascular. Actualmente, gracias a los avances en secuenciación masiva y su acceso al público, el diagnóstico genético se ha posicionado como la herramienta más certera para poder determinar si alguien tiene o no la enfermedad, sin embargo, esta metodología sigue presentando algunas problemáticas, la más importante, la falta de información. El 80% de los pacientes diagnosticados con HF presentan mutaciones en el gen del *LDLR* y para 2021, se han descrito cerca de 3700 mutaciones asociadas a este, de las que solo un pequeño porcentaje ha sido validado funcionalmente, dejando a muchas de estas mutaciones sin caracterización de su nivel de patogenicidad, y, por consiguiente, dejando sin un diagnóstico claro. Es por todo esto, que el objetivo de este trabajo es estandarizar una metodología para determinar la incorporación de c-LDL en monocitos diferenciados a macrófagos como método de caracterización funcional del *LDLR* usando microscopia confocal y análisis con célula viva. Nuestros resultados muestran que los ensayos en célula viva si permiten detectar el ingreso de c-LDL

al interior celular, y sumado con lo observado en microscopia confocal, determinamos que el intervalo de tiempo de incorporación es entre 30 y 60 minutos.

5. ABSTRACT

Familial Hypercholesterolemia (FH) is an inherited disorder characterized by elevated levels of LDL cholesterol in the blood, leading to the early manifestation of cardiovascular disease. Currently, thanks to advances in massive sequencing and its access to the public, genetic diagnosis has positioned itself as the most accurate tool to determine whether someone has the disease or not, however, this methodology continues to present some problems, the most important of which is , lack of information. 80% of patients diagnosed with FH have mutations in the LDLR gene and by 2021, nearly 3,700 mutations associated with it have been described, of which only a small percentage has been functionally validated, leaving many of these mutations without characterization of its level of pathogenicity, and, consequently, leaving without a clear diagnosis. For all this, the objective of this work is to standardize a methodology to determine the incorporation of LDL-c in differentiated monocytes into macrophages as a method of functional characterization of LDLR using confocal microscopy and live cell analysis. Our results show that live cell assays do allow detecting the entry of LDL-C into the cell interior, and added to what was observed in confocal

microscopy, we determined that the incorporation time interval is between 30 and 60 minutes.

6. INTRODUCCIÓN

6.1 Enfermedades Cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) corresponden a un grupo de desórdenes que afectan la anatomía y fisiología del corazón, y de los vasos sanguíneos (Balakumar et al., 2016), caracterizado por la formación de placas ateroscleróticas, que llevan a la estrechez del lumen de los vasos sanguíneos, resultando en el aumento de la rigidez de estos y la disminución del flujo de sangre (AHA, 2021).

A nivel mundial, las ECV se erigen como la principal causa de muerte, cobrando aproximadamente 17.9 millones de vidas al año, siendo en mayor medida afectados países en vías de desarrollo y no desarrollados, debido a la falta de políticas públicas en salud e información que promuevan medidas preventivas que lleven a un estilo de vida saludable, que fomenten la realización de controles médicos regulares y/o que permitan administrar el tratamiento adecuado en cada caso (Mattiuzzi et al., 2020; Mensah, Roth, & Fuster, 2019; OMS, 2017). En Chile, dicha tendencia se replica, ya que según datos preliminares obtenidos por el Departamento de Estadísticas e Informaciones en

Salud (DEIS) para el 2023, se registraron cerca de 30.000 defunciones relacionadas a ECV (Garantizar et al., 2023), superando a otras enfermedades como cáncer y enfermedades respiratorias, realidad que se ha visto mantenida en los últimos 10-15 años (Aguilera et al., 2016; OPS, 2021). Esta situación representa un gran desafío para la salud pública, donde el enfoque primordial es la evaluación e intervención temprana de los factores de riesgo.

6.2 Factores de Riesgo de las ECV

Los factores de riesgo cardiovascular (FRCV) pueden ser descritos como un rasgo biológico, un hábito o un estilo de vida que aumentan la probabilidad de sufrir un evento cardiovascular (Lobos Bejarano & Brotons Cuixart, 2011). Según la Federación Mundial del Corazón (WHF), los FRCV se pueden clasificar como modificables, los cuales se pueden controlar mediante cambios en el estilo de vida, como la hipertensión arterial (HTA), tabaquismo, perfil lipídico alterado, Diabetes mellitus (DM), inactividad física, una dieta no saludable y sobrepeso/obesidad; y los no modificables, los cuales son constitutivos de la persona y no es posible revertirlos o eliminarlos, tales como la edad, sexo y la historia familiar o genética. De entre los FRCV mencionados, el rasgo genético

tiene un gran impacto con relación al riesgo cardiovascular, pues existen una amplia gama de alteraciones genéticas asociadas a síndromes metabólicos, ejemplo de ello son las dislipidemias y una de las más preponderantes en la población es la Hipercolesterolemia Familiar (WHF, 2022).

6.3 Hipercolesterolemia Familiar

La Hipercolesterolemia Familiar (HF) es un trastorno genético del metabolismo del colesterol de lipoproteínas de baja densidad (c-LDL) que se caracteriza por niveles anormalmente elevados de c-LDL en la sangre, la cual se manifiesta desde el nacimiento y tiene una alta tasa de morbi-mortalidad por ECV precoz (Jefford et al., 1974; Nordestgaard et al., 2013). La HF autosómica dominante se puede manifestar de dos maneras, como homocigoto (HoHF) cuando se heredan dos alelos mutados de un mismo gen; o como heterocigoto (HeHF) si se hereda un único alelo mutado (Hopkins et al., 2011).

La gran mayoría de las mutaciones asociadas a la HF autosómica dominante se encuentran en el gen del receptor de LDL (*LDLR*), comprendiendo entre el 80-90% de los casos; le siguen en relevancia las mutaciones en el gen

de la *Proprotein Convertase Subtilin/Kexin Type 9 (PCSK9)*; y el gen de la Apolipoproteína B (*APOB*), con una incidencia entre 5-10% y el 1%, respectivamente. Si bien existe una importante cantidad de pacientes que responden al perfil genético asociado a estas mutaciones (*LDLR/PCSK9/APOB*), también se han descrito una HF autosómica recesiva asociada a mutaciones en el gen de la proteína adaptadora del receptor de LDL (*LDLRAP1*) (Merchán et al., 2016), y una HF poligénica, que se describe como una serie de mutaciones simultaneas en diferentes genes relacionadas a la regulación del metabolismo del c-LDL (*Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)*) o a defectos epigenéticos (Sniderman et al., 2014; Futema et al., 2018).

A nivel mundial, la incidencia de la HeHF es mayor que la HoHF, con estimaciones de 1:250 y 1:400.000, respectivamente (Civeira et al., 2004; Mata et al., 2015; Berberich & Hegele, 2019); esto posiciona a la HF como una de las dislipidemias más comunes, sin embargo, normalmente es mal diagnosticada o subdiagnosticada, de hecho se considera que solo el 20% de quienes padecen esta enfermedad son diagnosticados y menos del 10% recibe el tratamiento adecuado, especialmente en la niñez (Benito-Vicente et al., 2018; Hopkins et al., 2011), esto lleva a tener una alta probabilidad de desarrollar ECV temprano.

En relación con esta enfermedad, actualmente en Chile no existe datos epidemiológicos de la prevalencia de esta patología, ni menos un programa de

detección temprana en el sistema de salud pública como el que se está desarrollando en otros países, principalmente europeos; un ejemplo claro es España que ha implementado protocolos de pesquisa temprana (Mata et al., 2015), sin embargo, se estima que la prevalencia de HF es similar a la presentada en la población hispana debido a nuestro estrecho linaje genético común (Sánchez et al., 2021).

6.4 Fisiopatología de la Hipercolesterolemia Familiar

Con el objetivo de comprender la fisiopatología de la HF, primero debemos tener en cuenta el metabolismo normal del c-LDL. En conjunto, las vías exógena y endógena del metabolismo del c-LDL desempeñan un papel crítico en el mantenimiento de los niveles adecuados de colesterol en el organismo, lo que es esencial para la salud cardiovascular y metabólica. La vía exógena está relacionada con la dieta, el colesterol contenido en los diferentes alimentos consumidos es absorbido en el intestino y llevado a través del torrente sanguíneo hasta el hígado por los Quilomicrones (QM), que está formado por la apolipoproteína B48 (ApoB48), fosfolípidos, Triglicéridos (TG) y colesterol esterificado. Este QM pierde TG por hidrólisis de la Lipoprotein-lipasa (LPL)

presente en los tejidos periféricos, formándose así un QM remanente (QMR) que llega al hígado, donde comienza la vía endógena que corresponde a todo el proceso de transporte de los lípidos en el cuerpo desde el hígado, este ocurre gracias a la producción de otra molécula, la lipoproteína de muy baja densidad (VLDL). La VLDL está compuesta también por una gran cantidad de fosfolípidos, TG, colesterol esterificado y la ApoB100; la VLDL es liberada a la sangre y es degradada por los diferentes tejidos del cuerpo gracias a la acción de las LPL, así se obtienen las lipoproteínas de densidad intermedia (c-IDL) y de baja densidad (c-LDL), siendo esta última de gran relevancia frente a la HF (H. Tomkin, 2012) (**Figura 1**).

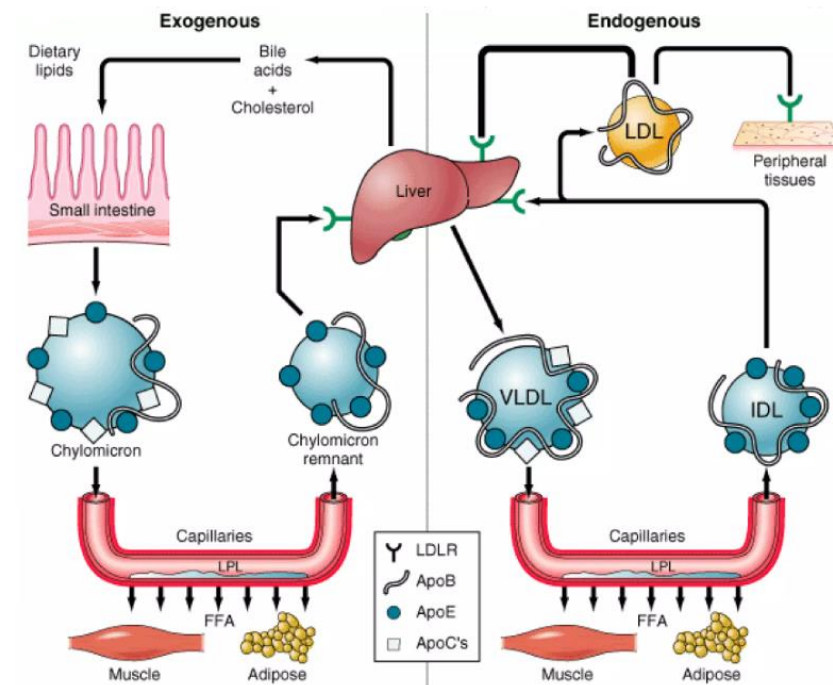


Figura 1. Vía endógena y exógena del metabolismo del colesterol. Extraído de Harrison: Principios de Medicina Interna. Vol.2. 19ªEd. Nueva York. McGraw-Hill; 2016. Pp. 3145-3161.

Una vez en circulación el c-LDL es captado por el tejido periférico y su catabolismo comienza en la membrana celular, donde se encuentra el receptor de LDL (LDLR), se conforma así el complejo LDL/LDLR gracias a la presencia de la apolipoproteína B (ApoB). Dicho complejo es invaginado gracias a la acción de la proteína adaptadora del receptor LDL (LDLRAP) y la vesícula resultante esta recubierta por clatrina; este endosoma temprano eventualmente pierde su

recubrimiento proteico y se fusiona con el lisosoma donde se produce un cambio de pH que permite la disociación del complejo LDL/LDLR, liberando así al receptor y dejando que este sea reciclado, y llevando a la degradación del c-LDL (Hovingh et al., 2013) (**Figura 2**). Es por ello que alteraciones en flujo normal del metabolismo de los lípidos conlleva a modificaciones en el perfil lipídico y por ende, a las dislipidemias.

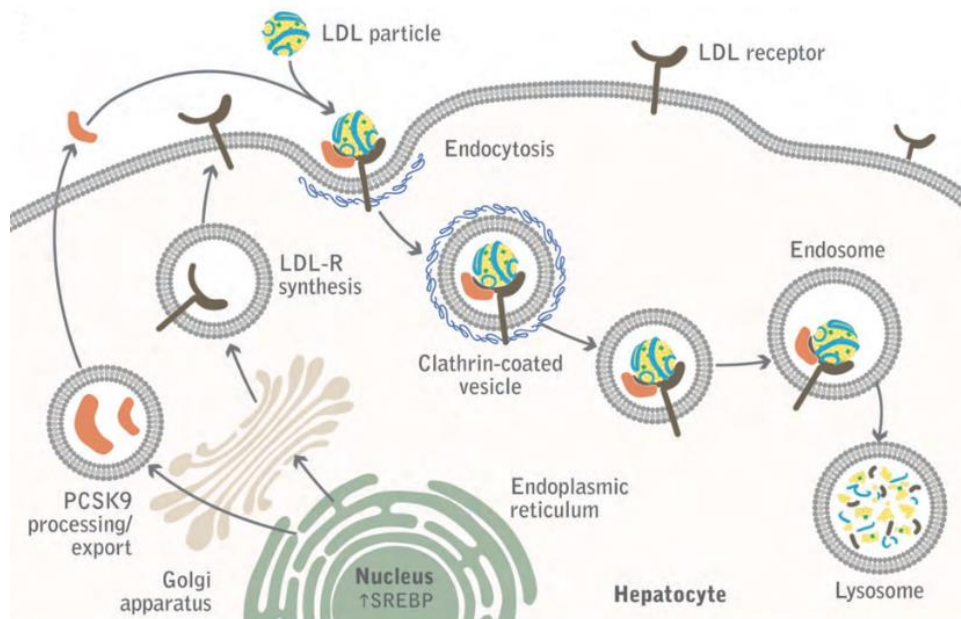


Figura 2. Catabolismo del c-LDL en célula hepática. Se esquematizan la síntesis del LDLR, el ingreso de la molécula de c-LDL mediada por el LDLR, los estadios del endosoma formado y su posterior unión con el lisosoma. También se representa a PCSK9 y su función reguladora. Extraído de Hovingh et al., 2013.

6.5 Manifestaciones y diagnóstico de Hipercolesterolemia Familiar

La HF presenta ciertas manifestaciones clínicas las cuales sirven como una primera aproximación diagnóstica. Entendiendo que es una enfermedad asociada al metabolismo de los lípidos, el perfil lipídico de los pacientes HF esta alterado con un colesterol total aumentado y un c-LDL con valores $>190\text{mg/dL}$, describiéndose valores de c-LDL $>500\text{mg/dL}$ en pacientes con HoHF (Merchán et al., 2016). Estos niveles de colesterol en sangre ocasiona que algunos pacientes desarrollen arco corneal (anillo blanco en la periferia del iris que cursa con aumento de la presión ocular), xantelasma palpebral (cumulo de grasa bajo la piel del parpado inferior o superior) y xantomas tendinosos (acumulación de grasa en zonas cercanas a tendones), principalmente en el tendón de Aquiles y tendones extensores de la mano (Asier Benito-Vicente et al., 2018) **(Figura 3)**. De la misma manera, ocurre la aparición temprana de aterosclerosis y estenosis aortica como consecuencia de este aumento de c-LDL y su acumulación en la túnica íntima (Watts et al., 2014; Holmes & Ala-Korpela, 2019).

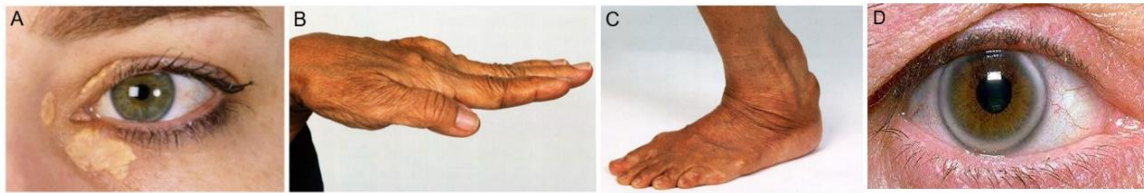


Figura 3. Manifestaciones clínicas asociadas a Hipercolesterolemia Familiar (A) Xantelasma palpebral. (B) Xantomas tendinosos. (C) Xantoma en tendón de Aquiles. (D) Arco corneal. Extraído y modificado de Page et al., 2014.

Si bien, las características clínicas de la HF pueden ser un punto de partida para iniciar un estudio, no todos los pacientes las presentan, por lo que el diagnóstico definitivo requiere la integración de diversos antecedentes personales y familiares, análisis clínicos, exámenes físicos y pruebas genéticas. En la actualidad, existen 3 herramientas clínicas recomendadas para realizar un primer diagnóstico de HF, estos son: Programa *Make Early Diagnosis to Prevent Early Deaths* (MEDPED); Criterio *Simon Broome* y el Criterios de la Red de Clínicas de Lípidos Holandesa (RCLH); siendo este último el más utilizado por incluir análisis genético (**Figura 4**), posicionándolo como el método *Gold standard* para diagnosticar esta patología (Civeira et al., 2004; Mata et al., 2015). Además, el RCLH categoriza a cada paciente de acuerdo con una cantidad de puntos adjudicados según la información obtenida; es un diagnóstico de certeza cuando se tienen 8 o más puntos, un diagnóstico probable si se tienen 6-7 puntos, y un diagnóstico posible si se tienen 3-5 puntos.

Clinical diagnosis of heterozygous familial hypercholesterolemia used by Dutch MEDPED group [48]	
Family history	Score
I. First-degree relative with premature coronary or vascular disease	1
II. First-degree relative with LDL-c levels >95th percentile, and/or	1
I. First-degree relative with tendon xanthomas and/or arcus cornealis	2
II. Children <18 years old with LDL-c levels >95th percentile	2
Personal history	
I. Coronary heart disease	2
II. Premature peripheral or cerebrovascular disease	1
Physical signs	
I. Tendon xanthomas	6
II. Arcus cornealis (<45 years old)	4
Blood analysis (with triglyceride levels <200 mg/dl, <2.3 mmol/l)	
I. LDL-c >330 mg/dl (8.5 mmol/l)	8
II. LDL-c 250–329 mg/dl (6.5–8.5 mmol/l)	5
III. LDL-c 190–249 mg/dl (4.9–6.5 mmol/l)	3
IV. LDL-c 155–189 mg/dl (4.0–4.9 mmol/l)	1
DNA analysis	
Functional mutation in LDL receptor gene present	8
Diagnostic total score: certain: ≥ 8 ; probable: 6–7; possible: 3–5.	

Figura 4. Criterio de la Red de Clínicas de Lípidos Holandesa (RCLH) para diagnosticar Hipercolesterolemia Familiar, incluye puntaje asociado y valores del score para la categorización de pacientes. Civeira et al., 2004.

Aunque estos algoritmos clínicos son de gran utilidad siguen teniendo una serie de limitaciones (1) Dificultad en la obtención de una adecuada historia familiar, (2) dificultad para diferenciar la HF de otras dislipemias, basándose exclusivamente en los niveles de c-LDL, (3) problemas para diagnosticar

precozmente a los familiares en función de los niveles de c-LDL y (4) casos de familias que cumplen los criterios clínicos y que no presentan una Hipercolesterolemia Familiar; es por esto que el énfasis en el uso de las herramientas moleculares disponibles es indispensable y la mejor opción para conseguir diagnósticos definitivos. Puntualmente para la HF el análisis genético está enfocado en las mutaciones del gen *LDLR*, por ser el que suele comprender entre el 80-90% de los caso.

En Chile, no tenemos información epidemiológica oficial sobre la prevalencia de la HF, los trabajos de investigación preliminares de nuestro laboratorio han obtenido datos relevante sobre pacientes del sistema público con perfiles lipídicos alterados y al hacer genotipificación por Secuenciación Masiva de Nueva Generación (NGS) para evaluar la presencia de mutaciones en la población de estudio, se reportó que 40 pacientes presentaron mutaciones asociadas a HF; de las que 90% tiene una mutación en el gen *LDLR*, el 2% en el gen *APOE*, el 5% son He compuestos, es decir, eran heterocigotos para 2 mutaciones distintas, y el 3% son He dobles, o sea, que porta dos mutaciones diferentes en genes distintos. De este grupo, al evaluar las mutaciones del gen *LDLR*, se identificó que un 33% de los pacientes tienen una variante patogénica (Ser326Cys) y un 67% presentan una mutación VUS (p.Asp47Asn o duplicación de exones 13 al 15). Para estos pacientes, el diagnóstico genético queda

inconcluso, por lo que la evaluación funcional de estas variantes es apremiante (Sánchez et al., 2021).

6.6 Receptor LDL y mutaciones genéticas asociadas a HF

El receptor de LDL (LDLR) está codificado en el brazo corto del cromosoma 19 (19p13.1-13.3) (Hopkins et al., 2011) y asociada a la HF existen cerca de 3700 mutaciones descritas en este (Berberich & Hegele, 2019; Hu et al., 2021), desafortunadamente, dicha información no es completamente útil para hacer un diagnóstico genético certero debido a la falta de datos conclusivos sobre la patogenicidad de estas.

Una forma de establecer la patogenicidad de las mutaciones asociadas a HF es a través de su distribución en 6 clases de mutaciones: Clase 1: ausencia en la síntesis del receptor; Clase 2: transporte defectuoso desde el retículo endoplasmático a la membrana; Clase 3: unión anormal de ApoB; Clase 4: problemas de internalización; Clase 5: problemas de reciclaje del receptor; y Clase 6: falla en la orientación del receptor hacia la membrana basolateral

(Figura 5). (Sniderman, Tsimikas, & Fazio, 2014; Benito-Vicente et al., 2018; Banerjee et al., 2019; Berberich & Hegele, 2019; Real & Ascaso, 2021).

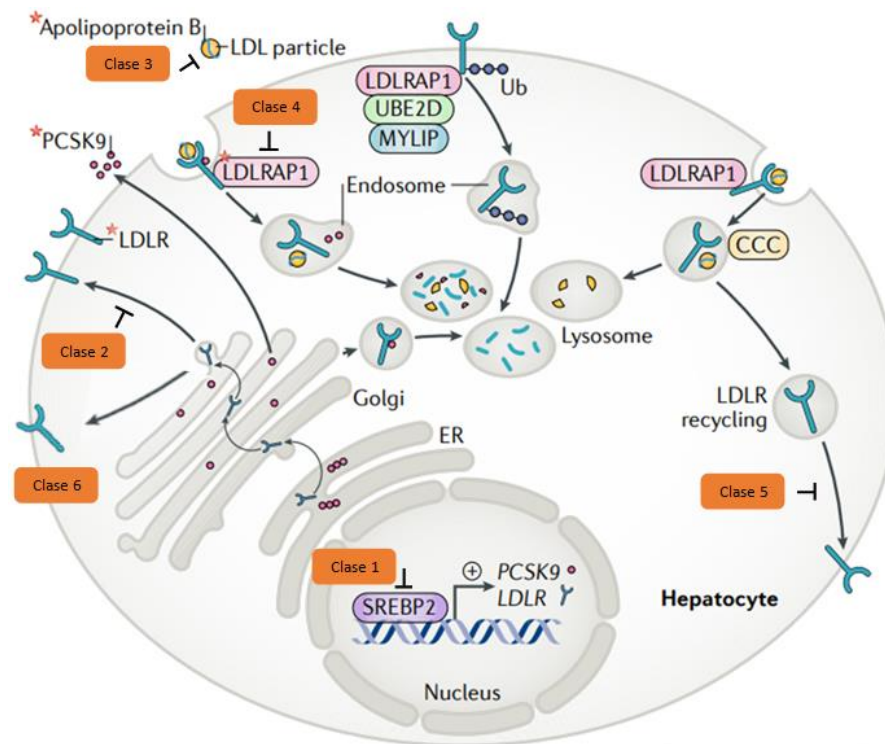


Figura 5. Esquema de las clases de mutaciones asociadas al LDLR en la Hipercolesterolemia Familiar. Se presentan las distintas moléculas reguladoras en la síntesis, expresión, maduración y liberación del LDLR. Extraído y modificado desde Berberich et al. 2018.

Para ello, el Colegio Americano de Medicina Genética (ACMG), ha establecido que existen 5 criterios de clasificación para determinar la patogenicidad de las mutaciones genéticas: patogénica, probablemente patogénica, de significado incierto (VUS), probablemente benigna y benigna. Si bien, Sin embargo, solo el 15% de las mutaciones en el LDLR han sido validadas mediante ensayos funcionales completos.

En este contexto, existen diversas propuestas para establecer el efecto funcional las variantes de HF, los cuales incluyen caracterización fenotípica de los pacientes portadores, algoritmos de predicción realizados en computadora (análisis *in silico*) y evidencia experimental, *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*, siendo estos últimos, utilizados como método directo para determinar la actividad de la proteína. Es así, que se han reportado una serie de aproximaciones experimentales para poder evaluar la actividad del receptor, utilizando una combinación de diferentes técnicas: *Western Blot*, citometría de flujo e Inmunocitoquímica y captación de LDL, estableciendo a qué tipo de clase pertenece la mutación estudiada y contribuyendo a la comprensión del fenotipo que presentan algunos pacientes (**Figura 6**) (Asier Benito-Vicente et al., 2018). Por lo que estandarizar e implementar ensayos de incorporación o transporte de LDL en un modelo celular *ex vivo* aportaría información adicional y complementaria a la evaluación funcional de las mutaciones.

7. OBJETIVO GENERAL

Estandarizar las técnicas de incorporación de c-LDL en monocitos diferenciados a macrófagos obtenidos de personas no portadora de Hipercolesterolemia Familiar.

8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Definir las condiciones óptimas de tratamiento y cultivo celular para la incorporación de c-LDL en monocitos diferenciados a macrófagos
- II. Estandarizar las técnicas basadas en imágenes y en tiempo real de incorporación de c-LDL en monocitos diferenciados a macrófagos

9. MATERIALES Y METODOLOGÍA

9.1. Aspectos bioéticos y de bioseguridad

Los aspectos bioéticos de este trabajo están recogidos por la Declaración de Helsinki que regula la investigación con seres humanos, y por la Ley Chilena n°20.120. El proyecto de investigación ejecutado fue revisado y aprobado por el Comité Ético-Científico del Servicio de Salud Concepción **(Anexo1)**.

En lo que compete a las normas de bioseguridad, la manipulación de muestras de sangre se realizará 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)**.

9.2. Consentimiento informado

Este estudio contempla el reclutamiento de personas que cumplan los criterios de inclusión y ninguno de exclusión de la **Tabla I**, previa firma de consentimiento informado y/o asentimiento informado según corresponda.

Tabla I. Criterios de inclusión y exclusión utilizados para incluir personas a este trabajo de tesis. Modificada de Mata et al., 2015.

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
Persona mayos de 18 años	Negación de firma de consentimiento informado
Normolipémicos	Poseer mutaciones asociadas a HF

OBJETIVO I: Definir las condiciones óptimas de tratamiento y cultivo celular para la incorporación de c-LDL en monocitos diferenciados a macrófagos

9.3. Estandarización de purificación y cultivo celular

9.3.1 Reclutamiento de muestras para el cultivo celular

El número de muestras utilizado en este estudio es por conveniencia, con personas no portadores de Hipercolesterolemia Familiar que cumplieran con los criterios de la **Tabla I**. Se les extrajo 20 mL de sangre venosa para realizar los cultivos celulares que se describen a continuación.

9.3.2 Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y purificación de CD14⁺

Desde 20 mL de sangre se obtuvo la capa de PMBC por medio de la adición de medio separador (Corning®) en relación 2:1 con el volumen de sangre diluida en Tampón Fosfato Salino 1X (PBS 1X; NaCl (137mM), KCl (2.7mM), Na₂HPO₄ (8.1mM), KH₂PO₄ (1.5mM) a pH 7.4), 1:1 y centrifugación 200 x g por 20 minutos. Posteriormente, las células se contaron y re-suspendieron en 80 µL de Buffer Beads (PBS 1X, pH 7.2, Albúmina de Suero Bovino 0.5%p/v (BSA 0.5%p/v) y EDTA 2mM) y 20 µL CD14⁺ *MicroBeads* por cada 10⁷ células, se mezcla e incuba 15 minutos a 4°C. Transcurrido el tiempo, las células se lavan con *Buffer Beads* y se centrifugan a 300 x g por 10 minutos. Luego, el pellet se re-suspendió en *Buffer Beads* y, posteriormente, sembradas en columnas MACS, según instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec).

9.3.3 Cultivo celular CD14⁺

Las células CD14⁺ fueron sembradas en placas de 96 pocillo (Corning®) para el trabajo en el equipo *Incucyte* S3 y en placa de 24 pocillos para el trabajo en microscopía confocal. El cultivo fue en condiciones estándar de cultivo celular a 37±1°C y 5% CO₂ en medio de cultivo completo, RPMI 1640 (Gibco) al 10% de suero bovino fetal (SBF), Penicilina/Estreptomicina (Pen/Strep) 100X, Glutamina 100X. Finalmente, las células se incubaron por 7 días en medio de cultivo completo suplementado con GM-CSF 25 µg/mL (Sigma) para su utilización. En el caso de las placas de 96 pocillos, se determinará la densidad celular probando 3 densidades celulares diferentes: (1) 15000 células/pocillo; (2) 30000 células/pocillo; (3) 50000 células/pocillo.

9.3.4 Ensayos viabilidad en tiempo real

Las células CD14⁺ sembradas en placas de 96 pocillos, se incubaron en las condiciones previamente mencionadas. El ensayo de viabilidad se realizó en el equipo *Incucyte* S3. Brevemente, las células se lavaron dos veces con PBS 1X

estéril y fueron incubadas en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con distintas proporciones de SBF y suero bovino fetal depletado de lipoproteínas (LDFCS), en proporción: (1) 10% SBF, (2) 2.5% LDFCS - 7.5% SBF, (3) 5% LDFCS - 5% SBF, (4) 7.5% LDFCS - 2.5% SBF, y (5) 10% LDFCS (**Tabla II**). Para visualizar la muerte celular se empleó la sonda SYTOX™Green (ThermoFisher) y para la visualización y análisis de 4 fotografías por pocillo cada 1hr por 12 horas con aumento 20X. Todos los parámetros se setean en el programa *Incucyte 2019B Controller*.

Tabla II. Preparación de 100mL de medio de cultivo RPMI 1640 con suero SFB y LDFCS.

	Porcentaje de delipidación				
	0% Delipidado	25% Delipidado	50% Delipidado	75% Delipidado	100% Delipidado
RPMI 1640	88mL	88mL	88mL	88mL	88mL
Glutamina 1X	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL
Antibiótico 1X	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL
SFB	10mL	7.5mL	5mL	2.5mL	0mL
LDFCS	0mL	2.5mL	5mL	7.5mL	10mL

OBJETIVO II: Estandarizar las técnicas basadas en imágenes y en tiempo real de incorporación de c-LDL en monocitos diferenciados a macrófagos

9.4. Reclutamiento de donantes extracción c-LDL

Para el proceso de purificación de c-LDL se solicitó la donación de sangre a personas sanas, no fumadores, normo-peso, normo-lipídemicos, que hagan deporte regularmente, con previa firma del consentimiento informado. La donación contempla un ayuno por 12 horas. Se extrajeron aproximadamente 50mL de sangre venosa a cada donante en tubos con anticoagulante (EDTA 10X).

9.5. Extracción c-LDL

Los 50mL sangre venosa obtenida de los donantes se llevó a tubos con anticoagulante (EDTA 1mg/mL), la sangre se centrifugo a 1000 x g por 20min, al plasma obtenido se le agrega Pen/Strep 100X y se llevó a los tubos especiales para la ultracentrífuga. Las condiciones de centrifugado fueron 146.682 x g por

20 horas a 15°C. Finalizando el centrifugado, se recuperó el anillo superior y se elimina. Se agregó Bromuro de potasio (KBr) para ajustar la densidad del infranadante a 1,063g/mL según la **ecuación 1**:

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

ρ_i = densidad inicial del infranadante

ρ_f = densidad final del infranadante

V = volumen obtenido del infranadante

Se centrifugo el infranadante ajustado con KBr, bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Se recupero el anillo superior y parte del infranadante. Lo obtenido, se llevó a diálisis sucesivas en PBS 1X por 48 horas en oscuridad a 4°C en una membrana con poro de 10 kDa. Luego de la diálisis, se cuantifico usando el *Pierce™ BCA Protein Assay kit* (ThermoFisher). Para su almacenaje, el c-LDL se lleva a refrigeración, bajo atmosfera de N₂ y en oscuridad.

9.6. Tinción c-LDL

9.6.1 Dil (DiIC₁₈)

Una solución Stock de Dil (DiIC₁₈) (ThermoFisher) fue preparada a una concentración de 3mg/mL en Dimetilsulfóxido (DMSO), sonicando por 10min y filtrada por 0.22µm; se almacena refrigerado y en oscuridad. Para la tinción, se comenzó diluyendo el c-LDL purificado a una concentración de 0.5mg/mL con una solución de PBS 1X con BSA 1%p/v. Se añaden 0.3mL de la solución Stock de Dil (DiIC₁₈) por cada 1mL de c-LDL 0.5mg/mL. Se lleva a incubación a 37±1°C por 18 horas, en oscuridad. Luego, se añadió KBr según la **ecuación 1** y se ultracentrifugó, dializó, cuantificó y almacenó bajo las mismas condiciones descritas en el **punto 9.5** (Probes, 2001).

9.6.2 FITC

Para la tinción con *Fluorescein IsoThioCyanate* (FITC) se usó el *FluoReporter® FITC Protein Labeling kit* (ThermoFisher) y se siguen las instrucciones del fabricante. Se inicio preparando la solución stock FITC; por 370ug de liofilizado se agregan 37uL de DMSO para una concentración final de 10mg/mL. Se calculo la cantidad de colorante FITC a usar según la cantidad de proteína contenida en la solución de acuerdo con la **ecuación 2**:

$$\mu L \text{ Solución Stock FITC} = \frac{\left[\frac{mg}{mL}\right]_{proteína} \times 0.2mL}{MW_{Proteína}} \times 389 \times 100 \times MR$$

- 0.2mL es el volumen de la solución a teñir
- 389 es el MW_{FITC}
- 100 es un factor de corrección
- MR es la proporción molar entre el colorante y la proteína

Para determinar los μL Solución Stock FITC a usar para teñir c-LDL 1mg/mL, se reemplazan los datos en la **ecuación 2**: c-LDL = 1mg/mL; MR = 60;

$MW_{Proteína} = 516$ kiloDalton (kDa). Por cada 200 μ L de la solución c-LDL 1mg/mL se agregó 20 μ L de Tampón Bicarbonato de sodio 1M ($NaHCO_3$ 1M), pH 9, recién preparado, y se llevó a agitación protegido de la luz. Se añade entonces a la solución en agitación la cantidad calculada de Solución Stock FITC y se deja reaccionar por 1 hora a temperatura ambiente. Al terminar la reacción, se lleva a diálisis intensiva por 48 horas en PBS 1X a 4°C en oscuridad y almaceno bajo las mismas condiciones descritas en el **punto 9.5** (Thermofisher, 2011)

9.6.3 pHrodo™Red

El protocolo rápido de reacción del *Amine-Reactive pHrodo™Red Dyes kit* (ThermoFisher) fue realizado considerando las instrucciones del fabricante. Para ello, la Solución Stock *pHrodo™Red* fue preparada re-suspendiendo 1mg de liofilizado en 75 μ L DMSO para una concentración final de 10mM. La solución c-LDL a teñir fue preparada diluyendo a una concentración final de 5mg/mL considerando un volumen de 1/10 de $NaHCO_3$ 1M, pH 8.3. La reacción de marcaje fue realizada utilizando con un ratio molar entre tinción y proteína igual a 20. En agitación y protegido de la luz, la reacción ocurre de 15-60 minutos a temperatura ambiente. Al terminar la reacción, la muestra fue centrifugada en

columnas de filtración en gel por 5 min a 1100 x g y se almaceno bajo las mismas condiciones descritas en el **punto 9.5** (Molecular Probes Inc., 2012).

9.7. Ensayos de incorporación c-LDL

9.7.1 Optimización cultivo celular con c-LDL

Para la optimización del cultivo celular con c-LDL marcado, las células CD14⁺ diferenciadas que fueron sembradas en placas de 96 pocillos, pre-incubadas 4 horas con el medio depletado de lípidos y, posteriormente, distintas concentraciones finales de c-LDL-Dil (DilC₁₈), c-LDL-FITC; c-LDL-phrodo Red: (1) 0µg/mL, (2) 10µg/mL, (3) 15µg/mL, (4) 20µg/mL, (5) 25µg/mL y (6) 30 µg/mL fueron incorporadas al medio de cultivo por triplicado (**Tabla III**). El tiempo de incubación en el equipo *Incucyte* S3 para todos los ensayos de transporte fue de 6 horas (**Figura 7**).

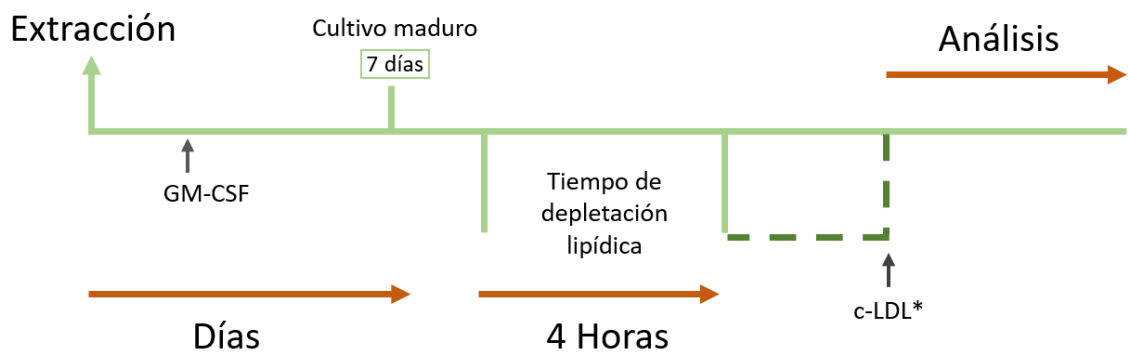


Figura 7. Diagrama del flujo de trabajo para los ensayos de transporte con c-LDL marcado en célula viva.

Tabla III. Preparación del medio RPMI 1640 depletado de lípidos con c-LDL marcado. Considerando una concentración inicial de solución c-LDL marcada de 1mg/mL y un volumen final de 160µL de medio por pocillo.

	Concentración de c-LDL					
	0µg/mL	10µg/mL	15µg/mL	20µg/mL	25µg/mL	30µg/mL
c-LDL marcado	0µL	1.6µL	2.4µL	3.2µL	4µL	4.8µL
RPMI 1640	160µL	158.4µL	157.6µL	156.8µL	156µL	155.2µL

9.7.2 Ensayos de transporte

El ensayo de transporte fue realizado en el equipo de incubación e imagenología *Incucyte* S3 utilizando el programa *Incucyte 2019B Controller* a través de la adquisición de 4 fotografías por pocillo cada 1 hora con aumento 10X para el transporte con c-LDL-Dil (DilC₁₈), 4 fotografías por pocillo cada 30 minutos con aumento 20X para el transporte con c-LDL-FITC y 4 fotografías por pocillo cada 15 minutos con aumento 20X para el transporte con c-LDL-phrodo Red.

9.8. Procesamiento y análisis de datos *Incucyte*

Una vez terminado el ensayo, se exportan los datos desde el ***Incucyte Graphical User Interface*** y se analizaron los parámetros de intensidad de fluorescencia versus tiempo, para posteriormente normalizarlo por el área celular (Essen Bioscience, 2017; Note, n.d.; Ritter et al., 2020) (**Anexo 3**).

9.9. Microscopía confocal

9.9.1 Ensayos de transporte

Las células CD14⁺ fueron previamente sembrados en vidrios estériles en placas de 24 pocillos e incubadas en las condiciones previamente mencionada. Para el ensayo de transporte, las células fueron incubadas a 0 min, 15 min, 30 min, 60 min, 90 min, 120 min y 180 min con y con 20µg/mL de c-LDL marcada con Dil (DilC¹⁸) y FITC (**Figura 8**). Luego, las células fueron fijadas con PFA 4%p/v en PBS 1X por 10 minutos, lavadas con *Trypan Blue* al 0.2%v/v y permeabilizadas con Tris-PO₄ 1X (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. La membrana celular y núcleo fueron marcadas con CF594®WGA (Biotium) y DAPI (ThermoFisher), respectivamente. Los resultados fueron visualizados por microscopía confocal en el microscopio multifotón espectral LSM 780 Zeiss y el análisis de datos fue realizado en software *ImageJ* y *Zeiss Zen Lite*.

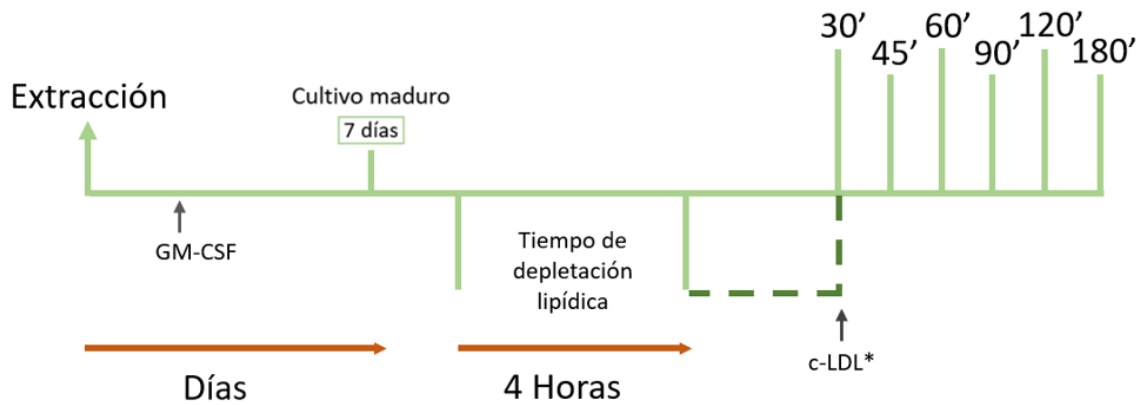


Figura 8. Diagrama del flujo de trabajo para los ensayos de transporte con c-LDL marcado en microscopía confocal.

9.9.2 Ensayos de competencia

Para los ensayos de competencia, las células CD14⁺ fueron sembradas e incubadas en las condiciones mencionadas en el **punto 9.9.1** utilizando los tiempos de transporte 0, 15, 30, 60, 90, 120 y 180min de incorporación de c-LDL, marcada versus sin marcar “fría” en proporciones 1:2 y 1:4. En la **Tabla IV**, se adjunta la preparación para que el medio de cultivo corresponda a las condiciones probadas. Luego, todas las células fueron fijadas como se menciona en el **punto 9.9.1**.

Tabla IV. Preparación del medio RPMI 1640 depletado de lípidos con c-LDL marcado y c-LDL frío. Considerando una concentración inicial de solución c-LDL marcada y no marcada de 1mg/mL y un volumen final de 160µL de medio por pocillo.

	Proporción c-LDL marcada/c-LDL frío	
	1:2	1:4
c-LDL marcado	3.2µL	3.2µL
c-LDL frío	6.4µL	12.8µL
RPMI 1640	150.4µL	144µL

9.10. Análisis de datos.

Las imágenes y datos en tablas fueron analizadas estadísticamente utilizando el programa *Prism GraphPad* versión 10.2.1 (Dotmatic). Los valores obtenidos fueron expresados como promedio $\pm$ desviación estándar (SD). Las diferencias estadísticas fueron determinadas usando las herramientas estadísticas *t* de *Student* y test ANOVA de dos vías, considerando un $p < 0.05$ como significativo.

10. RESULTADOS

10.1 Optimización Cultivo Celular y Viabilidad Celular Mediante Ensayos con SYTOX™Green

Con el objetivo de estandarizar las condiciones experimentales, 5000 células/pocillo, 30000 células/pocillo y 50000 células/pocillo fueron sembradas en placas de 96 pocillos y evaluadas para determinar la mejor visualización y definición célula-célula. Posteriormente, las condiciones fueron analizadas en el equipo *Incucyte* S3, cuyas imágenes representativas se observan en la **Figura 9**, definiendo que la menor densidad probada, 15000 células/pocillo, presentó un gran espacio entre células, zonas muy despobladas y pocas células en el campo (**Figura 9-A**). En contraste a lo que se observa en la **Figura 9-C**, la que representa la mayor densidad, en la cual se visualiza una gran cantidad de células por plano, poco espacio entre células y superposición celular. Finalmente, en la densidad intermedia, 30000 células/pocillo, se observa la condición óptima de distribución, separación y cantidad de células por plano (**Figura 9-B**), siendo esta condición la seleccionada para todos los ensayos de incorporación en célula viva.

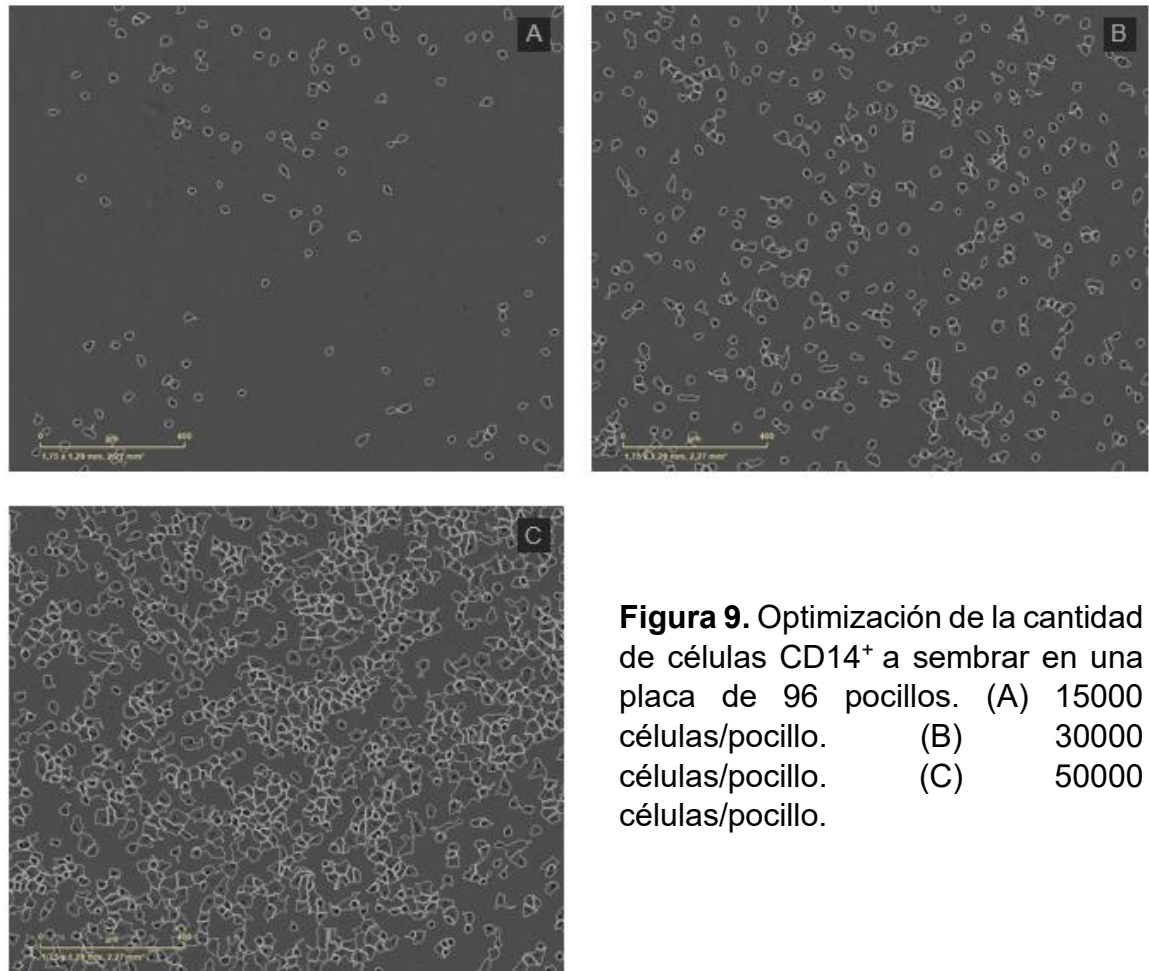


Figura 9. Optimización de la cantidad de células CD14⁺ a sembrar en una placa de 96 pocillos. (A) 15000 células/pocillo. (B) 30000 células/pocillo. (C) 50000 células/pocillo.

Con el objetivo de establecer la viabilidad de las condiciones de cultivo para la depleción de lípidos, los monocitos diferenciados a macrófagos fueron incubados con distintas proporciones de SFB/LDFCS en el medio de cultivo RPMI 1640 y la sonda comercial de viabilidad SYTOXTMGreen, observándose que hubo una muerte celular cercana al 10% en las condiciones 25%, 50% y 100% de delipidación (depletación lipídica) y para la condición 75% delipidado, la muerte

llego hasta un 20%; el porcentaje de muerte se mantiene relativamente constante a través del tiempo para las 4 condiciones probadas (**Figura 10**).

Por lo tanto, considerando los resultados indicados previamente, las condiciones óptimas para analizar la incorporación de c-LDL en el equipo *Incucyte* S3 son una densidad de 30000 células/pocillo y con medio de cultivo RPMI 1640 al 10% LDFCS (100% delipidado), con un tiempo de pre-incubación de 4 horas.

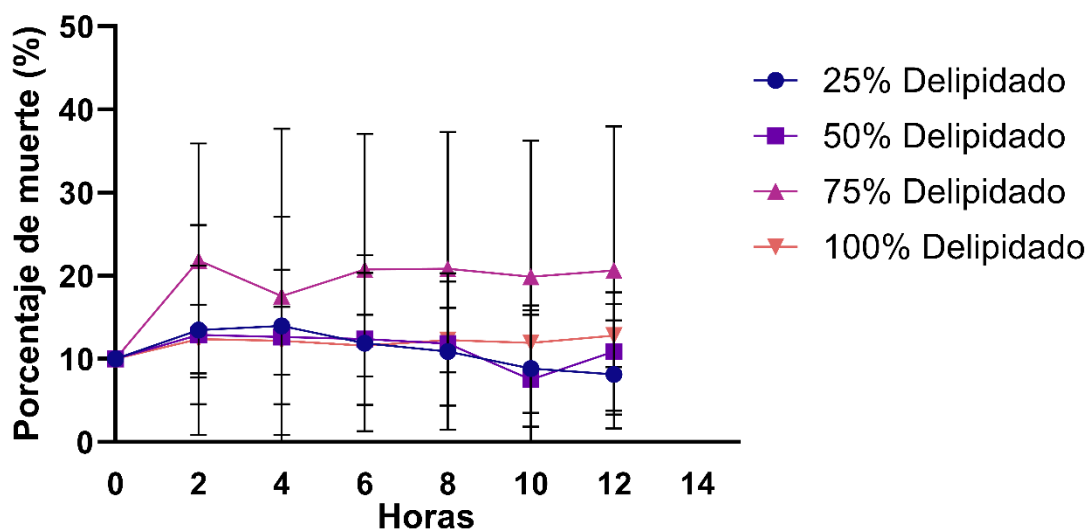


Figura 10. Muerte celular en monocitos diferenciados a macrófagos en distintas condiciones de depletación de lípidos. Las 4 condiciones de cultivo probadas fueron medio de cultivo 25% delipidado, medio de cultivo 50% delipidado, medio de cultivo 75% delipidado y medio de cultivo 100% delipidado. (N=5)

10.2 Optimización Ensayos de Transporte Intracelular de c-LDL en Célula Viva

Con el objetivo de estandarizar los ensayos de incorporación de c-LDL en el equipo *Incucyte* S3, concentraciones de 10µg/mL hasta los 30µg/mL de c-LDL marcada con Dil (DilC₁₈), FITC (*Fluorescein IsoThioCyanate*) y pHrodo Red fueron analizadas cada 15 minutos hasta 1 hora. Para el análisis de los datos conseguidos para cada tinción, se utilizó el control para eliminar toda la señal que fuera ruido de fondo. En el análisis de los resultados obtenidos con LDL-Dil (DilC₁₈), se observó que, a las concentraciones de 20µg/mL, 25µg/mL y 30µg/mL, la intensidad de fluorescencia es constante a través del tiempo. A diferencia de lo que ocurren en la concentración de 15µg/mL, en la cual se observa un aumento discreto a la 1 hora de incubación y no así a 10µg/mL, en la cual hay un aumento sostenido durante el tiempo evaluado (**Figura 11**).

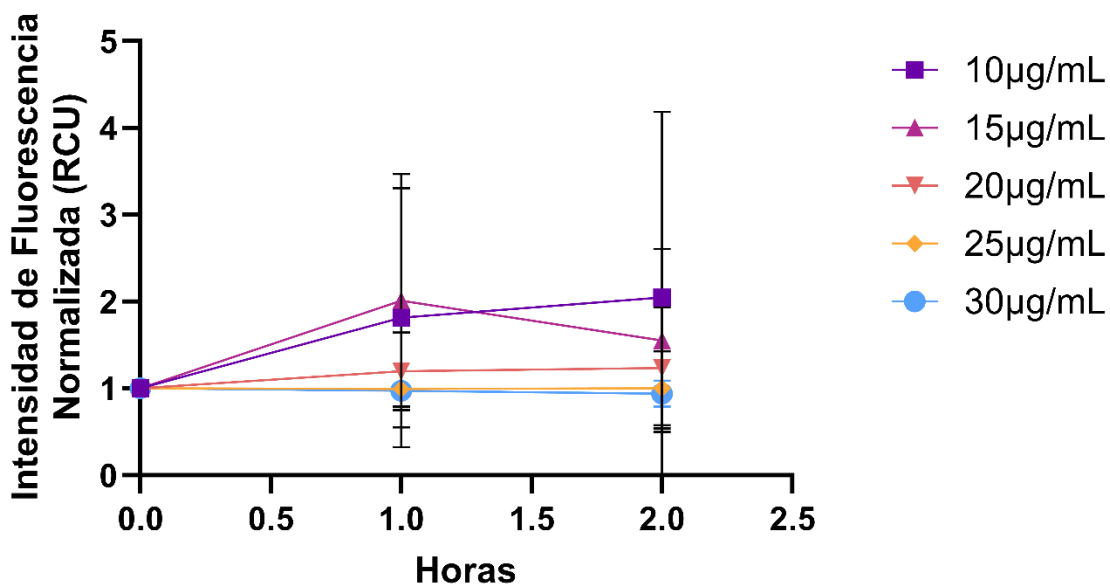


Figura 11. Gráfico de intensidad de fluorescencia normalizada de c-LDL-Dil (DilC₁₈) en monocitos diferenciados a macrófagos. (N=3)

Al analizar las imágenes obtenidas del Incucyte se observa que a 10µg/mL, 20µg/mL y 30µg/mL, existe señal roja asociada a la presencia de c-LDL-Dil (DilC₁₈) en la zona delimitada como célula, la cual desaparece al pasar el tiempo, sugiriendo la incorporación efectiva y posterior metabolización del c-LDL. Sin embargo, a concentraciones 15µg/mL y 25µg/mL, presentan adicionalmente señal fuera del contorno celular y algunas señales que no desaparece a través del tiempo, lo cual corresponde a precipitado inespecífico.

Sumado a esto, la baja señal fluorescentes, hace que la tinción Dil (DilC¹⁸) no sería de utilidad para el análisis de incorporación de c-LDL en macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica por una técnica de célula viva (Figura 12).

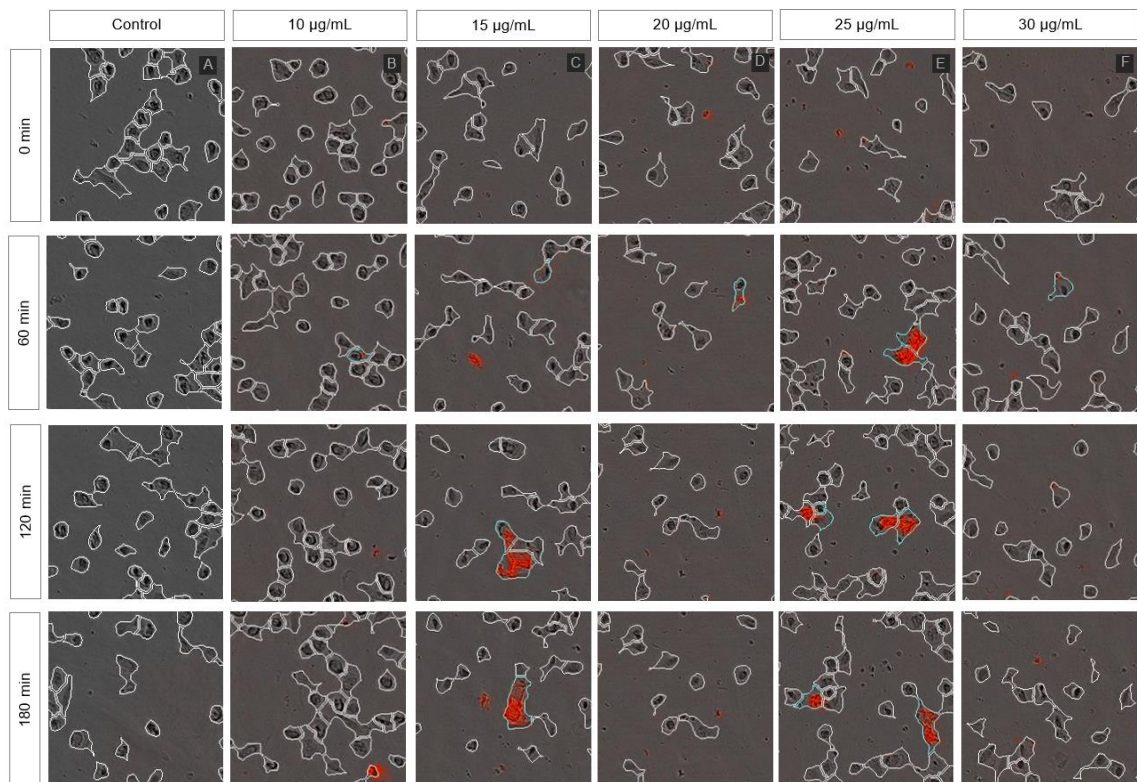


Figura 12. Imágenes de los ensayos de transporte con c-LDL-Dil (DilC₁₈) tomadas en equipo *Incucyte* S3. (A) Cultivo control; (B) Cultivo celular, 10µg/mL; (C) Cultivo celular, 15µg/mL; (D) Cultivo celular, 20µg/mL; (E) Cultivo celular, 25µg/mL; (F) Cultivo celular, 30µg/mL. Aumento 10X. (N=3)

La segunda tinción analizada corresponde a c-LDL-FITC (*Fluorescein IsoThioCyanate*), para estos ensayos no se utilizó la sonda SYTOX™Green, ya que ambos presentan un espectro de emisión cercano (517nm y 523nm, respectivamente). Las concentraciones 15µg/mL, 20µg/mL y 25µg/mL de c-LDL fueron analizadas a través de la adquisición de 4 fotografías por pocillo cada 30 minutos por un periodo de 6 horas; observándose que a los 60 minutos de incubación ocurre una disminución de la fluorescencia para las tres concentraciones usadas manteniéndose estable a través del tiempo (**Figura 13**). Al analizar las imágenes obtenidas se observó que la señal del c-LDL-FITC es extremadamente alta, poco específica con una distribución homogénea en todo el plano, no permitiendo evaluar la incorporación de esta molécula (**Figura 14**).

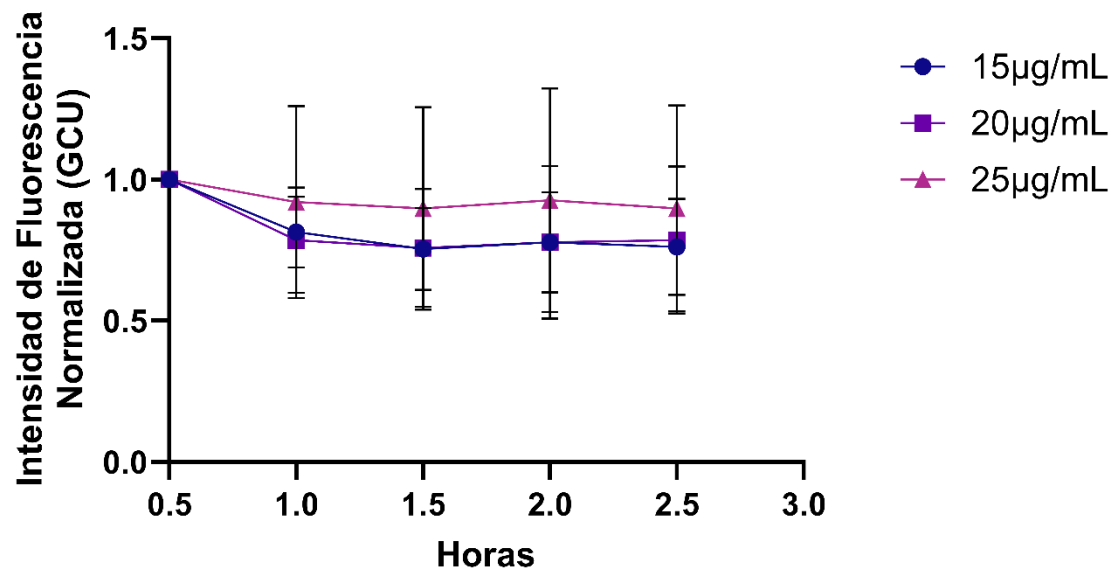


Figura 13. Gráfico de intensidad de fluorescencia normalizada de c-LDL-FITC en monocitos diferenciados a macrófagos. (N=4)

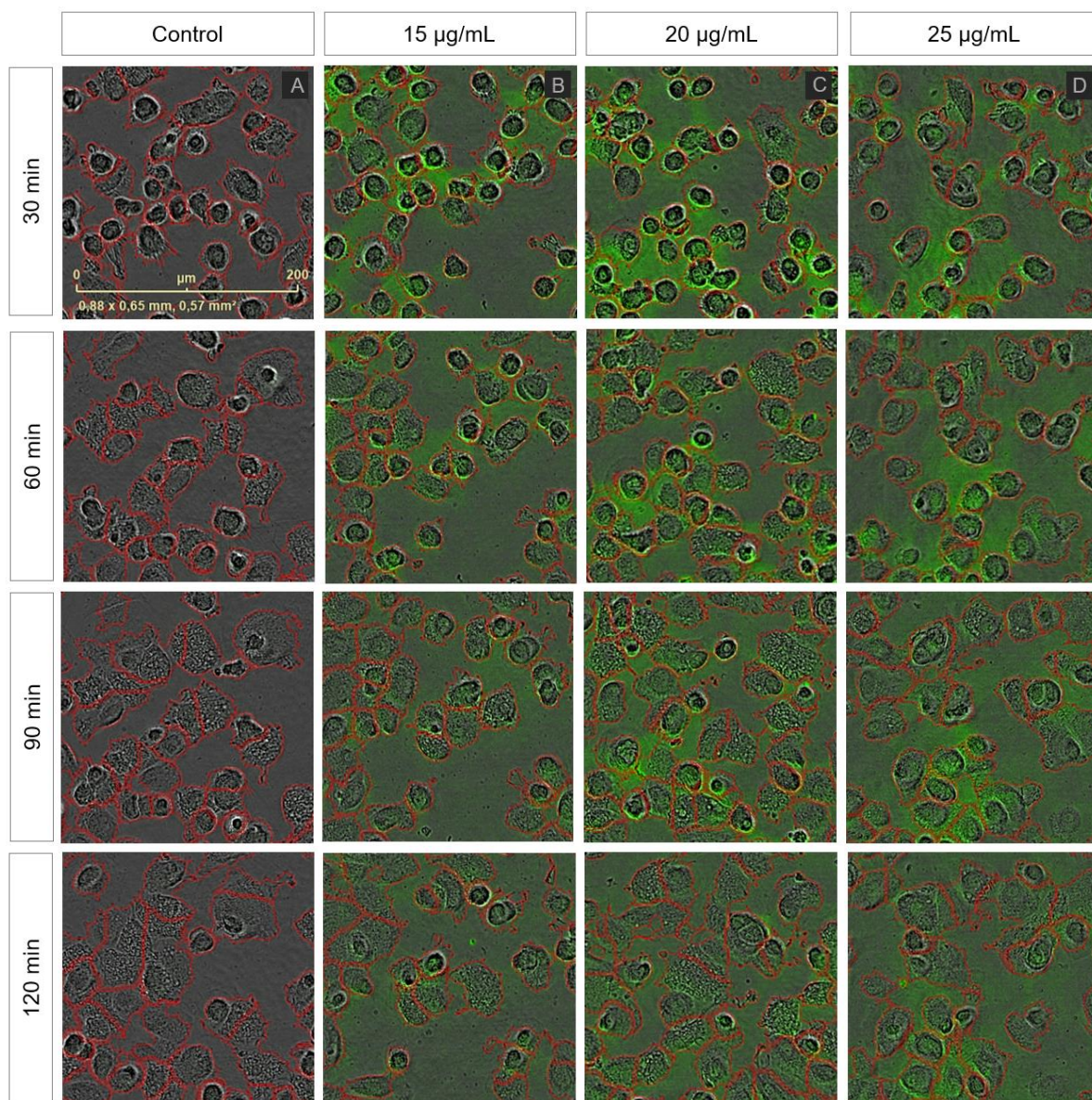


Figura 14. Fotografías de los ensayos de incorporación c-LDL-FITC tomadas en equipo *Incucyte* S3. Se presenta en función del tiempo transcurrido. (A) Cultivo control (B) Cultivo con c-LDL-FITC 15 $\mu\text{g/mL}$ (C) Cultivo con c-LDL-FITC 20 $\mu\text{g/mL}$ (D) Cultivo con c-LDL-FITC 25 $\mu\text{g/mL}$. Aumento 20X. (N=4).

Finalmente, con el objetivo de evaluar la internalización celular de nuestra molécula de colesterol con una sonda que aumentara la sensibilidad y especificidad con respecto a las tinciones anteriores, el c-LDL fue marcado con pHrodo Red, sonda sensible al pH. En esta ocasión, utilizando las mismas concentraciones de c-LDL utilizadas en los ensayos con FITC; fotografías cada 15 minutos por un periodo de 6 horas fueron analizadas observándose que, las 3 concentraciones de c-LDL-pHrodo Red ensayadas, presentan un aumento en la intensidad de fluorescencia a los 30 minutos después de la adición del c-LDL; de un $7.5 \pm 1.2\%$, $9.1 \pm 0.2\%$ y $10.1 \pm 0.2\%$ a concentraciones de $10 \mu\text{g/mL}$, $15 \mu\text{g/mL}$ y $20 \mu\text{g/mL}$, respectivamente (**Figura 15** y **Tabla V**). Además, al analizar las imágenes obtenidas a través del tiempo, se observó que solo hay fluorescencia en la zona delimitada como área celular, la cual va desapareciendo en función del tiempo (**Figura 16**).

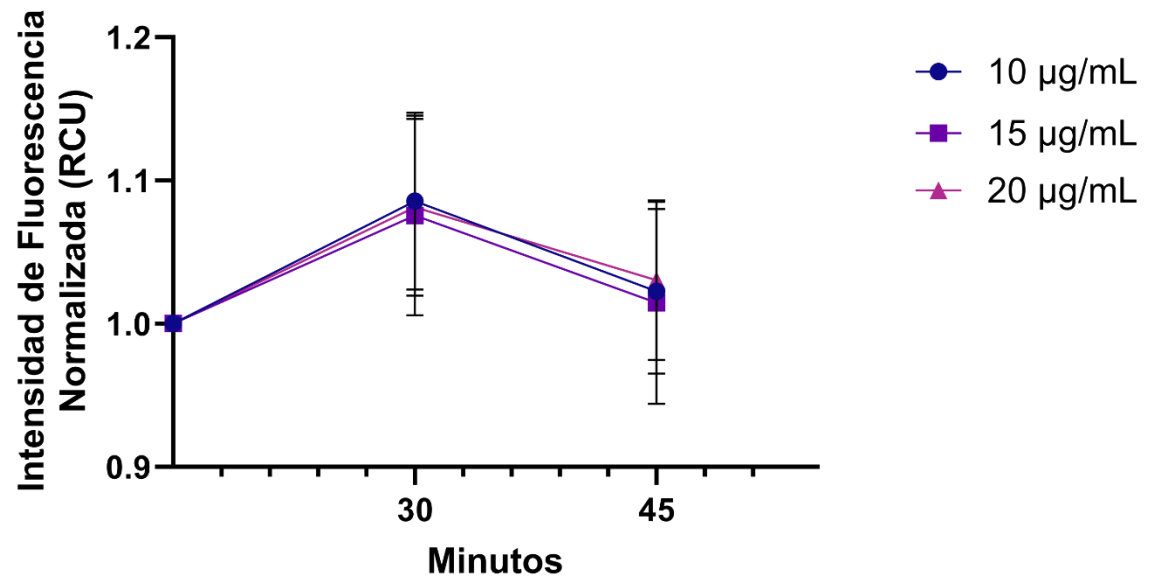


Figura 15. Gráfico de Intensidad de Fluorescencia Normalizada de c-LDL-pHrodo Red en monocitos diferenciados a macrófagos. (N=3)

Tabla V. Representación porcentual de la intensidad de fluorescencia con respecto al control.

Se utilizó la prueba de *Shapiro-Wilks* para evaluar normalidad y el valor *p* se calculó utilizando la prueba *t* de *Student* (T) para las variables continuas normales. Se considera significativo un valor $p < 0,05$.

Concentración c-LDL				
Tiempo	10µg/mL	15µg/mL	20µg/mL	<i>p value</i>
15 min	6.9±1.2%	8.6±0.4%	9.3±0.2%	<0,0001
30 min	7.5±1.4%	9.1±0.2%	10.1±0.1%	<0,0001
45 min	7.0±1.2%	8.6±0.1%	9.6±0.2%	<0,0001

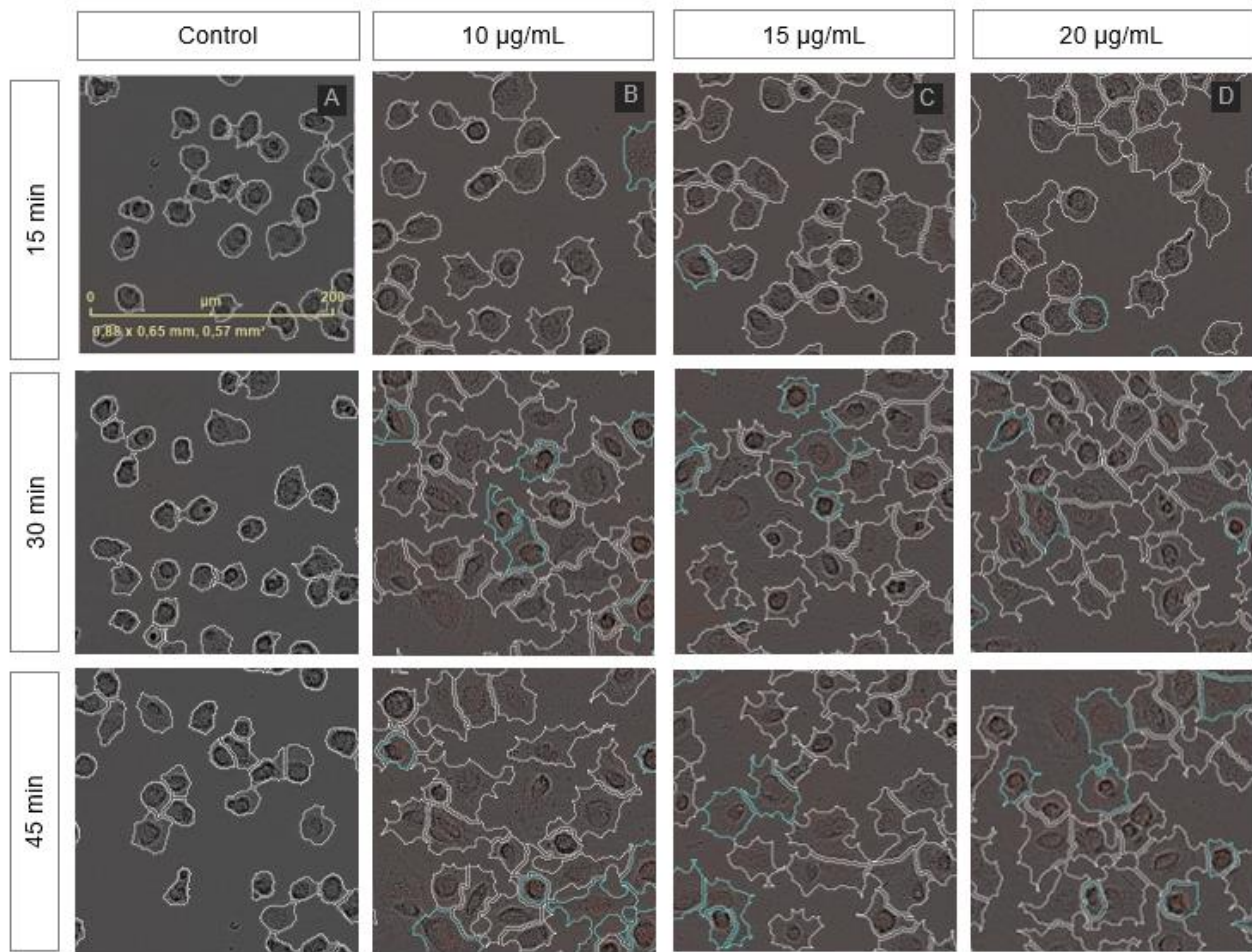


Figura 16. Fotografías de los ensayos de incorporación c-LDL-pHrodo Red tomadas en equipo *Incucyte* S3. Se presenta en función del tiempo transcurrido. (A) Cultivo control (B) Cultivo con c-LDL-pHrodo Red 10 $\mu\text{g/mL}$ (C) Cultivo con c-LDL-pHrodo Red 15 $\mu\text{g/mL}$ (D) Cultivo con c-LDL-pHrodo Red 20 $\mu\text{g/mL}$. Aumento 20X. (N=3)

10.3 Ensayos de Transporte en Monocitos Diferenciados a Macrófagos Usando Microscopía Confocal

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

Preliminarmente, al evaluar la incorporación de c-LDL con Dil (DilC¹⁸) y FITC a 1 hora de incubación, se observó que la intensidad de fluorescencia media (IFM) correspondiente a LDL-Dil (DilC¹⁸) (**Figura 17-B**) y LDL-FITC (**Figura 17-A**) fue de 4717 IFM y 8616 IFM, respectivamente; observándose una mayor de intensidad de señal para LDL-FITC.

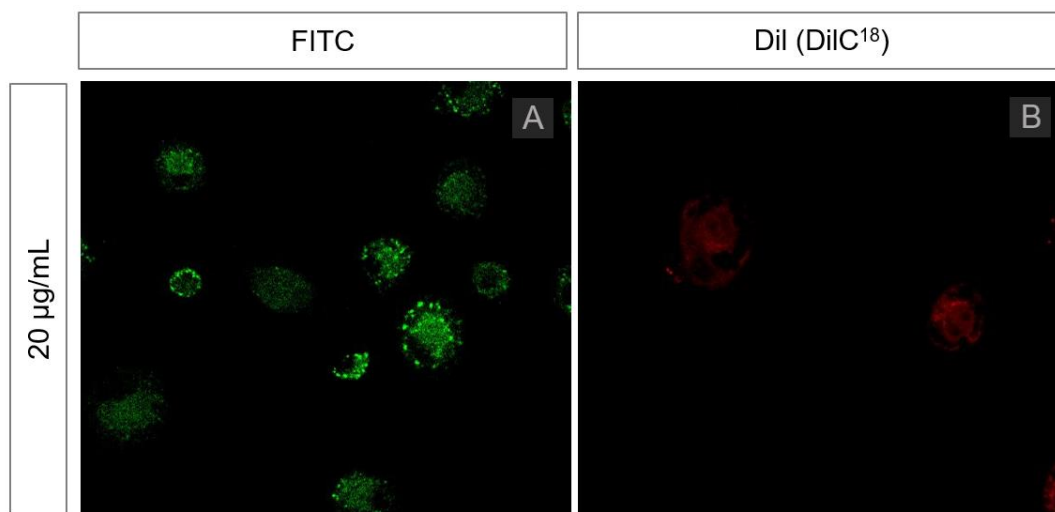


Figura 17. Ensayo preliminar de incorporación de c-LDL marcado con Dil (DiIC¹⁸) y FITC.

Una vez establecido el FITC como el fluoróforo a usar, se analizó la incorporación de c-LDL en función del tiempo, observándose que la intensidad de señal asociada al c-LDL-FITC al interior celular, la cual aumenta significativamente en los tiempo 30 y 60 minutos con respecto al control (**Figura 18**). Con el objetivo de establecer la especificidad de esta incorporación, ensayos de competencia de LDL marcada y no marcada fueron realizados utilizando las proporciones 1:2 (**Figura 19**) y 1:4 (**Figura 20**), observándose una disminución significativa en el transporte de c-LDL en los tiempos analizados (**Tabla VI**).

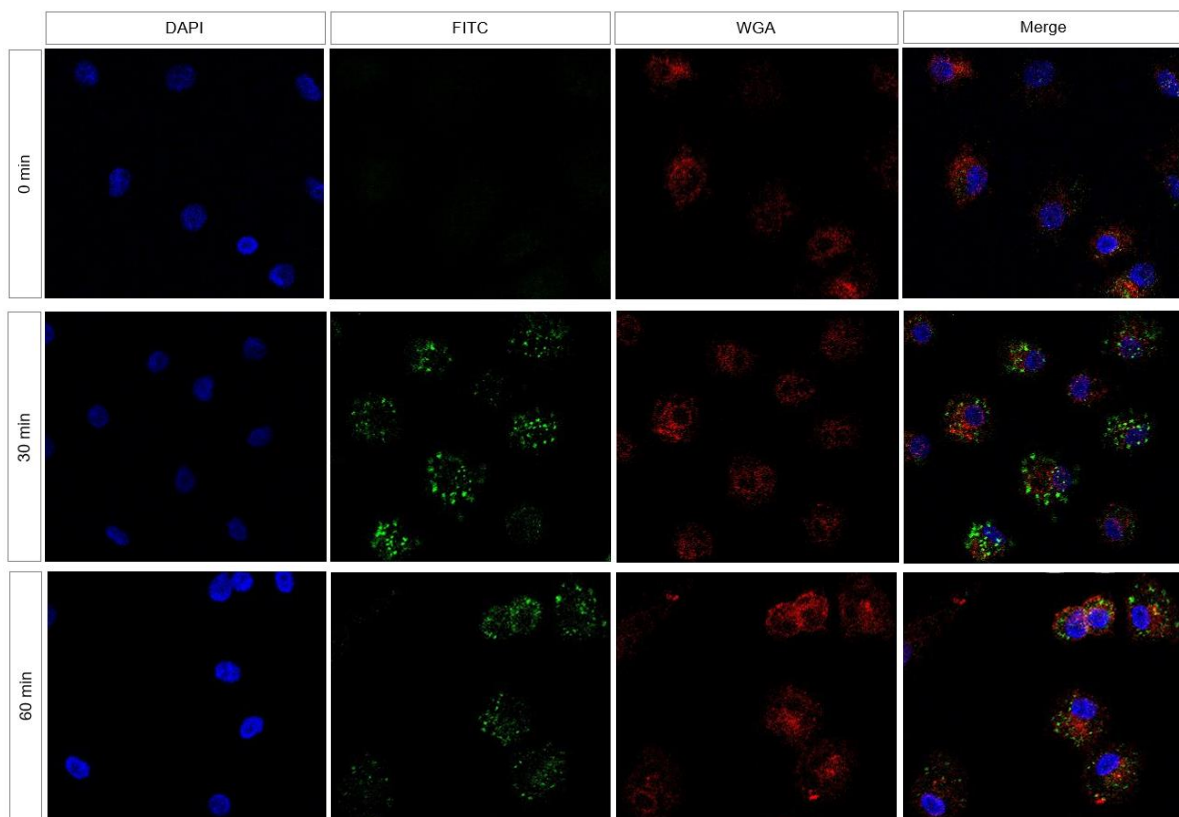


Figura 18. Fotografías representativas de los ensayos de transporte en microscopía confocal. Se presentan DAPI (azul), c-LDL-FITC (verde), WGA (rojo) y el Merge. Aumento 63X. (N=4)

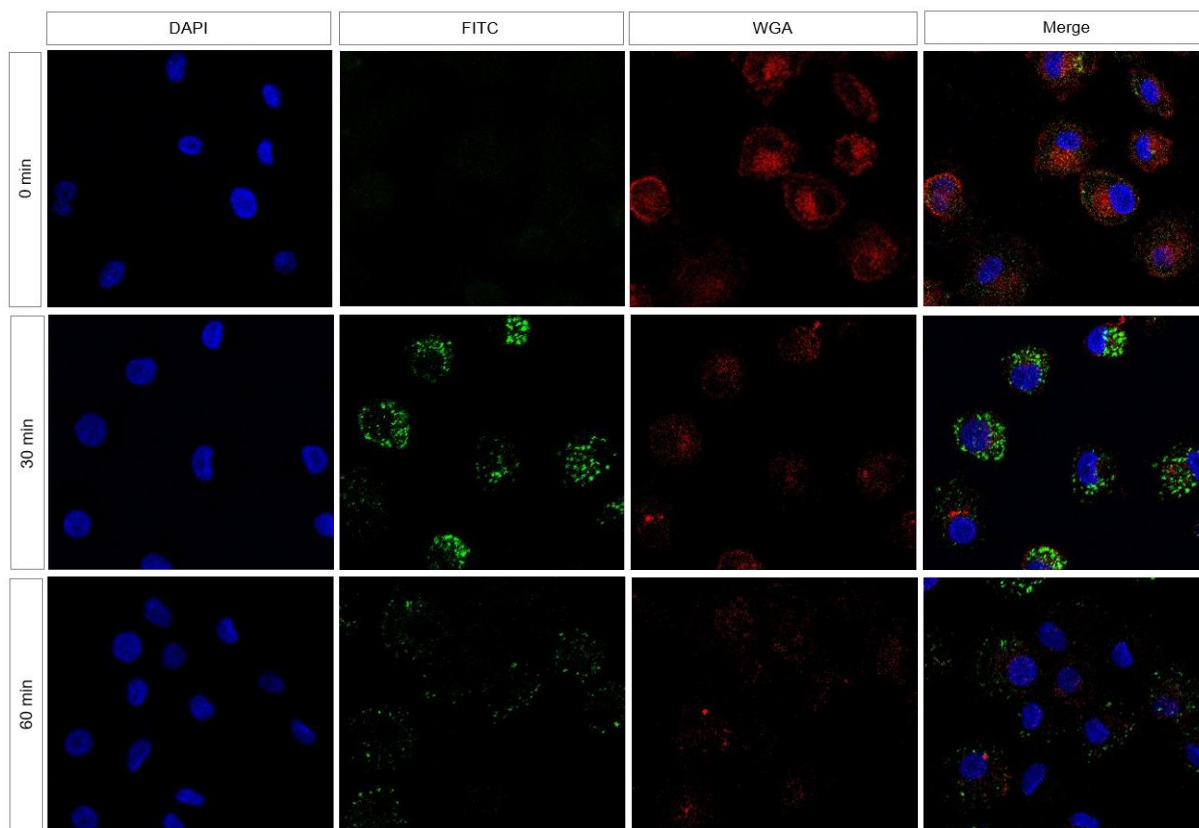


Figura 19. Fotografías representativas de los ensayos de competencia c-LDL marcado/c-LDL sin marcar en proporción 1:2. Se presentan DAPI (azul), c-LDL-FITC (verde), WGA (rojo) y el Merge. Aumento 63X. (N=4)

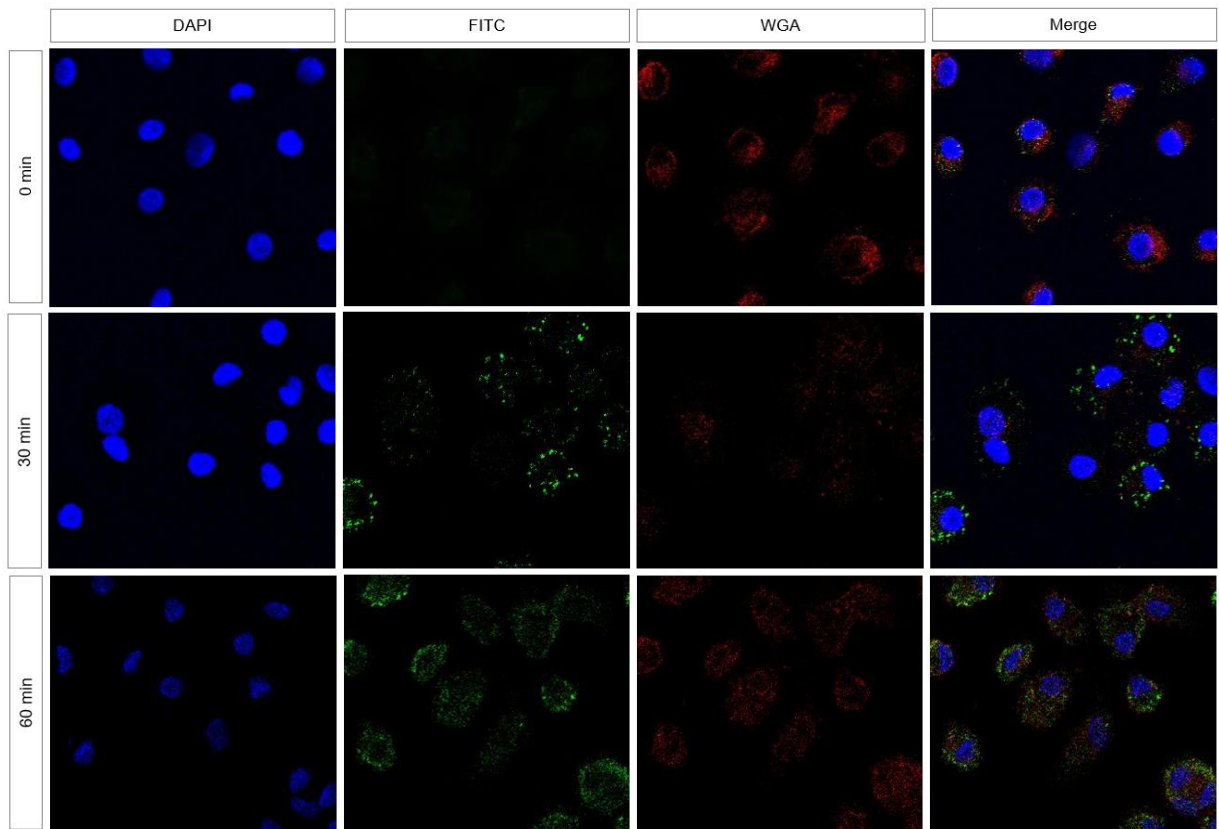


Figura 20. Fotografías representativas de los ensayos de competencia c-LDL marcado/c-LDL sin marcar en proporción 1:4. Se presentan DAPI (azul), c-LDL-FITC (verde), WGA (rojo) y el Merge. Aumento 63X. (N=4)

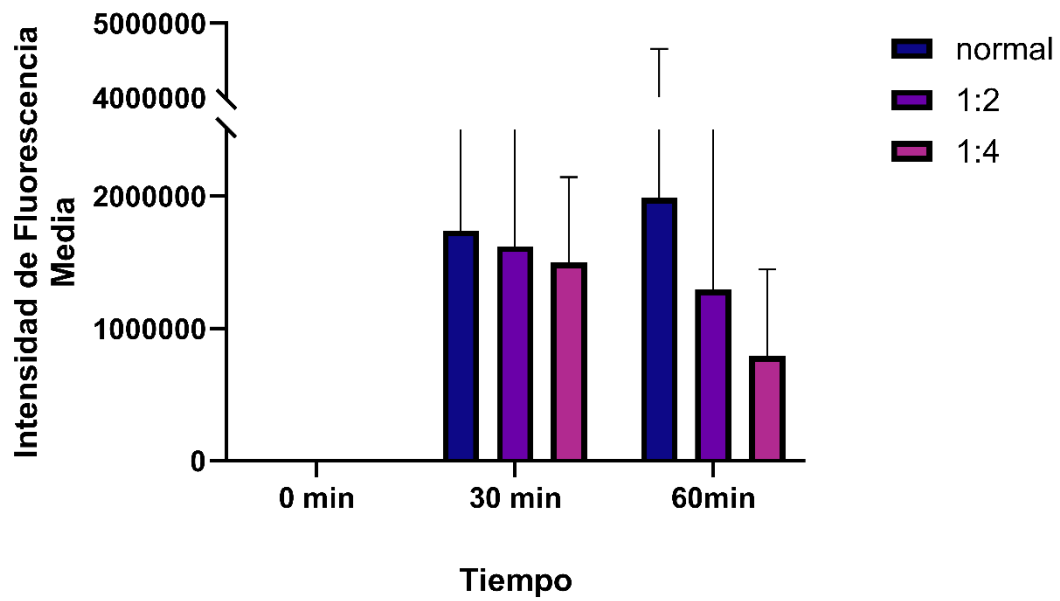


Figura 21. Gráfico de IFM para transporte normal, transporte 1:2 y transporte 1:4. (N=4)

Tabla VI. Intensidad de Fluorescencia Media para ensayos de transporte y competencia

Se utilizó la prueba de *Shapiro-Wilks* para evaluar normalidad y el valor p se calculó utilizando una prueba ANOVA de dos vías para las variables continuas normales. Se considera significativo un valor $p < 0,05$.

Tiempo	Condiciones de incorporación			<i>p value</i>
	Normal	1:2	1:4	
0 min	0	0	0	
30 min	1738525	1620316	1497569	<0,0001
60 min	1986232	1294611	790266	<0,0001

11. DISCUSIÓN

La Hipercolesterolemia Familiar es una dislipidemia primaria que presenta una gran prevalencia en población general y la alta probabilidad de sufrir un evento cardiovascular precoz (De Ferranti, 2015; Watts et al., 2023). Si bien, el diagnóstico de HF contempla la aplicación de criterios clínicos validados, la identificación de mutaciones patogénicas en genes relacionados con el metabolismo lipídico constituye el diagnóstico definitivo. 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 (Cuchel et al., 2023; Hu et al., 2021; Strøm et al., 2015), muchas de ellas, sin evidencia científica que sustente la categorización de la patogenicidad correspondiente (A. Benito-Vicente et al., 2018; Asier Benito-Vicente et al., 2015; Richards et al., 2015). En este contexto, los ensayos funcionales son el mejor modelo de validación para determinar la patogenicidad de una mutación, los cuales contemplan análisis de los niveles de expresión, localización, interacción proteína-proteína, ensayos cinéticos, afinidad a sus ligandos y de transporte o internalización de moléculas (Guglielmi et al., 2016; Merchán et al., 2016). Es por ello que el objetivo del presente trabajo fue estandarizar una metodología para determinar la incorporación de c-LDL en monocitos diferenciados a macrófagos, para utilizar esta metodología para la evaluación funcional de mutaciones

asociadas a HF en células de pacientes con mutaciones de patogenicidad incierta.

Históricamente la trazabilidad de moléculas en ensayos de incorporación, se realizaba con isotopos radioactivos como el Yodo 125 (I^{125}) (Reynolds & St. Clair, 1985), lo que comprendía un alto riesgo para el manipulador e implicancias medioambientales asociadas con su disposición final. Es por ello que actualmente, la utilización de marcadores fluorescentes presenta una serie de ventajas, entre las cuales se destaca la amplia gama de espectros de excitación y emisión (que se traduce en la detección de distintos colores) (Hickey et al., 2004), su naturaleza química, presentan una gran estabilidad estructural y muy bajo efecto tóxico sobre los sistemas biológicos (Fia & Keyphrases, 1985; Stephan & Yurachek, 1993). Una de las familias de marcadores fluorescentes más relevante es la de los dialquilcarbocianina, y la molécula Dil ($DilC^{18}$) es una de las más ampliamente usadas en la tinción de membranas lipídicas, por su buena fluorescencia, y en la incorporación de c-LDL en diversos tipos celulares (Banerjee et al., 2019; Stephan & Yurachek, 1993; Wei et al., 2014), sin embargo, los resultados expuestos en los ensayos de transporte en células viva y por microscopía mostraron una baja especificidad y sensibilidad en cultivos celulares primarios. En nuestra revisión bibliográfica, se describía persistentemente que los ensayos de transporte realizados eran a tiempo final y luego las células eran fijadas o eran lisadas, y a partir de esto, se cuantificaba la señal emitida por la molécula que se encontraba efectivamente en la zona intracelular (Banerjee et

al., 2019), esta metodología sorteaba la problemática que vimos en nuestro trabajo realizado con el *Incucyte* S3, donde la señal se registraba tanto dentro como fuera de las células; y en microscopía, la realización de estos transportes a tiempo final con células transfectadas (donde la expresión del receptor es considerablemente mayor que en un cultivo primario) evita el problema de la poca sensibilidad. Así que Dil (DilC¹⁸) no es lo suficientemente específico para un cultivo *ex vivo* y la señal emitida fue baja para esta metodología de visualización en tiempo real del transporte de c-LDL, ya que la emisión de fluorescencia de Dil (DilC¹⁸) pudo tener interferencia con ciertas moléculas presentes en la célula cuando hubo ingreso a estas (Wynn, Chawla, & Pollard, 2013) o puede ser que debido a la naturaleza misma de la molécula de c-LDL, que esta formada por una monocapalípídica, Dil (DilC¹⁸) no pudiese alcanzar su máxima emisión de fluorescencia (Bao et al., 2023).

Por otro lado, el c-LDL marcado con el fluoróforo FITC, si bien presentaba más intensidad de señal que Dil, era muy poco específico para el transporte en célula viva y también presentaba interferencia con el tipo celular utilizado y su diferenciación. En este contexto, como mencionamos, todas las células presentan una gran variedad de moléculas de importancia para las funciones vitales, muchas de ellas, tienen la capacidad de emitir señales fluorescentes debido a su estructura; las principales moléculas que emiten fluorescencia son

los aminoácidos con anillos aromáticos, los pigmentos lipídicos, las flavinoenzima como la MAO, succinato deshidrogenasa y la NADPH, las pirimidinas, entre otras (Monici, 2005). En el caso de nuestros ensayos, los macrófagos tienen una importante presencia de la NADPH, debido a su función como fagocito (Babior, 2004), y esta molécula tiene una fluorescencia asociada a longitudes de onda cercana a los 500nm, lo que lleva a los macrófagos a presentar un efecto de autofluorescencia difícil de eliminar en un equipo como el *Incucyte S3* (Njoroge et al., 2001). Las metodologías asociadas al uso de FITC y macrófagos en contextos distintos al de los ensayos de transporte en célula viva, pueden sortear esta problemática con *Trypan Blue* o *Violet Crystal* como *quencher* (Halldén et al., 1991), usándose como soluciones de lavados, pero en el caso de nuestra metodología, que requiere de un seguimiento constante a través del tiempo, estos *quenchers* impiden la visualización de las células debido al fuerte color que tienen (azul y violeta, respectivamente). Es claro entonces que, para los ensayos de transporte en célula viva, no poder hacer la diferenciación entre lo que está dentro o fuera del área celular es un problema a solucionar, lo que nos ha llevado a la búsqueda de marcadores más específicos.

Basados en lo conocido sobre el catabolismo del c-LDL, decidimos usar la sonda pHrodo Red. Una de las características más llamativas de este fluoróforo es que tiene la capacidad de aumentar su fluorescencia a medida que los valores de pH disminuyen, presentando su mayor señal de fluorescencia a pH 4

(Molecular Probes Inc., 2012); dicha característica, en el contexto de la degradación del c-LDL, es la que nos entrega la especificidad buscada, ya que cuando se forma el endolisosoma, existe una caída de pH (Yang et al., 2020). Se evidencio entonces que después de 4 horas de depletación lipídica, los monocitos diferenciados a macrófago incubados con c-LDL-pHrodo Red presentaron un aumento significativo en la fluorescencia intracelular, observándose un peak de fluorescencia a los 30 minutos de exposición con el c-LDL para las 3 concentraciones testeadas (10µg/mL, 15 µg/mL y 20µg/mL). Con todo lo anterior, se logró determinar que las condiciones óptimas para evaluar el transporte en célula viva y en tiempo real corresponde a: 30.000 células por pocillo cultivadas por 7 días en medio de cultivo estándar suplementado con GM-CFS, seguido de 4 horas de incubación con medio delipidado al 100% v/v y el análisis del transporte durante 1 hora con 20 µg/mL de c-LDL-pHrodo en el equipo *Incucyte S3*.

Con el objetivo de complementar los resultados obtenidos por los ensayo de incorporación en célula viva y en tiempo real, se evaluó el transporte de c-LDL a través de microscopía confocal utilizando el c-LDL marcado con Dil (DiIC¹⁸) y FITC, los cuales han sido ampliamente usados y descritos en microscopía (A. Benito-Vicente et al., 2018; Asier Benito-Vicente et al., 2018; Fia & Keyphrases, 1985). Las imágenes presentadas en la **Figura 17** muestran que las moléculas de c-LDL-Dil (DiIC18) y c-LDL-FITC estaban ubicadas en la zona intracelular, ya

que las imágenes fueron tomadas posterior a los lavados con *Trypan Blue* al 0.2% v/v, eliminando así la fluorescencia al exterior de la célula (Etxebarria et al., 2014; Halldén et al., 1991). Pese a que, ambas moléculas fueron detectadas por microscopía, debido a la mejor sensibilidad presentada por FITC, alrededor del 55% más que la señal cuantificada de Dil (DiIC¹⁸), fue la tinción seleccionada para continuar el trabajando en microscopía confocal. Cuando se evaluó el transporte de c-LDL-FITC a través de ensayos de competencia 1:2 y 1:4, se observa una disminución significativa de la incorporación de c-LDL-FITC, lo cual concuerda a lo descrito en bibliografía, que debido a la presión selectiva ejercida por el c-LDL sin marcar, la señal se ve disminuida en el interior celular, confirmándose así la especificidad del transporte (Hsu, Meng, & VanNieuwenhze, 2016).

Si bien, al contrastar nuestros resultados del *Incucyte* S3 y del microscopio multifotón LSM 780, se observa que el punto de mayor intensidad no coincide en los tiempos de exposición con el c-LDL, siendo 30 minutos para el *Incucyte* y 60 minutos para el LSM 780, esto puede deberse al mecanismo diferencial de fluorescencia de ambas sondas y al tiempo celular diferencial entre la internalización y la formación de las vesículas endolisosomales para la degradación del c-LDL, siendo ambas técnicas complementarias para la evaluación funcional de las variantes de significado incierto descritas para la Hipercolesterolemia Familiar.

12. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

En esta tesis de pregrado, fuimos capaces de presentar al Incucyte S3 y la microscopía confocal como herramientas sensibles, específicas y complementarias para el análisis de incorporación de c-LDL. Definiendo las condiciones de cultivo, las sondas de marcaje para cada una de las técnicas y los tiempos de incubación y análisis.

Si bien, este trabajo se presenta como el primer paso para definir el algoritmo de trabajo de un ensayo funcional, faltaría validar si éstas metodología son lo suficientemente sensibles para determinar incorporación de c-LDL en células de pacientes portadores de mutaciones patogénicas. Todo esto para poder para realizar la caracterización funcional en células de personas portadoras de variantes de significado incierto asociadas a Hipercolesterolemia Familiar.

13. BIBLIOGRAFÍA

American Heart Association (AHA). (2021). About Heart Disease. <https://www.heart.org/en/health-topics/consumer-healthcare/what-is-cardiovascular-disease>

Federación Mundial del Corazón (WHF). (2022). <https://world-heart-federation.org/what-is-cvd/>

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2017). Enfermedades cardiovasculares. [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))

Organización Panamericana de Salud (OPS). (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>

Aguilera, X. P., Gonzalez-Wiedmaier, C., Matute, I., Nájera-De Ferrari, M., & Olea, A. (2016). Las Enfermedades No Transmisibles en Chile. Aspectos Epidemiológicos y de Salud Pública, 110. Retrieved from <http://medicina.udd.cl/centro-epidemiologia-politicas-salud/investigacion-2/publicaciones/>

Babior, B. M. (2004). NADPH oxidase. *Current Opinion in Immunology*, 16(1), 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2003.12.001>

Balakumar, P., Maung-U, K., & Jagadeesh, G. (2016). Prevalence and prevention of cardiovascular disease and diabetes mellitus. *Pharmacological Research*, 113, 600–609. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.09.040>

Banerjee, P., Chan, K. C., Tarabocchia, M., Benito-Vicente, A., Alves, A. C., Uribe, K. B., ... 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>

Bao, C., Xiang, H., Chen, Q., Zhao, Y., Gao, Q., Huang, F., & Mao, L. (2023). A Review of Labeling Approaches Used in Small Extracellular Vesicles Tracing and Imaging. *International Journal of Nanomedicine*, 18(August), 4567–4588. <https://doi.org/10.2147/IJN.S416131>

- Benito-Vicente, A., Siddiqi, H., Uribe, K. B., Jebari, S., Galicia-Garcia, U., Larrea-Sebal, A., ... Martin, C. (2018). p.(Asp47Asn) and p.(Thr62Met): non deleterious LDL receptor missense variants functionally characterized in vitro. *Scientific Reports*, 8(1), 1–6. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34715-x>
- Benito-Vicente, Asier, Alves, A. C., Etxebarria, A., Medeiros, A. M., Martin, C., & Bourbon, M. (2015). The importance of an integrated analysis of clinical, molecular, and functional data for the genetic diagnosis of familial hypercholesterolemia. *Genetics in Medicine*, 17(12), 980–988. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.14>
- Benito-Vicente, Asier, 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). <https://doi.org/10.3390/ijms19061676>
- Berberich, A. J., & Hegele, R. A. (2019). The complex molecular genetics of familial hypercholesterolaemia. *Nature Reviews Cardiology*, 16(1), 9–20. <https://doi.org/10.1038/s41569-018-0052-6>
- 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>
- Essen Bioscience. (2017). Incucyte User Manual, 1–156.
- Etxebarria, A., Benito-Vicente, A., Alves, A. C., Ostolaza, H., Bourbon, M., & Martin, C. (2014). Advantages and versatility of fluorescence-based methodology to characterize the functionality of LDLR and class mutation assignment. *PLoS ONE*, 9(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112677>
- Fia, A., & Keyphrases, A. (1985). Fluorimetric assays and Immunoassays. *Clin. Chem.*, 31(3), 359–370.
- Futema, M., Bourbon, M., Williams, M., & Humphries, S. E. (2018). Clinical utility of the polygenic LDL-C SNP score in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, 277, 457–463. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2018.06.006>
- Garantizar, O. D. S., Vida, U. N. A., Promover, S. Y., Bienestar, E. L., Todas, D. E. T. A., Edades, L. A. S., ... Carlos, G. (2023). VOLUNTARIO ANEXO ESTADÍSTICO.
- 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>
- H. Tomkin, G. (2012). LDL as a Cause of Atherosclerosis. *The Open Atherosclerosis & Thrombosis Journal*, 5(1), 13–21.
<https://doi.org/10.2174/1876506801205010013>
- Halldén, G., Sköld, C. M., Eklund, A., Forslid, J., & Hed, J. (1991). Quenching of intracellular autofluorescence in alveolar macrophages permits analysis of fluorochrome labelled surface antigens by flow cytofluoremetry. *Journal of Immunological Methods*, 142(2), 207–214. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(91\)90108-R](https://doi.org/10.1016/0022-1759(91)90108-R)
- Hickey, P. C., Swift, S. R., Roca, M. G., & Read, N. D. (2004). Live-cell Imaging of Filamentous Fungi Using Vital Fluorescent Dyes and Confocal Microscopy. *Methods in Microbiology*, 34(d), 63–87.
[https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(04\)34003-1](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(04)34003-1)
- Holmes, M. V., & Ala-Korpela, M. (2019). What is ‘LDL cholesterol’? *Nature Reviews Cardiology*, 16(4), 197–198. <https://doi.org/10.1038/s41569-019-0157-6>
- Hopkins, P. N., Toth, P. P., Ballantyne, C. M., & Rader, D. J. (2011). Familial hypercholesterolemias: Prevalence, genetics, diagnosis and screening recommendations from the National Lipid Association Expert Panel on Familial Hypercholesterolemia. *Journal of Clinical Lipidology*, 5(3 SUPPL.), S9. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2011.03.452>
- Hovingh, G. K., Davidson, M. H., Kastelein, J. J. P., & O'Connor, A. M. (2013). Diagnosis and treatment of familial hypercholesterolaemia. *European Heart Journal*, 34(13), 962–971. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehd015>
- Hsu, Y. P., Meng, X., & VanNieuwenhze, M. S. (2016). Methods for visualization of peptidoglycan biosynthesis. *Methods in Microbiology*, 43, 3–48.
<https://doi.org/10.1016/bs.mim.2016.10.004>
- Hu, H., Chen, R., Hu, Y., Wang, J., Lin, S., & Chen, X. (2021). The LDLR c.501C>A is a disease-causing variant in familial hypercholesterolemia. *Lipids in Health and Disease*, 20(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12944-021-01536-3>
- Jefford, C. W., Kabengele, T., Kovacs, J., & Burger, U. (1974). No 主観的健康感を中心とした在宅高齢者における健康関連指標に関する共分散構造分析
 Title. *Tetrahedron Lett.*, 3(1), 257–260.
- Lobos Bejarano, J. M., & Brotons Cuixart, C. (2011). Factores de riesgo

- cardiovascular y atención primaria: evaluación e intervención. *Atencion Primaria*, 43(12), 668–677. <https://doi.org/10.1016/j.aprim.2011.10.002>
- Mata, P., Alonso, R., Ruiz, A., Gonzalez-Juanatey, J. R., Badimón, L., Díaz-Díaz, J. L., ... Pérez-Jiménez, F. (2015). Diagnóstico y tratamiento de la hipercolesterolemia familiar en España: documento de consenso. *SEMERGEN - Medicina de Familia*, 41(1), 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.semerg.2014.05.001>
- Mattiuzzi, C., Sanchis-Gomar, F., & Lippi, G. (2020). Worldwide burden of LDL cholesterol: Implications in cardiovascular disease. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 30(2), 241–244. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2019.09.008>
- Mensah, G. A., Roth, G. A., & Fuster, V. (2019). The Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors: 2020 and Beyond. *Journal of the American College of Cardiology*, 74(20), 2529–2532. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.10.009>
- Merchán, A., Ruiz, Á. J., Campo, R., Prada, C. E., Toro, J. M., Sánchez, R., ... 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>
- Molecular Probes Inc. (2012). pHrodo™ Green and Red Amine-Reactive Labels. *ThermoFisher*, 1–6.
- Monici, M. (2005). Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnology Annual Review*, 11(SUPPL.), 227–256. [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(05\)11007-2](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11007-2)
- Njoroge, J. M., Mitchell, L. B., Centola, M., Kastner, D., Raffeld, M., & Miller, J. L. (2001). Characterization of viable autofluorescent macrophages among cultured peripheral blood mononuclear cells. *Cytometry*, 44(1), 38–44. [https://doi.org/10.1002/1097-0320\(20010501\)44:1<38::AID-CYTO1080>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/1097-0320(20010501)44:1<38::AID-CYTO1080>3.0.CO;2-T)
- Nordestgaard, B. G., Chapman, M. J., Humphries, S. E., Ginsberg, H. N., Masana, L., Descamps, O. S., ... Tybjaerg-Hansen, A. (2013). Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: Guidance for clinicians to prevent coronary heart disease. *European Heart Journal*, 34(45), 3478–3490. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/eh273>
- Note, T. (n.d.). Incucyte® Live-Cell Analysis System Analysis Guidelines for the Incucyte® ATP Analysis Software Module Acquiring images using the ATP Analysis Software Module, 1–10.

- Probes, M. (2001). Lipophilic Tracers—Dil, DiO, DiD, DiA, and DiR. *Product Information*, (Figure 1), 1–5. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Lipophilic+Tracers+?+Dil+,+DiO+,+DiD+,+DiA+,+and+DiR#2>
- Real, J. T., & Ascaso, J. F. (2021). Metabolismo lipídico y clasificación de las hiperlipemias. *Clínica e Investigación En Arteriosclerosis*, 33, 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2020.12.008>
- Reynolds, G. D., & St. Clair, R. W. (1985). A comparative microscopic and biochemical study of the uptake of fluorescent and 125I-labeled lipoproteins by skin fibroblasts, smooth muscle cells, and peritoneal macrophages in culture. *American Journal of Pathology*, 121(2), 200–211.
- Sánchez, A., Bustos, P., Honorato, P., Sáez, K., Elim-Jannes, C., Barriga, N., ... 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://doi.org/10.4067/s0034-98872021000901267>
- Sniderman, A. D., Tsimikas, S., & Fazio, S. (2014). The severe hypercholesterolemia phenotype: Clinical diagnosis, management, and emerging therapies. *Journal of the American College of Cardiology*, 63(19), 1935–1947. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.01.060>
- Stephan, Z. F., & Yurachek, E. C. (1993). Rapid fluorometric assay of LDL receptor activity by Dil-labeled LDL. *Journal of Lipid Research*, 34(2), 325–330. [https://doi.org/10.1016/s0022-2275\(20\)40759-x](https://doi.org/10.1016/s0022-2275(20)40759-x)
- ThermoFisher. (2011). FluoReporter® FITC Protein Labeling Kit Catalog no. F6434, 1–6.
- 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 hypercholesterolaemia. *Nature Reviews Cardiology*, 20(12), 845–869. <https://doi.org/10.1038/s41569-023-00892-0>
- Watts, G. F., Gidding, S., Wierzbicki, A. S., Toth, P. P., Alonso, R., Brown, W. V., ... Kastelein, J. J. P. (2014). Integrated guidance on the care of familial hypercholesterolemia from the International FH Foundation. *Journal of Clinical Lipidology*, 8(2), 148–172. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2014.01.002>
- Wynn, T. A., Chawla, A., & Pollard, J. W. (2013). Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*, 496(7446), 445–455. <https://doi.org/10.1038/nature12034>
- Yang, H. xian, Zhang, M., Long, S. yin, Tuo, Q. hui, Tian, Y., Chen, J. xiong, ...

Liao, D. fang. (2020). Cholesterol in LDL receptor recycling and degradation. *Clinica Chimica Acta*, 500(November 2019), 81–86.
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.09.022>

14. GLOSARIO

ACMG: Colegio americano de medicina genética, organización multidisciplinaria que se especializa en genética y genómica, viene del inglés *American College of Medical Genetics and Genomics*

ApoB: Apolipoproteína B, principal componente proteico del C-LDL

ApoE: Apolipoproteína E, principal componente proteico de las partículas de VLDL

c-IDL: Colesterol compuesto por lipoproteínas de baja y alta densidad, viene del inglés *Intermediate Density Lipoprotein*

c-LDL: Colesterol compuesto de lipoproteínas de baja densidad, viene del inglés *Low Density Lipoprotein*

DM: Diabetes Mellitus

ECV: Enfermedad cardiovascular

FRCV: Factor de riesgo cardiovascular

HTA: Hipertensión arterial

HF: Hipercolesterolemia Familiar

LDLR: Receptor de LDL

LDLRAP1: *Low Density Lipoprotein Receptor adaptor Protein 1*, proteína adaptadora 1 del receptor de LDL

LPL: Lipoprotein-lipasa, enzima que se encarga de hidrolizar los triglicéridos de las lipoproteínas en el torrente sanguíneo

NGS: De la sigla en inglés “*Next Generation Sequencing*”, métodos de secuenciación de última generación utilizados para el estudio de genomas de forma masiva

PCSK9: Proproteína convertidora subtilisina/kexina tipo 9, del inglés *Proprotein Convertase Subtilisin Kexin 9*

QM: Quilomicrones

SNP: Polimorfismos de nucleótido único, viene del inglés, *Single Nucleotide Polymorphisms*

TG: Triglicéridos

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad, viene del inglés *Very Low Density Lipoprotein*

VUS: Mutación de significado incierto, viene del inglés *Variants of Unknown Significance*

15. ANEXOS

15.1. 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
Maria 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 PRÁCTICA CLÍNICA DEFINIDAS POR LA CONFERENCIA INTERNACIONAL DE ARMONIZACIÓN (GCP-ICH); CON LAS LEYES CHILENAS N° 20.120 Y N° 19.628 Y CON LAS NORMAS INSTITUCIONALES DEL SERVICIO DE SALUD CONCEPCIÓN



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 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.
- Planilla datos fuentes

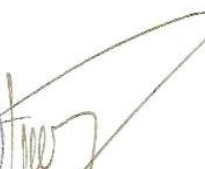
Además, este Comité solicita que:

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

CC: CEC-SSC



Dr. Nelson Pérez Terán
Presidente 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 CLÍNICA DEFINIDAS POR LA CONFERENCIA INTERNACIONAL DE ARMONIZACIÓN(GCP-ICH); CON LAS LEYES CHILENAS N° 20.120 Y N° 19.628 Y CON LAS NORMAS INSTITUCIONALES DEL SERVICIO DE SALUD CONCEPCION

15.2. 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.

15.3. Anexo 3: Procesamiento y análisis de datos *Incucyte*

Una vez terminado el ensayo, se exportan los datos desde el ***Incucyte Graphical User Interface***.

Para la obtención de Gráficos representativos de la incorporación del c-LDL, en el software fue seleccionado el archivo correspondiente al ensayo. De la carpeta se selecciona el ***Vessel*** a analizar.

1. Se selecciona ***Metrics Graph*** y se elige la subsección ***Time Plot***.
2. Se crean las métricas: ***Total (Red/Green) Object Integrated Intensity***, que

tiene relación con la cantidad de señal en todo el plano, y ***Total Area Per Image***, que tiene relación con el área que ocupan las células.

2.1. Para definir la métrica ***Total (Red/Green) Object Integrated Intensity*** se configura: ***Classification***, *High (Red/Green) Intensity*; ***Channel***, *(Red/Green)*; ***Metric***, *Integrated Intensity*; ***Value***, *Per Image*. Este parámetro se expresa como **$(RCU/GCU) \times \mu m^2/Image$** .

2.2. Para definir la métrica ***Total Area Per Image*** se configura: ***Classification***, *Total*; ***Channel***, *Phase*; ***Metric***, *Area*; ***Value***, *Per Image*. Este parámetro se expresa como **$\mu m^2/Image$** .

3. Para normalizar los valores del ***Total (Red/Green) Object Integrated Intensity*** de cada imagen se divide por su ***Total Area Per Image*** correspondiente.

4. El valor de RCU obtenido se gráfica y se le hace su respectivo análisis estadístico.

Para la obtención de Imágenes:

1. En el software, se selecciona y abre el archivo correspondiente al ensayo. De la carpeta se selecciona el **Vessel** a analizar.
2. Se abre por *default* la sección **Image** y se elige la imagen deseada para optimizar.
 - 2.1 En el programa aparecen 3 iconos asociados a los diferentes ajustes; se extienden las opciones **Vessel Scan Times**, **Image Layers** y **Tools**.
 - 2.2 En la subsección llamada **Vessel Scan Times**, se eligen los tiempos a mostrar.
 - 2.3 En la subsección llamada **Image Layers**, se ajustan valores de imagen.
 - 2.4 En la subsección **Image Channels**, seleccionar en el punto **Color** **Autoescale** la opción **Well**.
 - 2.5 En la subsección llamada **Phase** se ajusta el brillo y el contraste.
 - 2.6 En la subsección **Green** y **Red** se ajustan la opción **Subtract Background** y **Autoescale**.
 - 2.7 Por último, en la subsección **Analysis Masks** se eligen la opción **Cell-By-Cell Mask** en color blanco y **Low Green Intensity & High Red Intensity** en calipso.