

# MANLAB®

Diagnóstico Bioquímico y Genómico

## Lipoproteína de baja densidad oxidada y anticuerpos contra la proteína de estrés HSP 60: su interrelación en el accidente cerebrovascular isquémico

 27 min.



La LDL-oxidada se considera uno de los colesteroles más aterogénico dada su estrecha relación con los radicales libres y su aumento tiene valor predictivo directo en la aparición de aterosclerosis, la HSP 60 (por sus siglas en el idioma inglés Heat Shock Proteins) puede estimular el sistema inmune. Tanto la LDL-oxidada como la HSP 60 son consideradas

auto-antígenos primarios en el proceso de aterosclerosis. En el siguiente trabajo se propone la utilización de LDL-oxidada y los anticuerpos anti-HSP60 como marcadores no tradicionales de riesgo a enfermedad cerebrovascular isquémica.



Rodríguez, Norys<sup>1</sup>; Andrade, Henry<sup>2</sup>; Peña, José<sup>3</sup>; Poveda, José<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Universidad de Los Andes- Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Mérida-Venezuela; **Manlab- Diagnostico Bioquimico y Genómico- Buenos Aires-Argentina.**

<sup>2</sup> Universidad de Los Andes-Dirección de Planificación y Desarrollo, Mérida-Venezuela; Fundación Gustavo Palma, Manabí-Ecuador.

<sup>3</sup> Universidad de Carabobo,-Facultad de Ciencias de la Salud, Valencia-Venezuela; Universidad de Cornell, New York-USA.

<sup>4</sup> Universidad Autónoma de Madrid-Facultad de Medicina, Madrid-España.

### MicroScan



## Microbiología Automatizada

### Identificación y Sensibilidad

Microscan responde a las necesidades de atención eficaz de los pacientes mediante resultados automatizados rápidos de ID/AST sin reducir la exactitud.



WalkAway 40 Plus



WalkAway 96 Plus

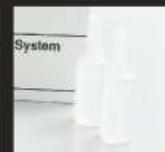


autoSCAN4



#### Selección de colonias con PROMPT

Estandarización de inóculos sin pérdida de tiempo por turbidez gracias al sistema de inoculación PROMPT™.



#### Preparación de inóculos con PROMPT

La estabilidad del inóculo de hasta cuatro horas flexibiliza el flujo de trabajo.



#### Inoculación de panel con RENOK

La inoculación simultánea de los 96 pocillos del panel simplifica el flujo de trabajo.

### Sistemas MicroScan

La línea se completa con múltiples opciones de paneles que han sido adaptados a la epidemiología local, de tipo Combo (ID/AST), solo CIM y solo identificación. También Paneles para identificación de levaduras, anaerobios y fastidiosos y Paneles especiales para sensibilidad de Microorganismos exigentes.

### LabPro Software Suite

La mejora de la gestión de datos con el conjunto de aplicaciones de LabPro promueve la eficacia en el laboratorio al agilizar el flujo de trabajo y facilitar el acceso a la información del paciente. LabPro Manager, LabPro Alert y LabPro Connect en forma conjunta, le ayudan a estandarizar y consolidar las pruebas, adaptar la creación versátil de informes de resultados y aumentar su capacidad para identificar la emergencia de nuevas resistencias.

 **BIODIAGNOSTICO**

Av. Ing. Huergo 1437 P.B. "I" C1107APB - Buenos Aires Argentina Tel/Fax: +54 11 4300-9090

info@biodiagnostico.com.ar www.biodiagnostico.com.ar

e-mail: norys.rodriguez@manlab.com.ar



## Resumen

A objeto de comparar los niveles de LDL oxidada y anticuerpos anti-HSP60 entre individuos sanos y con enfermedad cerebrovascular isquémica, y verificar su interrelación en dicha enfermedad, a 32 individuos: 16 hombres y 16 mujeres y sus respectivos controles (con similar edad y sexo), les fue medido las concentraciones en suero de LDL-oxidada y de los anticuerpos contra la proteína de estrés anti-HSP60 por el método de ELISA. Se empleó la prueba t de muestras independientes para comparar las medias; chi-cuadrado para comparar la severidad y la incidencia de la enfermedad; correlación de Pearson para medir la relación lineal entre las variables; Odds Ratio para determinar factores de riesgo y análisis de correspondencia múltiple para caracterizar los puntos de corte de los factores de riesgo. Los niveles promedio de ambos parámetros fueron significativamente superiores en los individuos con ACV ( $P < 0,05$ ), y al comparar individualmente, dicho grupo presentó entre 78,13% y 96,88% de individuos con mayor nivel de LDL-oxidada y antiHSP60, respectivamente, que su respectivo control pareado. Se detectó una correlación positiva entre la LDL-oxidada y anti-HSP60 ( $r = 0,204$ ). Se detectaron puntos de corte para cada parámetro que permitieron establecer porcentajes de incidencia para ACV isquémico superiores en el grupo de pacientes, revelando mayor probabilidad a padecer la enfermedad cerebrovascular al presentarse niveles por encima de los mismos y marcada diferenciación entre los grupos. De ello, se concluyó que, para la población estudiada, los factores psicológicos evaluados inducen la elevación de los niveles de LDL-oxidada y anticuerpos anti-HSP60, involucrándose todos en la etiopatogenia de la enfermedad cerebrovascular; por lo que, los parámetros bioquímicos evaluados en esta investigación pueden ser considerados como factores de riesgo al ACV isquémico.

**Palabras clave:** LDL oxidada, anticuerpos anti HSP60, factores de riesgo, aterosclerosis, ACV.

## Introducción

El cerebro recibe un 25% del oxígeno del cuerpo, el cual no puede almacenar, y como sus células requieren un aporte constante del mismo para mantenerse sanas y funcionar correctamente; requiere que la sangre llegue continuamente. Así que, una reducción del flujo sanguíneo durante un período de tiempo ocasiona la interrupción del suministro de oxígeno a las células, provocando la muerte (infarto) del tejido vital que, en este caso, se conoce como accidente cerebrovascular (ACV), también denominado, Apoplejía, Ictus o Stroke (17).

El ACV es considerado como la principal causa de discapacidad severa, ya que alrededor de un 60% de los pacientes que sobreviven al mismo padecen de discapacidad física y psicológica a largo plazo (3); constituyéndose en un verdadero problema de salud pública (39). Este se ha constituido en la tercera causa de muerte en el mundo (20, 27), y la Organización Mundial de la Salud ha estimado que para el año 2030 en países de bajos y medianos recursos la cifra de muertes por ACV ascenderá a 7,8 millones (20).

Los ACV de tipo isquémico son los más frecuentes, presentándose en el orden del 80-85%, siendo 2/3 de los mismos causados por la formación de trombos y émbolos en la región de la bifurcación de la arteria carótida (Roldán et al., 2006), los cuales terminan obstruyendo el vaso sanguíneo en algún punto afectado por estenosis ocasionada por aterosclerosis (8).

Es bien conocido que la aterosclerosis se caracteriza por la presencia de depósitos de lípidos en la capa íntima de las arterias, ya sea de grande, mediano o de pequeño calibre, produciendo con el tiempo, y la contribución de efectos inflamatorios, ambientales, genéticos y otros factores precipitantes, la formación y/o ruptura de la denominada placa aterosclerosa o placa de ateroma (9, 29).

Entre los factores de riesgo de esta enfermedad se han descrito: dislipidemias, hipertensión arterial, diabetes, obesidad (mayormente de tipo abdominal), discrasias sanguíneas, tabaquismo, hipertrofia ventricular izquierda, infarto de miocardio,

fibrilación auricular, insuficiencia coronaria, edad avanzada; lo favorecen ciertos hábitos de conducta, como el sedentarismo, consumo de café, tabaco, alcohol, anfetaminas, cocaína e inclusive algunos medicamentos (11, 12, 16). Además; han surgido los factores no tradicionales, como: hiperhomocisteinemia y deficiencia de vitaminas del complejo B, hiperfibrinogenemia, incrementos de la PCR e hiperlipoproteinemia A (10, 16).

A su vez, se describen factores de riesgo emergente y tratables, de índole microbiológico: infecciones por *Helicobacter pylori*, *Citomegalovirus*, *Chlamydia pneumoniae*, *Herpes zoster* (1, 2, 15), los cuales incrementan el riesgo a ACV por distintos mecanismos fisiopatológicos, indicando que su detección y control pueden contribuir en el manejo de la enfermedad aterotrombótica y que la búsqueda de infecciones recientes debería constituirse en una rutina en estos pacientes (2).

Sin embargo, los factores de riesgo convencionales explican menos del 50 por ciento de esta enfermedad; hecho que probablemente esté asociado a nuevos factores bioquímicos y genéticos, los cuales además podrían explicar la variación que existe entre los diferentes grupos étnicos, entre otros; de allí que, los avances recientes en la comprensión de la patogénesis de la enfermedad vascular aterosclerótica han estimulado el interés en los llamados nuevos factores de riesgo (7).

Por su parte, factores de riesgo ya ampliamente identificados, como hipertensión, hipercolesterolemia y tabaquismo, pueden actuar induciendo el desequilibrio entre pro-oxidación y anti-oxidación (14). De manera que, es una de las patologías asociadas a estrés oxidativo más estudiada durante los años, la cual en la mayoría de los casos, permanece silente para convertirse en uno de los principales factores de riesgo para ACV (7).

El proceso de la aterosclerosis se produce por una interrelación muy estrecha de múltiples mecanismos fisiopatológicos, que incluyen disfunción del metabolismo de los lípidos, activación plaquetaria, trombosis, disfunción endotelial, inflamación, estrés oxidativo, activación de células musculares

lisas vasculares, alteración de la matriz metabólica, remodelamiento y otros factores genéticos (18).

Para explicar su patogenia, la teoría más aceptada es la teoría oxidativa (Figura N° 1), que considera la lesión arterial inicial, la estría grasa y su progresión a placa de ateroma íntimamente asociadas a la acumulación de macrófagos de lipoproteínas de baja densidad (LDL) que han sido mínimamente oxidadas y participan en el desarrollo inicial de aterosclerosis y en la respuesta oxidativa al proceso inflamatorio (5, 19).

La LDL-oxidada se define como una "LDL modificada oxidativamente" por productos orgánicos como los aldehídos que transforman a los componentes de las proteínas y aumentan las cargas negativas de las LDL necesarias para su interacción y absorción por los macrófagos; siendo entonces, una partícula derivada de LDL que puede tener peróxidos o sus productos de degradación generados dentro de la molécula (28).

Esta ha sido considerada el cuarto colesterol, a sumar a los tres más utilizados en la práctica médica: HDL, LDL y colesterol total, siendo considerada un colesterol más aterogénico (5, 31), dada su estrecha relación con los radicales libres, conociéndose que su aumento tiene valor predictivo directo en la aparición de aterosclerosis que evidencian su relevante papel en la etiología de ésta (14);

En base a las pruebas in vitro, la LDL-oxidada se divide en dos categorías principales: "LDL mínimamente modificada" (LDL-MM) y "LDL ampliamente oxidada" (LDL-Ox). Las diferencias de las dos categorías de LDL se explica en que la LDL-MM se origina en la primera etapa de la oxidación antes de que los monocitos sean reclutados, donde la oxidación de la LDL presenta pocos cambios en la apo-B. La LDL-MM es químicamente diferente de la LDL nativa; sin embargo, todavía es reconocida por los receptores de la LDL nativa, pero no por la mayoría de los receptores *scavenger*. En la segunda etapa los monocitos son reclutados en la lesión y convertidos en macrófagos con la capacidad de fagocitar cuerpos extraños, entre ellos LDL oxidada, por un proceso de endocitosis. En esta etapa, los lípidos de la LDL se oxidan más, pero la porción de proteína de la LDL también se modifica, lo que lleva a una pérdida de reconocimiento por el receptor de LDL nativa y se produce un cambio de reconocimiento por parte de los receptores *scavenger* hacia la LDL-oxidada (9).

Cada una de las dos categorías de la LDL-oxidada se compone de una gran variedad de preparaciones que difieren en composición y efectos biológicos. Debido al tipo de agente oxidante utilizado y las condiciones de oxidación de la LDL se determinará las propiedades químicas y biológicas de la LDL-Ox (25).

Estas LDL oxidadas o productos

liberados de ellas, van a tener mayor poder aterogénico ya que son captadas más ávidamente por los macrófagos, son citotóxicas para el endotelio y estimulan la producción de factores vasoactivos, de adhesión, trombóticos y de proliferación de células musculares lisas de la vasculatura, iniciando o extendiendo la lesión aterosclerótica (9).

Numerosas investigaciones apoyan los aspectos ya descritos, en su mayoría asociadas a enfermedad cardiovascular; entre ellas, Holvoet et al. (22) fueron los primeros en demostrar que los pacientes con enfermedad coronaria tenían niveles plasmáticos significativamente elevados de LDL-oxidada, y que estos niveles eran muy similares en pacientes con enfermedad coronaria estable y en pacientes con síndromes coronarios agudos y significativamente mayores en pacientes con angina estable, angina inestable e infarto agudo de miocardio en comparación con sujetos de control de la misma edad y supuestamente sanos.

No obstante, la LDL-oxidada no solamente es pro-aterogénica y pro-inflamatoria, también tiene carácter inmunogénico, provocando la generación de autoanticuerpos séricos (anti-LDLox) (31). Estos anticuerpos anti-LDLox se demuestran tanto en individuos sanos como en pacientes con enfermedad cardiovascular (ECV) y su función aún no está clara, generando controversia al atribuírseles propiedades

## ZIKA, DENGUE & CHIKUNGUNYA

**KIT DE DETECCIÓN POR REAL TIME PCR DISEÑADO PARA LA DETECCIÓN Y DIFERENCIACIÓN ESPECÍFICA DE LOS VIRUS ZIKA, DENGUE Y CHIKUNGUNYA EN MUESTRAS CLÍNICAS PROCEDENTES DE PACIENTES CON SIGNOS Y SÍNTOMAS DE INFECCIÓN POR ESTOS VIRUS**

- El RNA es extraído a partir de las muestras clínicas, provenientes de sangre entera, suero, plasma u orina
- Compatible con múltiples plataformas de extracción manual y automáticas

- FTD-84-32 Test para 32 reacciones
- FTD-84-64 Test para 64 reacciones
- Validados con diferentes equipos de Real Time PCR

 **tecnolab**



**Fast Track**   
DIAGNOSTICS  
A Siemens Healthineers Company



Estomba 964 | C1427COV CABA  
Buenos Aires | Argentina  
Tel: 54 11 4859 5300  
info@tecnolab.com.ar  
[tecnolab.com.ar](http://tecnolab.com.ar)

aterogénicas así como también anti-aterogénicas y han permitido detectarla en circulación a través de inmunoensayos, considerándose un firme indicador del estrés oxidativo *in vivo* y marcador de aterosclerosis (36).

En este sentido, Biomedica Gruppe (3) señala que los auto-anticuerpos contra la forma oxidada de la LDL se pueden emplear como parámetro que refleja la incidencia del proceso de oxidación que tiene lugar *in vivo*, ya que se han detectado niveles elevados de estos auto-anticuerpos en la sangre de pacientes con enfermedades de las arterias coronarias. Algunos estudios han demostrado una correlación entre dichos auto-anticuerpos y la progresión de aterosclerosis de carótida, aunque también, se han observado niveles bajos de éstos durante procesos de septicemia e infarto de miocardio. Esta detección en suero anticuerpos anti-LDL-oxidada en pacientes con enfermedad aterotrombótica, así como linfocitos T reactivos contra las LDL-oxidada, hace que los mismos puedan ser utilizados como marcadores clínicos de estas enfermedades (13).

En otro orden de ideas, se ha demostrado que en respuesta a los estímulos de estrés o injuria celular, como la apoptosis inducida por el estrés oxidativo, toxinas, shock térmico, etanol y daño celular después de una isquemia, las células producen altos niveles de proteínas características de estrés celular o "proteínas de estrés", inicialmente denominadas HSP (por sus siglas en el idioma inglés Heat Shock Proteins) o proteínas de choque térmico (21, 30, 32).

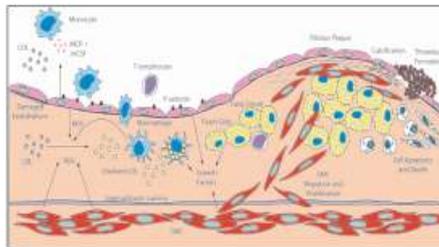
Las HSP se encuentran en formas, intracelular y extracelular. La expresión intracelular, ha sido relacionada a funciones en el plegamiento, estabilización, transporte, translocación y degradación proteica, siendo la HSP 60 una de las más conocidas de estas proteínas de choque térmico, cuya expresión se incrementa cuando las células están sometidas a diversos tipos de estrés (34).

Es conocido que la célula efectúa la producción de estas proteínas con la finalidad de protegerse de las condiciones desfavorables, como un mecanismo de defensa, inmediatamente después de un aumento repentino de la temperatura del medio

ambiente, actuando como buffer para amortiguar el daño que este aumento de temperatura pueda causarle. Este hecho puede ser observado tanto en las bacterias de estructura más simple como en las neuronas más diferenciadas (33). De modo que, estas proteínas aparecen involucradas en la tolerancia y la cito-protección y su participación ha sido investigada en relación con la patogénesis, la prognosis y el tratamiento de diversas patologías; a pesar de lo que los mecanismos asociados no han sido determinados adecuadamente. No obstante, la inducción de la síntesis de éstas ha sido relacionada con la defensa del organismo frente a infecciones diversas. Así, la familia Hsp60 ha sido vinculada con mecanismos involucrados en la defensa molecular del hospedador frente a infecciones por *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia trachomatis*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*, entre otras (34).



Figura N° 1. Development of atherosclerosis.



Tomado de: Madamanchi, N., Vendrov, A. & Runge M. (2005). Oxidative Stress and Vascular Disease. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 25, 30. "Especies reactivas de oxígeno producidas por células endoteliales macrófagos y LDL oxidada en el espacio sub-endotelial, en los sitios de daño endotelial, inician eventos que culminan en la formación de una placa fibrosa. La ruptura de la placa fibrosa conduce a la formación del trombo y la oclusión del vaso" (26)

Por otra parte, las HSP extracelulares pueden estimular el sistema inmune, particularmente influenciando la respuesta inflamatoria, induciendo la producción de citoquinas y mediando en la presentación de antígenos (34). De allí que, dichas proteínas, se encuentran inmersas en la hipótesis inmunológica de la aterosclerosis la cual tiene sus bases en los eventos de la respuesta inmunológica que tienen lugar ante los diferentes estímulos aterogénicos, dado que en las lesiones ateroscleróticas se han observado complejos de anticuerpos,

antígenos y proteínas del sistema del complemento en el espacio sub-endotelial, observándose linfocitos B en los bordes de las lesiones. También se ha comprobado que las etapas más tempranas de la aterosclerosis se caracterizan por una reacción probablemente causada por auto-antígenos y es posible identificar linfocitos T presentes en la lesión, incluso, antes que se produzca el desarrollo de la placa (13).

En este sentido, las HSP (junto con la LDL-oxidada) son consideradas auto-antígenos primarios en el proceso de aterosclerosis; y dado que participan en el recambio, reparación y aclaramiento de proteínas que han sido dañadas o inactivadas, se sintetizan en altas concentraciones cerca de regiones donde se produzca estrés celular, como en el endotelio vascular y los procesos inflamatorios; existiendo en la literatura evidencias del carácter inmunogénico de las HSP, ya que, su efecto protector celular termina siendo revertido en un proceso totalmente contrario; pues su presencia en la superficie celular de HSP60 constituye una señal para que el sistema inmunitario las reconozca, se active y la célula sea destruida. Además, se ha observado que existe una interrelación entre las LDL-oxidada y las HSP, puesto que las primeras pueden, por sí mismas, desencadenar un aumento de la expresión de HSP por parte de las células endoteliales (13).

De manera que, se condujo al surgimiento de la hipótesis inmunológica de la aterosclerosis, establecida por Knoflach, Bernard & Wick (24), la cual se pudiera resumir en que los anticuerpos y las células T que son formados en contra de la proteína de "heat-shock" (Hsp60) por infecciones recurrentes, pueden hacer reacción cruzada con la Hsp60 humana expresada en las células endoteliales estresadas, pero no en las células no estresadas (Figura N° 2). Considerando dentro de los estresores el estrés biomecánico (hipertensión arterial, estrés turbulento en los puntos de bifurcación del vaso), citoquinas (tales como el factor tumoral de necrosis [FTN-alfa] o la LDL oxidada. Algunos de estos factores pueden alterar químicamente la Hsp60 humana para hacerla inmunogénica e inducir una reacción autoinmune (30).



Figura N° 2. Resumen de la hipótesis

inmunológica de la aterosclerosis



Tomado de: Peña, J. (2009). Enfoque integral de la enfermedad coronaria en el hombre. Con especial referencia a los anticuerpos circulantes de la proteína de estrés Anti-Hsp60. [Tesis Doctoral]. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España (29).

Por tanto, se plantea la posibilidad de interrelación de estos dos marcadores bioquímicos: anticuerpos circulantes anti-HSP60 y de la LDL-oxidada, como marcadores de estrés oxidativo en individuos con ACV isquémico y sus diferencias con los respectivos controles pareados por edad y sexo. Considerándose que es posible que en

la muestra objeto de estudio, los individuos que han padecido ACV isquémico presenten niveles de LDL- oxidada y anti-HSP60, mayores que los individuos sanos y que en la misma exista una relación directa y concordante entre LDL-oxidada y anticuerpos contra la proteína de estrés (anti-HSP60), que sugiera que estos tienen una relación fisiopatogénica con el ACV isquémico y, por tanto, ser propuestos como factores de riesgo no tradicionales al mismo.

#### Objetivos

- Comparar las concentraciones de LDL-oxidada y anticuerpos anti-HSP60 entre el grupo de pacientes con ACV isquémico y su grupo control.
- Correlacionar los marcadores bioquímicos LDL- oxidada y anticuerpos anti-HSP60 en el grupo de estudio.
- Proponer a los ya mencionados marcadores bioquímicos LDL-oxidada y los anticuerpos anti-HSP60 como marcadores no tradicionales de riesgo a enfermedad cerebrovascular isquémica.

- Establecer niveles de LDL-oxidada y anti-HSP60 con probabilidad de riesgo a ACV isquémico.

#### Metodología

Se sometieron al estudio 64 individuos, dispuestos a participar en el mismo, según consentimiento firmado, divididos en dos grupos poblacionales: ACV y control.

El grupo ACV estuvo constituido por 16 mujeres entre 30 y 86 años de edad y 16 hombres, entre 36 y 73 años de edad con diagnóstico de de ACV isquémico, sucedido entre uno a seis meses previos al estudio, diagnosticado clínicamente, así como por Tomografía Axial Computarizada y/o Resonancia Magnética Nuclear, de acuerdo a los datos obtenidos de su historia clínica.

El grupo control estuvo constituido por 32 individuos aparentemente sanos, 16 mujeres entre 29 y 86 años de edad y 16 hombres entre 37 y 75 años de edad. Los

 **BD Vacutainer®**

Líder en Soluciones Preanalíticas

Calidad y Bioseguridad:  
Su interés y nuestro compromiso



Para contactarse, llámenos al: 0800-444-55BD (23)  
o escribanos a: [vacutainer@bd.com](mailto:vacutainer@bd.com)



mismos correspondieron a voluntarios seleccionados de manera tal que estuvieran pareados a un correspondiente individuo del grupo ACV, según su edad (con una diferencia no mayor a  $\pm 5$  años) y sexo. Todos sin enfermedad vascular periférica, cardiovascular o cerebrovascular, sin hiperlipidemias, ni hipertensión arterial, diabetes mellitus, síndrome metabólico, cardiopatías, tabaquismo, obesidad, drogadicción o alguna enfermedad crónica o psiquiátrica, con niveles basales de glicemia y perfil lipídico dentro del rango de referencia.

A cada individuo se le extrajo un espécimen de 5 a 10 mL sangre luego de 12 horas de ayuno, de una vena del antebrazo, después de ser mantenido en reposo al menos unos 15 minutos. Del mismo se obtuvo muestras de suero, de acuerdo a las recomendaciones para la obtención de muestras de calidad analítica para tal procedimiento.

Estas muestras fueron distribuidas en 3-5 alícuotas de 0,5 mL y se preservaron a  $-24^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la realización de los ensayos correspondientes. Las mismas se utilizaron para medir los niveles séricos basales de glicemia y perfil lipídico, que en el caso de los controles se empleó para determinar si cumplían con los criterios de inclusión, para lo cual también se les midió la tensión arterial, peso, medida del perímetro de la cintura y la altura del ombligo. Estas mediciones bioquímicas fueron efectuadas en el laboratorio de Bioquímica Clínica de la Escuela de Bioanálisis de la Universidad de Los Andes y en el Laboratorio del Hospital Sor Juana Ines de La Cruz de la ciudad de Mérida; verificando la confiabilidad de cada análisis. Mediante el uso de sueros controles para cada parámetro.

Dichas muestras también se emplearon para determinar la concentración de LDL-oxidada y anticuerpos antiHSP60.

La LDL-oxidada mediante el método de ELISA, empleando reactivos de Biomédica Gruppe (4).

Las determinaciones de anticuerpos anti HSP60 se realizaron por método de ELISA, empleando reactivos de Stressgen Biotechnologies (38).

Cada determinación fue realizada por duplicado y para evaluar la confiabilidad de la determinación fue procesado por triplicado un suero control valorado, provisto con el kit de reactivos ya descrito de Biomedica Gruppe para la LDL oxidada y un material de control preparado para evaluar la confiabilidad del ensayo de antiHSP60.

Para el cálculo de las concentraciones se utilizaron curvas de calibración elaboradas con las absorbancias resultantes de la determinación por duplicado en los diversos calibradores provistos con el kit de reactivos.

Con los resultados obtenidos se realizaron los análisis estadísticos necesarios para el cumplimiento de los objetivos planteados. Para ello, se utilizó el software IBM SPSS versión 21 para el diseño de la base de datos y procesamiento de los análisis mediante estadística descriptiva e inferencial. Dependiendo de la naturaleza de las variables, se empleó el estadístico  $t$  para muestras independientes para la comparación de medias; chi-cuadrado para comparar la severidad y la incidencia de la enfermedad; correlación de Pearson para medir la

relación lineal entre variables; Odds Ratio para determinar factores de riesgo y análisis de correspondencia múltiple para caracterizar los puntos de corte de los factores de riesgo. La significancia estadística se estableció si  $P < 0,05$ .

## Resultados

### Comparación de los marcadores bioquímicos.

La comparación de los marcadores bioquímicos LDL oxidada y anticuerpos anti-HSP60, entre el grupo con ACV y el grupo de pacientes, se muestra en la Tabla N° 1 y los Gráficos N° 1, N° 2 y N° 3.



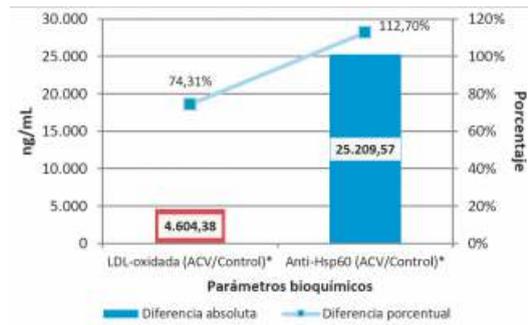
Tabla N° 1. Comparación de LDL oxidada y antiHSP60 por grupo.

MARCADOR BIOQUÍMICO	Grupo		P
	ACV	Control	
	Media (DE)	Media (DE)	
LDL-oxidada ng/mL	10,800,94 (4,183,95)	6,196,56 (3,054,24)	0,000*
Anti-Hsp60 ng/mL	47,577,41 (27,165,25)	22,367,84 (7,839,34)	0,000*

Fuente: Cálculos propios; \* diferencias significativas DE= desviación estándar



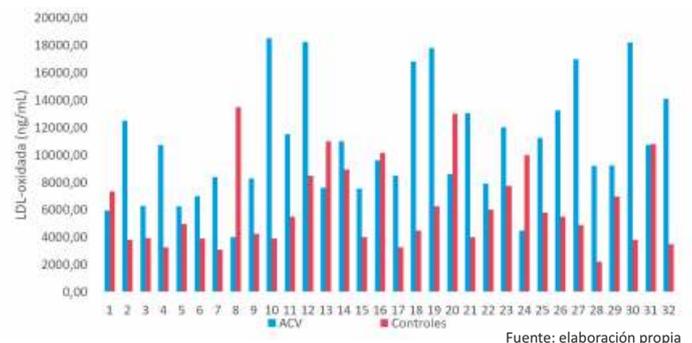
Gráfico N° 1. Diferencias absolutas y porcentuales de los parámetros bioquímicos entre grupos ACV y control.



Fuente: Cálculos propios; \*diferencias significativas  $P < 0,05$



Gráfico N° 2. Niveles individuales de LDL-oxidada en pacientes con ACV y sus respectivos controles.



Fuente: elaboración propia



Gráfico N° 3. Niveles individuales de anti-HSP60 en pacientes con ACV y sus respectivos controles.

# Dengue - Zika Chikungunya

**BIO-RAD**

## Dengue

- **Platelia Dengue NS1Ag**  
ELISA x 96 tests
- **Dengue NS1Ag strip**  
Inmunocromatografía – Test Rápido x 25 tests
- **MultiSure** Dengue IgG, IgA, IgM y NS1Ag  
Inmunocromatografía – Test Rápido x 20 tests
- **Dengue IgG**  
ELISA x 96 tests
- **Dengue IgM**  
ELISA x 96 tests
- **Dengue IgM captura**  
ELISA x 96 tests



## Zika

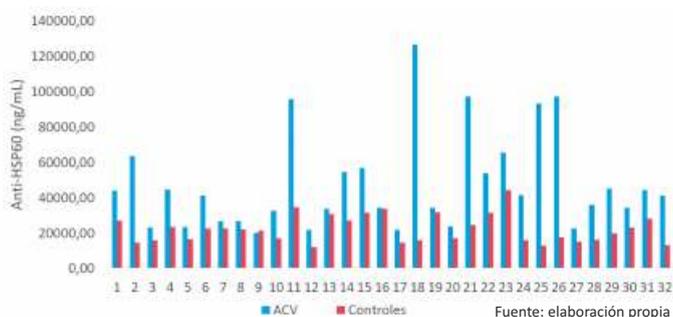
- **Zika IgM Captura**  
ELISA x 96 tests
- **DPP Zika IgM /IgG**  
Inmunocromatografía – Test Rápido x 25 tests



## Chikungunya

- **Chikungunya IgG**  
ELISA x 96 tests
- **Chikungunya IgM Captura**  
ELISA x 96 tests





Fuente: elaboración propia

Para el LDL-oxidada y el anti-Hsp60 se observó diferencias en los valores promedios de estos parámetros en los grupos ACV y control con  $P(0,000)$ ; siendo los promedios más elevado en el grupo de pacientes con ACV que en el grupo control.

En base a los valores promedios, la diferencia de los pacientes con ACV con respecto al grupo control, para el anti-Hsp60 fue 112,70% y de 74,31% para el LDL-oxidada.

Se muestran las 32 parejas de individuos: paciente y su respectivo control, 31 de los 32 (96,88%) de los individuos del grupo con ACV isquémico presentaron mayor concentración de anticuerpos anti-HSP60 que su respectivo control.

En diagrama de dispersión entre el LDL-oxidada y los anti-HSP60 muestra una correlación lineal directa con  $P(0,000)$  entre estos dos marcadores bioquímicos.

#### LDL-Oxidada y anti-HSP60 como factores de riesgo en la enfermedad cerebrovascular isquémica (ACV).

Al considerar la mediana como punto de corte para cada una de las variables bajo estudio (Tabla N° 2) y con éstos discriminar entre los grupos ACV y control, estableciendo un punto de corte referencial que diferencie la incidencia de la enfermedad cerebrovascular isquémica (ACV) y factor de riesgo, se presentaron los resultados mostrados en las Tablas 2 a la 4 y el Gráfico N° 4.

La mediana para los parámetros bioquímicos se tiene para el LDL-oxidada 7.825 ng/mL y anti-HSP60 27.138 ng/mL.

Para la LDL-oxidada la incidencia por encima del punto de corte de 7.825 ng/mL fue significativamente superior (75%) con  $P(0,000)$  en el grupo con ACV; presentándose 9 veces más probabilidad de presentar esta enfermedad en niveles superiores al punto de corte. Igualmente, para anti-HSP60 se observó mayor incidencia de individuos con valores superiores al punto de corte (27.138 ng/mL) en los pacientes con ACV (71,88%) con diferencias significativas  $P(0,001)$ , mostrando una probabilidad de 6,53 veces de presentar enfermedad cerebrovascular isquémica sobre al resultar sus niveles por encima del referido punto.

Se observa que, en el caso de la LDL-oxidada con  $P(0,029)$  en el sexo femenino y  $P(0,003)$  en el masculino, mayor incidencia de valores superiores al punto de corte de 7.825 ng/mL, en el grupo con ACV; mostrando 7,22 y 15,40 veces mayor, probabilidad de riesgo. Para



Tabla N° 2. Puntos de corte percentil 50 para las variables en estudio

VARIABLES	PERCENTIL (50)
LDL-Oxidada (ng/mL)	7825
Anti-HSP60 (ng/dmL)	27138

Fuente: Cálculos propios



Tabla N° 3. Parámetros bioquímicos como factor de riesgo en la enfermedad cerebrovascular isquémica

Parámetros bioquímicos	Grupo		P	OR	IC-OR (Li-Ls)
	ACV	Control			
	Total (%)	Total (%)			
<b>LDL-Oxidada</b>					
≥ 7.825 ng/mL	24 (75,00%)	8 (25,00%)	0,000*	9,00**	2,90 – 27,91
< 7.825 ng/mL	8 (25,00%)	24 (75,00%)			
<b>Anti-HSP60</b>					
≥ 27.138 ng/mL	23 (71,88%)	9 (28,12%)	0,001*	6,53**	2,20 – 19,42
< 27.138 ng/mL	9 (28,12%)	23 (71,88%)			

Fuente: Cálculos propios; \* diferencias significativas en la incidencia de ACV; \*\* OR (Odds Ratio) significativo Li &gt; 1



Tabla N° 4. LDL oxidada y antiHSP60 como factores de riesgo en la enfermedad cerebrovascular isquémica según sexo.

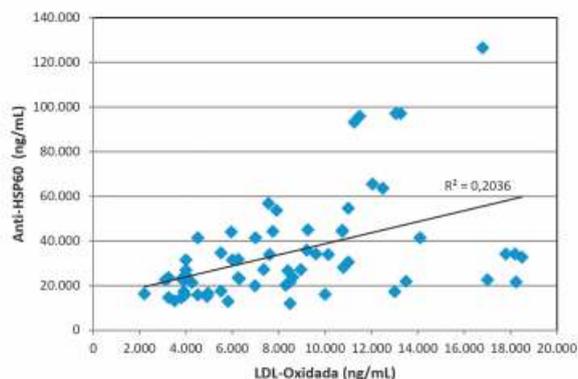
Parámetros bioquímicos/ sexo	Grupo		P	OR	IC-OR (Li-Ls)
	ACV	Control			
	Total (%)	Total (%)			
<b>Femenino</b>					
<b>LDL-oxidada</b>					
≥ 7.825 ng/mL	13 (68,42%)	6 (31,58%)	0,029*	7,22**	1,44 - 36,22
< 7.825 ng/mL	3 (23,08%)	10 (76,92%)			
<b>Anti-HSP60</b>					
≥ 27.138 ng/mL	13 (81,25%)	3 (18,75%)	0,001*	18,78**	3,18 - 110,84
< 27.138 ng/mL	3 (18,75%)	13 (81,25%)			
<b>Masculino</b>					
<b>LDL-oxidada</b>					
≥ 7.825 ng/mL	11 (84,62%)	2 (15,38%)	0,003*	15,40**	2,50 - 95,05
< 7.825 ng/mL	5 (26,32%)	14 (73,68%)			
<b>Anti-HSP60</b>					
≥ 27.138 ng/mL	10 (62,50%)	9 (37,50%)	0,289	2,78	0,66 - 11,62
< 27.138 ng/mL	9 (37,50%)	10 (62,50%)			

Fuente: Cálculos propios; \* diferencias significativas en la incidencia de ACV; \*\* OR significativo Li &gt; 1

Nota: OR= Odds Ratio



Gráfico N° 4. Correlación entre LDL-oxidada y anti-HSP60



el anti-HSP60 la diferencia solo se observó en el sexo femenino con  $P(0,001)$ , donde para valores  $\geq 27.138$  ng/mL la incidencia se ubicó en 81,25% en el grupo de ACV; el riesgo fue de 18,78 veces más al estar expuesta a valores de anti-HSP60  $\geq 27.138$ .

## Discusión

### Comparación de los niveles de LDL oxidada y antiHSP60.

Al efectuar la comparación estadística de las concentraciones promedio de los marcadores bioquímicos, se observa que para la LDL-oxidada y el anti-Hsp60 existieron diferencias en los valores promedios de estos parámetros entre los grupos ACV y control con  $P(0,000)$ ; dichas diferencias se reflejan en promedios de concentración más elevado en los pacientes con ACV que el grupo control (el LDL-oxidada con promedio de 10.800,94 ng/L para el grupo ACV y de 6.196,56 ng/mL en el control; anti-Hsp60 con promedio de 47.577,41 ng/mL en los pacientes con ACV y 22.367,84 ng/mL en el control) (Tabla N° 1).

Las diferencias descritas anteriormente se presentan en el gráfico N° 1 en valores absolutos y porcentuales en base a los valores promedios de los pacientes con ACV con respecto al grupo control, para el anti-Hsp60 la diferencia fue 112,70%, mientras que para el LDL-oxidada fue de 74,31%; lo cual denota que las mismas son bien marcadas.

De igual manera, los Gráficos N° 2 y N° 3 muestran las diferencias individuales de la concentración de LDL-oxidada y anti-HSp60, respectivamente, entre cada pareja de individuos (paciente del grupo ACV y su correspondiente individuo control de igual

sexo y similar edad). Los mismos indican que la mayoría de los pacientes (78,13% para LDL-oxidada y 96,88% para anti-HSP60) presentan mayor concentración de ambos parámetros.

Este hallazgo en las concentraciones de LDL-oxidada concuerdan con los estudios efectuados por investigadores en otros tipos de enfermedades subsecuentes a aterosclerosis, como Holvoet et al. (22) y Johnston et al. (23) en pacientes con enfermedad coronaria, los cuales presentaron niveles plasmáticos significativamente elevados de LDL-oxidada, en comparación con sujetos de control sanos. Al igual que la investigación de Sigurdardottir et al. (37) donde fue detectada una relación entre las concentraciones plasmáticas de LDL-oxidada en pacientes con síndrome metabólico y cifras bajas de LDL-oxidada en pacientes sin factores de riesgo. Mas, sin embargo, contrastan a los resultados de Boronat et al. (5), en un estudio del perfil lipídico y estado oxidativo en pacientes con enfermedad vascular periférica en distintos estadios, donde no se encontraron niveles mayores de LDL-oxidada a medida que progresa la patología, lo cual fue atribuido a que los pacientes no presentaban factores de riesgo añadidos y que siendo conocedores de su enfermedad tomaban en cuenta las recomendaciones lipídicas.

No obstante, Brito et al (6) señalan que la determinación directa de la LDL-oxidada en el plasma, o en el suero, es complicada, dada las posibles modificaciones in vivo de las muestras y por la variedad de partículas, en diferentes niveles de oxidación, que pueden ser identificadas y cuya significancia, en términos predictivos de enfermedad, es también potencialmente variable, además de la alta concentración de sustancias antioxidantes presentes en la

sangre.

Por otro lado, estos autores señalan que no hay correlación con la cantidad de LDL-oxidada en la placa aterosclerótica, protegida en la intimidad del subendotelio; pues estiman que en individuos sanos, la concentración plasmática media de LDL-oxidada sea de aproximadamente 0,1 ng/ $\mu$ g de la porción proteica de la LDL, sugiriendo que la localización primaria del análisis de interés podría no ser la circulación (6). Lo cual es apoyado por Boronat et al. (5) quienes cuestionan los niveles circulantes de la misma debido a que, si la lipoproteína oxidada se deposita en el espacio sub-íntimo, no estaría en el plasma.

En cuanto a la concentración de anticuerpos anti-HSP60, los valores promedio superiores en el grupo con ACV (Tabla N° 6), así como el alto porcentaje de este grupo con mayor nivel que sus controles respectivos (Gráfico N°5) concuerda con los hallazgos de Quintini en mujeres en el 2008 (33) y Peña en hombres en el 2009 (29) en mujeres y hombres, respectivamente, con cardiopatía isquémica. Así como, Zhu (41), demostraron una relación significativa entre los Anti-Hsp60 con la presencia y severidad de la enfermedad angiográficamente significativa (>70% de obstrucción).

Por otra parte, Xiao et al. (40) aportan los primeros datos que confirman la asociación entre altos títulos de Anti-Hsp60 y la arterioesclerosis carotídea temprana indicando la posibilidad que ésta proteína esté involucrada en los procesos pro-inflamatorios asociados con la patología inicial del vaso sanguíneo.

# MEG@NALIZAR

Tecnología y Calidad al servicio de la Salud

- Endocrinología
- Química Clínica
- Marcadores Tumorales
- Marcadores Virales
- Hematología
- Inmunología
- Drogas Anticonvulsionantes
- Inmunosupresores

## ● Serología

El Megalaboratorio de los Bioquímicos de Cuyo ●  
Rigurosos Controles Internos y Externos de Calidad ●

Más de 220 laboratorios de toda la Provincia de Mendoza, ●  
confían en Meganalizar por Tecnología, Calidad y resultados en el día



## LDL-Oxidada y anti-HSP60 como factores de riesgo en la enfermedad cerebrovascular isquémica (ACV).

Al proceder a determinar puntos de corte que pudieran discriminar entre los grupos ACV y control, se lograron establecer puntos de corte referencial que diferencian la incidencia de la enfermedad cerebrovascular isquémica (ACV) y factor de riesgo; tal como se muestra en la Tabla N° 2.

Para la LDL-oxidada se tiene diferencias significativas en la incidencia de la enfermedad cerebrovascular isquémica (ACV) con  $P(0,000)$ , donde para valores  $\geq$  al punto de corte hallado (7.825 ng/mL) la incidencia fue de 75%, a diferencia del 25% para valores  $<$  7.825 ng/mL; encontrándose que, para valores  $\geq$  7.825 ng/mL se tiene 9 veces más probabilidad de presentar ACV.

Con relación a anticuerpos anti-HSP60 se observó con  $P(0,001)$  diferencias significativas en la incidencia de ACV. Para valores  $\geq$  27.138 ng/mL (punto de corte) la incidencia fue de 71,88% y para valores  $<$  27.138 ng/mL ésta se ubicó en 28,12%. Igualmente, para valores  $\geq$  27.138 ng/mL se tiene 6,53 veces más probabilidad de presentar enfermedad cerebrovascular isquémica (ver Tabla N° 3).

Por otra parte, se determinó el factor de riesgo según sexo, observándose diferencias en la incidencia de ACV para la LDL-oxidada con  $P(0,029)$  en el sexo femenino y  $P(0,003)$  en el masculino. Para valores  $\geq$  7.825 ng/mL ésta, la incidencia fue de 68,42% y 81,25% respectivamente; mientras que el riesgo fue de 7,22 y 15,40 veces más para valores de la LDL-oxidada  $\geq$  7.825 ng/mL.

Por su parte, para el anti-HSP60 la diferencia solo se observó en el sexo femenino con  $P(0,001)$ , donde para valores  $\geq$  27.138 ng/mL la incidencia se ubicó en 81,25% y para valores  $<$  27.138 ng/mL en 18,75%; el riesgo fue de 18,78 veces más al estar expuesta a valores de anti-HSP60  $\geq$  27.138 (ver Tabla N° 15).

No se encontraron en la bibliografía investigaciones con las cuales contrastar los resultados de esta investigación a este respecto.

## Conclusiones

Dados los resultados obtenidos en la muestra objeto de estudio, se concluye que:

- Los individuos que han padecido ACV isquémico presentan mayores niveles de LDL-oxidada y anti-HSP60 que los individuos sanos.
- Existe una relación directa y concordante LDL-oxidada y anticuerpos contra la proteína de estrés (anti-HSP60), que sugiere que estos tienen una relación fisiopatogénica con el ACV isquémico; por lo que pudieran ser propuestos como factores de riesgo a ACV isquémico.



# MANLAB®

Diagnóstico Bioquímico y Genómico

## Referencias bibliohemerográficas

1. Abdalla, M., Fumagalli, A.I., Galantucci, S., Garib, A., Comi, G., Kwan, J. & Corea, F. (2007). Factores de riesgo microbiológicos para enfermedades cardíacas y cerebrovasculares: potenciales opciones terapéuticas. *Anuario Fundación Dr. J. R. Villavicencio*, 15, 105-110.
2. Ameriso, S. (2009). Inflamación/Infección y enfermedad cerebrovascular. *Revista de Neurología Argentina*, 1(1), 35-40.
3. Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG, A-1210 Wien, Divischgasse. (2010a). OLAB IgG anti oxidised low density lipoprotein enzyme immunoassay for the quantitative determination of Human IgG autoantibodies against oxidised low density lipoprotein in serum CAT. NO. BI-20032.
4. Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG, A-1210 Wien, Divischgasse. (2010b). Oxidised LDL. Enzyme immunoassay for the quantitative determination of oxidised LDL in human edta plasma and serum CAT. NO. BI-20042. 12 X 8 tests.
5. Boronat, M., García, M., Parra, S., Albaladejo, M. & Martínez, P. (2005). LDL oxidada: el cuarto colesterol. *Actualidades 2005*. 2-11
6. Brito, A., Von Mühlen, C., Ake, M., Bodanese, R., Gottlieb, V. & Bodanese, L. (2010). Anticuerpos contra LDL-ox y síndrome coronario agudo. *Arq Bras Cardiol*, 95(1), 47-54.
7. Celis, J., Hernández, D. & King, L. (2006). Enfermedad cerebrovascular. *Guía Neurológica 8*, Capítulo 3 (pp 31-44). Extraído el 09 de Mayo, 2014, de <http://www.acnweb.org/guia/g8cap3.pdf>
8. Centro de Información Cardiovascular del Texas Heart-Institute. (2014). Tipos de accidentes cerebrovasculares. Extraído el 10 de Junio, 2015, de [http://www.texasheart.org/HIC/Topics\\_Esp/Cond/stroktys.cfm](http://www.texasheart.org/HIC/Topics_Esp/Cond/stroktys.cfm)
9. Cirpa, V. (2013). *LDL oxidada correlacionada a la tabla de predicción de riesgo cardiovascular de la OMS/ISH y las fracciones del colesterol, en pacientes del Centro Médico Quirúrgico Boliviano Belga de Cochabamba*. Tesis de grado para optar al título de Magister en Bioquímica Clínica, Facultad de Bioquímica y Farmacia, Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba, Bolivia.
10. Comisión de nuevos factores de riesgo (2001). *Revista Argentina de Cardiología*, 1(69), 1-14.
11. Costa, S., Barontini, M., Forcada, P., Carrizo, P. & Almada, L. (2010). Estrés psicosocial y baja resiliencia, un factor de riesgo de hipertensión arterial. *Revista Argentina de Cardiología*, 5(78), 425-431.
12. De la Serna, P. (2004). Trastornos psiquiátricos en los accidentes cerebrovasculares. *Revista de la Sociedad Española de Médicos Generales y de Familia*, 66, 419-425.
13. Delgado, L., Vázquez, A. & Fernández, E. (2012). Alternativas inmunoterapéuticas para el tratamiento de la aterosclerosis. [versión electrónica]. *Vaccinonator*, 2(1), 8-42.
14. Elejalde, J. (2001). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *Anales de Medicina Interna*, 18(6), 326-335.
15. Escosa, L., Moreno, E., Galache, J., Monzón, F., Salazar, J., Sánchez, J. & Placer, L. (2004). Inflamación y aterosclerosis 2ª parte. Posibles agentes causantes. Tratamientos y ensayos clínicos. *Revista de la Sociedad Aragonesa de Cardiología*, 2(7).
16. Estrada, G. & Estrada, M. (2008). Factores de riesgo para enfermedad aterotrombótica. Capítulo 5. En: *Enfermedad arterial coronaria*. (pp. 397-407). Extraído el 11 de Mayo, 2010, de <http://www.scc.org.co/libros/libro%20cardiologia/capitulo5.pdf>.
17. Fábregas, N. & Valero, R. (2001). Fisiología cerebral y monitorización neurológica y de la profundidad anestésica (*Societat Catalana d'Anestesiologia. Programa Residents segon any*) Abril.
18. Faxon, D., Fuster, V., Libby, P. y col. (2004) Atherosclerotic Vascular Disease Conference: Writing Group III: Pathophysiology, 109: 2617-2625.
19. Fenollar, M., Parra, M., Albaladejo, M. & Cassinello, N. (2005). Perfil lipídico y estado oxidativo en pacientes con enfermedad vascular periférica. *Anales de Cirugía Cardíaca y Vascular*, 11(3), 124-128.
20. Fernández, O., Buego, M. & López, M. (2012). Hiperglicemia post-ictus. *Rev Cubana Neurol Neurocir*, 2(2):144-9.
21. González, J. (2010). *Los síndromes de estrés*. Madrid: Editorial Síntesis, S. A.
22. Holvoet, P., Vanhaecke, J., Janssens, S., Van de Werf, F. & Collen, D. (1998). Oxidized LDL and malondialdehyde-modified LDL in patients with acute coronary syndromes and stable coronary artery disease. *Circulation* 98,1487-1494.
23. Johnston, N., Lagerqvist, B., Siegbahn, A. & Wallentin, L. (2002). *Oxidized LDL and unstable coronary artery disease*. Presented at the American Heart Association Scientific Sessions Chicago, USA.
24. Knoflach, M., Bernhard, D. & Wick G. (2005). Anti-HSP60 Immunity is already associated with atherosclerosis early in life. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1051, 323-331.
25. Levitan, I., Volkov S., & Subbiah, P. (2010). Oxidized LDL: Diversity, Patterns of Recognition, and Pathophysiology. *Antioxid Redox Signal*, 13(1):39-75.
26. Madamanchi, N., Vendrov, A. & Runge M. (2005). Oxidative Stress and Vascular Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25, 29-38.
27. Organización Mundial de la Salud (OMS). (2014). *Estadísticas sanitarias mundiales* [En línea]. Extraído 08 de Agosto, 2015, de [http://www.who.int/gho/publications/world\\_health\\_statistics/2014/fr/](http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2014/fr/)
28. Parthasarathy, S., Raghavamenon, A., Garelzabi, M., & Santanam, N. (2010). Oxidized Low-Density Lipoprotein. *Methods Molecular Biology*, 610, 403-417.
29. Peña, J. (2009). *Enfoque integral de la enfermedad coronaria en el hombre. Con especial referencia a los anticuerpos circulantes de la proteína de estrés Anti-Hsp60*. Tesis de Doctorado para optar al título de Doctor en Patología Existencial e Intervención en Crisis, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España.
30. Peña, J. & Quintini, A. (1999). *Nuevo enfoque en la patogénesis de la aterosclerosis*. Valencia: Dirección de Medios y Publicaciones. Universidad de Carabobo.
31. Pereira, G., Reyes, A., Rodríguez, A., Sánchez, D. & Barrios, V. (2000). Montaje y estandarización para determinar colesterol inmune en suero humano. *Revista Cubana de Endocrinología*, 11(3), 174-80.
32. Qingbo, X. & Georg, M. (2004). El papel patogénico de las proteínas de choque térmico en la aterosclerosis. *Infección y autoinmunidad*, 11, 71-77.
33. Quintini, A. (2008). *Los eventos vitales y las necesidades existenciales como factores de riesgo en la mujer con cardiopatía isquémica. Los autoanticuerpos contra la proteína de estrés anti-Hsp60 como marcador biológico para la cardiopatía isquémica*. Tesis de Doctorado para optar al título de Doctor en Patología Existencial e Intervención en Crisis, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España.
34. Rada, A., Roschman, A., Strauss, M. & Tejero, F. (2011). Expresión de HSP 60 en infecciones murinas experimentales por *Trypanosoma evansi*. *Revista del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"*, 42(1).
35. Roldán, R., Oñate, R., López, F., Cabrezo, M. & Martínez, F. (2006). La ortopantografía como método para la detección de las placas de ateroma calcificadas. *Revista Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, 11, 261-266.
36. Ruiz, N., Espinoza, M., González J., Leal, U., & Reigosa, A. (2011). LDL Oxidada circulante y anticuerpos contra LDL oxidada según niveles de ácido úrico en mujeres con exceso de peso (Venezuela). *Elsevier: Archivos Cardiología México*, 81(3):188-196.
37. Sigurdardottir, V., Fagerberg, B. & Hulthe, J. (2002). Circulating oxidized low-density lipoproteins (LDL) is associated with risk factors of the metabolic syndrome and LDL size in clinically healthy 58-year old man (AIR study). *Journal of Internal Medicine*, 252, 440-447.
38. Stressgen Biotechnologies. 2008. *Anti-Human Hsp60 (total) ELISA Kit For the detection and quantitation of antibodies to Hsp60 in serum*. Catalog Number: EKS-650.
39. Vivar, A. (2009). Ictus, una catástrofe prevenible. *Ictus*, 1(4).
40. Xiao, Q., Mandal, K., Schett, G., Mayr, M., Wick G, Oberholzer, F. et al. (2005). Association of serum-soluble Heat Shock Protein 60 with carotid atherosclerosis. *Stroke*, 36, 2571-2576.
41. Zhu, J. (2001). Antibodies to Human Heat-Shock Protein 60 are associated with the presence and severity of coronary artery disease: evidence for an autoimmune component of atherogenesis. *Circulation*, 103,1071-1075.