

UNIVERSIDAD DE SONORA

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**Determinación de la Expresión de Receptores Tipo Toll
2 Y 4 en Células CD14+ Estimuladas con LDL y HDL
Glicadas**

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el Título de

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

Alan Daniel Romandia Molina

Hermosillo, Sonora

Agosto de 2013

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

DEDICATORIA

Mi trabajo de tesis culmina una etapa de mi vida, y más que un trabajo experimental significa el fruto de 5 años de esfuerzo y dedicación, por lo que ello va para mis seres favoritos en esta vida.

A Dios, por darme sabiduría para entender su ciencia y discernir entre los caminos. Por permitirme indagar y descubrir la maravilla de su creación.

A mi madre, que desde sus entrañas ha creído en mí y me ha dado su amor incondicional.

A mi Padre, quien me ha dado consejo y entendimiento cuando lo he necesitado.

A mi mamá Lola, por cuidarme siempre y por su amor de abuela, que para mí ha sido una segunda madre.

A mi María Renée, por enseñarme a darle una mejor cara a la vida y por siempre regalarme una sonrisa.

A toda mi familia y amigos.

Gracias a Ustedes, porque sin ustedes esto no tendría sentido.

"La sabiduría marca muchos límites, incluso al conocimiento". - Friedrich Nietzsche

AGRADECIMIENTOS

A los Doctores José Manuel Galván Moroyoqui, Luis Fernando López Soto y Jesús Adriana Soto Guzmán por ser parte vital de mi trabajo y por su asesoría.

Al Q.B.C. Juan Manuel Martínez Soto por el apoyo brindado en el desarrollo experimental.

A los miembros del jurado, Enrique Bolado Martínez y Lucía Castellón Campaña por su asesoría en la culminación de este proyecto.

Al Laboratorio Estatal del Estado de Sonora, en especial a la Q.B. Sandra Elena Amarillas Valenzuela por su colaboración y asesoría técnica en este trabajo.

A mis profesores, quienes sin ellos no hubiera sido posible culminar mis estudios y a aquellos quienes me empujaron a seguir creciendo como estudiante y como persona, entre ellos Eduardo Ruiz Bustos, Guadalupe Cañez Carrasco, Adriana Garibay Escobar, Carlos Velázquez Contreras, Rosa Lerma Maldonado, Armando Lizárraga Rubio y Enrique Robles Zepeda.

"Nunca consideres el estudio como una obligación sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber." - Albert Einstein

CONTENIDO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
OBJETIVOS.....	IX
Objetivo General.....	IX
Objetivos Específicos.....	IX
RESUMEN.....	X
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	6
Diabetes Mellitus Tipo 2.....	6
Patogénesis.....	7
Complicaciones.....	7
Complicaciones microvasculares.....	8
Complicaciones macrovasculares.....	8
Aterosclerosis.....	10
Lesión Endotelial.....	10
Sucesos Celulares en la Aterosclerosis.....	12
Efectos de la Diabetes en la Aterogénesis.....	14
Funciones Modificadas en Plaquetas.....	14
Alteraciones de las Lipoproteínas.....	15
Alteraciones en la composición de las lipoproteínas	

	Página
de baja densidad.....	15
Receptores Tipo Toll.....	16
Receptores Toll y la aterosclerosis.....	18
Lipoproteínas.....	19
Lipoproteína de Baja Densidad.....	20
LDL en relación con la aterosclerosis.....	20
Lipoproteína de Alta Densidad.....	21
HDL e inflamación.....	21
Productos de Glicación Avanzada.....	22
Glicación de LDL.....	24
Glicación de HDL.....	25
METODOLOGÍA.....	26
Materiales y Métodos.....	26
Obtención de Células Monocíticas de Sangre Periférica (CMSP) CD14+.....	26
Preparación de LDL y HDL glicada.....	26
Determinación de TLRs 2 y 4 en células monocíticas CD14+ mediante citometría de flujo.....	26
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	28
Expresión de CD14+ en Células Monocíticas de Sangre Periférica estimuladas con LDL, LDL Glicada, HDL, HDL Glicada y Zymosan.....	28

Expresión de TLR2 en células monocíticas de sangre periférica estimuladas con LDL, LDL glicada, HDL, HDL glicada y Zymosan.....	29
Expresión de TLR4 en células monocíticas de sangre periférica estimuladas con LDL, LDL glicada, HDL, HDL glicada y Zymosan.....	30
CONCLUSIONES.....	33
PERSPECTIVAS.....	33
BIBLIOGRAFÍA.....	34

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Participación de la inflamación en todos los estadios de la aterosclerosis.....	13
2. Disfunción endotelial en la diabetes.....	16
3. Activación de receptores tipo Toll.....	18
4. Glicación no-enzimática de proteínas.....	23
5. Expresión de CD14 en CMSP.....	29
6. Expresión de TLR2 en CMSP.....	30
7. Expresión de TLR4 en CMSP.....	31

OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión de TLR2 y TLR4 en células CD14+ estimuladas con HDL y LDL glicadas.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Determinar los niveles basales de TLR2 y TLR4 en las CMSP CD14+ estimuladas con HDL y LDL glicada.

Determinar los niveles post-estímulo de TLR2 y TLR4 en las CMSP CD14+ estimuladas con HDL y LDL glicada.

RESUMEN

La Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) es una preocupación de salud mundial que afecta a millones de personas en todo el mundo. Dicha enfermedad causa una importante morbimortalidad. La magnitud del problema radica no solo en la resistencia a la insulina sino también se asocia con complicaciones vasculares como la aterosclerosis. Estudios reportan altos niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL) con síndrome metabólico, DM2 y desarrollo de la aterosclerosis. Un proceso importante para la aterogénesis es la glicación no enzimática de proteínas lo cual genera productos de glicación avanzada (AGEs) que son un factor importante para el inicio y la progresión de lesiones ateroscleróticas en los pacientes con DM2. Se ha propuesto que las lipoproteínas de baja y alta densidad (HDL) son glicadas en mayor proporción gracias a la hiperglicemia presente en la DM2 sufriendo una modificación lo cual ocasiona que sean reconocidas por las células monocíticas CD14+ involucrados en las respuestas inflamatorias. El objetivo de la presente investigación fue determinar si las proteínas HDL y LDL en estado glicado son capaces de inducir la expresión de los receptores tipo Toll 2 y 4 de células mononucleares de sangre periférica humanas. Se observó que las lipoproteínas de baja como de alta intensidad son capaces de inducir un aumento en la expresión de TLR2 y TLR4 en células monocíticas CD14+ de sangre periférica cuando son modificadas por glicación. Estos resultados nos sugieren que la modificación de lipoproteínas por glicación activa la vía de señalización dependiente de MYD88 en las células monocíticas CD14+ y la posterior activación de NF- κ B activando la expresión de genes proinflamatorios dando como resultado un aumento en la expresión de TLR2, TLR4 y un aumento en la secreción de citocinas proinflamatorias.

INTRODUCCIÓN

La Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) es una condición causada por una deficiencia cuantitativa en la secreción de insulina o por un estado de resistencia a esta y un estado de hiperglicemia crónica (Giacco y Brownlee, 2010). La incidencia de DM2 sigue creciendo a nivel mundial, un estudio reciente menciona que la prevalencia de diabetes incrementaría del 2.8% en el 2000 al 4.4% en el 2030 resultando en 366 millones de personas afectadas (Wild y col., 2004). Sin embargo hasta el 2012 existen 371 millones de diabéticos (IDF, 2012), se espera que aumenten a 552 millones para el 2025 (Whiting y col., 2011). Existen diversos factores que contribuyen al desarrollo de la DM2, entre ellos el sedentarismo y el consumo de alimentos con alto contenido calórico son los que generan una mayor población obesa lo que a su vez aumenta la prevalencia de DM 2 (Gugliucci, 2000; Schulze y col., 2004). Otro factor importante es la predisposición genética a DM2 donde los factores genéticos y su relación entre genes no están aún bien comprendidos (Gugliucci, 2000).

La DM2 es responsable de alrededor el 90% de casos de diabetes (Van den Oever y col., 2012). La diabetes mellitus puede ser asintomática por muchos años, lográndose su diagnóstico principalmente por complicaciones relacionadas. Los síntomas más comunes son fatiga, pérdida de peso, polifagia, polidipsia, poliuria, irritabilidad y visión borrosa (Clark y col., 2007). El estado de hiperglicemia en la DM2 genera en gran parte una serie de complicaciones causadas por lesiones micro- y macrovasculares (Saha y Tuttle, 2010), produciendo patologías como retinopatía, nefropatía y neuropatía (Gugliucci, 2000).

La aterosclerosis es conocida por ser una enfermedad inflamatoria lípido-inducida. La disfunción endotelial termina con la acumulación subendotelial de lipoproteínas aterogénicas y la adhesión de leucocitos en el endotelio, incluyendo monocitos y linfocitos T (den Dekker y col., 2010). Subsecuentemente, se producen y secretan citocinas proinflamatorias, las cuales pueden activar macrófagos residentes, los cuales participan en la inflamación local (den Dekker y col., 2010; Ross, 1999). El complejo entre las células inflamatorias, las citocinas y las enzimas puede conducir a la aparición de una lesión aterosclerótica y eventualmente la formación de una placa o la ruptura de la misma (Davies y col., 1985; Spagnoli y col., 2007). Existen varios mecanismos que pueden contribuir al desarrollo de las lesiones ateroscleróticas en los pacientes con DM2, tales como la hipertensión, hipercolesterolemia, disfunción endotelial, aumento de la activación y agregación plaquetaria, alteraciones de la coagulación de

la placa anormal, alteraciones de las lipoproteínas, y modificación de proteínas por glicación (Calverley y col., 2003; Creager y col., 2003; Kumar y col., 1999).

La glicación de proteínas es un proceso de condensación espontáneo y no enzimática de azúcares reductores, principalmente la glucosa, con proteínas para formar productos covalentes estables que producen una alteración estructural y altera la funcionalidad de las mismas. (González Flecha y col., 2000). El grupo aldehído (o cetona) de azúcares reductores o compuestos derivados de la glucosa, como el glicolaldehído o metilglioxal (Takeuchi y col., 2001; Bunn y Higgins, 1981; González Flecha y col., 2000) condensan reversiblemente con los grupos amino de las proteínas formando una base de Schiff (o aldimina) que experimenta un cambio irreversible a una cetoamina más estable conocida como “producto de amadori” (Bunn y Higgins, 1981; González Flecha y col., 2000), estas son conocidas como aductos de fructosamina y son parte de la primera fase de la glicación llamada “glicación temprana” (Gugliucci, 2000). En segunda fase el producto es sometido a ciclos de condensación con aminos adicionales, deshidrataciones y fragmentaciones de oxidación para producir compuestos heterogéneos estables denominados en general como productos finales de glicación avanzada (AGEs) (Voziyan y col, 2003). Los AGEs modulan el inicio de la aterogénesis en las paredes de los vasos sanguíneos provocando un proceso inflamatorio, proliferativo y además, contribuyen a la perturbación vascular en la enfermedad establecida (Janine y col., 2010), dando lugar a padecimientos como nefropatía, neuropatía y aterosclerosis (Gugliucci, 2000; Jakus y Rietbrock, 2004).

El proceso de glicación tiene significancia fisiológica y patofisiológica, dado que bajo condiciones fisiológicas, la glicación puede detectarse en el proceso de envejecimiento celular, siendo así las reacciones más rápidas e intensas junto a concentraciones de glucosa altas. La hiperglicemia es conocida por aumentar el proceso de glicación en todas las fases y está comprobado que niveles altos de glucosa están directamente relacionados con la formación de AGEs, así como es conocido que la hiperglicemia crónica tanto como aguda favorece la glicación temprana, intermedia y avanzada de proteínas (Jakus y Rietbrock, 2004). Se produce un incremento en la formación de AGEs en sangre y tejidos de diabéticos así como en otros estadios patofisiológicos, como la aterosclerosis, la enfermedad de Alzheimer, enfermedad renal terminal, artritis reumatoide y cirrosis hepática (Jakus y Rietbrock, 2004).

La modificación de lipoproteínas por glicación durante el desarrollo del síndrome metabólico así como en la DM2, presentan un papel muy importante para el desarrollo de la

aterosclerosis. Estudios recientes sugieren que las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y de baja densidad (LDL) pueden influenciar la función de las células beta de los islotes pancreáticos de Langerhans, implicando un rol de estas últimas en la patogénesis de DM2 (Janine y col., 2010). La dislipemia aterogénica es una característica prominente en DM2 incluyendo niveles elevados de lipoproteínas con apolipoproteínas B (ApoB) y bajos niveles de HDL, donde esta última cumple un papel antiaterogénico (Janine y col., 2010).

Las lipoproteínas de alta densidad son una de los 5 grupos mayores de lipoproteínas. Contienen la proporción más alta de colesterol, son abundantes en ApoA-1 y ApoA-2. Su principal función es transportar el colesterol internamente desde las células gracias al transportador ATP-binding Cassette A1 (ABCA1) hacia el hígado (Tabet y Rye, 2009). La enzima plasmática lecitina colesterol aciltransferasa (LCAT) convierte el colesterol libre en un colesterol éster (una forma más hidrofóbica de colesterol) transportada a su núcleo (o core, utilizado también frecuentemente) (Christison y col., 1995). Los niveles de HDL deseables son de 40 mg/dL para los hombres y 50 mg/dL para las mujeres (Bonow y col., 2011). Las HDL son altamente heterogéneas en composición, identificándose más de 100 proteínas en ella (Nahla y col., 2012), teniendo un amplio espectro de actividades antiaterogénicas, incluyendo el flujo de colesterol celular de los tejidos periféricos en el proceso de transporte reverso, así como actividades anti-inflamatorias, anti-oxidativas y anti-apoptóticas (Scanu y Edelstein, 2008). La anormalidad encontrada más frecuentemente en la composición de HDL en pacientes con DM2 es un enriquecimiento de triglicéridos en el núcleo de HDL y una depleción de esteres de colesterol (Janine y col., 2010), otras alteraciones pueden ser un incremento en la concentración de la enzima amiloide sérica A (SAA), acumulación de ApoA1 y ApoA2, disminución de enzimas asociadas a HDL como la paraoxonasa 1 (PON1) (Janine y col., 2010; Nahla y col., 2012) y la LCAT (Janine y col., 2010). Un estudio reciente demuestra que la partícula HDL es capaz de proteger a la LDL de la glicación no enzimática y así mismo demuestra tener una capacidad anti-glicativa (Nahla y col., 2012).

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) pertenecen también a los 5 grupos mayores de lipoproteínas, estas contienen a la apolipoproteína B (ApoB). Tiene un núcleo altamente hidrofóbico que consiste en ácidos grasos poliinsaturados como linoleato y alrededor de 1500 moléculas de colesterol esterificado, su estructura puede ser altamente heterogénea. La función principal de las LDL es el transporte de colesterol hacia las células cuando estas lo requieren. Los niveles óptimos para personas deben rondar en menos de 100 mg/dL (NHLBI, 2004; Bonow y col., 2011) y deben ser menores a 70 mg/dL para personas con alto riesgo de

enfermedades cardiovasculares (Rodney y col., 2003). La LDL participa en los procesos de la aterosclerosis, dando como resultado la formación de células espumosas. Para ser fagocitadas por los macrófagos/monocitos, las lipoproteínas deben ser químicamente modificadas, esta modificación debe ser por glicación y/ oxidación de estas últimas (Nahla y col., 2012).

Uno de los mecanismos inflamatorios que participan durante la aterosclerosis es la activación de receptores tipo toll (TLRs) (Björkbacka, 2006). La señalización de receptores tipo toll es dada por la proteína adaptadora de diferenciación mieloide de respuesta primaria (MyD88) codificada por el gen MyD88. MyD88 juega un papel central en las respuesta inmunitaria tanto innata como adaptativa. Esta proteína funciona como un transductor de señal en las vías de señalización para la Interleucina 1 y los receptores tipo toll. Así mismo estas vías regulan la activación de numerosos genes proinflamatorios (Buchsbaum y col., 2012). Es una proteína adaptadora universal utilizada por todos los TLRs (excepto TLR3) para activar el Factor Nuclear Kappa Beta (NF- κ B) (Arancibia y col., 2007). Otra proteína adaptadora es Mal (también conocido como TIRAP), la cual es necesaria para reclutar MyD88 durante la señalización por TLR 2 y TLR 4 favoreciendo así que MyD88 continúe la señalización a través de IRAK (Arancibia y col., 2007).

Recientemente se encontró que la glicación de las lipoproteínas LDL y HDL induce la expresión y activación de TLRs en células murinas, además esta modificación conduce a su posterior oxidación generando ligandos que activan más receptores tipo toll, ayudando así al desarrollo de la lesión aterosclerótica (Björkbacka, 2006). Por otro lado, se reporta que ratones deficientes en TLR2, TLR4 y el gen MyD88 tienen un desarrollo reducido de aterogénesis, sugiriendo entonces que los TLRs contribuyen de manera importante en esta enfermedad (Björkbacka, 2006). Un estudio hecho con ratones *knockout* (TLR2 $-/-$ apoE $-/-$) comprueba que la expresión y activación de TLR2 participa en la progresión de aterosclerosis (Liu y col., 2007). Otro estudio reportó que en macrófagos provenientes de ratón expresan TLR4 al ser expuestos a LDL mínimamente modificada (un paso temprano en su oxidación) activando las vías de señalización dependientes e independientes de TLR4 (Miller y col., 2005).

Con estos antecedentes es posible considerar que durante el estado de hiperglicemia producido por la DM2 existe una tasa más alta de lipoproteínas glicadas (Janine y col., 2010; Nahla y col., 2012), las cuales pueden contribuir al desarrollo de la lesión aterosclerótica indicado por el proceso inflamatorio y la expresión de TLRs así como la activación de la señalización dependiente de MyD88 (Björkbacka, 2006) como se ha observado en modelos de

ratones. Considerando lo anterior es muy probable que el mecanismo de activación y expresión de TLRs sea similar en humanos de permitiendo la activación de vías de señalización dependiente del MyD88 y la expresión de receptores tipo Toll. Por lo que en este trabajo se medirá la activación de la señalización de TLRs en células CD14+ humanas estimuladas con HDL y LDL glicadas.

ANTECEDENTES

Diabetes Mellitus Tipo 2

Los cambios en el comportamiento humano y su estilo de vida en el último siglo han resultado en un incremento dramático de incidencia en la diabetes a nivel mundial (Zimmet y col., 2001). La epidemia es principalmente de DM2 asociándose principalmente a la obesidad y el síndrome metabólico. En conjunto con la susceptibilidad genética, la DM2 es inducida por factores ambientales y sus comportamientos tales como el sedentarismo (Lyssenko y col., 2008).

La diabetes fue considerada como una enfermedad de menor importancia a lo largo del mundo. Hoy toma lugar como una de las principales amenazas en la salud humana en el siglo 21 (Zimmet y col., 2001). En las últimas dos décadas se ha observado un incremento explosivo en el número de personas diagnosticadas con diabetes a nivel mundial, aumentando en más del 100% en los últimos 13 años, con una estimación de 151 millones de diabéticos en el 2000 (Whiting y col., 2011) a 371 millones en el 2012 (IDF, 2012).

La incidencia de DM2 sigue creciendo a nivel mundial, estudios recientes predicen que la prevalencia de diabetes incrementará del 2.8% en el 2000 al 4.4% en el 2030 resultando en 366 millones de personas afectadas (Gugliucci, 2000; Wild y col., 2004). Sin embargo hasta el 2013 existen 371 millones de diabéticos (IDF, 2012), se espera que aumenten a 552 millones para el 2025 donde la mayoría de los afectados viven en países pobres o en vías de desarrollo (Whiting y col., 2011). Se ha estimado que hay más personas con tolerancia a la glucosa, lo cual es de suma importancia ya que son más susceptibles a desarrollar DM2 (Van den Oever y col., 2012). Es una amenaza multifactorial de salud causada por una compleja interacción entre la predisposición genética y los factores ambientales, con un aumento dramático en su prevalencia (Temelkova-Kurktschiev y Stefanov, 2011).

México ocupa el sexto lugar en número de DM2 a nivel mundial con 10.6 millones de pacientes con DM2 aproximadamente. De este total, alrededor de 2 millones de ellas no han sido diagnosticadas (IDF, 2012).

La diabetes mellitus incluye una serie de trastornos metabólicos que son resultado de la secreción de insulina (Deng y col., 2004), en la respuesta periférica a la misma o en ambas; lo que conduce a un síndrome caracterizado por hiperglucemia crónica y alteraciones en el metabolismo general de carbohidratos, proteínas y lípidos (Díaz-Flores y col., 2004).

Patogénesis

La secuencia patológica de DM2 es compleja y detalla varios elementos que actúan al mismo tiempo para causar esta enfermedad. Una predisposición genética debe existir, aunque es conocido muy poco hasta la fecha. Si el fenotipo de la diabetes ocurrirá depende de muchos factores ambientales que puedan tener una capacidad para estresar el sistema homeostático de la glucosa, junto a la aparición recurrente de obesidad y un estilo de vida sedentario son una causa mayor de la epidemia de la diabetes a nivel mundial (Leahy, 2005).

La insulina es la hormona clave para la regulación de la glucosa en sangre. En general, la normoglicemia se mantiene por la interacción equilibrada entre la secreción de insulina y la eficacia de las acciones de la insulina. Después de una comida, la insulina es secretada en cantidades elevadas, lo que disminuye la producción hepática de la glucosa y conduce a una captación de glucosa en músculos y tejido adiposo (Bergman y Lilly, 1989). La célula de páncreas normal es capaz de adaptarse a los cambios en la acción de la insulina, es decir, una disminución de la acción de la insulina se acompaña de la regulación positiva de la secreción de insulina (y viceversa) (Bergman y Lilly, 1989). La adaptación de las células beta del páncreas impide el desarrollo de la DM2 en un gran número de personas insulino resistentes.

El primer evento en la secuencia que conduce a esta enfermedad es una resistencia insulínica que lleva un incremento en la síntesis y secreción de insulina, e hiperinsulinismo compensatorio lo cual conduce a trabajar más a las células beta, siendo capaz de mantener la homeostasia metabólica por años (Stumvoll y col., 2003). Otros estudios proponen que una masa disminuida de células betas por factores genéticos o citotóxicos predisponen también a la intolerancia de la glucosa (Leahy, 2005). Así mismo cuando la adaptación de la célula beta es insuficiente, ya sea por agotamiento, glicotoxicidad (Yki-Jarvinen, 1992), lipotoxicidad (Poitout y Robertson, 2008), ferrototoxicidad (Kim y col., 2000), deposición amiloide (Hoppener y col., 2000), etc., los sujetos desarrollan intolerancia a la glucosa (IGT) o DM2 (Deng y col., 2004).

Complicaciones

La DM2 magnifica la morbilidad y mortalidad de patologías cardiovasculares. Aparte de las complicaciones microvasculares ya conocidas como nefropatía y retinopatía, existe una creciente epidemia de complicaciones macrovasculares tales como enfermedades de las arterias coronarias, arterias periféricas y venas de la carótida, particularmente afectando a la población con pacientes DM2 (Creager y Col., 2003).

Complicaciones microvasculares. Si bien las complicaciones macrovasculares se asocian con importante morbilidad y mortalidad en paciente diabéticos, las complicaciones microvasculares también contribuyen de manera significativa. Del 30-45% de los pacientes diabéticos sufren complicaciones microvasculares y la DM2 se ha convertido en la principal causa de ceguera y enfermedad renal crónica en los países occidentales (Abdul-Ghani y col., 2006).

Adicionalmente a las elevaciones de la glicemia que, a través de los años, va desencadenando procesos bioquímicos y físico-químicos en los tejidos, se suman la duración de la enfermedad, la hipertensión y la dislipemia los cuales son considerados como importantes factores de riesgo (Abdul-Ghani y col., 2006).

La nefropatía diabética es presentada por el daño que causa el exceso de la glucosa sobre las nefronas, dando lugar a procesos inflamatorios, degenerativos y escleróticos relacionados a hiperglicemia persistente asociado a otros factores (hipertensión, dislipemia, predisposición genética) (Yokoyama y col., 2009). La retinopatía diabética por su lado es un desorden de la vasculatura en la retina que ocurre igualmente como una complicación de la diabetes, siendo la causa principal de ceguera en los adultos de Estados Unidos. Es caracterizada por signos de isquemia retinal (microaneurismas, hemorragias, anormalidades intraretinales microvasculares, neovascularización, etc.) y signos de permeabilidad incrementada en la vasculatura retinal (Kempen, 2004).

Complicaciones macrovasculares. Las complicaciones macrovasculares como la enfermedad periférica, la cardiopatía coronaria y el accidente cerebrovascular son la causa más importante de morbilidad y mortalidad en la DM2 (Bate y Jerums, 2003). El estado de hiperglicemia sostenida complica al diabético. Las complicaciones microvasculares están directamente relacionadas con su estado aunque no está bien clara aún esa relación con las complicaciones macrovasculares (Jiménez Navarrete, 2000). Las complicaciones macrovasculares de la diabetes pueden ocurrir con niveles de glicemia en 126 mg/dl o menos (Jiménez Navarrete, 2000). La DM2 incrementa el riesgo de la enfermedad de cardiopatía coronaria de 2 a 4 veces y elimina la protección en el sexo femenino no-diabético de esta enfermedad (Bate y Jerums, 2003). La DM2 y las complicaciones macrovasculares están asociadas junto con hiperglucemia, hipertensión, alteraciones lipídicas, un estado protrombótico, la resistencia a la insulina, obesidad abdominal (Van den Oever y col., 2012)

(Bate y Jerums, 2003), tabaquismo y la nefropatía son los factores de riesgo más importantes para la enfermedad cardiovascular (Van den Oever y col., 2012).

Los pacientes diabéticos tienen una mayor probabilidad de sufrir un infarto al miocardio (IAM) y adicionalmente, poseen una menor probabilidad de sobrevivencia y pronóstico frente a los pacientes no diabéticos (Herlitz y col., 1992). Además presentan una mayor tasa de mortalidad los sobrevivientes a un IAM siendo diabéticos (Vaccaro y col., 2004).

La enfermedad vascular periférica (EVP) es una afección en la que se crean depósitos grasos (llamados placa) a lo largo de las paredes de las arterias que transportan sangre a extremidades superiores e inferiores. Es comúnmente conocida como aterosclerosis o endurecimiento de arterias. Las arterias se estrechan lentamente y pueden incluso bloquearse, afectando la circulación de la sangre, especialmente en las piernas y en los pies. La EVP es una característica clínica común que impacta significativamente en el pronóstico y costos del cuidado de la salud en la población diabética con una tasa de prevalencia alta (22%) (Vigilance y col., 1999).

En la población con DM2, se señala un incremento de 1.5 a 3 veces en la mortalidad por cardiopatía coronaria, en comparación con lo observado en la población general (LeRoith y Olefky, 2003). Los pacientes diabéticos presentan primariamente un incremento en la incidencia de fallo cardíaco congestivo (Aronson y col., 1997). Estos pacientes suelen tener una enfermedad arterial coronaria (EAC) más extensa en el momento del diagnóstico, así como un mayor número de factores de riesgo y presentar este padecimiento en la quinta o sexta década de vida, así como evidencia patológica y angiográfica indicando que las arterias coronarias se encuentran más graves en pacientes con DM2 (Aronson y col., 1997).

La enfermedad cerebrovascular representa una importante fuente de gastos para los servicios de salud, y la DM2 es un importante factor de riesgo para estas enfermedades, ya que causa la proliferación endotelial y el engrosamiento de la membrana plasmática de los vasos sanguíneos. Los pacientes diabéticos tienen una incidencia significativamente mayor de enfermedad de múltiple vasos en comparación con pacientes no diabéticos, si se menciona la mortalidad por accidentes apopléticos es más alta en pacientes con DM2, y estos son pacientes los que tienden a mayor mortalidad en el accidente cerebrovascular, una mayor frecuencia de recurrencia, y una recuperación pobre comparado con los pacientes sin DM2. La prevalencia de diabetes en los pacientes que sufren un accidente cerebrovascular es de 10 y 20%, con una tendencia al aumento durante los últimos 20 años, probablemente en respuesta a las crecientes tasas de sobrepeso y obesidad en la población general y otros factores como el sedentarismo (Béjot y Giroud, 2010).

Aterosclerosis

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria de la pared arterial, donde los mecanismos inmunes tanto celular como humoral están participando. La disfunción vascular endotelial y la retención de lipoproteínas en la íntima arterial han sido reportadas como los eventos primarios en la aterogénesis, promoviendo la liberación de citocinas y quimiocinas (Rodríguez y col., 2009).

En una variedad de modelos animales de aterosclerosis, ocurren signos de inflamación relacionados con una acumulación incipiente de lípidos en la pared arterial (Libby y col, 2002). Un ejemplo es que leucocitos son encontrados en las lesiones tempranas de la aterosclerosis no solo en animales sino en modelos humanos también (Libby y col, 2002).

En la formación de la aterosclerosis, la teoría con mayor aceptación en la actualidad, y la que recibe mayor atención, es la hipótesis de respuesta a lesión; las características centrales de esta hipótesis son:

1. Surgimiento de lesión endotelial crónica focal, casi siempre sutil, con el resultante incremento de permeabilidad endotelial u otra evidencia de disfunción endotelial.
2. Incremento del paso de lipoproteínas al interior de la pared vascular (insudación), sobre todo LDL o LDL modificadas, con su alto contenido de colesterol, y también VLDL.
3. Una serie de interacciones celulares en estos focos de lesión que implican células endoteliales, monocitos-macrófagos, linfocitos T y células de músculo liso originadas en la capa íntima.
4. Proliferación de las células de músculo liso en la íntima con formación subsecuente de matriz extracelular por estas mismas (Kumar y col., 1999).

Lesión Endotelial

Las lesiones ateroscleróticas, de acuerdo con la Asociación Americana del Corazón, están divididas en 2 grupos: lesiones de la íntima no-aterosclerótica y lesiones ateroscleróticas progresivas. Un tercer grupo de lesiones: placas ateroscleróticas sanadas, que son las lesiones más prevalentes, son localizadas particularmente en las arterias carótidas (Spagnoli y col., 2007). La lesión endotelial crónica o repetida es la piedra angular de la hipótesis de respuesta a lesión. Factores como las endotoxinas circulantes, hipoxia, productos derivados del humo de cigarro, virus y toxinas endoteliales específicamente como homocisteína podrían participar, sin embargo, es mucho más probable que otros factores tales como trastornos hemodinámicos

(fuerzas deslizantes, flujo turbulento) y efectos adversos de la hipercolesterolemia, sean los que actúan de manera conjunta (Kumar, 1999).

Las fuerzas deslizantes y el flujo turbulento ocasionan incremento de la permeabilidad endotelial y del recambio de células, aumento de la endocitosis de LDL mediada por receptor e incremento de la adhesividad del endotelio a leucocitos (LDLR). Estas alteraciones se acompañan de trastornos de la expresión de genes de moléculas importantes, como citocinas, moléculas de adhesión y proteínas de coagulación. La compleja geometría del sistema arterial con sus giros, vueltas y ramificaciones puede dar lugar a patrones de flujo turbulento con fuerzas deslizantes de grado variable capaces de generar focos de disfunción endotelial (Kumar y col.,1999).

La hiperlipidemia contribuye a la aterogénesis de varias maneras (Kumar y col., 1999):

1. La hiperlipidemia crónica, en particular hipercolesterolemia, puede iniciar por si sola la disfunción endotelial.
2. Con la hiperlipidemia crónica, las lipoproteínas se acumulan dentro de la íntima en los sitio de lesión o disfunción endotelial.
3. De mayor importancia, brinda la oportunidad para modificar los lípidos en la pared endotelial, sobre todo por mecanismos oxidativos, que producen LDL modificadas. Se piensa que los cambios de glicación y oxidación de las LDL representan un aspecto significativo del proceso aterogénico. Se piensa que en el microambiente de monocitos y células endoteliales adheridos a las LDL, estimulan la producción de radicales libres generados por estas células activadas. Las LDL oxidadas contribuyen a la aterogénesis de la siguiente manera: 1) los macrófagos las ingieren con rapidez por medio del receptor "carroñero"(scavenger)distinto del receptor clásico LDL; 2) son quimiotácticas para monocitos circulantes; 3) incrementan la adhesión de monocitos; 4) inhiben la motilidad ya presente en las lesiones; 5) estimulan la liberación de factores de crecimiento y de citocinas; 6) Son citotóxicas para células endoteliales y células del musculo liso, y 7) son inmunogénicas (Kumar y col., 1999).

Sucesos Celulares en la Aterogénesis

La lesión endotelial ha sido propuesta para ser un evento patofisiológico temprano y clínicamente relevante en el proceso aterosclerótico. Los pacientes con disfunción endotelial tienden a tener un riesgo incrementado para los eventos cardiovasculares futuros, incluyendo accidente cerebrovascular (Spagnoli y col., 2007).

La participación de la inflamación en la aterosclerosis en todos sus estadios es lo siguiente enfocándose desde otro punto.

- A. El reclutamiento de leucocitos a la lesión naciente. Las células blancas se adhieren pobremente al endotelio normal. Cuando la monocapa endotelial sufre inflamación, expresa moléculas de adhesión que son conjugados con sus ligandos correspondientes en leucocitos, formando con integrinas y selectinas una adherencia más firme. Las citocinas proinflamatorias expresadas en el ateroma proveen un estímulo quimiotáctico a los leucocitos adherentes, direccionando su migración a la íntima.
- B. Los linfocitos T se unen con los macrófagos en la íntima durante la evolución de la lesión. Estos leucocitos, así como las células residentes de la pared vascular, secretan citocinas y factores de crecimiento que pueden promover la migración de células de músculo liso y estas expresar enzimas especializadas que pueden degradar a la elastina y el colágeno en respuesta a la estimulación inflamatoria. La degradación de la matriz extracelular arterial permite la penetración de las células de músculo liso a la placa creciente.
- C. Por último, los mediadores de inflamación pueden inhibir la síntesis de colágeno y evocar la expresión de colágenasas por las células espumosas en la lesión intimal. Estas alteraciones en el metabolismo de la matriz extracelular hacen más delgada la capa fibrosa dejándola débil y susceptible a la ruptura. (Libby y col., 2002) (figura 1).

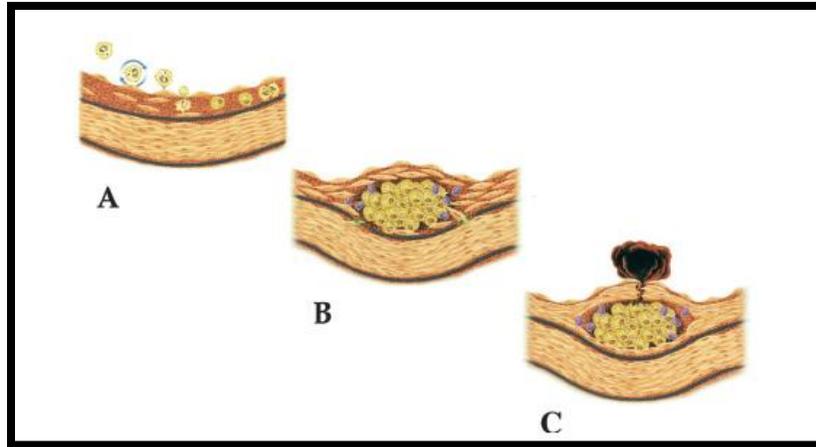


Figura 1.- Participación de la inflamación en todos los estadios de la aterosclerosis (Libby y col., 2002)

Se ha observado que la glicación de lipoproteínas (HDL y LDL) induce la expresión y activación de TLRs, esta modificación también conduce a su oxidación generando ligandos que activan más receptores tipo Toll, favoreciendo a su vez el desarrollo de la enfermedad aterosclerótica (Younis y col., 2008).

La proliferación de células de músculo liso alrededor del foco de células espumosas convierte las bandas grasosas en ateromas maduros fibro-adiposos (Linton y Fazio, 2003). La evolución del ateroma se ha relacionado con una reacción inflamatoria crónica con células T activadas, monocitos-macrófagos, células endoteliales y células de músculo liso, en la cual expresan o contribuyen con una variedad de citocinas que pueden tener alguna función a la adherencia, locomoción y replicación celular (Linton y Fazio, 2003).

Las placas en la íntima representan un agregado central de células espumosas provenientes de macrófagos y células de músculo liso, algunas de las que, ya muertas, han liberado lípidos y restos celulares y están rodeadas por células de músculo liso. Durante su evolución el ateroma celular-adiposo sufre modificaciones por un mayor depósito de colágeno, elastina y proteoglicanos. Este tejido conectivo es prominente sobre todo en el lado de la íntima, donde forma el llamado casquete fibroso. Así avanza el ateroma fibro-adiposo hasta su maduración completa. Algunos ateromas muestran proliferación celular considerable y el tejido conectivo que se forma produce las placas fibrosas. Otros retienen células llenas de lípidos y residuos grasos en un núcleo central (Kumar y col., 1999).

La trombosis es una complicación de las etapas tardías de la aterosclerosis y los trombos organizados pueden contribuir a la formación de placas e invasión de la luz vascular.

En general las plaquetas no se adhieren a la pared arterial sino a una lesión grave previa o a una porción desnuda del endotelio, aun las alteraciones bioquímicas más sutiles de una célula endotelial normal pueden crear condiciones para producir trombos (Falk y Fernandez-Ortiz, 1995).

Efectos de la Diabetes en Aterosclerosis

Los principales factores de riesgo adquirido susceptibles de control son cuatro: hiperlipidemia (hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia), hipertensión, tabaquismo y diabetes (Kumar y col., 1999). Hay varios mecanismos que pueden contribuir al aumento de aterosclerosis en los diabéticos además de los factores de riesgo más comunes, estos incluyen la disfunción endotelial, aumento de la activación y agregación plaquetaria, alteraciones de la coagulación y la composición de la placa anormal, alteraciones en la composición de las lipoproteínas, y proteínas glicadas (Kumar, 1999).

La diabetes modifica la vasodilatación dependiente de endotelio antes de la formación del ateroma. Un número fundamental de mecanismos contribuye a la disminuida biodisponibilidad del óxido nítrico derivado del endotelio en la diabetes (Beckman y col., 2009). La hiperglicemia inhibe la producción de óxido nítrico bloqueando la eNOS sintasa y al mismo tiempo incrementando las especies reactivas de oxígeno en las células endoteliales y musculo liso (Beckman y col., 2009). La resistencia a la insulina provoca el exceso de liberación de ácidos grasos libres del tejido adiposo, el cual activa la enzima de señalización proteína cinasa C, Inhibiendo a fosfatidilinositol-3 (PI-3) cinasa (un antagonista de la vía eNOS), e incrementando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Beckman y col., 2009).

La diabetes incrementa la producción de vasoconstrictores, tales como endotelina-1, la cual activa sus receptores correspondientes en la célula de músculo liso vascular para inducir la vasoconstricción. En adición, esta incrementa la retención de agua y electrolitos/iones en los riñones por medio del sistema de renina-angiotensina e induce la hipertrofia de las células del musculo liso. Así mismo puede estimular la producción de receptores para los AGEs e incrementar la transcripción inducida por la LDL oxidada. Estudios recientes demuestran que células de musculo liso arteriales cultivadas de pacientes con DM2 poseen una mayor capacidad de migración (Beckman y col., 2009).

Funciones modificadas en plaquetas. Las plaquetas pueden modular la función vascular y participar significativamente en la formación del trombo. Las anormalidades pueden

exacerbar la progresión de la aterosclerosis y como consecuencia la ruptura de la placa. La concentración de glucosa interplaquetaria se iguala a la concentración extracelular ya que no depende de insulina (Beckman y col., 2009), esta a su vez es la que regula los niveles de glucosa en las células endoteliales, llevando a la activación de la proteína cinasa C (Beckman y col., 2009).

En los pacientes con diabetes, se observa un desorden en la homeostasis del calcio. La regulación alterada del calcio contribuye a una actividad modificada siendo que el calcio intraplaquetario regula su cambio de forma, secreción, agregación y formación del tromboxano.

Los pacientes con diabetes tienen una sobreexpresión de glicoproteína Ib (GpIb) sobre la superficie plaquetaria, la cual participa en la unión del factor Von Willebrand y GpIIb/IIIa, el cual media la interacción plaqueta-fibrina. Estas anomalías a su vez disminuye la producción endotelial de antiagregantes como óxido nítrico y la prostaciclina así como incrementando la producción de fibrinógeno y activadores plaquetarios, como trombina y factor Von Willebrand. En conjunto, estas anomalías causadas por la diabetes incrementan la activación plaquetaria intrínseca y decrecientan los inhibidores endógenos de esta misma (Beckman y col., 2009). En adición, la diabetes aumenta la coagulabilidad de la sangre, ayudando a la ruptura de la placa aterosclerótica o su erosión lo que ocasionaría una oclusión trombótica de la arteria (Beckman y col., 2009)(figura 2).

Alteraciones de las lipoproteínas. Surgen como parte del cuadro clínico en la DM2; se mencionan entre ellos bajos valores circulantes de lipoproteína de alta densidad (HDL) (Beckman y col., 2009). Los bajos niveles de HDL representan la segunda anomalía más común en DM2. Los niveles elevados de lipoproteínas ricas en triglicéridos bajan los niveles de HDL promoviendo los intercambios de colesterol del HDL a VLDL vía proteína transferencia colesterol-éster (Beckman y col., 2009).

Alteraciones en la composición de la lipoproteína de baja densidad. La LDL es uno de los principales determinantes para la cardiopatía coronaria, los cambios cualitativos en las LDL de los pacientes con diabetes sugieren mayor aterogénicidad. En concreto, la apolipoproteína B de LDL es susceptible a la glicación, esto disminuye su afinidad por el receptor de LDL, y aumenta su susceptibilidad a la modificación oxidativa. Además, la composición de esta es alterada en los pacientes con diabetes; en concreto, la LDL es más pequeña y más densa, siendo esta una forma más susceptible a la peroxidación y oxidación, conduciendo finalmente a un aumento en la captación por macrófagos con la posterior

formación de células espumosas, y por lo tanto un mayor potencial aterogénico (Fabryova y Cagan, 1998).

Receptores Tipo Toll

Los TLRs son unos receptores de una familia evolutivamente conservada de patrones de reconocimiento expresados en varios tipos celulares, los cuales emplean un rol esencial en la respuesta inmune innata. Estos receptores contienen un receptor Toll/IL1 (TIR) con un dominio homólogo en su región citoplasmática la cual es esencial para la señalización (Abbas y col., 2011).

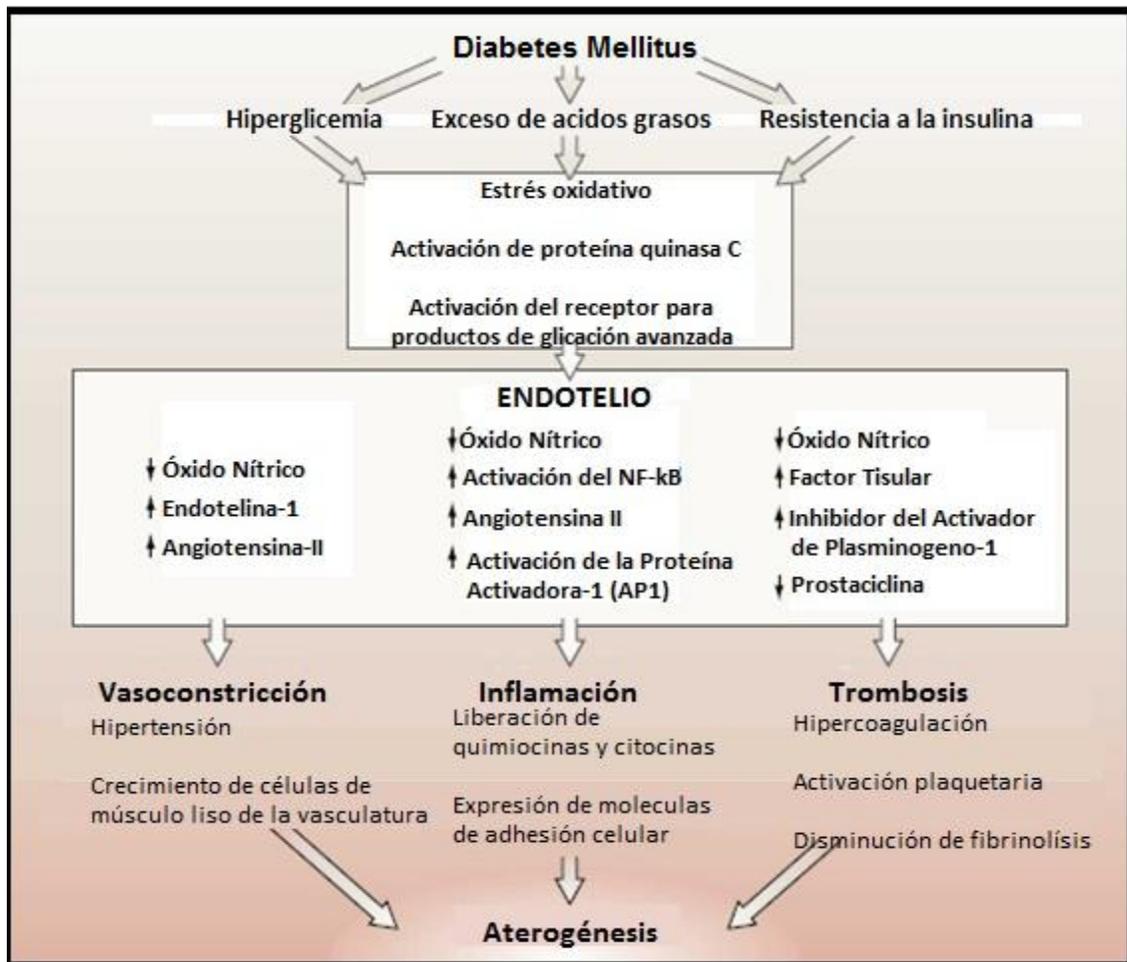


Figura 2.- Disfunción endotelial en la diabetes: En la diabetes la hiperglicemia, la liberación de ácidos grasos libres y la resistencia a la insulina dan como resultado eventos metabólicos adversos en la célula endotelial. La activación de estos sistemas afecta a la función endotelial,

aumenta la vasoconstricción, incrementa la inflamación y promueve la trombosis. Se decrementan los niveles de óxido nítrico y se aumentan las concentraciones de endotelina-1 y angiotensina II dando lugar al incremento del tono vascular y al crecimiento vascular de las células de músculo liso. La activación del factor nuclear de transcripción κB (NF- κB) y la proteína 1 activadora induce la expresión de genes proinflamatorios, con la liberación de quimiocinas atrayentes de leucocitos, así como un incremento en la producción de citocinas proinflamatorias y la expresión aumentada de moléculas de adhesión celular. Incrementando así también la producción del factor tisular y el inhibidor activador de plasmina 1 creando un milieu protrombótico, mientras disminuye el óxido nítrico derivado de endotelio y la prostaciclina favoreciendo la activación de las plaquetas (modificado de Beckman y col., 2009).

Los TLRs son encontrados en la superficie celular así como en membranas intracelulares, siendo capaz de reconocer microbios en diferentes localizaciones de la célula. Algunos de los productos que estimulan la señalización de los TLRs incluyen el lipopolisacárido (LPS) de bacterias gram negativas, el peptidoglicano de bacterias gram positivas, lipoproteínas bacterianas, ácido lipoteicoico, lipoarabinomanano, zymosan, proteína flagelina del flagelo bacteriano, motivos CpG sin metilar, RNA de doble hélice así como de una hélice. El TLR2 es específico para peptidoglicano, lipoproteínas, ácido lipoteicoico y porinas así como hemaglutinina viral; El TLR4 reconoce el lipopolisacárido, mannanos fúngicos, fosfolípidos parasitarios, proteínas virales de la envoltura, entre otras (Abbas y col., 2011).

Los miembros de la familia TLR comparten una arquitectura común, que consiste en un ectodominio que lleva ricas repeticiones de leucina (LRR), un segmento de transducción de membrana, y un dominio de señalización citoplasmático toll parecido al receptor de interleucina 1 (TIR). La activación de los TLR por estímulos microbianos, resulta la mayoría de los casos en el reclutamiento de las proteínas adaptadoras citoplasmáticas MyD88 (factor de diferenciación mieloide de respuesta primaria 88), y TIRAP/Mal (proteína asociada a TIR/adaptador tipo MyD88) seguido por la formación de un complejo con la cinasa serina/treonina IRAK y TRAF6 (proteína adaptadora contenedora del dominio TIR asociado a factor 6), después de la modulación de la familia del complejo de proteínas IKK y proteínas I κ B (inhibidor del factor nuclear κB) y que en última instancia se traduce en la activación y translocación nuclear del factor de transcripción NF- κB . Este factor de transcripción controla la expresión de genes implicados en la modulación de la inmunidad innata y adaptativa. La señalización de TLR también activa varias cinasas MAP, tales como p38, JNK y ERK1/2, o vía de señalización

dependiente de TRIF, IRF-3 que desempeñan un papel modulador en la inducción de genes de expresión pro-inflamatorio (figura 3) (Björkbacka, 2006).

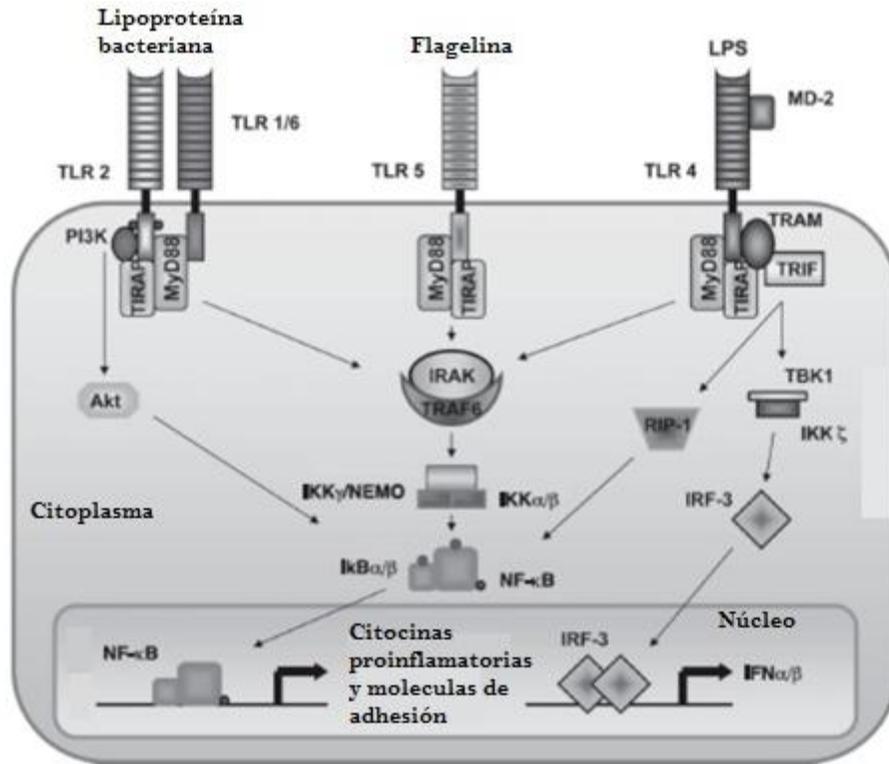


Figura 3. Activación de receptores tipo Toll. Cuando TLR2, 4 y 5 se activan, el MyD88 es reclutado junto al dominio TLR / TIR para inducir la producción de citocinas pro-inflamatorias a través de una vía de señalización clásica. En esta vía de la familia de las proteínas IKK se activa en un proceso que implica a IRAK-1 y TRAF6. El complejo IKK cataliza la fosforilación de I κ B α y la degradación por el proteosoma, por lo tanto permitiendo NF- κ B para traslocarse en el núcleo. Una vez en el núcleo, NF- κ B regula la expresión de citocinas pro-inflamatorias y moléculas e adhesión. Además, TLR2 y TLR4 utilizan una vía de MyD88 independiente que implica el reclutamiento de PI3K y TRIF al dominio TLR/TIR. TLR4 activa una vía TRIF-dependiente que induce la activación de IRF-3 y, posteriormente, la producción de IFN e tipo I en respuesta a LPS (Björkbacka, 2006).

Receptores Toll y la Aterosclerosis

Evidencia de diversas fuentes han sugerido que los TLRs pueden participar en la aterosclerosis de múltiples maneras (Liu y col., 2007). Varios reportes documentan la expresión de TLRs en lesiones ateroscleróticas (Xu y col., 2001) y sugieren que la vía de NF- κ B es activada en la lesión, resultando la transcripción de una variedad de genes participantes en la respuesta celular de tipo inflamatorio y proliferativo a la aterogénesis y finalmente la síntesis de péptidos antimicrobianos así como citocinas proinflamatorias (Liu y col., 2007). Está comprobado por otro lado que la expresión de TLR4 en macrófagos es aumentada por la LDL oxidada, lo que sugiere un mecanismo potencial para efectos sinérgicos de hipercolesterolemia e infección en la aceleración de la aterosclerosis (Liu y col., 2007).

Se sugiere que los TLRs pueden tener participación en la aterosclerosis con moléculas endógenas (MM-LDL, HSP60, EDA) y exógenas (provenientes de patógenos) junto con sus ligandos afines (Liu y col., 2007; Vabulas y col., 2001). Los TLRs pueden interferir con el metabolismo del colesterol directamente en los macrófagos (Castrillo y col., 2003) sugiriendo un mecanismo adicional en el que los TLRs participan en la aterogénesis (Liu y col., 2007). Se ha documentado la expresión en particular de TLR1, TLR2, TLR4 y en menor proporción TLR5 en placas ateroscleróticas de modelos humanos y murinos donde fueron localizados en macrófagos y células endoteliales principalmente (Xu y col., 2001). En un estudio hecho por Edfelt y colaboradores, la expresión de TLR2 y TLR4 aumentó en lesiones ateroscleróticas humanas y frecuentemente fueron localizados con NF- κ B así como el aumento de del factor nuclear en macrófagos TLR positivo (Edfeldt y col., 2002).

Un estudio reportó que los ratones C3H/HeJ son resistentes a la aterosclerosis en comparación con ratones C57BL/6 al ser alimentados con una dieta alta en colesterol (Paigen, 1995). Estos ratones C3H/HeJ cuentan con una mutación puntual en la región intracitoplasmática del TLR4 que codifica para un receptor no funcional. Los leucocitos de ratones C3H/HeJ carecen de respuestas inflamatorias a LDL mínimamente modificada, apoyando la idea de que la mínima modificación de la LDL inicia la aterosclerosis a través de TLR4 (Shi y col., 2000).

Lipoproteínas

Las diferencias específicas entre las diferentes clases de lipoproteínas implica la cantidad de lípidos presente, lo cual afecta su tamaño, densidad y la naturaleza de la apolipoproteína en su membrana (Cruz Jaime, 1995).

Lipoproteínas de Baja Densidad

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) pertenecen también a los 5 grupos mayores de lipoproteínas, estas contienen a la apolipoproteína B100 (ApoB100). Tiene un núcleo altamente hidrofóbico que consiste en ácidos grasos poliinsaturados como linoleato y alrededor de 1500 moléculas de colesterol esterificado, su estructura puede ser altamente heterogénea. La función principal de las LDL es el transporte de colesterol hacia las células cuando estas lo requieren. Los niveles óptimos para personas deben rondar en menos de 100 mg/dL (NHLBI, 2004) y deben ser menores a 70 mg/dL para personas con alto riesgo de enfermedades cardiovasculares (Rodney y col., 2003). La LDL participa en procesos de la aterosclerosis, como la formación de células espumosas que son el resultado, pero estas lipoproteínas deben ser químicamente modificadas para ser fagocitadas por los macrófagos/monocitos, esta modificación debe ser por un proceso de glicación y/ oxidación (Nahla y col., 2012).

La lipoproteína de baja densidad constituye alrededor del 50% del plasma humano, el tamaño de la partícula es más pequeña que las proteínas ricas en triglicéridos (quilomicrones y VLDL). El colesterol constituye alrededor de la mitad de la masa de LDL estando esterificado en su mayor parte. Alrededor del 25% del total de LDL está constituido por proteínas principalmente APO B100 con indicios de APOC. Esta proteína es la más peligrosa por su elevado potencial aterogénico ya que transporta la mayor cantidad de colesterol (Cruz Jaime, 1995).

LDL en relación con aterosclerosis. Las lipoproteínas de baja densidad juegan un papel importante en el desarrollo de la lesión. Cuando las LDLs son reclutadas de la circulación en la pared arterial, estas se oxidan y son convertidas en ligandos para los receptores scavenger expresados en la superficie celular de los macrófagos (Tabet y Rye, 2009; Steinberg, 1997), y está establecido que los monocitos fagocitan LDL glicada (Younis y col., 2012). La indiscriminada fagocitación por parte de los macrófagos logra que se generen las células espumosas, uno de los tipos celulares clave en las lesiones ateroscleróticas (Tabet y Rye, 2009; Van Der Wal y col., 1992). La modificación oxidativa de LDL juega un papel importante en el desarrollo de una lesión aterosclerótica, así como en su desestabilización y la ruptura de la placa (Tabet y Rye, 2009; Napoli y col., 2001). Otros estudios nos ayudan a

comprender que la glicación y la oxidación en estas lipoproteínas parecen ocurrir simultáneamente (Younis y col., 2008).

Lipoproteínas de Alta Densidad

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) son una de los 5 grupos mayores de lipoproteínas. Contienen la proporción más alta de colesterol, son abundantes en ApoA-1 y ApoA-2. Su principal función es transportar el colesterol internamente desde las células gracias al transportador ATP-binding Cassette A1 (ABCA1) hacia el hígado (Tabet y Rye, 2009). La enzima plasmática lecitina colesterol aciltransferasa (LCAT) convierte el colesterol libre en un colesterol éster (una forma más hidrofóbica de colesterol) transportada a su núcleo (o core) (Christison, 1995). Los niveles de HDL óptimos deben ser mayores de 40 mg/dL para hombres y 50 mg/dL para mujeres (Bonow y col., 2011). Las HDL son altamente heterogéneas en composición, identificándose más de 100 proteínas en ella (Nahla y col., 2012), teniendo un amplio espectro de actividades antiaterogénicas, incluyendo el flujo de colesterol celular de los tejidos periféricos en el proceso de transporte reverso, así como actividades anti-inflamatorias, antioxidativas y antiapoptóticas (Christison, 1995; Janine y col., 2010; Scanu y Edelstein, 2008).

La anomalía encontrada más frecuentemente en la composición de HDL en pacientes con DM2 es un enriquecimiento de triglicéridos en el núcleo de HDL y una baja en los niveles de ésteres de colesterol (Janine y col., 2010), otras alteraciones pueden ser un incremento en la concentración de amiloide sérica A (SAA), acumulación de ApoA1 y ApoA2, disminución de enzimas asociadas a HDL como la paraoxonasa 1 (PON1) y la LCAT (Janine y col., 2010). Un estudio reciente demuestra que la partícula HDL es capaz de proteger a la LDL de la glicación y así mismo demuestra tener una capacidad anti-glicativa (Nahla y col., 2012).

La lipoproteína de alta densidad es una pequeña partícula excretada por el hígado en forma de discos (Cruz Jaime, 1995). A medida que absorbe el colesterol del tejido periférico va adoptando una forma esférica, para después terminar en el hígado donde es metabolizado y excretado (Cruz Jaime, 1995). Existen 5 subpoblaciones de HDL llevando su diámetro desde 10.6 a 7.6 nanómetros (Tabet y Rye, 2009). Alrededor de 100 proteínas han sido identificadas en HDL, su composición varía en personas que padecen o son susceptibles a diabetes, aterosclerosis o inflamación crónica. Las principales variaciones están en paraoxonasa1 (PON1), lecitina colesterol aciltransferasa, fosfolipasa A2, amiloide sérica A y apolipoproteína J. Se relaciona la baja actividad de PON1 en HDL se asocia con la baja protección de HDL en la oxidación de LDL (Younis y col., 2012).

HDL e inflamación. Existe evidencia que la HDL inhibe la inflamación asociada con el desarrollo de la placa aterosclerótica, incluyendo el paso inicial (Tabet y Rye, 2009). Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que las HDLs son altamente efectivas en inhibir la expresión de moléculas de adhesión endoteliales y previniendo el reclutamiento de monocitos en la pared arterial (Cockerill y col., 1995; Tabet y Rye, 2009)). Estas lipoproteínas también inhiben el proceso de oxidación de LDL (Kopprasch y col., 2004). Varias líneas de investigación sugieren que las HDLs tienen propiedades antioxidantes que protegen contra el daño oxidativo en la aterosclerosis. Estos efectos benéficos han sido atribuidos a las enzimas como PON1 y PAF-AH (Tabet y Rye, 2009; Forte y col., 1999; Ng y col., 2005). Varios estudios han demostrado que la HDL tiene una actividad antiglicativa en la LDL *in vitro*, apoyándose en que la PON1 está asociado a esta actividad antiglicativa (Younis y col., 2012). El conjunto de estudios dan una evidencia clara de que la lipoproteína de alta densidad reduce el desarrollo de la lesión aterosclerótica por múltiples mecanismos (Tabet y Rye, 2009). La HDL demuestra tener la habilidad para influenciar la función endotelial y los mecanismos responsables de sus propiedades antiinflamatorias (Tabet y Rye, 2009).

Productos de Glicación Avanzada

La glicación postsecretora de proteínas es un proceso donde la condensación no-enzimática de la glucosa con proteínas se lleva a cabo formando aductos covalentes que son estables dando como resultado alteraciones estructurales y consecuentemente, anomalías funcionales. Bajo condiciones fisiológicas, la solución de glucosa existe como un anillo de piranosa estable en equilibrio con su forma de aldehído de cadena abierta (Younis y col., 2008). El grupo aldehído (o cetona) de los azúcares (su reductor) o los compuestos de baja masa derivados de la glucosa, tales como el glicolaldehído o el metilglicoxal, son reversiblemente condensados con grupos aminos en las proteínas, formando una lábil base de Schiff (o aldimina) la cual irreversiblemente es modificada a una cetamina más estable conocida como producto amadori (figura 4) (Younis y col., 2008). Este producto amadori puede tener ciclos posteriores de condensación entre grupos amino y grupos aldehídos lo que dará resultado a una fragmentación oxidativa dando al final ciertos compuestos referidos como productos de glicación avanzada (AGEs) (Basta y col., 2004; Brown y col., 2006; Thornalley y col., 1999; Younis y col., 2008; Voziyan y col., 2003).

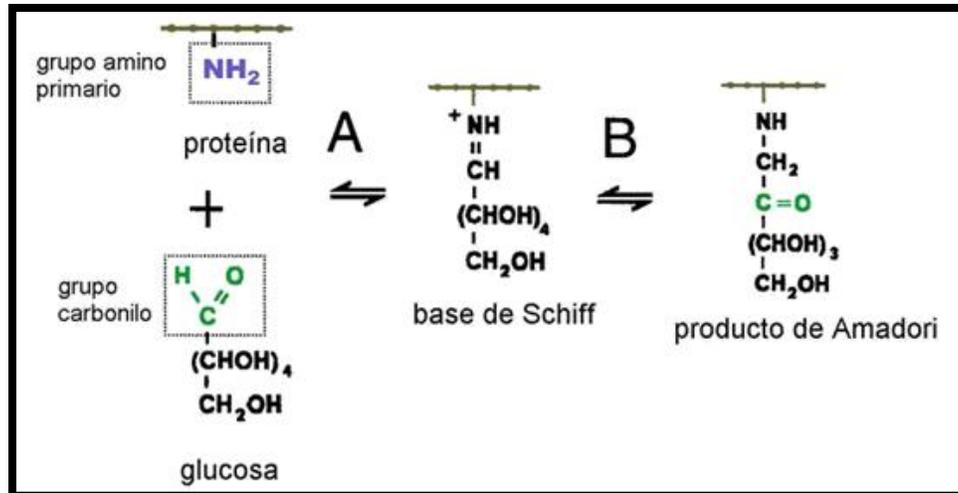


Figura 4.-Glicación no-enzimática de proteínas, comienza con la condensación de un grupo aldehído de un azúcar reductor y un grupo amino libre para formar una base de Schiff labil (glicosamina), la cual irreversiblemente llega a un rearrreglo dando una cetoamina mas estable la cual es conocida como “producto de Amadori”(González Flecha y col.,2000).

Los AGEs se forman a un ritmo constante y lento en el cuerpo humano, desde su fase embriogénica y son acumulados con el tiempo. (Younis y col., 2008; Hernebring y col., 2006). En el caso de la diabetes, su formación se ve acelerada debido a la incrementada presencia de la glucosa y sus aldehídos de bajo peso molecular como el glicolaldehído o el metilglicoxal (Thornalley y col., 1999; Younis y col., 2008). Diversas proteínas son glicadas durante la diabetes y son asociadas con sus complicaciones. La más conocida es la hemoglobina A1c (HbA1c), otras moléculas implicadas son proteínas séricas como la albumina, proteínas de membrana eritrocitarias, apolipoproteína B 100 (apoB100), proteínas de la mielina periférica y citoesquelética, colágena de la piel, proteínas de la córnea como la colágena I, fibronectina y laminina (Younis y col., 2008). La función de la proteína glicada puede ser modificada si el o los grupos amino afectados son rearrreglados en su forma estructural o al menos en su sitio activo (Younis y col., 2008). Las proteínas glicadas son acumuladas con la edad (Verzijl y col., 2000) y han sido implicadas en la enfermedad de Alzheimer (Sasaki y col., 2001), osteoporosis (Hein y col., 2006), sordera (Assimakopoulos y col., 2001), ceguera (Howes y col., 2004) y varios cánceres (Younis y col., 2008) así como las principales complicaciones vasculares en la diabetes como nefropatía, retinopatía, neuropatía y aterosclerosis (Jakus y Rietbrock,2004).

Los niveles de AGEs están correlacionados con la severidad de las lesiones ateroscleróticas y con la acumulación de proteínas plasmáticas, lipoproteínas y lípidos en la pared del vaso (Björkbacka, 2006)

Recientemente se ha propuesto que los intermediarios comunes que contribuyen a la formación de AGEs son 3-deoxi-glucosona, glioxal y metilglioxal (Takeuchi y col., 2001). El glioxal y metilglioxal pueden ser formados también por la autoxidación de la glucosa y por productos de glucolípidos (Thornalley y col., 1999). Estos productos iniciales e intermediarios de glicación lentamente se someten a una compleja serie de reordenamientos químicos adicionales para producir estructuras irreversibles (AGEs) de color amarillo-marrón con una propensión a generar especies reactivas de oxígeno e interactuar con las estructuras específicas de la superficie celular (Brownlee y col., 1988).

Los AGEs comprenden un gran número de estructuras químicas que incluyen: 2-(2-furoil)-4(5)-furanil-1H-imidazol (FFI), 1-alkil-2-formil-3,4 diglicosil pirrol (AFGPs), N-e-carboximetil-lisina (CML), pirralina y pentosidina (Vlassara y col., 1994). Estudios bioquímicos e inmunohistoquímicos sugieren que entre las modificaciones de las proteínas, el producto final de glicación avanzada CML se acumula *in vivo* de forma predominante (Ikeda y col., 1996). Algunos productos AGEs son antigénicos, y se ha demostrado que el anti-AGE del suero predominantemente reconoce CML unido a proteína (Ikeda y col., 1996). La CML es un AGE predominante en los depósitos intracelulares neurofibrilares en los pacientes con enfermedad de Alzheimer (Voziyan y col., 2003) y en células espumosas derivadas de macrófagos en las placas ateroscleróticas humanas (Imanaga y col., 2000).

Glicación de LDL

La glicación no enzimática de LDL toma su lugar principalmente en la apoB. La lisina es el mayor aminoácido que sufre glicación con un rango de 2-17% de residuos LDL-lisina. No existe evidencia substancial que otros aminoácidos en la LDL son glicados con glucosa o glicolaldehído (Brown y col., 2006; Younis y col., 2008).

Está demostrado *in vivo* que la apoB en la LDL de pacientes con Diabetes mellitus contiene una proporción más alta de glucosa unida a lisina comparada con individuos no diabéticos (Schleicher y col., 1981). Otro estudio indica que el contenido de fructosamina en LDL aislada en pacientes con DM2 fue más alta que en los pacientes no diabéticos (Sanguinetti y col., 1999), así como otro estudio donde la apoB glicada en suero es más alta en los pacientes diabéticos que en pacientes sin diabetes (Tames y col. 1992) además de que los

pacientes con niveles de LDL elevados sin diabetes mostraban una concentración más alta de apoB glicada pero manteniendo el porcentaje de dicha apolipoproteína en valores normales (Tames y col. 1992). El porcentaje de apoB glicada en pacientes con diabetes esta correlacionado positivamente con las concentraciones de Hb1Ac y glucosa en ayunas (Tames y col. 1992). Otro estudio encontró que la concentración de LDL glicada circulante se ve aumentada gracias a la hiperlipidemia sin relacionar el estado glicémico, esto gracias a que se encontraron dichas concentraciones elevadas en pacientes con hiperlipidemia sin diabetes (Howes y col., 2004; Tames y col. 1992).

Glicación de HDL

En un estudio reciente se mostró que HDL glicada aislada de pacientes con diabetes reduce potencialmente la inhibición de liberación de TNF- α e IL-1 β comparado con la HDL nativa. Asimismo la glicación de HDL *in vivo* disminuye su habilidad para inhibir estas mismas citocinas. Los niveles de glicación no enzimática de la HDL glicada y HDL de diabético se incrementaron 28 veces y 4 veces respectivamente con los niveles de HDL nativa (Liu y col., 2012).

METODOLOGÍA

Materiales y Métodos

Obtención de CMSP CD14+

Se eligieron 5 sujetos control en ayuno de 12 horas en edades similares para obtener muestra de sangre periférica, este número fue elegido para observar la estimulación de los CMSP y no una comparación entre poblaciones. Se obtuvo el pool de muestra sanguínea conteniendo en los tubos anticoagulante heparina, este pool fue utilizado para determinar la expresión y activación de los TLR-2 y -4 mediante citometría de flujo (Martínez-Soto, 2012).

Preparación de LDL y HDL Glicada

Preparación de LDL. 1 mg de LDL se disolvió en 1 mL de PBS 20mM, PH 7.2 con EDTA 1mM, 0.1 mg de cloranfenicol y NaN_3 3 mM, aforado en 500 mL de PBS 20mM, y se incubó con una solución de glucosa 0.4M a 37 °C durante 1 semana bajo una atmosfera de nitrógeno (Martínez-Soto, 2012; Ravandi y col., 2000).

Posterior a la semana de incubación, la proteína se redujo con 1.3 gr de NaBH_4 en 500 mL de PBS 0.1 M durante 1 hora a 4 °C, posteriormente se dializó contra una solución de fosfatos 0.1M con EDTA 1mM durante 24 horas (Martínez-Soto, 2012; Ravandi y col., 2000).

Preparación de HDL. Para la preparación de la lipoproteína de alta densidad se llevó el mismo proceso que con LDL.

Determinación de TLRs 2 y 4 en células monocíticas CD14+ mediante citometría de flujo.

A partir del pool de sangre total, se tomaron alícuotas de 500 μL de la suspensión celular y se depositaron en tubos para citometría ajustando la cantidad de células mononucleares a 1×10^6 cel/100 μL en PBS, pH 7.4. Se estimularon las células con LDL y HDL respectivamente a una concentración de 50 ng/mL durante 2 horas a temperatura ambiente (T.A.) para observar si hay una activación de TLR-2 y TLR4. Se utilizó un control de LDL (o HDL en su caso) sin glicarse, esto para determinar la activación basal que pudiese existir para ambos TLR. Se

utilizó como control positivo zymosan para TLR2 y TLR 4 (Martínez-Soto, 2012; Marshak-Rothstein, 2006).

Posteriormente se lavaron las células y se añadieron 20 μ L de anticuerpo correspondiente a CD14, TLR2 y TLR4 (Anti-CD14-PerCP/Cy5.5, Anti TLR2-FITC, Anti-TLR4-PE, respectivamente; Biolegend, San Diego, CA). Se incubaron las células durante 30 minutos en la oscuridad a T.A., después se lavaron las células con 2.5 mL de PBS/SFB 2% y se centrifugaron por 5 minutos a 1500 g, posteriormente se decantó el sobrenadante (el cual fue guardado para la determinación de citocinas IL-6 e IL-8 por ensayos de tipo ELISA; PREPROTECH, 2012) y a las células estimuladas se les agregó 1 mL de solución de lisis (para glóbulos rojos) y se incubaron durante 15 minutos en la oscuridad a T.A. Se procedió a lavar las células y después a agregar 200 μ L de solución fijadora y se incubó durante 20 min en oscuridad a T.A. Se lavaron las células con 2.5 ml de PBS/SFB 2% y posteriormente se centrifugaron por 5 minutos a 1500 rpm, se decantó el sobrenadante y se añadió 200 μ L de PBS. Finalmente se analizaron 20,000 eventos por citometría de flujo (Camacho Villa y col., 2012; Martínez-Soto, 2012).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los mecanismos celulares y moleculares donde la diabetes acelera las enfermedades cardiovasculares faltan de ser elucidados. Estudios recientes demuestran claramente que reduciendo el nivel de glucosa con tratamiento de insulina disminuye los eventos cardiovasculares. Además de la aterogénesis, la hiperglicemia induce inflamación, afecta la matriz extracelular y a las proteínas procoagulantes, incrementa la apoptosis en las células endoteliales, decrecientan su proliferación e inhibe la fibrinólisis, resultando en disfunción endotelial. La hiperglicemia también induce estrés oxidativo (Moscat y col., 2003) lo que conllevaría a una mayor oxidación de proteínas (Levitan y col., 2010).

Está documentada la expresión en particular de TLR1, TLR2, TLR4 y en menor proporción TLR5 en placas ateroscleróticas de modelos humanos y murinos donde fueron principalmente localizados en macrófagos y células endoteliales (Xu y col., 2001). En dichas células, ambos TLR2 y TLR4 frecuentemente fueron localizados con NF- κ B (Edfeldt y col., 2002). Adicionalmente se ha reportado que las lipoproteínas de baja densidad glicadas crean una respuesta de tipo inflamatoria en modelos de ratón (Tabet y Rye, 2009), con base a estos antecedentes en este trabajo se determinará si se activan los mismos mecanismos en células monocíticas de humanos.

Expresión de CD14+ en Células Monocíticas de Sangre Periférica Estimuladas con LDL, LDL Glicada, HDL, HDL Glicada y Zymosan.

Se determinó la expresión del receptor CD14 en células monocíticas de sangre periférica, estimuladas con lipoproteínas (HDL y LDL), lipoproteínas glicadas y zymosan a una concentración de 50 ng/ml (figura 5) por 2 horas. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de células que expresan CD14 en superficie, estimuladas con HDL y HDL glicada (41.11 y 50.10% respectivamente; $P \leq 0.05$) así como entre las células estimuladas con LDL y LDL glicada cuyos porcentajes de células que expresan CD14 fueron 35.88 y 69.95% respectivamente ($P \leq 0.05$). Estos resultados sugieren que en las células monocíticas humanas se observa el mismo tipo de efecto sobre el aumento del porcentaje de células que expresan CD14 en superficie como cuando las células monocíticas murinas son expuestas a una LDL mínimamente modificada según Miller y colaboradores, (Miller y col., 2003). Se utilizó como control positivo a zymosan (Martínez-Soto, 2012) para TLR2 y TLR4 por tener una reacción cruzada para ambos TLRs (Palazzo y col., 2008), donde se observó como

se esperaba un aumento significativo del 86.89% en el porcentaje de células que expresan CD14 en superficie en comparación con la expresión basal que fue de 24.37% ($P \leq 0.05$).

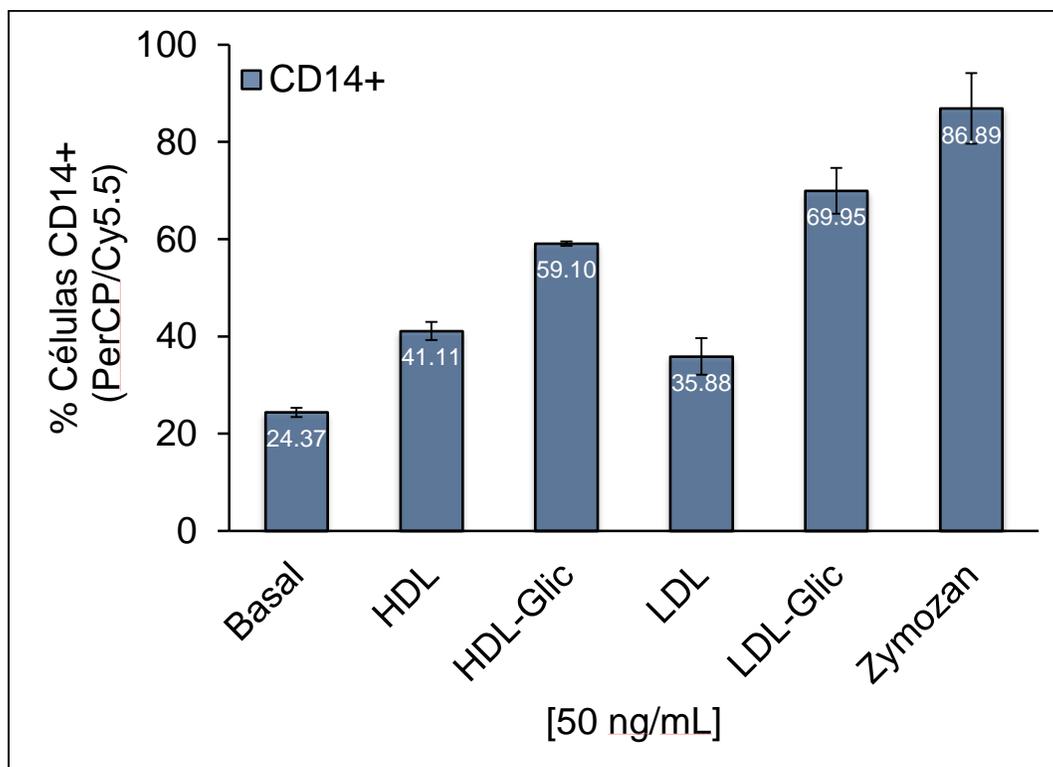


Figura 5.- Expresión de CD14 en CMSP. ($P \leq 0.05$)

Expresión de TLR2 en células monocíticas de sangre periférica estimuladas con LDL, LDL glicada, HDL, HDL glicada y Zymosan

Se cuantificó la expresión de TLR2 en células monocíticas humanas utilizando los mismos estímulos previamente mencionados. Se observó una diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de células positivas a TLR2 cuando son estimuladas con HDL glicada comparado con las células expuestas a HDL (figura 6, 60.22 y 36.23, respectivamente; $P \leq 0.05$). Para el caso de las LDL se obtuvo un comportamiento similar en donde se mostró una diferencia significativa ($P \leq 0.05$) cuando las células son estimuladas con LDL glicada (66.38%), comparado con el porcentaje de las células estimuladas con LDL (34.98%) que expresan TLR2. El porcentaje de células que expresan TLR2 frente al estímulo con zymosan fue del 91.61% comparado con el estímulo basal de 25.89% de las células monocíticas que expresan TLR2, mostró una diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$). Observamos una correlación

con el estudio hecho con ratones knockout (TLR2 -/- apoE -/-) en donde se determinó que la expresión y activación de TLR2 participa en la progresión de aterosclerosis (Liu y col., 2007) desde el punto de vista que el TLR2 es sobreexpresado al ser expuesto a LDL modificada la cual contiene en gran cantidad a la apolipoproteína E.

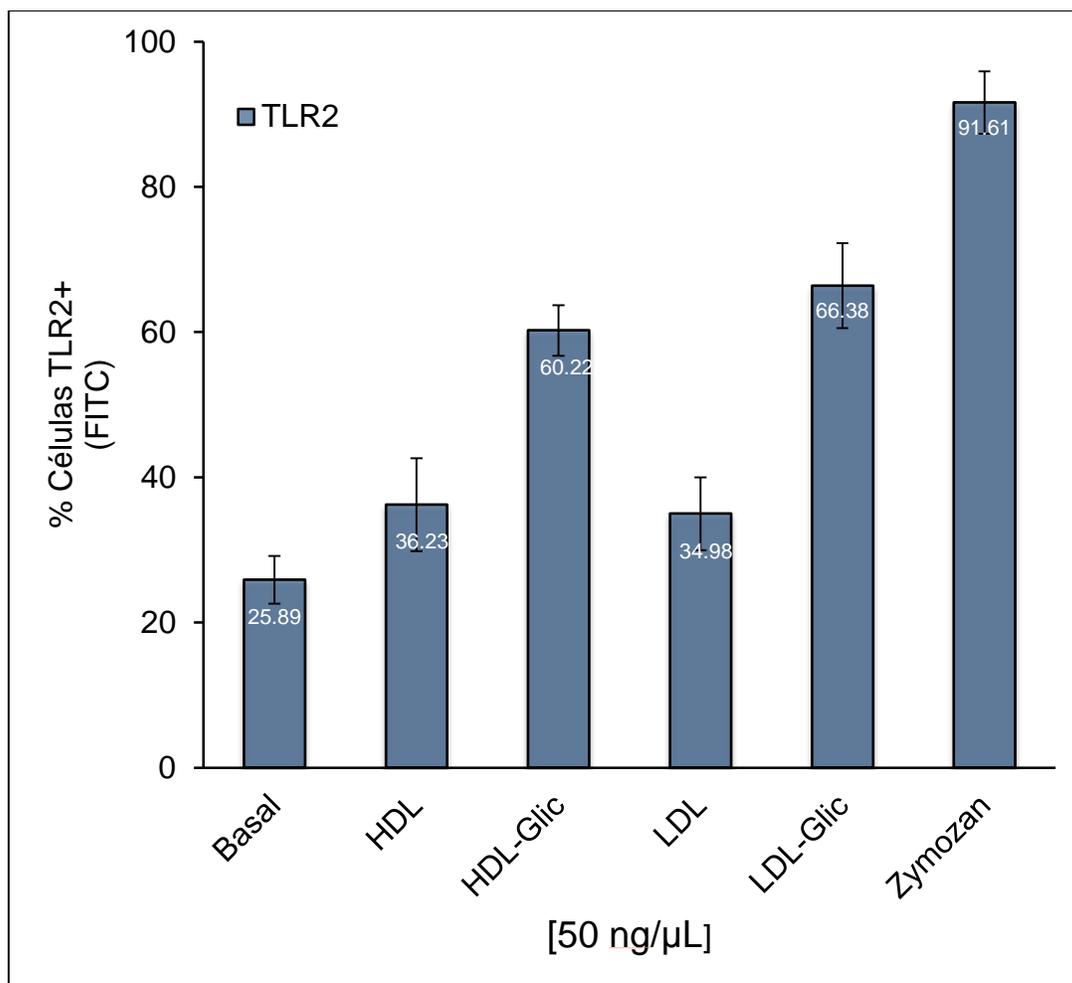


Figura 6.- Expresión de TLR2 en CMSP. ($P \leq 0.05$)

Expresión de TLR4 en células monocíticas de sangre periférica estimuladas con LDL, LDL glicada, HDL, HDL glicada y Zymosan.

Se midió la expresión de TLR4 en CMSP utilizando los estímulos y condiciones previamente mencionados. Cuando se estimularon los monocitos con HDL glicada y ser comparados contra monocitos expuestos a HDL se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de células que expresan TLR4 en superficie (49.74 y 60.33%, respectivamente; $P \leq$

0.05). Las células monocíticas estimuladas con LDL glicada aumenta significativamente el porcentaje de células que expresan TLR4 en superficie (62.45%) comparado con el porcentaje de células que expresan TLR4 cuando se exponen a LDL (43.07%; $P \leq 0.05$). La expresión de TLR4 en monocitos fue de 88.86% para el control positivo zymosan en comparación con la expresión basal de TLR4 que fue de 23.29% la cual mostró una diferencia significativa ($P \leq 0.05$). La expresión de TLR4 se ve aumentada cuando las células monocíticas son expuestas a las lipoproteínas modificadas por glicación, esto concuerda con el ensayo donde los leucocitos de ratones C3H/HeJ que cuentan con una mutación puntual en la región intracitoplasmática del TLR4 carecen de respuestas inflamatorias a LDL mínimamente modificada, apoyando la idea de que la mínima modificación de la LDL inicia la aterosclerosis a través de TLR4 (Shi y col., 2000) así como el que diferentes lípidos oxidados han sido reportados que expresan y activan TLR4 (den Dekker y col., 2010). Xu y colaboradores demostraron que la LDL oxidizada es capaz de incrementar la expresión de mRNA de TLR4 en cultivos de monocitos derivados de humano en contraste con los niveles expresados de LDL nativa sugiriendo que tal vez presente el mismo proceso ante el estímulo de las lipoproteínas modificadas por glicación que se llevó a cabo en el presente estudio utilizando células monocíticas de sangre periférica humanas (Xu y col., 2001).

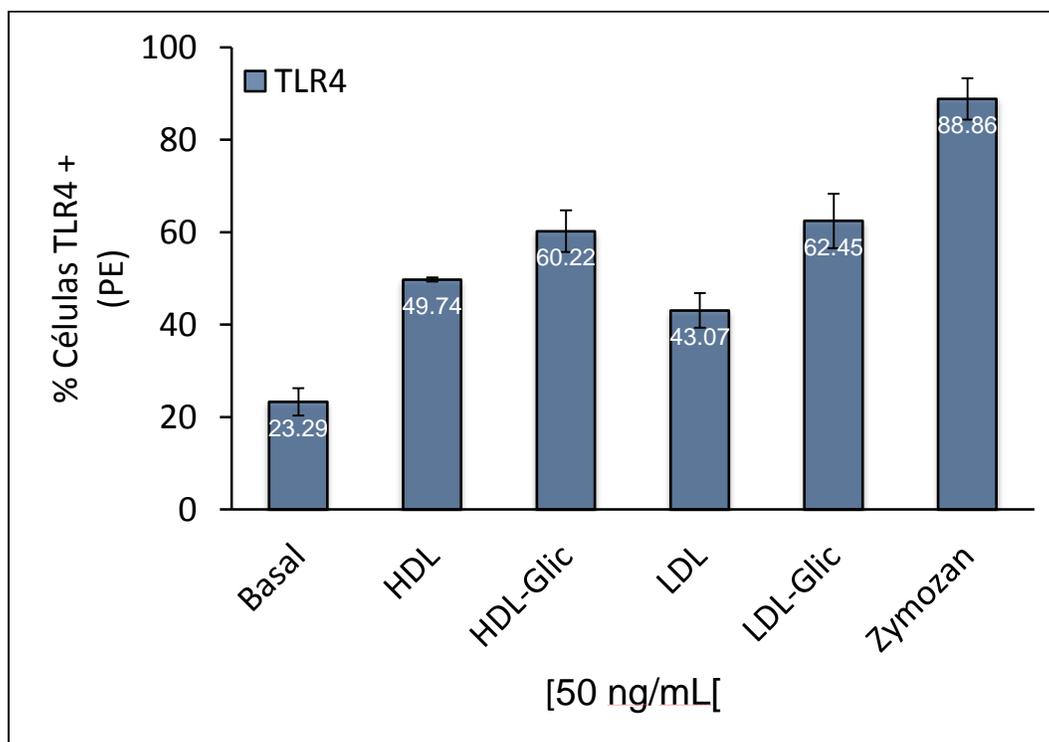


Figura 7.- Expresión de TLR4 en CMSP. ($P \leq 0.05$)

Estos resultados nos sugieren que hay una activación de TLRs en células monocíticas de sangre periférica en humanos así como existe en modelos de ratón (25,28, 29) y podrían activar la vía de señalización dependiente de MYD88 y NF- κ B (Björkbacka, 2006) como ya está comprobado que en ratones deficientes de MyD88, TLR2 y 4 tienen un desarrollo reducido de la aterosclerosis y es posible que la señalización este dada por los TLR2 y 4 (Tabet y Rye, 2009). Según Dasu y colaboradores las concentraciones altas de glucosa inducen la expresión de TLR 2 y 4 vía de la proteína quinasa C (PKC) estimulando el NADPH oxidasa en cultivos de monocitos de humano (Dasu y col., 2008) generando una mayor expresión de TLRs *in vivo* conjuntamente con las lipoproteínas glicadas y otras posibles moléculas séricas modificadas por glicación o glicoxidación. Este estudio también demuestra que la expresión de estos TLRs debido a la alta concentración de glucosa dependen de MyD88. La vía de activación de PKC está envuelta en la activación de NF- κ B (Moscat y col., 2003) e información publicada nos dice que hay una reacción cruzada entre TLR2, TLR4 y PKC (Dasu y col., 2008).

CONCLUSIONES

Se observó que las lipoproteínas de baja como de alta intensidad son capaces de inducir un aumento en la expresión de TLR2 y TLR4 en células monocíticas CD14+ de sangre periférica cuando son modificadas por glicación.

Esto sugiere que la modificación de lipoproteínas por glicación probablemente activa la vía de señalización dependiente de MYD88 en las células monocíticas CD14+ y la posterior activación de NF- κ B activando la expresión de los genes proinflamatorios dando como resultado un aumento en la expresión de TLR2, TLR4 y de las citocinas proinflamatorias.

PERSPECTIVAS

Evaluar la expresión de TLR2 y 4 así como la secreción de citocinas proinflamatorias IL-6 e IL-8 al ser expuestas con LDL y HDL glicoxidadas en CMSP CD14+ de humanos.

Evaluar la vía de señalización dependiente de MyD88 y NF- κ B en células monocíticas CD14+ de humanos estimuladas con LDL y HDL glicadas así como glicoxidadas ya que solo está comprobado en modelos de ratón.

BIBLIOGRAFÍA

- (NHLBI) National Heart, Lung, and Blood Institute. 2004. **Implications of Recent Clinical Trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines.** *Circulation* 110:227-239
- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. 2011. **Cellular and molecular immunology.** Saunders Elsevier. 6ta edición. Philadelphia. PA
- Abdul-Ghani M, Nawaf G, Nawaf F, Itzhak B, Minuchin O, Vardi P. 2006. **Increased prevalence of microvascular complications in type 2 diabetes patients with the metabolic syndrome.** *Isr Med Assoc J* 8(6):378-382.
- Arancibia SA, Beltrán CJ, Aguirre IM, Silva P, Peralta AL, Malinarich F, Hermoso MA. 2007. **Toll-like receptors are key participants in innate immune responses.**
- Aronson D, Rayfield EJ, Chesebro JH. 1997. **Mechanisms determining course and outcome of diabetic patients who have had acute myocardial infarction.** *Ann Intern Med* 126(4):296-306.
- Assimakopoulos D, Danielides V, Kontogianis N. 2001. **Sudden hearing loss as the presenting symptom of diabetes mellitus.** *Diabetes Res Clin Pract* 53:201-203.
- Basta G, Schmidt AM, De Caterina R. 2004. **Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes.** *Cardiovasc Res* 63:582–592.
- Bate KL, Jerums G. 2003. **Preventing complications of diabetes.** *Med J Aust* 179(9):498-503.
- Beckman JA, Creager Mark A, Libby P. 2009. **Diabetes and atherosclerosis: Epidemiology, pathophysiology, and management.** *JAMA* 287(19):2570-2581.
- Béjot Y, Giroud M. 2010. **Stroke in diabetic patients. Accidents vasculaires cérébraux le patient diabétique.** *Diab Metab* 36(3):S84-87
- Bergman RN, Lilly L. 1989. **Toward physiological understanding of glucose tolerance. Minimal-model approach.** *Diabetes* 38(12):1512-1527.
- Björkbacka H. 2006. **Multiple roles of Toll-like receptor signaling in atherosclerosis.** *Curr Opin Lipidol* 17(5):527-533.
- Bonow RO, Mann DL, Zipes DP, Libby P. 2011. **Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine.** 9th edition, Philadelphia, Pa. Saunders Elsevier.
- Brown BE, Mahroof FM, Cook NL, van Reyk DM, Davies MJ. **Hydrazine compounds inhibit glycation of low-density lipoproteins and prevent the in vitro formation of**

model foam cells from glycolaldehyde-modified low-density lipoproteins. Diabetología 49:775–783.

Brown BE, Mahroof FM, Cook NL. 2006. **Hydrazine compounds inhibit glycation of low-density lipoproteins and prevent the in vitro formation of model foam cells from glycolaldehyde-modified low-density lipoproteins.** Diabetologia 49:775–783.

Brownlee M, Creami A, Vlassara H. 1988. **Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications.** N Engl Med 318(20):1315-1321.

Buchsbaum S, Bercovich B, Ziv T. 2012. **Modification of the inflammatory mediator LRRFIP2 by the ubiquitin-like protein FAT10 inhibits its activity during cellular response to LPS.** Biochem Biophys Res Commun. 428(1):11-16.

Bunn HF, Higgins PJ. 1981. **Reaction of monosaccharides with proteins: possible evolutionary significance.** Science 213 (4504):222- 224

Calverley DC, Hacker MR, Loda KA, Brass E, Buchanan TA, Tsao-Wei DD, Groshen S. 2003. **Increased platelet Fc receptor expression as a potential contributing cause of platelet hypersensitivity to collage in diabetes mellitus.** Br Haematol 121(1):139-142.

Camacho Villa AY, Reyes Maldonado E, Montiel Cervantes LA, Vela Ojeda J. 2012. **CD133+ CD34+ and CD133+ CD38+ blood progenitor cells as predictors of platelet engraftment in patients undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation.** Transfus Apher Sci 46(3):239-244.

Castrillo A, Joseph SB, Vaidya SA. 2003. **Crosstalk between LXR and toll-like receptor signaling mediates bacterial and viral antagonism of cholesterol metabolism.** Mol Cell 12:805–16.

Christison JK, Rye KA, Stocker R. 1995. **Exchange of oxidized cholesteryl linoleate between LDL and HDL mediated by cholesteryl ester transfer protein.** 36(9):2017-26.

Clark NG, Fox KM, Grandy S. 2007. **Symptoms of diabetes and their association with the risk and presence of diabetes: findings from the Study to Help Improve Early evaluation and management of risk factors Leading to Diabetes.** Diabetes Care 30(11):2868-2873

Cockerill GW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. 1995. **High density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules.** Arterioscler Thromb Vasc Biol 15:1987-1994.

Creager MA, Lusher TF, Cosentino F, Beckman JA. 2003. **Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences and medical therapy: Part I.** Circulation 108(12):1527-1532.

Cruz Jaime G. 1995. **Lipoproteína y su relación con la aterosclerosis.**

- Dasu RM, Devaraj S, Zhao L, Hwang DH, Jialal I. 2008. **High glucose induces toll-like receptor expression in human monocytes.** *Diabetes* 57:3090-3098.
- Davies MJ, Thomas AC, Br Heart J. 1985. **Plaque fissuring—the cause of acute myocardial infarction, sudden ischaemic death, and crescendo angina.** *Br Heart J* 53(4):363–73.
- den Dekker WK, Cheng C, Pasterkamp G, Duckers HJ. 2010. **Toll like receptor 4 in atherosclerosis and plaque destabilization.** *Atherosclerosis* 209(2010):314–320.
- Deng S, Vatamaniuk M, Huan X, Doliba n, Lian MM, Frank A, Velidedeoglu E, Desai NM, Koeberlein B, Wolf B, Barker CF, Naji A, Matschinsky FM, Markmann JF. 2004. **Structural and functional abnormalities in the islets isolated from type 2 diabetic subjects.** *Diabetes* 53(3):624-632.
- Díaz-Flores M, Baiza-Gutman LA, Ibanez-Hernandez MA, Pascoe-Lira D, Guzman-Greenfel AM, Kumate-Rodriguez J. 2004. **Molecular aspects of chronic hyperglycemia-induced tissue damage.** *Gac Med Mex* 140 (4):437-447.
- Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson GK, Yan ZQ. 2002. **Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation.** *Circulation* 105:1158–1161.
- Fabryova L, Cagan S. 1998. **Relation between insulin resistance and small, dense lipoproteins with low density and the development of atherosclerosis in type 2 diabetes mellitus.** *Bratisl Lek Listy* 99(3):138- 145.
- Falk E, Fernández-Ortiz A. 1995. **Role of thrombosis in atherosclerosis and its complications.** *Am J Cardiol* 75(6):3B-11B.
- Forte TM, Oda MN, Knoff L. 1999. **Targeted disruption of the murine lecithin:cholesterol acyltransferase gene is associated with reductions in plasma paraoxonase and platelet-activating factor acetylhydrolase activities but not in apolipoprotein J concentration.** *J. Lipid Res.* 40:1276–1283.
- Giacco F, Brownlee M. 2010. **Oxidative Stress and Diabetic Complications.** *Circ Res* 107:1058-1070.
- González Flecha FL, Castello PR, Gagliardino JJ, Rossi JP. 2000. **La glucosilación no enzimática de proteínas. Mecánismo y papel en la diabetes y el envejecimiento.** *Ciencia al día internacional* 3(2):1-17. www.ciencia.cl
- Gugliucci A. 2000. **Glycation as the glucose link to diabetic complications.** *JAOA*100(10):621-634.
- Hein G, Weiss C, Lehmann G. 2006. **Advanced glycation end product modification of bone proteins and bone remodelling: hypothesis and preliminary immunohistochemical findings.** *Ann Rheum Dis* 65:101–104.

- Herlitz J, Karlson BW, Edwardsson N, Emanuelsson H, Hjalmarson A. 1992. **Prognosis in diabetics with chest pain or other symptoms suggestive of acute myocardial infarction.** *Cardiology* 80(3):237-245.
- Hernebring M, Brolen G, Aguilaniu H. 2006. **Elimination of damaged proteins during differentiation of embryonic stem cells.** *Proc Natl Acad Sci USA* 103:7700–7705.
- Hoppener JW, Nieuwenhuis MG, Vroom TM, Lips CJ. 2000. **Islet amyloid and diabetes mellitus type 2.** *Ned Tijdschr Geneesk* 144(42):1995-2000.
- Howes KA, Liu Y, Dunaief JL. 2004. **Receptor for advanced glycation end products and age-related macular degeneration.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:3713–3720.
- IDF. 2012. **Diabetes Atlas.** 5ta Edición. International Diabetes Federation. www.idf.org
- Ikeda K, Higashi T, Sano H, Jinnouchi Y, Yoshida M, Araki T, Ueda S, Horiuchi S. 1996. **N (epsilon)-(carboxymethyl)lysine protein adduct is a major immunological epitope in proteins modified with advanced glycation end products of the Maillard reaction.** *Biochemistry* 25(24):8075-8083.
- Imanaga Y, Sakata N, Takebayashi S, Matsunaga A, Sasaki J, Arakawa K, Nagai R, Horiuchi S, Itabe H, Takano T. 2000. **In vivo and in vitro evidence for the glycoxidation of low density lipoprotein in human atherosclerotic plaques.** *Atherosclerosis* 150(2):343-355.
- Jakus V, Rietbrock N. 2004. **Advanced glycation end-products and the progress of diabetic vascular complications.** *Physiol Res* 53(2):131- 142.
- Janine K. Kruit, Liam R. Brunham, C. Bruce Verchere and Michael R. Hayden. 2010. **HDL and LDL cholesterol significantly influence b-cell function in type 2 diabetes mellitus.** *Curr Op Lipid* 21:178–185.
- Jiménez Navarrete MF. 2000. **Diabetes mellitus: actualización.** *Acta Méd* 42(2):53-65.
- Kempen JH. 2004. **The prevalence of diabetic retinopathy among adults in the United States.** *Arch Ophthalmol* 122(4):552-563.
- Kim NH, Oh JH, Choi KM, Kim YH, Baik SH, Choi DS, Kim SJ. 2000. **Serum ferritin in healthy subjects and type 2 diabetic patients.** *Yonsei Med J* 31(3):387-392.
- Kopprasch S, Pietzsch J, Graessler J. 2004. **The protective effects of HDL and its constituents against neutrophil respiratory burst activation by hypochlorite-oxidized LDL.** *Mol Cell Biochem* 258:121-127.
- Kumar V, Cotran R, Robbins S. 1999. **Patología Humana.** 6ta edición. México D.F.McGraw-Hill interamericana.
- Leahy JL. 2005. **Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus.** *Archives of Medical Research* 36:197-209.

- LeRoith D, Olefky M. 2003. **Diabetes mellitus: Texto básico y clínico.** McGraw-Hill. 2da Edición. México D.F. 130-133.
- Levitan I, Volkov S, Subbaiah PV. 2010. **Oxidized LDL: Diversity, patterns of recognition, and pathophysiology.** *Antioxid Redox Signal* 13(1):39-72
- Libby P, Ridker PM, Maseri A. 2002. **Inflammation and atherosclerosis.** *Circulation* 105:1135-1143.
- Linton MF, Fazio S. 2003. **Macrophages, inflammation, and atherosclerosis.** *Int J Obes Relat Metab Disord* 27(3):S35-40.
- Liu D, Ji L, Zhang D, Tong X, Pan B, Liu P, Zhang Y, Huang Y, Su J, Willard B, Zheng L. 2012. **Nonenzymatic glycation of high density lipoprotein impairs its anti-inflammatory effects in innate immunity.** *Diabetes/metabolism Research and Reviews* 28(2) 186-195.
- Liu X, Yumoto H, Davey M, Goswami S, Gibson FC, Genco CA. 2007. **Toll-like receptor 2 plays a critical role in the progression of atherosclerosis that is independent of dietary lipids.** *Atherosclerosis* 196: 146-154.
- Liu Y, Yu H, Zhang Y, Zhao Y. 2007. **TLRs are important inflammatory factors in atherosclerosis and may be a therapeutic target.** *Medical Hypotheses* 70:314-316.
- Lyssenko V, Jonsson A, Almgren P, Pulizzi N, Isomaa B, Tuomi T, Berglund G, Altshuler D, Nilsson P, Groop L. 2008. **Clinical Risk Factors, DNA Variants, and the Development of Type 2 Diabetes.** *N Engl J* 359:2200-2232.
- Marshak-Rothstein A. 2006. **Toll-like receptors in systemic autoimmune disease.** *Nat Rev Immunol* 6(11):823-835.
- Martínez-Soto JM. 2012. **Expresión y Activación de Receptores Tipo Toll en Células CD14+ de Sangre Periférica Estimuladas con Ferritina Glicada.**
- Miller YI, Viriyakosol S, Binder CJ, Feramisco JR, Kirkland TN, Witztum JL. 2003. **Minimally modified LDL binds to CD14 Induces Macrophage preading via TLR4/MD-2 and inhibits phagocytosis of apoptotic cells.** *The journal of biological chemistry* 278(2): 1561–1568.
- Miller YI, Viriyakosol S, Worrall DS, Boullier A, Butler S, Witztum JL. 2005. **Toll-Like Receptor 4-Dependent and –Independent Cytokine Secretion Induced by Minimally Oxidized Low Density Lipoprotein in Macrophages.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:1213-1219.
- Moscat J, Diaz-Meco MT, Rennert P. 2003. **NF- κ B activation by protein kinase C isoforms and B-cell function.** 2003; *EMBO Rep*4:31–36.
- Nahla NY, Handrean S, Valentine CM, Reena S, Salam Hama P. 2012. **High-density lipoprotein impedes glycation of low-density lipoprotein.** *Diab Vasc Dis Res* 10(2):152-160.

- Napoli C, de Nigris F, Palinski W. 2001. **Multiple role of reactive oxygen species in the arterial wall.** *J Cell Biochem* 82:674-682.
- Ng CJ, Shih, DM, Hama SY, Villa N, Navab M, Reddy ST. 2005. **The paraoxonase gene family and atherosclerosis.** *Free Radical Biol Med* 38:153–163.
- Paigen B. 1995. **Genetics of responsiveness to high-fat and high-cholesterol diets in the mouse.** *Am J Clin Nutr* 62(2):458S-462S.
- Palazzo M, Gariboldi S, Zanobbio L, Dusio GF, Selleri S, Bedoni M, Balsari A, Rumio C. 2008. **Cross-Talk among Toll like receptors and their ligands.** *Int Immunol* 20(5):709-718.
- Poitout V, Robertson RP. 2008. **Glucolipototoxicity: Fuel excess and beta cell dysfunction.** *Endocr Rev* 29(3):351-366.
- Ravandi A, Kuksis A, Shaikh NA. 2000. **Glucosylated glycerophosphoethanolamines are the major LDL glycation products and increase LDL susceptibility to oxidation: evidence of their presence in atherosclerotic lesions.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(2):467-477.
- Rodney A. Hayward, Timothy P. Hofer, Sandeep Vijan. 2003. **Narrative Review: Lack of Evidence for Recommended Low-Density Lipoprotein Treatment Targets: A Solvable Problem.** *Ann Intern Med.* 3, 145(7):520-530.
- Rodríguez G, Mago N, Rosa F. 2009. **Role of inflammation in atherogenesis.** *Invest Clin* 50(1):109-129.
- Ross R. 1999. **Atherosclerosis—an inflammatory disease.** *N Engl J Med* 340(2):115-126.
- Saha SA, Tuttle KR. 2010. **Influence of glycemic control on the development of diabetic cardiovascular and kidney disease.** *Cardiol Clin* 28(3):497-516.
- Sanguinetti SM, Schreier LE, Elbert A. 1999. **Detection of structural alterations in LDL isolated from type 2 diabetic patients: application of the fructosamine assay to evaluate the extent of LDL glycation.** *Atherosclerosis* 143:213–215.
- Sasaki N, Toki S, Chowei H. 2001. **Immunohistochemical distribution of the receptor for advanced glycation end products in neurons and astrocytes in Alzheimer's disease.** *Brain Res* 888:256–262.
- Scanu AM, Edelstein. 2008. **HDL: bridging past and present with a look at the future.** *C. FASEB J*; 22:4044–4054.
- Schleicher E, Deufel T, Wieland OH. 1981. **Nonenzymatic glycosylation of human serum lipoproteins. Elevated epsilon-lysine glycosylated low density lipoprotein in diabetic patients.** *FEBS Lett* 129:1–4.

- Schulze MB, Manson JE, Ludwig DS, Colditz JA, Stampfer MJ, Willett WC, Hu FB. 2004. **Sugar sweetened beverages, weight gain, and incidence of type 2 diabetes in young and middle-aged women.** *JAMA* 292:927–934.
- Shi W, Haberland ME, Jien ML, Shih DM, Lusis AJ. 2000. **Endothelial responses to oxidized lipoproteins determine genetic susceptibility to atherosclerosis in mice.** *Circulation* 102(1):75-81.
- Spagnoli LG, Bonanno E, Sangiorgi G, Mauriello A. 2007. **Role of inflammation in atherosclerosis.** *J Nucl Med* 48(11):1800-1815.
- Steinberg D. 1997. **Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance.** *J Biol Chem* 272:20963-20966.
- Stumvoll M, Tataranni PA, Stefan N, Vozarova B, Bogards C. 2003. **Glucose allostasis.** *Diabetes* 52(4):903-909.
- Tabet F, Rye KA. 2009. **High-density lipoproteins, inflammation and oxidative stress.** 2009; *Clin Sci (Lond)* 116: 87–98.
- Takeuchi M, Ynase Y, Matsuura N, Yamagishi Si S, Kameda Y, Bucala R, Makita z. 2001. **Immunological detection of a novel advanced glycation end-product.** *Mol Med* 7(11):783-791.
- Tames FJ, Mackness MI, Arrol S. 1992. **Nonenzymatic glycation of apolipoprotein B in the sera of diabetic and nondiabetic subjects.** *Atherosclerosis* 93:237–244.
- Temelkova-Kurktschiev T, Stefanov T. 2011. **Lifestyle and genetics in obesity and type 2 diabetes.** *Exp Clin Endocrinol Diab* 120(1):1-6.
- Thornalley PJ, Langborg A, Minhas HS. 1999. **Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose.** *Biochem J* 344:109–116.
- Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, da Costa C. 2001. **Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells.** *J Biol Chem* 276:31332–9.
- Vaccaro O, Eberly LE, Neaton JD, Yang L, Riccardi G, Tamler J. 2004. **Impact of diabetes and previous myocardial infarction on long term survival: 25-year mortality follow-up of primary screeners of the Multiple Risk Factor Intervention Trial.** *Arch Intern Med* 164(13):1438-1443.
- Van den Oever IA, Raterman HG, Nurmohamed MT, Simsek S. 2012. **Endothelial dysfunction, inflammation and apoptosis in diabetes mellitus.** *Mediators Inflamm* 201(1):383-393.
- Van der Wal AC, Das PK, Tigges AJ, Becker AE. 1992. **Macrophage differentiation in atherosclerosis. An *In Situ* immunohistochemical analysis in humans.** *Am J Pathol* 141:161-168.

- Verzijl N, DeGroot J, Oldehinkel E. 2000. **Age-related accumulation of Maillard reaction products in human articular cartilage collagen.** *Biochem J* 350:381–387.
- Vigilance JE, Reid HL, Richards-George P. 1999. **Peripheral occlusive arterial disease in diabetic clinic attendees.** *West Indian Med J* 48(3):143-146.
- Vlassara H, Bucala R, Striker L. 1994. **Pathogenic Effects of advanced glycosylation: biochemical,biologic and clinical implication for diabetes and aging.** *Lab Invest* 70(2):138-151.
- Voziyan PA, Khalifah RG, Thibaudeau C, Yildiz A, Jacob J, Serianni AS, Hudson BG. 2003. **Modification of proteins in vitro by physiological levels of glucose: pyridoxamine inhibits onversions of Amadori intermediate to advanced glycation end-products through binding of redox metal ions.** *J Biol Chem* 278(47):46616-46624
- Whiting D, Guariguata L, Weil C, Shaw J. 2011. **IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence for 2011 and 2030.** *Diab Res Clin Prac* (94)(3): 311-321.
- Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. 2004. **Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030.** *Diabetes Care* 27:1047–1053.
- Xu XH, Shah PK, Faure E. 2001. **Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL.** *Circulation* 104:3103–8.
- Yki-Jarvinen H. 1992. **Glucose toxicity.** *Endocr Rev* 13(3):415-431.
- Yokoyama H, one H, Oihi M, Kawai K, Fukumoto Y, Kobayashi M. 2009. **Prevalence of albuminuria and renal insufficiency and associated clinical factors in type 2 diabetes: The japan Diabetes Clinical Data Management Study (JDDM15).** *Nephrol Dial Transplant* 24:(4):1212-1219.
- Younis N, Sharma R, Soran H, Charlton-Menys V, Elseweidy M, Durrington PN. 2008. **Glycation as an atherogenic modification of LDL.** *Curr Op Lipid* 19:378-384.
- Younis N, Soran H, Charlton-Menys V, Sharma R, Hama S, Pemberton P, Elseweidy MM, . 2012. **High-density lipoprotein impedes glycation of low-density lipoprotein.** *Diab Vasc Dis Res* 0(0):1-9.
- Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. 2001. **Global and societal implications of the diabetes epidemic.** *Nature* 414(6865):782-787.