

UNIVERSIDAD DE SONORA

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

**Determinación de la producción de micropartículas TLR2 y
TLR4 positivas derivadas de células mononucleares de
sangre periférica CD14+ estimuladas con ferritina glicada**

TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

Que para obtener el Título de

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

Ashley Patricia Rosales Ruíz

Hermosillo, Sonora

Mayo del 2014

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

VOTOS APROBATORIOS

Los miembros del jurado calificador del examen profesional de Ashley Patricia Rosales Ruíz hemos revisado detenidamente su trabajo escrito titulado “Determinación de la producción de micropartículas TLR2 y TLR4 positivas derivadas de células mononucleares de sangre periférica CD14+ estimuladas con ferritina glicada” y encontramos que cumple con los requisitos para la presentación de su examen profesional. Por tal motivo recomendamos se acepte dicho trabajo como requisito parcial para la obtención de título de Ashley Patricia Rosales Ruíz.

Atentamente:

Dr. José Manuel Galván Moroyoqui
Presidente

Dr. Enrique Bolado Martínez
Secretario

M. en C. Antonio Rascón Careaga
Vocal

M. en C. Oralía Orduño Fragoza
Suplente

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Manuel, ya que gracias a el comencé a hacer mi servicio social en el laboratorio de medicina y adquirí muchísimos conocimientos, además de conocer a personas agradables las cuales siempre me brindaron su apoyo. Por ser el presidente de mi tesis y apoyarme en este largo camino hacia la titulación.

A mis sinodales, por brindarme su apoyo y más que nada por dedicarle tiempo a mi tesis, aun cuando tiempo era lo que les faltaba.

A la Dra. Adriana, ya que gracias a ella me nació el interés hacia el tema de las Micropartículas, además siempre pude contar con su apoyo.

A Juan Martínez, muchísimas gracias porque siempre pude contar contigo y siempre me brindaste tu ayuda y conocimientos.

A mi familia y amigos, los cuales han estado conmigo a lo largo de esta etapa siempre animándome a seguir adelante y dar lo mejor.

DEDICATORIA

A mis padres, a esas personas las cuales siempre han estado en mi vida, apoyándome para siempre salir a delante, a luchar por lo que quiero y nunca dejarme vencer por nada ni por nadie. A ellos les dedico todos mis logros, ya que sé que son y siempre serán las personas que estén a mi lado incondicionalmente y le doy gracias a dios por tenerlos a mi lado y espero tenerlos muchísimos más años conmigo. Los adoro y muchísimas gracias por todo.

A mis hermanos, por todo el apoyo y cariño brindado y como dice la ley metafísica de causa y efecto “A toda acción le sigue una reacción” ya que todo es posible con esfuerzo y dedicación.

A mis hermanas Aiko, Alejandra y Elizabeth, porque a pesar de no ser mis hermanas de sangre siempre han estado conmigo apoyándome y brindándome su amistad.

A Miguel Ángel, que aunque no tiene mucho tiempo en mi vida siempre me ha brindado su apoyo incondicional, animándome a no darme nunca por vencida, y tratándome de convencer que soy la mejor y puedo hacer todo lo que me proponga, además del inmenso cariño que siempre me brinda.

A estas personas las cuales son las más importantes en mi vida les agradezco todo el cariño y apoyo que me han dado y por esa razón les dedico mis logros.

CONTENIDO

	Página
VOTOS APROBATORIOS	2
AGRADECIMIENTOS	3
DEDICATORIA	4
CONTENIDO	5
LISTA DE FIGURAS	7
OBJETIVOS	8
Objetivo General	8
Objetivos Particulares	8
RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	10
ANTECEDENTES	12
Micropartículas	12
Producción	13
Composición	13
Papel de las MP's en el organismo humano	14
Ferritina	16
Glicación no Enzimática	17
Glicación Inicial o temprana	18
Glicación Tardía o Avanzada	19
Receptores Tipo Toll	20
TLRs en Aterosclerosis	21
MATERIALES Y MÉTODOS	23
Sujetos de Estudio	23
Consideraciones Bioéticas	23
Obtención de Muestras	23
Glicación de Ferritina	24

Estimulación de Células de Sangre Periférica.....	24
Determinación de MP's Derivadas de Monocitos Mediante Citometría de Flujo.....	24
Análisis Estadístico.....	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
CONCLUSIONES	31
RECOMENDACIONES.....	32
BIBLIOGRAFÍA.....	33

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Representación esquemática de la formación de micropartículas.....	12
2. Representación esquemática de la composición de las micropartículas.....	14
3. Reacciones necesarias para la formación de productos de glicación avanzada	19
4. Panel representativo del análisis citométrico.....	26
5. Expresión de la TLR2 en micropartículas CD14+.....	27
6. Media de la intensidad de fluorescencia para TLR2 en micropartículas CD14+...28	
7. Expresión de TLR4 en micropartículas CD14+.....	29
8. Media de la intensidad de fluorescencia para TLR4 en micropartículas CD14+.	30

OBJETIVOS

Objetivo General

Analizar la expresión de TLR2 y TLR4 en micropartículas de células mononucleares CD14+ de sangre periférica en condiciones basales y posteriores al estímulo con ferritina glicada.

Objetivos Particulares

Analizar los niveles basales y post estímulo de micropartículas CD14+ derivadas de monocitos de sangre periférica tratadas con ferritina glicada.

Analizar la expresión de TLR2 y TLR4 en micropartículas CD14+ derivadas de monocitos de sangre periférica estimulados con ferritina glicada.

RESUMEN

Las micropartículas son microvesículas liberadas por las diferentes tipos de células en respuesta a estímulos específicos, las cuales se encuentran incrementadas en distintas patologías y pueden contribuir a procesos inflamatorios y de la coagulación entre otros. Datos recientes obtenidos en nuestro laboratorio, muestran que ferritina glicada induce la activación de células monocíticas de sangre periférica CD14+, provocando una respuesta de tipo inflamatoria, la cual es evidenciada por un aumento en la expresión de TLR 2 y TLR 4 en su superficie, así como el incremento en la secreción de citocinas IL-6 y 8 .

La ferritina es una proteína, cuya elevación de sus niveles se ha relacionado con enfermedades tales como diabetes mellitus tipo 2 (DM2), donde se cree que colabora con el proceso inflamatorio crónico de este padecimiento, sin embargo hasta el momento se desconoce su papel específico en esta enfermedad.

El presente estudio pretende evidenciar si la activación inducida por ferritina glicada a células monocíticas de sangre periférica desencadena la liberación de micropartículas de membrana que co-expresen los receptores CD14, TLR2 y TLR4. Se logró observar que la estimulación con ferritina glicada sobre las células monocíticas actúa como un estímulo inflamatorio, aumentando la liberación de MP's CD14+, así como también un incremento en el porcentaje de TLR 2 y TLR 4, y también se detectó un aumento de TLR 2 en la superficie de las MP's.

INTRODUCCIÓN

Las micropartículas (MP's) fueron descritas por primera vez en 1967 cuando Jean-Pierre Wolf las encontró en plasma humano y las reportó como fragmentos de membrana plaquetaria. Este investigador nombró a estos fragmentos polvo de plaquetas y las describió como vesículas de 0.1 a 1.0 μm de diámetro las cuales promueven la coagulación (VanWijk y col., 2003; Wolf, 1967).

En la actualidad, se reconoce que las MP's son pequeños fragmentos de membrana plasmática liberados por distintos tipos de células en el torrente sanguíneo, entre las cuales se han caracterizado a MP's derivadas de plaquetas, monocitos, células endoteliales, eritrocitos, granulocitos, entre otras (VanWijk y col., 2003; Morel y col., 2011). Existen dos mecanismos que pueden llevar a su formación: la activación celular y la apoptosis (Morel y col., 2011). Las MP's están compuestas de una bicapa lipídica que expone las proteínas transmembranales y receptores, característicos de la célula proveniente, mientras que en el interior posee componentes citosólicos tales como enzimas, factores de transcripción y ARNm derivado de su célula progenitora (VanWijk y col., 2003). Se ha encontrado evidencia que sugiere que las MP's regulan procesos tales como inflamación, coagulación y apoptosis, y que también pueden desempeñar un papel en la proliferación celular o diferenciación (VanWijk y col., 2003). Se han encontrado un mayor número de MP's en el plasma de pacientes con algunos padecimientos tales como Diabetes Mellitus (DM), enfermedad arteriocoronaria, síndrome metabólico y algunos tipos de cáncer. Por otro lado se relacionan también a eventos plasmáticos tales como hipertensión y trombosis, y adicionalmente asociadas a cambios en componentes plasmáticos como hipercolesterolemia, anticoagulante lúpico y preeclampsia, mientras que los niveles de MP's plasmáticas de sujetos sanos no se alteran (Morel y col., 2011).

La ferritina es una proteína soluble con un peso aproximado de 460 kDa, se encuentra constituida por 24 subunidades mismas que pueden ser H-ferritina (subunidad pesada), cuyo peso es de 22 kDa, está compuesta por 182 aminoácidos, o L-ferritina (subunidad ligera) la cual tiene un peso de 20 kDa y contiene 174 aminoácidos. La conformación de esta proteína puede existir como diversas combinaciones de estos dos tipos de subunidades, dando lugar a heteropolímeros o isoferritinas (Koorts y Viljoen, no y col., 2007a).

En el humano, la ferritina es la principal proteína intracelular responsable de la captura, almacenamiento y liberación de hierro, en su estructura externa puede captar hasta 4,500 átomos de hierro, los cuales son liberados cuando hay un incremento en las necesidades celulares de hierro (Koorts y col., 2007a). El hierro es esencial para las funciones celulares tales como el transporte de oxígeno, transferencia de electrones, fijación de nitrógeno, síntesis de ADN, y producción de hemoproteínas tales como la mioglobina (Koorts y col., 2007b). La ferritina también puede desempeñar un papel en las funciones especializadas, por ejemplo, en el reciclaje de hierro en los macrófagos y en el almacenamiento a corto y largo plazo de hierro, así como en funciones de mantenimiento intracelulares en las que proporciona una reserva de hierro para citocromos, nitrogenasas, reductasas de ribonucleótidos, hemoglobina y mioglobina (Koorts y col., 2007b).

Datos recientes obtenidos en nuestro laboratorio muestran que ferritina glicada induce la activación de células monocíticas de sangre periférica, en la que incrementa la expresión de TLR2 y TLR4 en superficie, así como incremento en la liberación de citocinas pro inflamatorias IL-6 e IL-8, evento que no se observa cuando las células son expuestas a la proteína de ferritina sin glicación (Martínez, 2012).

ANTECEDENTES

Micropartículas

Las MP's son una población heterogénea de pequeñas estructuras de membrana plasmática, las cuales sirven como importantes vectores de señalización entre células. Estas MP's circulan en el torrente sanguíneo, por lo cual pueden ser detectados en sangre periférica, y pueden proceder de diferentes tipos de células tales como plaquetas, monocitos, células endoteliales, eritrocitos, y granulocitos (Morel y col., 2011). Sin embargo, las MP's con mayor predominancia en plasma humano, son MP's derivadas de plaquetas y megacariocitos (Viera y col., 2012). Existen dos mecanismos que promueven su producción, los cuales son la activación celular, y muerte celular por apoptosis (Figura 1). Ambos mecanismos promueven la entrada del calcio, activando de este modo a las enzimas flippasa, floppasa y scramblasa que provocan la externalización de fosfatidilserina, adicionalmente se induce la reorganización del citoesqueleto lo cual conduce a la aparición de protuberancias en la membrana con la formación y desprendimiento de las MP's (Martinez y col., 2011; Viera y col., 2012).

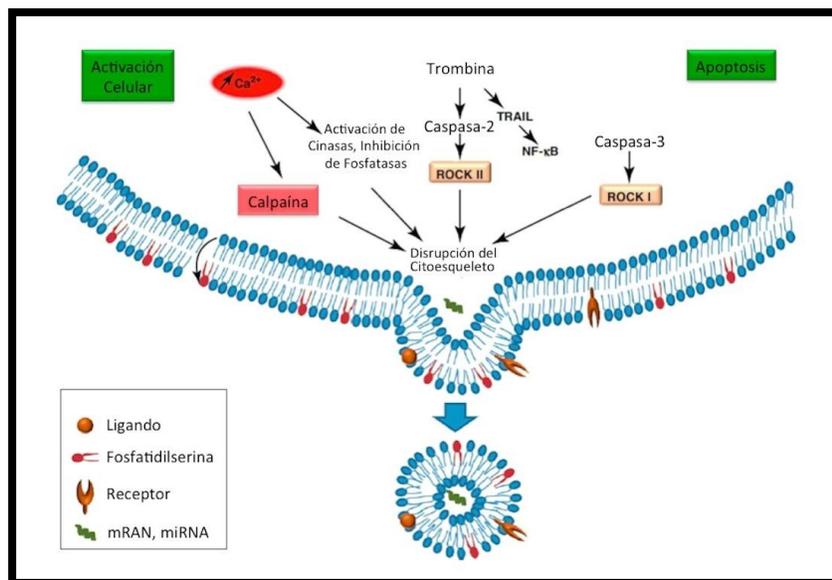


Figura 1. Representación esquemática de la formación de micropartículas.

Fuente: Modificado de Martinez y col., 2011.

Producción

Las MP's se generan durante la activación celular o bien durante la apoptosis temprana mediante la formación de protuberancias en la membrana celular, las cuales pueden desprenderse de la célula mediante la ruptura de su tallo de unión (Muñoz y col., 2012). Este proceso sucede debido a una reorganización del citoesqueleto. Durante la activación celular la reorganización es secundaria al efecto a enzimas dependientes de calcio, tal como la calpaína la cual degrada proteínas estructurales del citoesqueleto. En el caso de la apoptosis, se produce por la activación de cinasas intracelulares las cuales fosforilan las cadenas ligeras de miosina permitiendo así el desarrollo de fuerzas de contracción y deslizamiento. En ambos procesos se observa que el incremento del calcio citosólico produce una alteración en las enzimas que mantienen la asimetría de la bicapa lipídica permitiendo la exteriorización de fosfolípidos aniónicos, principalmente fosfatidilserina (Muñoz y col., 2012).

Composición

Las MP's contienen varios componentes derivados de su célula progenitora obtenidos durante su formación los cuales incluyen proteínas, lípidos y material genético, estos componentes se incorporan en las MP's a través de un proceso regulado (Norling y Dalli, no y col., 2013). Estas MP's pueden contener en su superficie receptores de quimiocinas, moléculas de adhesión, marcadores como CMH (complejo mayor de histocompatibilidad) de clase II y algunas moléculas coestimuladoras, factor tisular, diferentes tipos de ligandos, ADN, fosfolípidos (fosfatidilserina principalmente), entre otros (Mause y Weber, no y col., 2010). Adicionalmente, en su interior contiene proteínas derivadas del citosol, retículo endoplasmático y núcleo, incluyendo histonas, y ARN (ARN mensajero, microARN, ARN de cadena sencilla). Se ha observado que los marcadores de superficie que expresan las MP's permiten reconocer la célula de procedencia (Mause y col., 2010; Muñoz y col., 2012).

Papel de las MP's en el organismo humano

Las MP's son pequeñas vesículas las cuales pueden ser potencialmente liberadas de cualquier tipo de células. Se ha encontrado que estas están involucradas en la comunicación celular y parecen ser vectores de mensajes biológicos, esto debido a que las MP's pueden transferir parte de sus componentes y contenido (incluyendo lípidos bioactivos, ARN y proteínas como citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento) a células diana seleccionadas, mediando así la activación celular, modificación fenotípica y la reprogramación de la función celular. La transferencia del contenido de estas partículas puede ser facilitada por interacciones transitorias, o puede requerir de una asociación firme como la asimilación de membrana o la incorporación definitiva de la MP (Figura 2) en la célula diana (Mause y col., 2010).

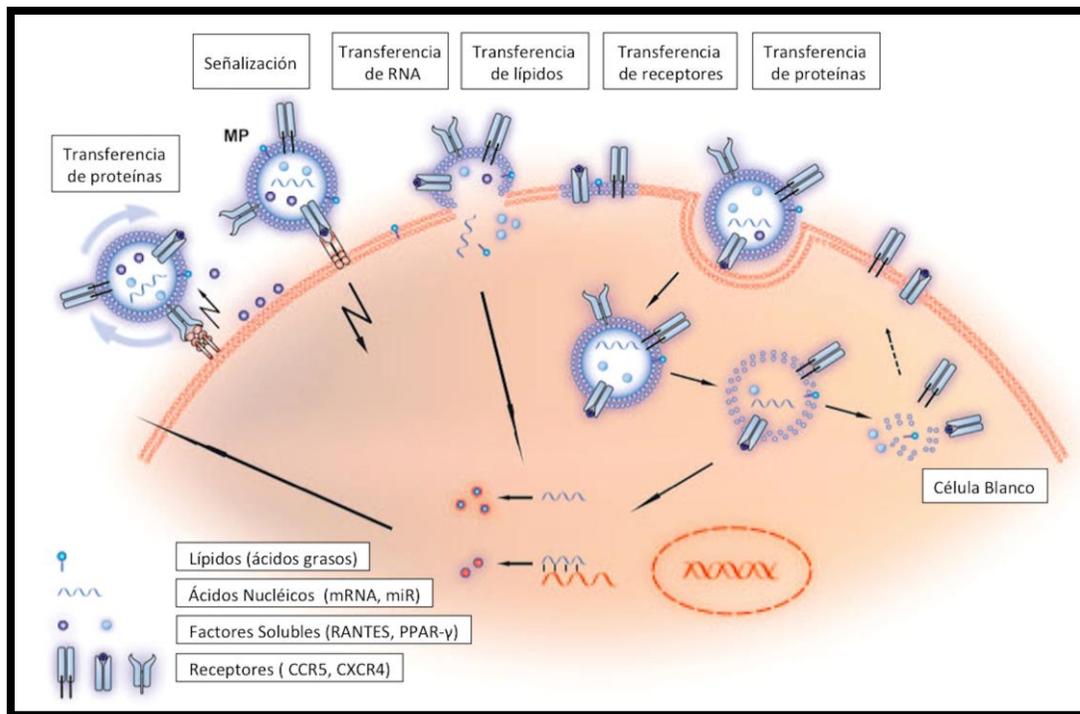


Figura 2. Representación esquemática de la composición de las micropartículas.

Fuente: Modificado de Mause y col., 2010.

Se ha reportado que las MP's pueden circular fácilmente en el sistema vascular, por lo tanto pueden servir como módulos de transporte y transducción de señales no sólo en su entorno local, sino también a notable distancia de su lugar de origen. Estudios recientes también han planteado la posibilidad de que las vesículas derivadas del sistema nervioso central (SNC) pueden entrar en el torrente sanguíneo e interactuar con las células endoteliales en la circulación periférica, presentando así un nuevo canal de comunicación entre el SNC y el sistema cardiovascular (Mause y col., 2010).

Debido a las propiedades mencionadas anteriormente las MP's pueden perpetuar y agravar los procesos locales y generales deletéreos tales como inflamación, trombosis y propagación metastásica del cáncer (Mause y Weber, 2010). Datos recientes en donde se evaluaron los niveles de MP's en humanos, se observó que en pacientes sanos solo se pueden encontrar niveles bajos de MP's, mientras que estas aumentan significativamente en algunos padecimientos tales como trastornos trombóticos y condiciones inflamatorias sistémicas, incluyendo aterotrombosis (Morel y col., 2011). Otro de los padecimientos en los cuales se encuentra un aumento de MP's es en el cáncer, principalmente en cáncer de pulmón, ovario, próstata, recto y colón, en el cual se ha demostrado que las MP's tienen un enorme impacto en el crecimiento del tumor, así como en la supervivencia y propagación, así como efectos demostrados en muchas etapas de la progresión tumor, incluyendo la angiogénesis, evasión al sistema inmune, promoción de la degradación de la matriz extracelular, y de la metástasis (D'Souza-Schorey y col., 2012). La presencia de MP's en varios padecimientos ha promovido que se estudie el perfil molecular de estas estructuras, las cuales se ha observado poseen un potencial como biomarcadores circulantes, y adicionalmente como plataformas para la medicina personalizada (D'Souza-Schorey y col., 2012).

Ferritina

Ferritina es la principal proteína encargada del almacenamiento de hierro intracelular en todos los organismos vivos. Esta molécula consiste en una cubierta proteínica hueca la cual mide 12-13 nm de diámetro en su exterior, mientras que en el interior de 7-8 nm, con una masa de alrededor de 500 kDa, su estructura permite el almacenamiento de hasta 4.500 átomos de Fe^{+3} (Koorts y col., 2007b). Cada cubierta de apoferritina (ferritina libre de hierro) se ensambla a partir de 24 cadenas de polipéptidos de los cuales están formadas por una subunidad pesada o H-ferritina, y una subunidad ligera o L-ferritina. La subunidad H tiene un peso molecular de 21 kDa, mientras que la subunidad L es una proteína más pequeña con un peso molecular de 19 kDa (Koorts y col., 2007a). La cubierta de la proteína de ferritina existe como diversas combinaciones de estos dos tipos de subunidades, dando lugar a heteropolímeros o isoferritinas. Estas Isoferritinas, poseen diferentes funciones y características dependiendo del tipo de célula, el estado de proliferación de la célula y la presencia de algún padecimiento (You y Wong, no y col., 2005; Koorts y Viljoen, no y col., 2007b).

Debido a que H-ferritina puede unirse a hierro y liberarlo más fácilmente que la L-ferritina, se cree que la H-ferritina juega un papel clave en la rápida desintoxicación de hierro y el transporte de hierro intracelular. La subunidad H, funciona como un ferroxidasa del hierro, el cual se oxida a la forma Fe (III), mientras que el subunidad L, se asocia con la nucleación de hierro, así como la mineralización y el almacenamiento a largo plazo (Koorts y col., 2007a). La relación entre las subunidades H y L en la ferritina varía ampliamente en diferentes tejidos. La proteína ferritina con mayor contenido de subunidades L, predomina en órganos de almacenamiento de hierro, tales como hígado y bazo, mientras que la ferritina rica en subunidades H predomina en los órganos de bajo contenido de hierro, tales como corazón y páncreas (Koorts y col., 2007a).

Una de las capacidades del hierro es la de donar electrones para la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), esto a través de la reacción de Fenton. La toxicidad del hierro en sistemas celulares se ha atribuido en gran parte a su capacidad para participar en la generación de ROS, lo que puede dañar directamente a proteínas, ADN y lípidos, que conducirá a una elevada toxicidad celular (Koorts y col., 2007b). Recientemente se ha encontrado que el aumento de las concentraciones de ferritina en suero se encuentra relacionado con condiciones

patógenas, lo que refleja la asociación de la sobrecarga de hierro subclínica con la resistencia a la insulina y un aumento del riesgo de padecer diabetes mellitus tipo 2 (An y col., 2012).

Glicación No Enzimática

La glucosilación no enzimática de proteínas, denominada reacción de Maillard, recientemente llamada glicación, ha sido estudiada sistemáticamente desde principios de siglo a partir de su aplicación en la industria alimentaria en el mejoramiento del aspecto y el sabor de los alimentos (Price y col., 2007). Estos alimentos modificados se ingieren diariamente con la dieta y actualmente se determinó que algunos de ellos pueden ser nocivos para el organismo. Por más de 50 años, el avance en la comprensión química de esta reacción estuvo directamente vinculada con la ciencia y la tecnología alimentaria (Adamska y col., 2012). Su relevancia fisiológica se puso de manifiesto a partir del descubrimiento de moléculas de hemoglobina glucosiladas en la sangre de individuos sanos y del aumento en su proporción en personas que padecen diabetes (Adamska y col., 2012).

Debido a que la glucosa es el azúcar reductor más abundante en el organismo, su concentración en la sangre está sometida a un cuidadoso mecanismo de regulación en individuos sanos, esta azúcar aumenta sustancialmente en individuos que padecen diabetes los cuales presentan un estado de hiperglicemia (Yamagishi y col., 2012). Una de las principales consecuencias fisiopatológicas de la hiperglucemia es la excesiva interacción química entre la glucosa con las proteínas, propiciando la unión entre éstas sin que haya necesidad de una intervención enzimática; este proceso depende exclusivamente de la concentración de la glucosa y del tiempo de contacto de ésta con las proteínas (Price y col., 2007; Yamagishi y col., 2012). Cuando hay un aumento persistente de glucosa en sangre, se acelera la reacción entre azúcares y otras moléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, produciendo así modificaciones por reducción de azúcares llamada glicosilación no enzimática (GNE), o más recientemente denominada como glicación. Esta reacción resulta en la formación de productos finales de la glicosilación avanzada (AGES)(Price y col., 2007; Yamagishi y col., 2012).

Desde el punto de vista químico, la glicación se define como la reacción de grupos amino primario de aminoácidos, péptido y proteínas con el grupo carbonilo de los azúcares reductores. Durante esta reacción se pueden distinguir tres etapas: inicialmente se produce la asociación del azúcar con la proteína, formando un compuesto denominado base de Schiff; después la estructura de este compuesto se reordena hacia una forma más estable, la cual es llamada producto de Amadori (Price y col., 2007; Yamagishi y col., 2012). Durante las etapas iniciales de la glicación las reacciones iniciales son reversibles y se completan en tiempos relativamente cortos, mientras que en las etapas posteriores transcurren más lentamente y son irreversibles. Se ha postulado que tanto las etapas iniciales como las finales de la glucosilación están implicadas en los procesos de envejecimiento celular y en el desarrollo de las complicaciones crónicas de la diabetes (Yamagishi y col., 2012).

Glicación Inicial o Temprana

En esta etapa se forman enlaces covalentes entre los grupos libres amino (reactivos) de las proteínas y la glucosa. Estos grupos se ubican generalmente sobre las cadenas laterales de lisina y en los residuos NH₂-terminales de los aminoácidos. Esta reacción solo ocurre cuando la glucosa se encuentra en su conformación de cadena abierta, lo cual permite que quede expuesto un grupo carbonilo reactivo (grupo aldehído de la glucosa), y es la que da lugar a la base de Schiff (Price y col., 2007).

El primer producto de la glicación temprana es la aldimina inestable, también conocida como base de Schiff (Figura 3), y esta reacción es fácilmente reversible. No obstante, la base de Schiff también puede experimentar un reordenamiento intramolecular lento, transformándola en un producto más estable, el compuesto de Amadori, también conocido como fructosamina (1-amino-1-desoxicetona); metabolito que surge cuando el resto glucosil de la base de Schiff se transforma en fructosil, por el desplazamiento del grupo carbonilo del carbono 1 al 2 durante el reordenamiento (Price y col., 2007). Tanto la reacción en la cual se forma la base de Schiff como en la que se produce el compuesto de Amadori, son reversibles, por lo tanto si se interrumpe el contacto de la glucosa con la proteína en cualquiera de estas dos etapas ocasiona la reversión completa del efecto (Price y col., 2007; Yamagishi y col., 2012).

Glicación Tardía o Avanzada

La conversión del compuesto de Amadori en AGES, es un proceso que ocurre en diversas proteínas estructurales tales como colágeno, elastina, mielina, actina y miosina. También puede afectar a proteínas de vida media corta, como las lipoproteínas, lo cual se favorece cuando son retenidas por períodos prolongados en la pared arterial (Actis y col., 2000; Knott y col., 2003). Un paso crítico durante la glicación avanzada es la formación de la fructosamina, ya que ciertos residuos y/o productos de su disociación son necesarios para que se den las reacciones con las proteínas (Knott y col., 2003). Estas reacciones generan un gran número de AGES estables, en las cuales está implicada la oxidación por radicales libres del oxígeno. Sin embargo los AGES también derivan de la autoxidación de la glucosa (Actis y col., 2000). La N e-carboximetil lisina (CML) puede formarse por descomposición oxidativa de la fructosamina o por interacciones de las proteínas con el glioxal (producto principal de la autoxidación de la glucosa) que contiene un grupo dicarbonilo, y también puede ser un producto de la peroxidación de los lípidos (Boulanger y col., 2006; Simoes y col., 2013).

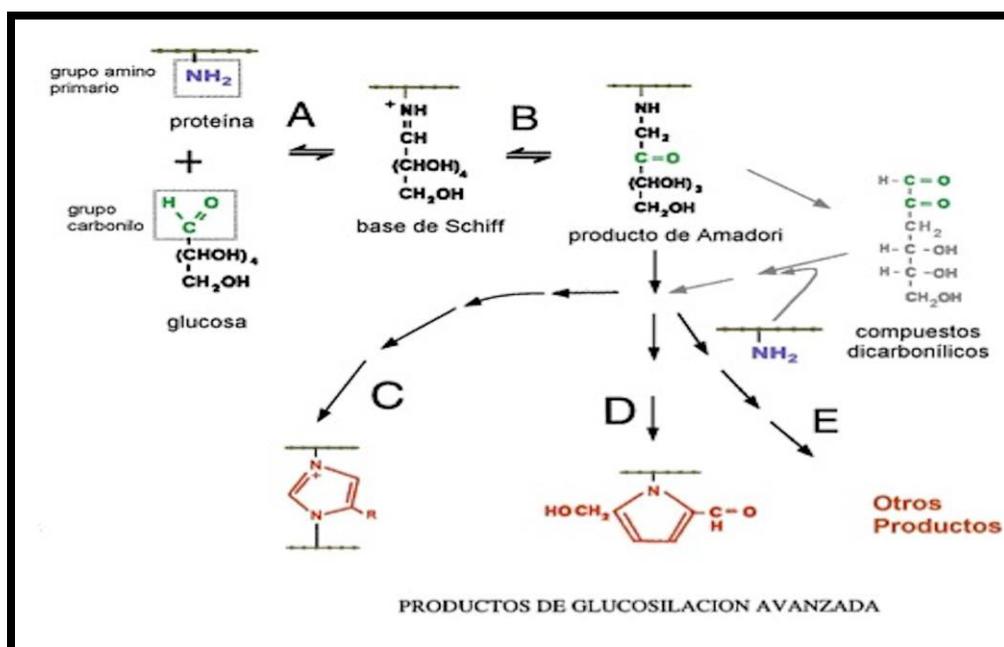


Figura 3. Reacciones necesarias para la formación de productos de glicación avanzada.

Fuente: Modificado de (Gugliucci, 2000).

Receptores Tipo Toll

Los Receptores Tipo Toll (TLR) fueron descritos por primera vez a finales de los años 90's, éstos se describieron como un receptor esencial para *Drosophila*, donde se vio que participaban en la respuesta inmune frente a algunos hongos induciendo la síntesis de péptidos antimicóticos. Un año más tarde, se demostró que TLR4 homólogo de mamíferos puede inducir la expresión de genes inflamatorios (Kawai y col., 2006).

Los TLR actúan como receptores, llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). Algunos ejemplos típicos de estos patrones son el lipopolisacárido (LPS) de organismos Gram-negativos, los ácidos teicoicos de organismos Gram-positivos, los glicolípidos de micobacterias, zymosan de levadura, y ARN de doble cadena de virus (Kawai y col., 2006; O'Neill y col., 2013). La activación de la inmunidad innata es un paso crucial en el desarrollo de la inmunidad adquirida frente a un antígeno específico (Kawai y col., 2006). En el sistema inmune innato, la respuesta primaria a los agentes patógenos es activada por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), los cuales se unen a PAMP que se encuentran en un amplio tipo de organismos (O'Neill y col., 2013). Entre las familias más importantes de PRR se encuentran los TLR, los cuales reconocen con selectividad, un gran número de variados y complejos PAMP. Existen por lo menos 10 diferentes TLR en los seres humanos. La activación de TLRs se da como resultado en la inducción de los mecanismos de la inmunidad innata, así como en el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa antígeno-específicos, contribuyendo así a la inmunidad innata y adaptativa (Kawai y col., 2006; O'Neill y col., 2013).

Más recientemente, se ha encontrado evidencia que los TLR también reconocen patrones moleculares del material endógeno del hospedero, mismo que se libera durante una lesión celular o la muerte, los cuales son denominados patrones moleculares asociados a daños (DAMP's; O'Neill y col., 2013). Los DAMP's pueden derivarse de las células que se encuentran muertas o heridas, de proteínas derivadas de matriz extracelular dañada, o proteínas oxidadas circulantes. Estos hallazgos han proporcionado un enlace potencialmente importante entre la lesión de los tejidos y la activación de mediadores proinflamatorios (Akira, 2006).

La estructura los miembros de la familia de los TLR comparten una arquitectura común entre ellos, la cual consiste en un ectodominio que lleva repeticiones ricas en leucina (LRR), un segmento de transducción de membrana, y un dominio de señalización citoplasmática Toll parecido al receptor de interleucina (IL-1R; dominio TIR; (Akira, 2006; Kawai y col., 2006). La vía de activación asociada a la activación de los diferentes TLRs puede ser independiente o dependiente de MyD88 (respuesta de diferenciación mieloide primaria gen 88). La vía independiente, utiliza como molécula adaptadora a TRIF (dominio TIR que contiene proteínas adaptadoras que inducen interferón β ; (Kawai y col., 2006)). En ambos casos se activan señales de comunicación intracelular en la que participan NF-KB (factor de transcripción nuclear potenciador de las cadenas ligeras *Kappa* de las células B activadas) y la cascada de la MAPK (Proteincinasas activadas por mitógenos), que dan lugar a la expresión de citocinas proinflamatorias.

Los TLR se dividen en dos sub grupos en función de su localización celular y sus respectivos ligandos PAMP. Un grupo se compone de TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 y TLR11, los cuales se expresan en las superficies celulares y reconocer componentes de la membrana principalmente microbianos tales como lípidos, lipoproteínas y proteínas, y el otro grupo se compone de TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9, que se expresan exclusivamente en las vesículas intracelulares tales como el retículo endoplasmático (ER), endosomas, lisosomas y endolisosomas, donde reconocen ácidos nucleicos microbianos (Akira, 2006; Kawai y col., 2006).

TLRs en Aterosclerosis

Algunas evidencias implican la señalización de los TLR en el desarrollo de la inflamación en la aterosclerosis. Los TLR 1, 2, 4, y 5 se han encontrado expresados en las placas ateroscleróticas por las células residentes del lugar afectado y por los leucocitos que migran a la pared arterial (Doherty y col., 2006; Bielinski y col., 2011). También se ha encontrado que el TLR4 es regulada y se concentra en la región más frágil de la placa aterosclerótica, la cual es más sensible a sufrir una ruptura (Lu y col., 2013). La señalización de los TLR tiene la capacidad de regular el aumento de citocinas proinflamatorias, moléculas de adhesión celular derivadas de células endoteliales vasculares, y aumenta la liberación de metaloproteinasas de

la matriz de los macrófagos, los cuales pueden contribuir a la aterosclerosis progresiva y/o ruptura de la placa aterosclerótica (Sato y col., 2000; Bielinski y col., 2011). La señalización de estos receptores también ha sido asociada con una inadecuada remodelación arterial, lo cual contribuye con la patología de la aterosclerosis. Por otro lado algunos estudios han demostrado una asociación epidemiológica entre las infecciones bacterianas y esta enfermedad, lo cual sugiere una posible relación entre el desarrollo de ésta y la activación de los TLR en la señalización proinflamatoria (Sato y col., 2000; Doherty y col., 2006; Bielinski y col., 2011; O'Neill y col., 2013).

MATERIALES Y MÉTODOS

Sujetos de Estudio

Se utilizaron 5 muestras de pacientes elegidos por conveniencia, se excluyeron a las personas que habían padecido un proceso infeccioso en los últimos 2 meses previos a la toma de muestra.

Consideraciones Bioéticas

Se explicó a los sujetos invitados a participar en este proyecto detalladamente el objetivo y alcances, así como los beneficios que se obtendrían de este. Se otorgó una carta consentimiento a cada una de ellos donde firmaron para participar en este protocolo y se informó el alto nivel de confidencialidad con que se manejarían los datos colectados y la posibilidad de abandonar el protocolo en el momento en que lo decidieran.

Obtención de Muestras

Las muestras de sangre periférica se obtuvieron a través de venopunción, utilizando el sistema de tubos al vacío con heparina como anticoagulante (BD Vacutainer®, México) y una aguja de 23G 0.65 x 20 mm (Venofix® A). La totalidad de las muestras proveniente de los cinco se integraron en una mezcla homogénea en el cual se llevaron a cabo los procedimientos de estímulo de manera inmediata. Todos los reactivos salvo en los que se indique, se adquirieron en SIGMA-ALDRICH™, México.

Glicación de Ferritina

Para llevar a cabo el procedimiento de glicación de ferritina, se disolvió 1mg de ferritina de bazo de caballo (SIGMA-ALDRICH™, México) en 1mL de PBS 20 mM (Na_2HPO_4 0.1 M, NaH_2PO_4 0.1584 M, 9 gr NaCl), pH 7.2 con EDTA 1 mM, 0.1 mg de Cloranfenicol y NaN_3 3 mM, todo esto aforado en 500 mL de PBS 20 mM. Una vez preparada la solución de ferritina, se incubó con glucosa 0.4 M a 37°C durante una semana en una atmosfera de nitrógeno. Posteriormente se pasó a reducir la proteína con 1.3 g de NaBH_4 en 500 mL de PBS 0.1 M durante 1 h a 4°C y se dializó contra PBS 0.1 M con EDTA 1 mM durante 24 h (Ravandi y col., 2000).

Estimulación de Células de Sangre Periférica

A partir de la mezcla homogénea de sangre total se tomaron alícuotas de 100 μL y se depositaron en tubos para citometría de flujo ajustando la cantidad de células monocíticas a 1×10^6 cel/100 μL en PBS pH 7.4. Se estimularon las células con ferritina glicada, ferritina y zymoSAN (50 ng/mL) durante 2 h a temperatura ambiente, se utilizó a ferritina (en su forma nativa, sin glicar) como control negativo, y como control positivo a zymosan (Akira, 2006). Posteriormente se centrifugó durante 5 minutos a 1500 g y el sobrenadante se separó para su posterior análisis.

Determinación de Micropartículas Derivadas de Monocitos Mediante Citometría de Flujo

Se analizó la presencia de micropartículas derivadas de monocitos en los sobrenadantes colectados de la sangre estimulada, se evidenció su procedencia de células monocíticas CD14+ empleando un anticuerpo Anti-CD14 acoplado al fluorocromo PerCP/CY5.5 (Clorofil-Peridinina/Cianina) y se utilizaron anticuerpos Anti TLR2 acoplados a FITC (Isotiocianato de Fluoresceína) y Anti TLR4 acoplados a PE (Ficoeritrina), de la marca Biolegend, para identificar la expresión de ambos receptores en la superficie de las MP's CD14+. Se incubaron durante 30 min en la oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente se adquirieron y analizaron 20,000

eventos mediante citometría de flujo para detectar las MP's CD14, TLR2 y TLR4 positivas en un intervalo de tamaño de 0.1 a 1.0 μM de diámetro (Camacho Villa y col., 2012; Almada, 2013). Previamente para su adquisición y análisis el citómetro de flujo se calibró mediante el uso de un sistema de perlas de látex (SIGMA ALDRICH™, México) de 0.1 y 1.0 μm de diámetro marcadas con TRITC (Isotiocianato de Rodamina) y naranja fluorescente respectivamente.

Análisis Estadístico

Se expresaron los datos como la media (empleando como mínimo tres experimentos independientes). La comparación de los datos entre grupos de estudio se hizo mediante la prueba paramétrica de "t" de student, con el software SigmaStat (GraphPad, software Inc., San Diego, Ca, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para evaluar el tamaño de MP's se utilizó un sistema de perlas de látex de 0.1 y 1.0 μm de diámetro marcadas con TRITC (Isotiocianato de Rodamina) y naranja fluorescente respectivamente para calibrar el rango de tamaño de la población de MP's (Wolf, 1967). En la figura 4, se observa un panel representativo del análisis citométrico llevado a cabo. En el primer panel de la sección A tenemos una región marcada como R1 la cual corresponde a las MP's de 1.0 μm de diámetro, mientras que en el segundo panel se encuentra una región marcada como R2 la cual corresponde a las MP's de 0.1 μm de diámetro (Almada-Balderrama, 2013). Tomando en cuenta estas dos regiones, en el ultimo panel de la sección A se creó un área R5 la cual abarca tanto R1 como R2, para así poder incluir en el estudio las MP's que estaban entre ese intervalo de diámetro (Dey-Hazra y col., 2010; Almada-Balderrama, 2013).

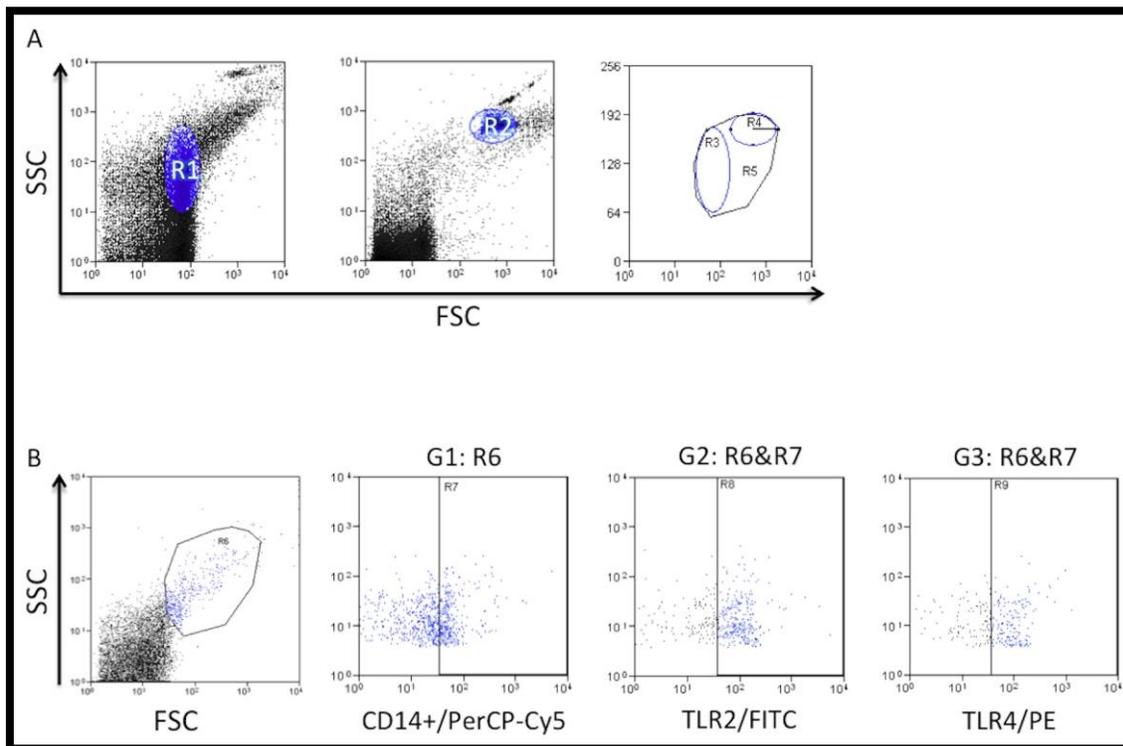


Figura 4. Panel representativo del análisis citométrico.

Para determinar el origen de las MP's se utilizaron anticuerpos Anti-CD14 acoplados al fluorocromo PerCP/Cy5.5 (los cuales se utilizan como marcadores específicos de monocitos). En la sección B de la figura 4 se encuentran cuatro paneles más, en el primero en donde se grafica el tamaño (SSC) contra granularidad (FSC), se observa la región R6 en la cual seleccionamos las MP's que corresponden al intervalo de diámetro de 0.1 a 1.0 μm . En el segundo panel se muestra una ventana con la región R7 la cual deriva de R6 que corresponde a las MP's entre 0.1 a 1.0 μm de diámetro, pero además en la región R7 tenemos a todas estas MP's que expresen en su superficie CD14+. En el tercer panel se encuentra una ventana con la región R8, la cual deriva de MP's de entre 0.1 a 1.0 μm de diámetro (R6) y CD14+ (R7), que co-expresan TLR2 en superficie. El ultimo panel contiene la región R9, la cual también deriva de las regiones R6 y R7, por lo cual se encuentran MP's entre 0.1 a 1.0 μm que co-expresan CD14 y TLR4 en su superficie. En la figura 5 se muestra la expresión de TLR2 en la superficie de MP's derivadas de monocitos (CD14+) pre-tratados con ferritina, ferritina glicada y zymozan a una concentración de 50 ng/mL.

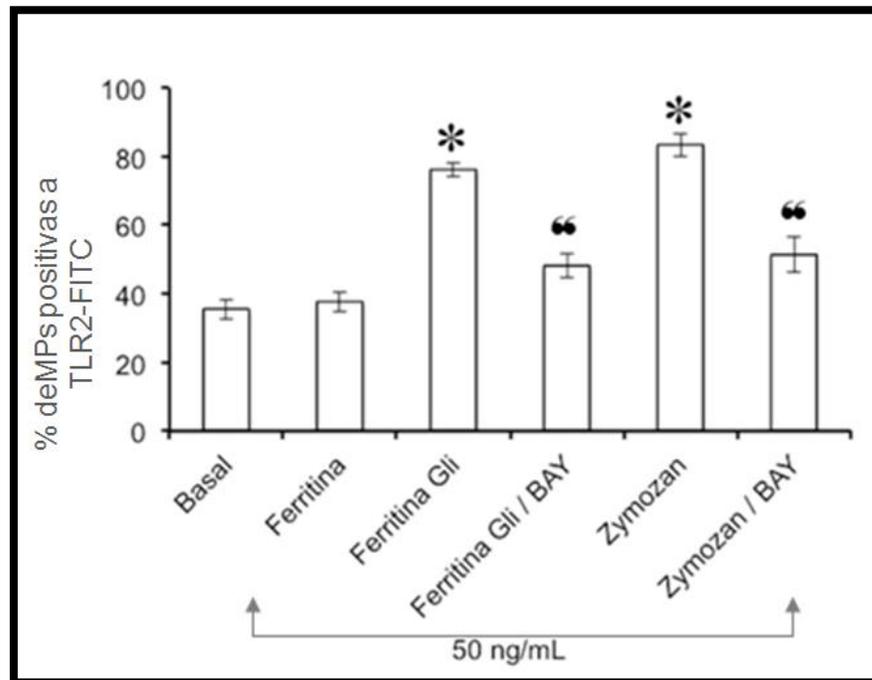


Figura 5. Expresión de TLR2 en micropartículas CD14+. Las micropartículas son derivadas de células monocíticas.

Se utilizó al inhibidor BAY117085 (15 μ M) para bloquear la ruta de señalización dependiente del factor de transcripción NF- κ B. Se observó que ferritina no afecta los valores basales de expresión de TLR2 en las MP's derivadas de monocitos (Basal 34.54 ± 2.95). Por otro lado el estímulo con ferritina glicada aumentó significativamente ($P < 0.05$) el porcentaje de MP's CD14+ que expresan TLR2 en superficie (76.20 ± 1.97), mientras que al utilizar el inhibidor de NF- κ B se observó que estos valores disminuyen a niveles basales, lo cual sugiere que la expresión de TLR2 en las MP's CD14+ depende de la señalización de este factor de transcripción. Estos datos concuerdan con lo reportado por Gauley y col., donde reportan que el estímulo a través de TLRs activa la liberación de MP's (Gauley y Pisetsky, no y col., 2010). Se utilizó zymozan como control positivo para el estímulo y se obtuvo el resultado esperado ya que este estímulo aumentó significativamente el porcentaje de MP's CD14+ que expresan TLR2. El uso del inhibidor BAY también reduce el porcentaje de MP's que co-expresan TLR2 y CD14 (Pierce y col., 1997). Adicionalmente se analizó la media de intensidad de fluorescencia (MIF) la cual refleja la cantidad de moléculas en la superficie de las MP's. En la figura 6 se muestran los valores para la media de intensidad de fluorescencia de TLR2 en MP's CD14+. Se observó que tanto ferritina glicada como zymozan aumentan significativamente la cantidad de TLR2 en la superficie de las MP's CD14+, y que esta cantidad disminuye significativamente al estar en contacto con el inhibidor de NF- κ B.

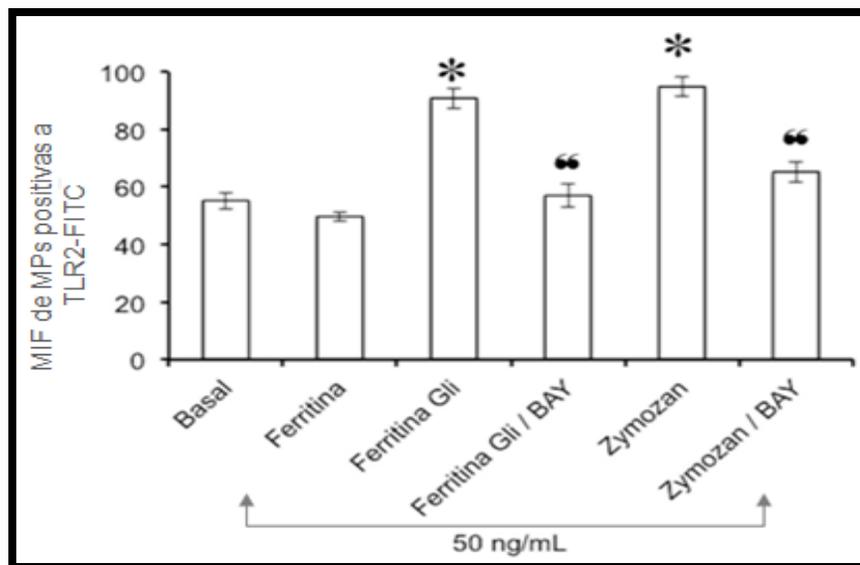


Figura 6. Media de la intensidad de fluorescencia para TLR2 en micropartículas CD14+. Las micropartículas son derivadas de células monocíticas.

Mientras el estímulo con ferritina no modifica los niveles basales. Estos datos sugieren que el estímulo con ferritina glicada incrementa el número de MP's TLR2+ y la densidad de este receptor, lo cual pudiera tener un papel importante para las MP's al activar un proceso inflamatorio y actuar como mediadores de la activación de TLR2 en los monocitos de sangre periférica (Cerri y col., 2006)

También se evaluó la expresión de TLR4 en las MP's derivadas de monocitos (Figura 7), y se observó que en las células estimuladas con ferritina, no altera el porcentaje de MP's CD14+ que co-expresan TLR4. Por otro lado se observó que hubo un aumento significativo en el estímulo de ferritina glicada, el cual se redujo significativamente por el pre-tratamiento con el inhibidor de NF- κ B. También utilizamos a zymozan como control positivo, y observamos que aumenta significativamente el porcentaje de MP's que co-expresan CD14 y TLR4. Estos valores se reducen a niveles basales con el pre-tratamiento de las células con BAY-117085. Estos datos muestran que ferritina glicada incrementa la expresión de TLR4 en MP's derivadas de monocitos, lo cual también concuerda con los datos mostrados por Gauley y cols., los cuales indicaron que la activación de TLR4 en monocitos murinos se estimula la producción de MP's.

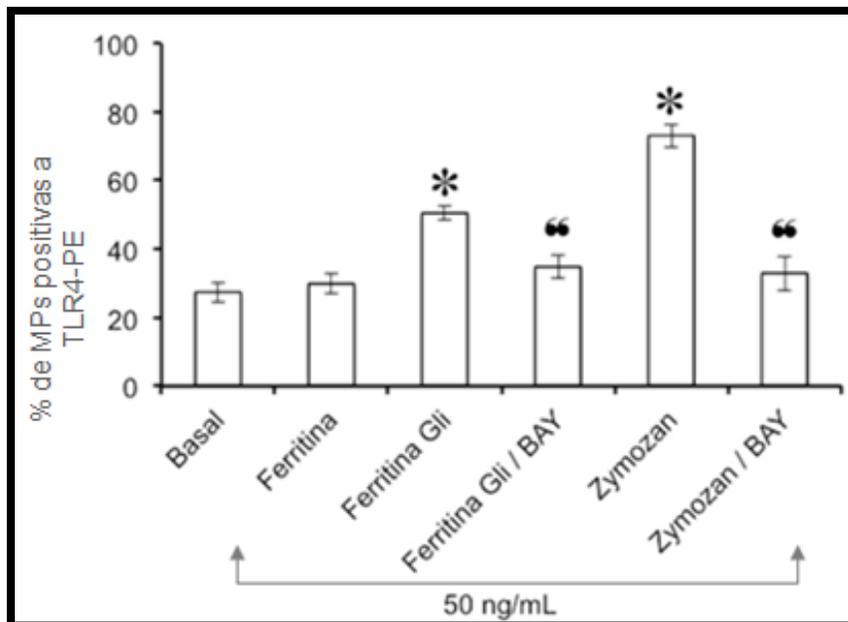


Figura 7. Expresión de TLR4 en micropartículas CD14+. Las micropartículas son derivadas de células monocíticas.

Se analizó la MIF para TLR4 en las MP's CD14+ (Figura 8), y se observó que los niveles basales no se ven modificados por el estímulo de los monocitos con ferritina, y ferritina glicada, mientras que el control positivo (zymozan) si aumenta significativamente la MIF de TLR4 en las MP's derivadas de monocitos. Adicionalmente se observó que el pre-tratamiento con el inhibidor de NF-kB reduce la MIF para TLR4 a niveles cercanos al basal. Todos estos datos en conjunto muestran que ferritina glicada puede ser un estímulo de tipo inflamatorio para los monocitos ya que incrementa el porcentaje de MP's CD14+ liberadas por estas células.

En las MP's CD 14+ también incrementa el porcentaje de TLR2 y TLR4 estimulado por ferritina glicada, y adicionalmente aumenta la cantidad de TLR2 en estas MP's, lo cual sugiere que las MP's derivadas de monocitos CD14+TLR2+TLR4+ pudieran actuar como mediadores inflamatorios de los monocitos de sangre periférica estimulados con ferritina glicada. Adicionalmente se puede proponer por los datos obtenidos que la glicación de ferritina es el factor que permite activar a los monocitos, los cuales responden al estímulo con una respuesta de tipo inflamatoria por el aumento en la expresión de TLR2 y TLR4, propiciado por un ligando endógeno modificado por el exceso de glucosa, como se ha observado sucede con otras moléculas endógenas modificadas de manera similar a la utilizada en este trabajo (Miller y cols., 2003; Choi y cols., 2009; Sima y cols., 2010).

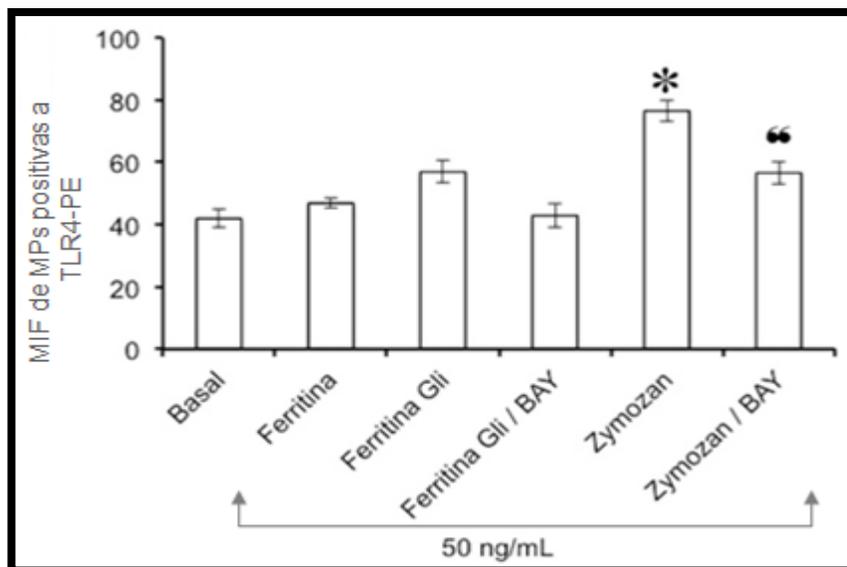


Figura 8. Media de la intensidad de fluorescencia para TLR4 en micropartículas CD14+. Las micropartículas son derivadas de células monocíticas.

CONCLUSIONES

Ferritina glicada actúa como un estímulo de tipo inflamatorio para los monocitos aumentando el porcentaje de MP's CD14+ liberadas por estas células.

En estas MP's también incrementa el porcentaje de TLR2 y TLR4 estimulado por ferritina glicada, y adicionalmente aumenta la cantidad de TLR2 en estas MP's, lo cual nos permitiría sugerir que las MP's CD14+TLR2+TLR4+ pueden actuar como mediadores inflamatorios de los monocitos de sangre periférica activados con ferritina glicada.

Estos resultados nos permiten proponer que la glicación de ferritina puede activar a las células monocíticas de sangre periférica, las cuales responden secretando al medio MP's, las cuales contienen en superficie TLRs, que pueden actuar sobre otras células propagando la respuesta inflamatoria, queda por determinar la presencia de otras moléculas contenidas en las MP's que puedan ayudar a dilucidar que tipo de mensaje molecular contienen y su potencial efecto.

RECOMENDACIONES

Evaluar el contenido de otras moléculas tanto en la superficie como en el interior de las MP's, para determinar los posibles efectos sobre otros tipos de células diferentes a las que las originaron.

BIBLIOGRAFÍA

- Actis DSM, Rebolledo OR. 2000. Lipoprotein Glycation And Glycooxidation: Their Importance In Diabetes Mellitus. *Medicina (B Aires)* 60(5 Pt 1): 645-656.
- Adamska E, Waszczeniuk M, Goscik J, Golonko A, Wilk J, Pliszka J, Maliszewska K, Lipinska D, Milewski R, Wasilewska A, Citko A, Nikolajuk A, Ostrowska L, Kretowski A, Gorska M. 2012. The Usefulness Of Glycated Hemoglobin A1c (Hba1c) For Identifying Dysglycemic States In Individuals Without Previously Diagnosed Diabetes. *Adv Med Sci* 57(2): 296-301.
- Akira S. 2006. TLR Signaling. *Curr Top Microbiol Immunol* 311: 1-16.
- Almada-Balderrama ME. 2013. Estandarización De Un Método Citométrico Para La Cauntificación Relativa De Adipor1 En Micropartículas Plasmáticas De Origen Endotelial. Tesis De Especialidad. Programa De Especialización En Inmunohematología Diagnóstica. División De Ciencias Biológicas Y De La Salud. Universidad De Sonora: 33-34.
- An SH, Lee MS, Kang JH. 2012. Oxidative Modification Of Ferritin Induced By Methylglyoxal. *BMB Rep* 45(3): 147-152.
- Bielinski SJ, Hall JL, Pankow JS, Boerwinkle E, Matijevic-Aleksic N, He M, Chambless L, Folsom AR. 2011. Genetic Variants In TLR2 And TLR4 Are Associated With Markers Of Monocyte Activation: The Atherosclerosis Risk In Communities MRI Study. *Hum Genet* 129(6): 655-662.
- Boulanger E, Wautier JL, Dequiedt P, Schmidt AM. 2006. Glycation, Glycooxidation And Diabetes Mellitus. *Nephrol Ther* 2 (Suppl 1): S8-16.
- Cerri C, Chimenti D, Conti I, Neri T, Paggiaro P, Celi A. 2006. Monocyte/Macrophage-Derived Microparticles Up-Regulate Inflammatory Mediator Synthesis By Human Airway Epithelial Cells. *J Immunol* 177(3): 1975-1980.
- Choi SH, Harkewicz R, Lee JH, Boullier A, Almazan F, Li AC, Witztum JL, Bae YS, Miller YI. 2009. Lipoprotein Accumulation In Macrophages Via Toll-Like Receptor-4-Dependent Fluid Phase Uptake. *Circ Res* 104(12): 1355-1363.
- D'Souza-Schorey C, Clancy JW. 2012. Tumor-Derived Microvesicles: Shedding Light On Novel Microenvironment Modulators And Prospective Cancer Biomarkers. *Genes Dev* 26(12): 1287-1299.

- Dey-Hazra E, Hertel B, Kirsch T, Woywodt A, Lovric S, Haller H, Haubitz M, Erdbruegger U. 2010. Detection Of Circulating Microparticles By Flow Cytometry: Influence Of Centrifugation, Filtration Of Buffer, And Freezing. *Vasc Health Risk Manag* 6: 1125-1133.
- Doherty TM, Fisher EA, Arditi M. 2006. TLR Signaling And Trapped Vascular Dendritic Cells In The Development Of Atherosclerosis. *Trends Immunol* 27(5): 222-227.
- Gugliucci A. 2000. Glycation As The Glucose Link To Diabetic Complications. *J Am Osteopath Assoc* 100(10): 621-634.
- Kawai T, Akira S. 2006. TLR Signaling. *Cell Death Differ* 13(5): 816-825.
- Knott HM, Brown BE, Davies MJ, Dean RT. 2003. Glycation And Glycooxidation Of Low-Density Lipoproteins By Glucose And Low-Molecular Mass Aldehydes. Formation Of Modified And Oxidized Particles. *Eur J Biochem* 270(17): 3572-3582.
- Koorts AM, Viljoen M. 2007a. Ferritin And Ferritin Isoforms I: Structure-Function Relationships, Synthesis, Degradation And Secretion. *Arch Physiol Biochem* 113(1): 30-54.
- Koorts AM, Viljoen M. 2007b. Ferritin And Ferritin Isoforms II: Protection Against Uncontrolled Cellular Proliferation, Oxidative Damage And Inflammatory Processes. *Arch Physiol Biochem* 113(2): 55-64.
- Lu Z, Zhang X, Li Y, Jin J, Huang Y. 2013. TLR4 Antagonist Reduces Early-Stage Atherosclerosis In Diabetic Apolipoprotein E-Deficient Mice. *J Endocrinol* 216(1): 61-71.
- Martinez MC, Tual-Chalot S, Leonetti D, Andriantsitohaina R. 2011. Microparticles: Targets And Tools In Cardiovascular Disease. *Trends In Pharmacological Sciences* 32(11): 659-665.
- Mause SF, Weber C. 2010. Microparticles: Protagonists Of A Novel Communication Network For Intercellular Information Exchange. *Circ Res* 107(9): 1047-1057.
- Miller YI, Chang MK, Binder CJ, Shaw PX, Witztum JL. 2003. Oxidized Low Density Lipoprotein And Innate Immune Receptors. *Curr Opin Lipidol* 14(5): 437-445.
- Morel O, Jesel L, Freyssinet JM, Toti F. 2011. Cellular Mechanisms Underlying The Formation Of Circulating Microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31(1): 15-26.
- Muñoz GC, Vásquez DGM. 2012. Micropartículas Como Sustrato Antigénico En Lupus Eritematoso Sistémico. *Inmunología* 31(3): 78-82.
- O'Neill LAJ, Golenbock D, Bowie AG. 2013. The History Of Toll-Like Receptors: Redefining Innate Immunity. *Nat Rev Immunol* 13(6): 453-460.
- Pierce JW, Schoenleber R, Jesmok G, Best J, Moore SA, Collins T, Gerritsen ME. 1997. Novel Inhibitors Of Cytokine-Induced IκBα Phosphorylation And Endothelial Cell Adhesion Molecule Expression Show Anti-Inflammatory Effects In Vivo. *J Biol Chem* 272(34): 21096-21103.

- Price CL, Knight SC. 2007. Advanced Glycation: A Novel Outlook On Atherosclerosis. *Curr Pharm Des* 13(36): 3681-3687.
- 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.
- Sato S, Nomura F, Kawai T, Takeuchi O, Muhlradt PF, Takeda K, Akira S. 2000. Synergy And Cross-Tolerance Between Toll-Like Receptor (TLR) 2- And TLR4-Mediated Signaling Pathways. *J Immunol* 165(12): 7096-7101.
- Sima AV, Botez GM, Stancu CS, Manea A, Raicu M, Simionescu M. 2010. Effect Of Irreversibly Glycated LDL In Human Vascular Smooth Muscle Cells: Lipid Loading, Oxidative And Inflammatory Stress. *J Cell Mol Med* 14(12): 2790-2802.
- Simoës C, Silva AC, Domingues P, Laranjeira P, Paiva A, Domingues MR. 2013. Phosphatidylethanolamines Glycation, Oxidation, And Glycooxidation: Effects On Monocyte And Dendritic Cell Stimulation. *Cell Biochem Biophys* 66(3): 477-487.
- Vanwijk MJ, Vanbavel E, Sturk A, Nieuwland R. 2003. Microparticles In Cardiovascular Diseases. *Cardiovasc Res* 59(2): 277-287.
- Viera AJ, Mooberry M, Key NS. 2012. Microparticles In Cardiovascular Disease Pathophysiology And Outcomes. *J Am Soc Hypertens* 6(4): 243-252.
- Wolf P. 1967. The Nature And Significance Of Platelet Products In Human Plasma. *Br J Haematol* 13(3): 269-288.
- Yamagishi S, Maeda S, Matsui T, Ueda S, Fukami K, Okuda S. 2012. Role Of Advanced Glycation End Products (Ages) And Oxidative Stress In Vascular Complications In Diabetes. *Biochim Biophys Acta* 1820(5): 663-671.