



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES CD14,
TLR2 Y/O TLR4 EN RESPUESTA A LA
LIPOPROTEINA DE BAJA DENSIDAD
MÍNIMAMENTE MODIFICADA EN
MONOCITOS DE HUMANOS**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORADO EN CIENCIAS EN INMUNOLOGÍA

P R E S E N T A

FRANCISCO ANTONIO BLANCO FAVELA

DIRECTORAS DE TESIS

Dra. Adriana Karina Chávez Rueda

Dra. Martha Cecilia Moreno Lafont



MÉXICO, D.F.

2010

Date: May 05, 2010
To: "Francisco Blanco-Favela" fblanco1@terra.com.mx
From: "Human Immunology" js1040@columbia.edu
Subject: Your Submission
Ms. Ref. No.: HIM-D-09-00319R1
Title: The activation of TLR2 and TLR4 by minimally modified LDL in human macrophages and monocytes triggers the inflammatory response
Human Immunology

Dear Dr Francisco Blanco-Favela,

I am pleased to confirm that your paper "The activation of TLR2 and TLR4 by minimally modified LDL in human macrophages and monocytes triggers the inflammatory response" has been accepted for publication in Human Immunology.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards,

Nicole Suci-Foca, PhD
Receiving Office/Editor-in-Chief
Human Immunology

Human Immunology is the official journal of the American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI), a not-for-profit association of clinical and research professionals. If you are not already a member of ASHI and wish to know more about its activities, please visit www.ashi-hla.org <<http://www.ashi-hla.org/>>.

For further assistance, please visit our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

Manuscript Number: HIM-D-09-00319R1

Title: The activation of TLR2 and TLR4 by minimally modified LDL in human macrophages and monocytes triggers the inflammatory response

Article Type: Research Article

Keywords: Keywords: mmLDL, TLR, Monocyte, Macrophage, TNF- α .

Corresponding Author: Dr Francisco Blanco-Favela, M.D.

Corresponding Author's Institution: IMSS

First Author: Luis Chávez-Sánchez , M.Sc

Order of Authors: Luis Chávez-Sánchez , M.Sc; Alejandra Madrid-Miller , M.D.; Karina Chávez-Rueda , Ph.D; Victoria M Legorreta-Haquet , M.Sc; Emiliano Tesoro-Cruz , Ph.D; Francisco Blanco-Favela, M.D.

Abstract: Oxidized low-density lipoproteins and toll-like receptors (TLRs) 2 and 4 are involved in the development of atherosclerosis. The TLRs are important in the pro-inflammatory response. The aim of this research was to analyze the activation of CD14, TLR4, and TLR2 in response to minimally modified low-density lipoprotein (mmLDL). Human monocytes and macrophages secrete TNF- α in response to mmLDL, and blocking CD14 or TLR4 results in a ~60% decrease in mmLDL-induced TNF- α secretion. We also observed similar inhibition of TNF- α synthesis in human monocytes (~65%) and macrophages (~70%) when both receptors were blocked simultaneously. When TLR2 was blocked, TNF- α synthesis was inhibited by ~70% in both cell types. Moreover, we demonstrate that mmLDL induces redistribution of CD14, TLR4 and TLR2 on the cell surface. This is the first evidence that TLR2 and TLR4 are upregulated in response to mmLDL. Our results suggest that mmLDL activates CD14, TLR4, and TLR2, inducing the production of TNF- α and increasing the expression of TLR2 and TLR4.

El presente trabajo se realizó en La Unidad de Investigación Médica en Inmunología del Hospital de Pediatría del Centro medico Nacional "Siglo XXI" del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) bajo la dirección de la Dra. Adriana Karina Chávez Rueda y en colaboración con el Departamento de Inmunología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. Martha C. Moreno Lafont.

Este trabajo fue financiado en parte con el apoyo de los proyectos de CONACyT del Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social con número 44171 de la convocatoria 2006 y con el apoyo el programa de Apoyo Financiero para el Desarrollo de Proyectos de Investigación en Salud del IMSS con Numero FIS/IMSS/prot/006.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Martha C. Moreno Lafont: con todo respeto y admiración ya que su aportación y valioso apoyo, me permitió realizar esta tesis.

A la Dra. Karina Chávez Rueda: con todo el afecto acumulado a través de los años y por ser la alumna que se convirtió en mi tutora para la realización de esta meta

Al Dr. Sergio Estrada Parra: le agradezco por la predilección demostrada a través de todos estos años y por el apoyo que me ha brindado.

Al Dr. Edgar Zenteno Galindo: por concederme su amistad, proporcionarme apoyo incondicional y entusiasmo en la colaboración.

Dra. María Eugenia Castro Mussot: por la preferencia mostrada a hacia mi desarrollo personal y por el respaldo que me facilitó el camino andado.

Dra. Luvia Enid Sánchez Torres: por el apoyo académico que me permitió la realización de esta tesis.

Quiero agradecer también a mis alumnos de Maestría y Doctorado quienes siempre son un aliciente para continuar el desarrollo académico en especial a Dr. Luis Chávez Sánchez quien con su esfuerzo y dedicación hizo posible esta tesis.

Finalmente a todo el personal de la Unidad de Investigación Medica en Inmunología por su apoyo, paciencia, consideraciones y dedicación.

DEDICATORIAS

A Carmen mi mujer, quien le ha dado sentido a mi vida y porque junto a ella he podido lograr cada una de las metas que me he propuesto, has sido mi respaldo en los tiempos difíciles, mi puntal para continuar y mi inspiración concluir cada uno de mis propósitos.

A mis Hijas:

Jimena: siempre deseada. Llegaste para ocupar todos esos espacios que me faltaban para realizarme como persona.

Goya: apareciste en mi vida como un sol. Tu presencia siempre ha iluminado tu alrededor lo que me ha facilitado recorrer el camino que me he propuesto

Sofía: anhelada y llena de ternura. Apareciste en mi vida para devolverme la ilusión de seguir adelante, tu cariño me hace mas fácil la lucha que me he planteado.

Finalmente dedico este esfuerzo a mis hermanos con quienes forje los sueños por los que lucho y que además siempre han sido parte de ellos y a mis padres que aunque ya no están, su memoria en una fuerza constante y me recuerdan que la vida se trata de alcanzar y lograr sueños.

ÍNDICE

	Página
Índice	i
Abreviaturas	ii
Índice de figuras	iii
Resumen	v
Introducción	1
Justificación	11
Planteamiento del problema	11
Hipótesis	11
Objetivo general	12
Objetivos específicos	12
Materiales y métodos	13
Esquema general de trabajo	17
Resultados	18
Discusión	29
Conclusión	31
Bibliografía	32

ABREVIATURAS

Ab	Anticuerpo
Apo B	Apolipoproteína B
Apo E	Apolipoproteína E
CD	Grupo de diferenciación
ECG	Electrocardiograma
HDL	Lipoproteína de alta densidad
IAM sEST	Infarto agudo del miocardio sin elevación del segmento ST
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1
IKB	Inhibidor del factor nuclear kappa-Beta
IL	Interleucina
IFN- γ	Interferón- γ
IRAK	Cinasa asociada al receptor de interleucina
IRF	Factor regulatorio de IFN;
LAL	Lisado de amebocitos de <i>Lymulus</i>
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LDLmm	Lipoproteína de baja densidad mínimamente modificada
LDLn	Lipoproteína de baja densidad nativa
LDLox	Lipoproteína de baja densidad oxidada
LPS	Lipopolisacárido
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos-1
MDA5	Gen 5 asociado a la diferenciación del melanoma
MMP	Metaloproteinasas
MyD88	Respuesta primaria para diferenciación mieloides 88
Nf-Kb	Factor nuclear kappa-B
Pam3CSK4	Lipopéptido sintético tripalmitoilatado
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PECAM-1	Molécula de adhesión de plaquetas a células endoteliales-1
RIG	Genes inducibles por el ácido retinoico-1
SICA	Síndromes isquémicos coronarios agudos
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TBA	Acido tiobarbitúrico
TBK1	Cinasa de unión a TANK1
TIRAP	Proteína adaptadora del dominio TIR
TIR	Dominio homólogo al receptor Toll/ Interleucina-1
TLR	Receptor tipo Toll
TRAM	Molécula relacionada al adaptador
TRIF	Proteínas adaptadoras asociadas al dominio TIR
TNF- α	Factor de necrosis tumoral- α
TRAF	Factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral
VCAM	Molécula de adhesión de células vasculares

ÍNDICE DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1.- Representación gráfica electrocardiograma	1
Figura 2.- Estructura de la lipoproteína de baja densidad.	2
Figura 3.- Desarrollo de la lesión aterosclerosa.	4
Figura 4.- Representación esquemática de las vías de señalización de los TLR.	8
Figura 5.- Caracterización de la lipoproteína de baja densidad obtenida por ultracentrifugación a partir de plasma de sujetos clínicamente sanos.	19
Figura 6.- Grado de oxidación de LDL nativa (LDL _n) y LDL mínimamente modificada (LDL _{mm}) por el método de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.	20
Figura 7.- Actividad biológica de la LDL nativa y LDL mínimamente modificada en monocitos.	20
Figura 8.- Determinación de la pureza de monocitos a través de citometría de flujo	21
Figura 9.- Efecto biológico del LPS y LDL _{mm} en presencia de polimixina B.	22
Figura 10.- Participación de los receptores CD14 y TLR4 al estímulo de LPS.	23
Figura 11.- Participación de los receptores CD14, TLR4 y ambos en respuesta a LDL _{mm} .	24
Figura 12.- Producción de TNF- α bloqueando el receptor TLR2 en monocitos en presencia de Pam3CSK4.	26
Figura 13.- Participación de TLR2 en respuesta a LDL _{mm} .	27
Figura 14.- Redistribución de CD14, TLR4 y TLR2 en la superficie celular en monocitos.	28

RESUMEN

La aterosclerosis se considera una enfermedad inflamatoria crónica. Se ha demostrado la expresión de los receptores tipo Toll (TLR) 2 y TLR4 en la placa. Ambos TLR tal vez son activados por reconocimiento de microorganismos en la placa. Sin embargo, no se conoce con claridad el papel que juegan estos receptores a antígenos endógenos como la lipoproteína de baja densidad (LDL) modificada oxidativamente. El objetivo de este trabajo fue analizar la participación de CD14, TLR4 y TLR2 en respuesta a LDL mínimamente modificada (LDLmm) en monocitos humanos. MÉTODOS Y RESULTADOS. Monocitos humanos se incubaron con anticuerpos anti-CD14 (10 μ g/ml), anti-TLR4 (10 μ g/ml) y anti-TLR2 (10 μ g/ml) y se estimularon con 50 μ g/ml de LDLmm por 24h y se determinó TNF- α . Los monocitos secretaron TNF- α al estímulo a LDLmm y el bloqueo de CD14 provocó disminución en la secreción de TNF- α del 60%. Al bloquear TLR4 encontramos inhibición del 63%. En el mismo sentido encontramos discreto aumento en la inhibición del 68% en la síntesis de TNF- α al bloquear ambos receptores en monocitos. Al bloquear TLR2 se provocó una inhibición del 60% en la producción de TNF- α . CONCLUSIONES: Nuestros resultados sugieren que la LDLmm activa a CD14, TLR4 y TLR2 induciendo la producción de TNF- α . Este mecanismo puede explicar en parte la participación de los TLR en respuesta a LDL modificada oxidativamente en el fenómeno inflamatorio en aterosclerosis.

ABSTRACT

Atherosclerosis is recognized as a chronic inflammatory disease. Toll-like receptors (TLRs) 2 and 4 have been observed in the atherosclerotic plaque. Additionally, both TLRs could be activated by the recognition of microorganisms in plaques. However, the role that these receptors play in the recognition of endogenous antigens such as oxidized low-density lipoprotein is not clear. The aim of this research was to analyze the participation of CD14, TLR4, and TLR2 in the response to minimally modified LDL (mmLDL) in human monocytes. **METHOD AND RESULTS:** Human monocytes were incubated with monoclonal antibodies against to CD14, TLR4, and TLR2 in order to block these molecules. Then, human monocytes were stimulated with mmLDL for 24 h, and TNF- α was determined. The monocytes secreted TNF- α in response to mmLDL. This secretion inhibit in ~60% after blocking CD14. When TLR4 was blocked, we found 63% of inhibition. We also observed discrete increase in inhibition of TNF- α synthesis when both receptors were blocked in monocytes to 68%. Moreover, when TLR2 was blocked, 60% inhibition of TNF- α secretion occurred in human monocytes. **CONCLUSIONS;** Our results suggest that mmLDL activates to CD14, TLR4, and TLR2, inducing the production of TNF- α . These results provide new perspectives for understanding the mmLDL role in inflammatory processes of atherosclerosis.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares y en particular los síndromes isquémicos coronarios agudos (SICA), representan un grave problema de salud en el mundo. En países desarrollados y en algunos en vías de desarrollo estas patologías ocupan la principal causa de muerte [1]. Una herramienta en el diagnóstico de las enfermedades cardiovasculares es el uso del electrocardiograma (ECG). El ECG es un registro de la actividad eléctrica del corazón. Por cada ciclo cardíaco se registran sucesivamente las ondas de despolarización auricular (onda P), despolarización ventricular (complejo QRS), la onda Q, representa la pequeña corriente horizontal (de izquierda a derecha) del potencial de acción viajando a través del Septum interventricular, contracción del miocardio (ondas R y S), re-polarización de los ventrículos (onda T), el segmento ST conecta al complejo QRS y la onda T [2] como se puede apreciar en al figura 1.

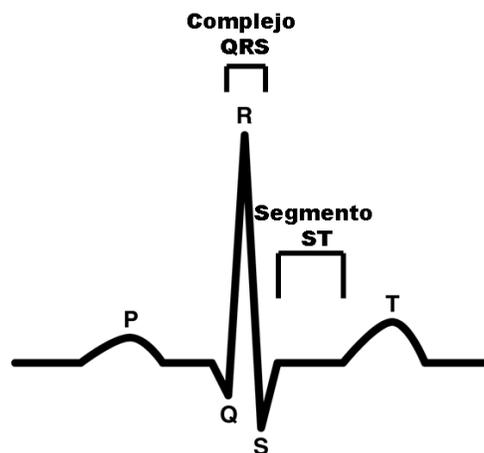


Figura 1. Representación gráfica de un electrocardiograma. Onda P, onda Q, onda S, onda T, complejo QRS y segmento ST.

Los SICA incluyen diferentes tipos de presentaciones clínicas como: la angina inestable y el infarto agudo del miocardio. Por su presentación electrocardiográfica se clasifican como: SICA sin elevación del segmento ST (sEST), SICA con elevación del segmento ST, con onda Q y sin onda Q, mientras que la angina inestable, representa la transición entre la enfermedad arterial coronaria estable y el estado en el que el paciente se encuentra en alto riesgo de presentar un infarto. De hecho, la angina inestable es la primera forma de presentación clínica en algunos pacientes. La angina inestable, se caracteriza clínicamente por dolor precordial de origen isquémico, o dolor en extremidades superiores, mandíbula y epigastrio, desencadenado con el esfuerzo o aun en reposo, con duración menor a 30 min, cuyo inicio de síntomas es menor a 8 semanas, en pacientes previamente asintomáticos. Pero en los pacientes con antecedente de angina estable, se presenta con cambios en la frecuencia de los eventos de angina, o bien, en su duración, severidad y factores desencadenantes del evento, acompañado o no de síntomas neurovegetativos y/o alteraciones electrocardiográficas. Sin embargo, se ha considerado un peor pronóstico cuando se presentan cambios electrocardiográficos en el segmento ST y/o en la onda T [3].

En el infarto agudo del miocardio, las manifestaciones clínicas habitualmente tienen una duración superior a los 30 min y existe elevación de marcadores séricos de necrosis miocárdica [4].

En Estados Unidos de Norteamérica se reportaron aproximadamente 1.5 millones de casos por SICA, de los cuales 669,000 son por angina inestable o por infarto agudo del miocardio sin elevación del segmento ST (IAM sEST) por año [5]. En México, los síndromes isquémicos agudos fueron la segunda causa de muerte en población general en el 2001, actualmente ocupan el primer lugar, originando 81,242 muertes por año, de las cuales 60,610 se presentaron en individuos mayores de 65 años y alrededor de 20,631 en individuos en edad productiva. En personas mayores de 75 años causa el 70% de todas las muertes [6].

Además, el infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST causa el 56.24% de los ingresos hospitalarios por SICA. Mientras que la angina inestable y IAM sEST ocasionan el 43.75%. El SICA es más frecuente en el género masculino que en el femenino, con relación aproximada de 1:10, Sin embargo, en mujeres después de los 65 años de edad, se pierde ésta relación y se vuelven tan vulnerables como los hombres. La forma más frecuente de presentación clínica de la enfermedad coronaria en las mujeres es la angina de pecho, mientras que en los hombres se presenta más a menudo en forma de infarto del miocardio [7].

Los factores de riesgo asociados con enfermedades cardiovasculares son: dislipidemia, diabetes mellitus, hipertensión arterial sistémica, tabaquismo, niveles elevados en plasma de homocisteína, concentraciones elevadas de lipoproteína a, alteración del balance entre radicales oxidantes y antioxidantes, la expresión del antígeno leucocitario humano, infecciones por microorganismos como citomegalovirus, *Chlamydia pneumoniae* y *Helicobacter pylori* [8-10]. Entre estos, la dislipidemia, en particular los niveles elevados de colesterol total en suero, las altas concentraciones de lipoproteína de baja densidad (LDL) y las bajas concentraciones de lipoproteína de alta densidad (HDL), han cobrado importancia como factores de riesgo de aterosclerosis.

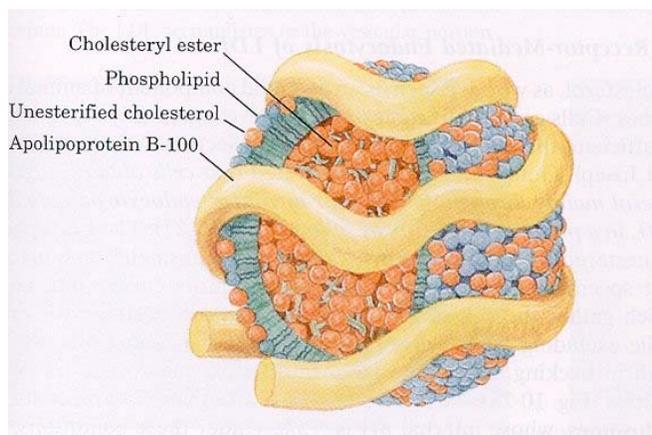


Figura 2. Estructura de la lipoproteína de baja densidad. La LDL es una molécula esférica compuesta por la apolipoproteína B-100, fosfolípidos, ésteres de colesterol y colesterol no esterificado [11].

La LDL es una partícula esférica con un diámetro de 22 nm y un peso molecular de 2500 kDa. La partícula consiste en un núcleo hidrofóbico de alrededor de 1600 moléculas de ésteres de colesterol y 170 moléculas de triglicéridos rodeada por una monocapa superficial de 700 moléculas de fosfolípidos (predominantemente fosfatidilcolina) y 600 moléculas de colesterol libre. Embebida en la monocapa se localiza la apolipoproteína B-100 (apo B), consistiendo en 4536 residuos de aminoácidos, con un peso molecular de 500 kDa. La LDL contiene cantidades variables de ácidos grasos poli-insaturados en su composición como se puede apreciar en la Figura 1. También contiene diversos antioxidantes, uno de los más importantes es el alfa-tocoferol. La vida media de la LDL en circulación es de 2.5 días, el principal mecanismo de eliminación en sangre es por endocitosis en las células nucleadas a través del receptor de LDL, siendo la principal fuente de colesterol para el mantenimiento de membranas celulares. La LDL es una molécula extremadamente susceptible a la oxidación [11].

La modificación oxidativa de LDL (LDLox) es un proceso complejo de lipoperoxidación en el cual los ácidos grasos insaturados reaccionan con radicales libres (anión hidroxilo, anión superóxido y peróxido de hidrógeno) y remueven un átomo de hidrógeno de un metileno de cadena hidrocarbonada de los ácidos grasos insaturados. Después del inicio de la lipoperoxidación se genera una cadena de reacciones en la cual hay un electrón desapareado en el carbono donde se eliminó el hidrógeno, generando un radical graso, en éste se produce un rearrreglo formando la estructura de un dieno conjugado que reacciona con el oxígeno molecular y produce el radical lipoperoxilo que sustrae un hidrógeno del ácido graso vecino formando el hidroperóxido, la reacción continua hasta que el malondealdehído u otros aldehídos generados en la oxidación forman bases de Schiff con grupos gamma-aminos de residuos de lisina, hidroperóxidos de lípidos, peróxidos cíclicos y fragmentación lipídica [12]. El colesterol en la partícula de LDL puede ser oxidado a oxisterol como el 7-ketosterol, hidróxido linoleato de colesterol, 7 beta-hidroperoxi-colesterol. La oxidación de los ácidos grasos insaturados produce fragmentos de 3 a 9 carbonos de longitud, incluyendo aldehídos y cetonas que pueden conjugarse con otros lípidos especialmente con amino lípidos o con la apo B.

Numerosos estudios apoyan la participación de la LDLox en el desarrollo de la lesión aterosclerosa. Goldstein y col. fueron los primeros en demostrar *in vitro*, que las formas modificadas de LDL (LDL acetilada) son rápidamente endocitadas a través del receptor “scavenger A” de macrófagos, la acumulación de LDL acetilada generó células espumosas [13]. En 1980 se demostró que células endoteliales y de músculo liso modifican la LDL *in vitro*, lo que la hace más susceptible de ser endocitada por macrófagos. A esta LDL modificada por las células se le ha denominado LDL mínimamente oxidada. Los efectos de las células sobre la LDL se pueden mimetizar incubando LDL con iones de cobre como catalizador de la oxidación [14].

Diversos estudios muestran que la LDLox participa en la fisiopatología de la enfermedad. Se ha obtenido LDL de placas aterosclerosas de arterias de humanos y de modelos animales que presentan las mismas propiedades y características de la LDLox *in vitro*: una alta movilidad electroforética, alto contenido de colesterol libre y en la fracción de fosfolípidos

la proporción esfingomielina y lisofostidilcolina se encuentra elevada. Adicionalmente, la LDL obtenida de las placas induce quimiotaxis de monocitos como la LDLox *in vitro* [15,16,17]. Además de demostrado que la LDLox se encuentra *in vivo*, mediante análisis inmunohistoquímico, se ha encontrado la LDL modificada oxidativamente en lesiones aterosclerosas de conejos hiperlipidémicos utilizando anticuerpos contra LDLox [18]. En pacientes diabéticos y con riesgo a infarto de miocardio, los niveles séricos de LDLox se encuentran elevados comparados con los del grupo de personas sanas [19]. También se ha encontrado LDL modificada oxidativamente en lesiones aterosclerosas en estos pacientes a través de inmunohistoquímica, utilizando anticuerpos contra LDLox [12,15].

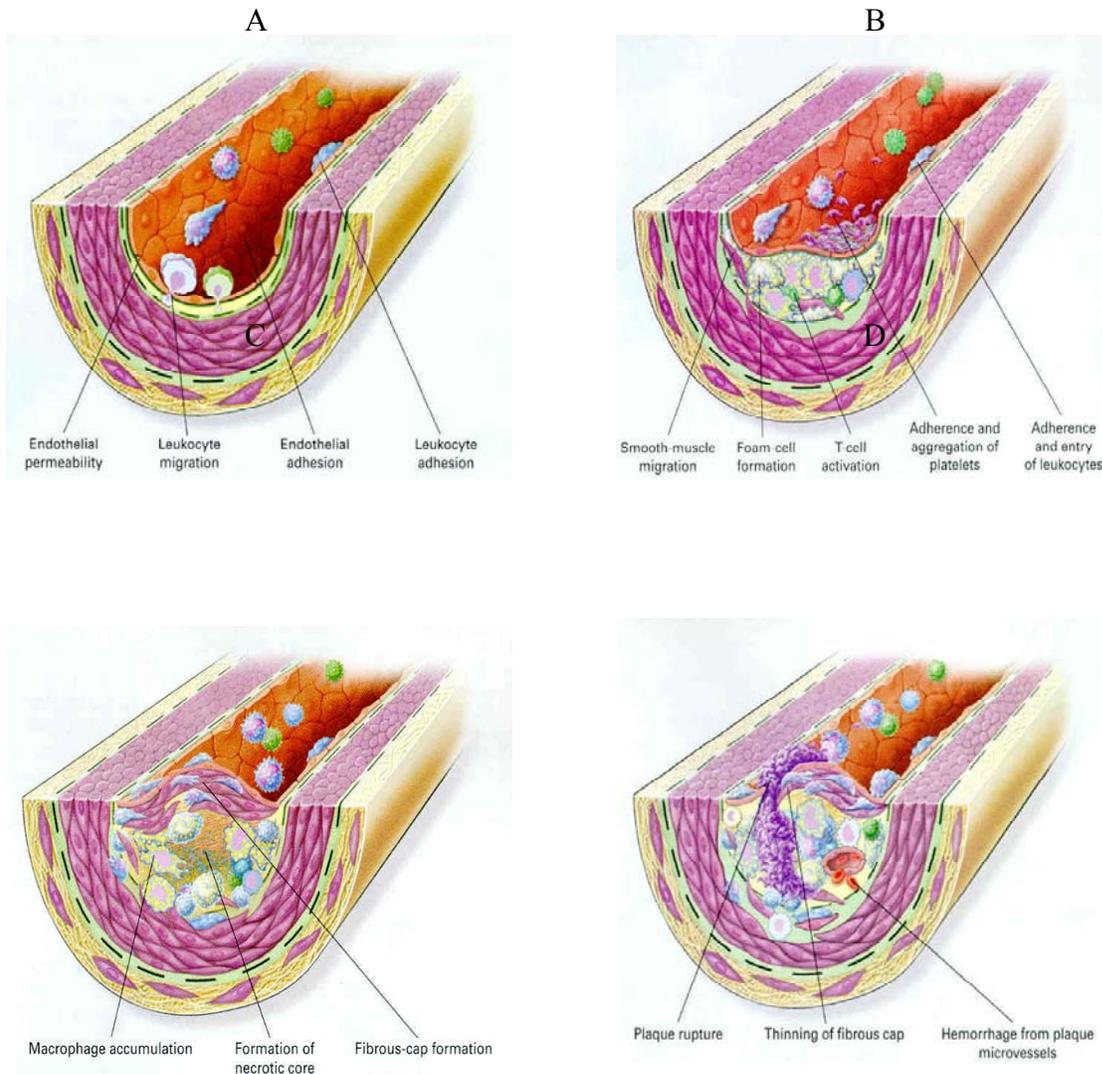


Figura 3. Desarrollo de la lesión aterosclerosa. La lesión se origina por un daño al endotelio lo que permite la entrada de LDL la cual es oxidada. Células activadas secretan $TNF-\alpha$ que induce la expresión de selectinas e integrinas en el endotelio. Se reclutan principalmente monocitos a la lesión. Los macrófagos en la lesión endocitan LDL oxidada a través de receptores como CD36 provocando su activación y la secreción de citocinas pro-inflamatorias. La placa aterosclerosa sufre la formación de la capa fibrosa, neovascularización y generación de células espumosas. En la lesión ocurre apoptosis o necrosis de células generándose el núcleo necrótico [9].

El proceso aterogénico se inicia con la disfunción endotelial la cual representa uno de los primeros estadios en la patogénesis de la aterosclerosis, la primera fase consiste en una pérdida de las funciones homeostáticas del endotelio (anti-adhesiva, anti-agregante, anti-proliferativa, antioxidante, anti-trombótica y reguladora del tono vasomotor). Estos cambios tempranos que preceden a la formación de la lesión aterosclerosa incluyen un aumento de la permeabilidad endotelial a lipoproteínas de baja densidad las cuales se retienen por interacciones de los grupos positivos de lisina y arginina que interactúan con cargas negativas de grupos sulfatos de cadenas de glicosaminoglicanas de proteoglicanas. La LDL es modificada por lipoperoxidación en el espacio subendotelial por compuestos reactivos del oxígeno derivados de las interacciones celulares [9,20]. El acúmulo de partículas de LDL en el espacio subendotelial inicia la formación de la placa aterosclerosa [9]. La lipólisis de la LDL por fosfolipasa A2 y la liperoxidación, genera lisofosfatidilcolina la cual potencia el efecto pro-inflamatorio en la íntima de la arteria [21]. Como consecuencia, en presencia de un endotelio disfuncional, se observa la expresión de moléculas de adhesión tales como las selectinas endoteliales y plaquetas, moléculas de adhesión de plaquetas a células endoteliales-1 (PECAM-1), moléculas de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) y molécula de adhesión de células vasculares (VCAM) como se muestra en la figura 3A, las cuales producen la interacción entre las células T y los monocitos circulantes con las células endoteliales. Además, las células del endotelio y musculares lisas sintetizan y liberan moléculas quimiotractantes como la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), estimulando la migración y acumulación de monocitos al sitio de la lesión. En esta etapa de la lesión, las células musculares lisas migran a la placa estimuladas por el factor de crecimiento derivado de plaquetas y el factor de crecimiento de fibroblastos 2, entre otros estímulos. Adicionalmente, los linfocitos T son activados por factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) [9,10,22,23].

Los monocitos/macrófagos participan en la respuesta inmune innata y son células efectoras esenciales en la enfermedad aterosclerosa. Expresan en la superficie celular receptores “scavenger” clase A tipo I y II, clase B, CD36, los cuales identifican e internalizan las partículas de LDLox, induciendo su activación y transformación en células espumosas. (Figura 3B) [24,25], generándose la placa fibrosa caracterizada por un crecimiento extracelular de lípidos, particularmente colesterol, ésteres de colesterol y matriz derivada de células musculares lisas [10]. Los macrófagos activados presentes en la placa, secretan citocinas pro-inflamatorias, entre las que se encuentran interleucina (IL)-1 β , IL-8, TNF- α , factor estimulador de colonias de macrófagos y proteína quimiotractante de monocitos-1. También existe un aumento en la expresión de moléculas co-estimuladoras como CD80/CD86, en macrófagos que participan en la regulación de la activación de los linfocitos. Otra molécula inmunoreguladora que se ha demostrado sobre-expresada en la placa es CD40. La activación de células vasculares con CD40L induce la liberación de IL-1 β . Otro evento que se inicia es la muerte celular de macrófagos por interferón (IFN)- γ . Por otro lado, la apoptosis o necrosis puede ser generada por la acumulación de lípidos promoviendo el avance del núcleo necrótico en la placa. Además, los macrófagos producen TNF- α , IL-1 β y metaloproteinasas que pueden ser críticos en el daño a la lesión. (Figura 3C) [9,10,25,26]. En la última etapa de la aterosclerosis ocurre ruptura o ulceración de la placa fibrosa lo que conduce a síndromes de angina inestable o al infarto de miocardio. La

vulnerabilidad de la placa se origina por un adelgazamiento de la lesión y ocurre por inhibición de la secreción de matriz proveniente de células musculares lisas a través de IFN- γ secretado por linfocitos T. Los macrófagos degradan la matriz de la capa fibrosa por medio de colagenasa intersticial, gelatinasa y estromilina. La degradación de la capa fibrosa frecuentemente se origina en los hombros de la lesión y puede conducir a una hemorragia, las plaquetas activadas se adhieren a la arteria lesionada ocasionando la formación de un trombo y la oclusión de la arteria (Figura 3D) [9].

Con base en lo anterior, actualmente la aterosclerosis se considera una enfermedad inflamatoria crónica donde las citocinas juegan un papel relevante. Las citocinas pro-inflamatorias involucradas en aterosclerosis son: IL-1, IL-6, IL-8, IL-18, TNF- α [9,10].

La IL-1 desempeña un papel central en el inicio de las respuestas inflamatorias, es producida por monocitos y macrófagos. Existen dos formas biológicamente activas: la IL-1 α y la IL-1 β ; de éstas, la IL-1 β es la isoforma que predomina en sangre periférica en humanos. La IL-1 se une a receptores que se encuentran en linfocitos T, fibroblastos, células endoteliales y hepatocitos. La IL-1 provoca la síntesis de prostaglandinas, leucotrienos, factor activador de plaquetas y óxido nítrico sintasa en células musculares lisas. Induce la expresión de genes para factores de la coagulación e inhibidores de la fibrinólisis, la adhesión y migración de leucocitos a través del endotelio así como la síntesis de factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos [27]. Se ha demostrado que la ausencia de IL-1 β disminuye la severidad de la lesión en ratones propensos a desarrollar aterosclerosis [28].

La IL-6 es una citocina pro-inflamatoria multi-funcional, regula la respuesta humoral y celular, participa en el daño tisular y juega un papel central en el proceso inflamatorio: es el principal mediador de la respuesta de fase aguda y de la producción hepática de proteína C reactiva así como de fibrinógeno; estimula la función de los linfocitos T y B; provoca la migración y diferenciación de macrófagos e induce la síntesis de enzimas degradadoras de matriz extracelular, lo cual puede debilitar la placa aterosclerosa; además, promueve la expresión de receptores de LDL-colesterol en la superficie de los macrófagos y estimula la proliferación de células musculares lisas, favoreciendo la progresión de la placa [29,30].

Otra citocina pro-inflamatoria importante es el TNF- α , siendo los monocitos y macrófagos sus principales productores, aunque también es secretado por linfocitos T, células asesinas naturales, células musculares lisas y células endoteliales. El TNF- α ejerce acciones pro-inflamatorias sobre estas células lo que favorece la progresión e inestabilización de la placa aterosclerosa. También estimula la producción de IL-6 en células musculares lisas de la placa, y la expresión de moléculas de adhesión como la selectina-E, ICAM-1, VCAM-1 por células endoteliales y macrófagos. Se ha identificado aumento en la producción de TNF- α por células mononucleares de pacientes después de un infarto agudo del miocardio. Además, la concentración del receptor soluble de TNF también se incrementa rápidamente en estos pacientes [31,32]. Otras citocinas pro-inflamatorias involucradas en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular son IL-8, IL-18 e IFN- γ [9,10,33].

Las quimiocinas son pequeños péptidos con función quimioattractante que median la migración, crecimiento, y activación de linfocitos T, células naturales asesinas, monocitos y macrófagos [34]. En 1991, se demostró la expresión de MCP-1 en lesiones aterosclerosas humanas. La MCP-1 es expresada por macrófagos, células musculares lisas y células endoteliales. También se ha descrito que la MCP-1 induce la adhesión y el rodamiento de monocitos sobre células endoteliales activadas y el reclutamiento de éstos [35]. El tratamiento de las células endoteliales con LDLox *in vitro* induce la secreción de MCP-1, homocisteína, la adhesión de plaquetas activadas y la producción de TNF- α . El eliminar el gen que codifica para MCP-1 en ratones apoE^{-/-} resulta en una marcada reducción del tamaño de las lesiones aterosclerosas. Estas evidencias demuestran la importancia de MCP-1 en las lesiones aterosclerosas [36,37].

En el proceso de formación de la placa aterosclerosa, los macrófagos activados expresan moléculas de histocompatibilidad clase II, CD40, CD86. Se ha demostrado que la molécula inmunoreguladora CD40 se expresa en macrófagos y CD40L en células T, de lesiones aterosclerosas, *in vivo* [38]. La señalización de CD40 puede promover la expresión de mediadores pro-aterogénicos regulados probablemente por citocinas como la IL-1, TNF- α , IFN- γ , metaloproteinasas (MMP-1, MMP-2 y MMP-9) y moléculas de adhesión celular (selectina E, VCAM-1, ICAM-1) [39]. Existen estudios que demuestran que la disfunción del sistema CD40-CD40L puede retardar la iniciación de la formación de la placa de ateroma. El tratamiento con anticuerpos anti-ratón CD40L, limita la aterosclerosis en ratones deficientes del receptor de LDL, cuando son alimentados con una dieta alta en colesterol durante 12 semanas. En ellos se encontró una reducción significativa en el tamaño y contenido de lípidos en la lesión aortica aterosclerosa [38]. También, se ha demostrado que al estimular monocitos con LDLox incrementa la expresión de CD86 e inducen a una activación de linfocitos T. Los linfocitos T expresan de manera constitutiva el ligando CD28 el cual puede ser reconocido por CD86, la interacción CD28 con CD86 resulta en la activación del linfocito T, provocando su proliferación y la secreción de citocinas como IFN- γ [40]. Se ha determinado, que células dendríticas de pacientes con enfermedad cardiovascular presentan un incremento en la expresión de CD80, CD86 y CD40 al ser comparados con los testigos sanos, esta sobreexpresión correlacionó de forma positiva con factores de riesgo [41].

Uno de los posibles factores que inducen la respuesta inflamatoria en aterosclerosis es LDL modificada oxidativamente. A pesar que aún no existen conocimientos suficientes que demuestren el posible mecanismo que provoca este suceso, diversas evidencias han demostrado que los receptores tipo Toll (TLR) juegan un papel esencial en las respuestas inflamatorias y al parecer contribuyen de forma importante en la enfermedad aterosclerosa [42,43,44].

El gene que codifica para los receptores tipo Toll fue descubierto al inicio de la década de los 80 como un componente esencial de la vía que establece el eje dorsoventral en el embrión temprano de *Drosophila melanogaster* [42]. En 1996 Lemaitre B y colaboradores documentó el primer receptor Toll involucrado en la respuesta inmune antifúngica en *Drosophila* [43], y el descubrimiento del primer receptor tipo Toll en el humano (TLR) 4 se realizó en 1997 por Medzhitov y col., el cual fue crucial para el entendimiento de muchos

mecanismos importantes implicados en la inmunidad innata y adaptativa [45]. Los TLR constituyen una familia de receptores de reconocimiento de patrones, que se han conservado filogenéticamente. Son receptores transmembranales tipo I y presentan tres características estructurales: 1.-Tienen un dominio extracelular rico en repeticiones de leucina, 2.- Poseen un dominio transmembranal corto y 3.- Su dominio citoplásmico es homólogo al receptor de toll/interleucina-1, el cual es necesario para el inicio de las cascadas de señalización [46].

Los TLR participan en la respuesta inmune innata, reconociendo patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) (Figura 4). Estudios *ex vivo* establecen que los TLR están involucrados en el reconocimiento de moléculas provenientes de microbios: TLR1 una lipopéptidos tri-acetilados (LP) de *Mycobacterium tuberculosis*; TLR2 reconoce especies de peptidoglicana de *Staphylococcus aureus*; TLR3 une RNA de doble cadena; TLR4 reconoce polisacáridos de bacterias Gram negativas, y HSP60 bacteriana; TLR 5 une flagelina; TLR6 une modulina fenol soluble; TLR7 responde a drogas anti-virales imidazoquinolina; TLR8 responde a imidazoquinolina; TLR9 es esencial en respuesta a DNA bacteriano, viral y oligodeoxinucleótidos sintéticos que contienen dinucleótidos CpG no metilados; TLR10 ha sido identificado en linfocitos B y células dendríticas plasmacitoides, no se conoce su ligando específico y TLR11 se encuentra en ratón, reconoce *Escherichia coli* uropatogénica y su primer ligando descrito es una proteína tipo profilina de *Toxoplasma gondii* [42,43,45,46].

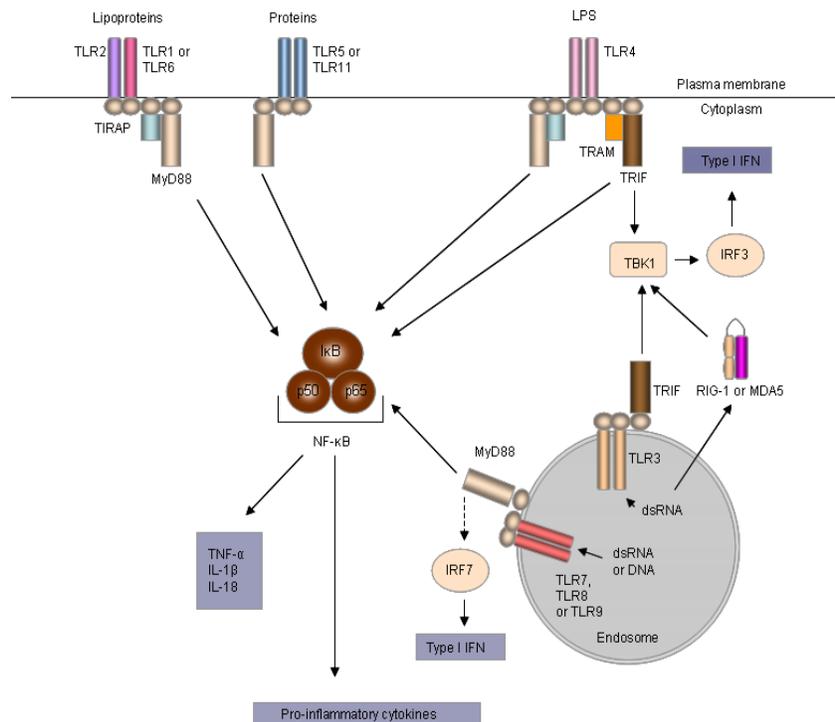


Figura 4. Representación esquemática de las vías de señalización de los TLR. La señalización de los TLR se inicia cuando reconocen a sus ligandos específicos, disparando una compleja vía de señalización que permite la activación de la respuesta inflamatoria. Los TLR señalizan a través de la vía dependiente o independiente de MyD88 a excepción del TLR4 que utiliza ambas vías, resultando en la activación de NF-κB lo que genera la expresión de citocinas pro-inflamatorias como TNF-α, IL-1β, IL-8 e IFN tipo I [modificado de 47].

Los TLR reconocen una gran cantidad de componentes microbianos formando heterodímeros, dímeros o colaborando con otros receptores como CD14. La activación de los TLR se inicia principalmente a través de las vías de señalización dependiente e independiente de MyD88. En la ruta de señalización dependiente de MyD88, posterior al reconocimiento microbiano, por ejemplo de LPS, TIRAP es reclutada al dominio TIR así como MyD88 interaccionando con IRAK4 y fosforilando a IRAK1 e interacciona con TRAF6 (receptor asociado al receptor de TNF) generándose el complejo IRAK1-TRAF6 el cual interactúa con otras moléculas que inducen la fosforilación de IKK permitiendo la liberación y posterior translocación de NF- κ B al núcleo. Los TLR3 y TLR4 señalizan a través de la vía independiente de MyD88. En la ruta de señalización TRIF interactúa con TRAF6 y TBK1. La activación de TRIF dependiente de TBK1 conduce a la fosforilación de IRF3 y TRAF6 media la activación de NF- κ B. La activación de IRF3 y NF- κ B contribuyen a la síntesis de IFN- β . La activación de las rutas de señalización de los TLR inducen la activación de los factores NF- κ B e IRF involucrados en activar múltiples genes inflamatorios como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- β , CD80, CD86, ICAM-1, VCAM-1, IL-8 y MIP1- α entre otras moléculas [46-48].

Recientemente se ha demostrado un aumento de la expresión de TLR2 y TLR4 en células endoteliales y macrófagos, en lesiones aterosclerosas de ratón y humanas [49,50]. Se ha demostrado que al alimentar ratones ApoE^{-/-} con una dieta rica en grasas, incrementa importantemente la expresión del RNA mensajero (RNAm) para TLR2 en la lesión aterosclerosa. En contraste, los ratones C57BL/6 al ser alimentados con una dieta similar a los ratones ApoE^{-/-} no presentaron un incremento en la expresión del RNAm de TLR2 en la placa de ateroma [51]. Mientras que los ratones ApoE^{-/-}/TLR2^{-/-} presentaron una reducción de la placa de ateroma, así como una disminución de la quimiocina MCP-1 lo que produjo un menor infiltrado de macrófagos en el sitio de la lesión [52]. Otro grupo encontró una reducción del 24% de la placa aterosclerosa en ratones ApoE^{-/-} TLR4^{-/-}. También, se determinó una reducción en el contenido lipídico e infiltrado de macrófagos en la lesión, al compararse con el ratón testigo [53]. Dos reportes por separado investigaron el papel de la molécula adaptadora MyD88 en la enfermedad aterosclerosa, usando ratones ApoE^{-/-} MyD88^{-/-}, las investigaciones revelaron una reducción del 65% en el tamaño de la lesión [53,54]. La importancia de la vía de TLR4 en aterosclerosis humana es apoyada por datos obtenidos en la población de Bruneck, Italia en la que se demostró que el polimorfismo D299G de TLR4 atenúa la señalización del receptor, asociándose con una disminución de riesgo de aterosclerosis [55]. Estudios *in vitro* han demostrado que la LDL modificada por oxidación al parecer se une a CD14 y mediante la vía TLR4/MD2 induce el “spreading” (expansión) en macrófagos por la polimerización de F-actina [56]. Existe evidencia que la LDL modificada oxidativamente incrementa la expresión del transcrito para TLR4, pero no de TLR2 en monocitos de sangre periférica de personas sanas [57]. En contraste, otro grupo de investigadores ha demostrado que la LDL oxidada al inducir células espumosas incrementa la expresión génica de TLR2 en macrófagos [49]. También se ha demostrado en el modelo porcino miniatura, un incremento de la proteína y del RNA mensajero para TLR2, que correlaciona de forma positiva con el aumento de LDL oxidada en la placa aterosclerosa [58]. Por otro lado, se ha reportado que la deficiencia de CD14 en ratones induce una disminución de citocinas pro-inflamatorias así como un retardo en la activación de NF- κ B en respuesta al LPS [59]. Mientras que, el polimorfismo C269T en el promotor

de CD14, es asociado con una alta densidad de CD14 y es identificado como un factor de riesgo de infarto del miocardio, lo cual es apoyado por el hecho de que se encontró una alta densidad de CD14 en monocitos de pacientes diabéticos con enfermedad cardiovascular comparado con pacientes no diabéticos [60,61]. Por consiguiente, estos datos sugieren un papel potencial de CD14, TLR2 y TLR4 en el fenómeno inflamatorio en respuesta a la lipoproteína de baja densidad modificada por oxidación.

JUSTIFICACIÓN

Los receptores tipo Toll (TLR) juegan un papel esencial en la respuesta inmune innata e iniciando la respuesta inflamatoria. Los TLR se expresan en monocitos/macrófagos, consideradas las principales células efectoras en el fenómeno inflamatorio de la placa aterosclerosa. Existe evidencia de sobre-expresión de TLR2 y TLR4 en macrófagos en la lesión ateromatosa y se ha asociado a una respuesta inflamatoria. Los estudios han considerado la posibilidad de una respuesta a infecciones. En contraste, otras evidencias apuntan a posibles antígenos endógenos. Se ha demostrado que LDL modificada oxidativamente se une a CD14 y a través de TLR4 induce el “spreading” en macrófagos y el transcrito para TLR2 y TLR4. Sin embargo, aún no tenemos evidencia suficiente del papel que están jugando los TLR en el reconocimiento a antígenos endógenos como la LDL mínimamente modificada, por lo que nos parece interesante explorar si los receptores CD14, TLR4 y TLR2 participan en respuesta a LDL mínimamente modificada en monocitos humanos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La aterosclerosis se considera una enfermedad inflamatoria crónica. El estímulo de LDL oxidada en macrófagos induce la secreción de IL-1 β , TNF- α , IL-6 entre otras. Existe evidencia que la LDL modificada oxidativamente puede regular la expresión de TLR4 en monocitos de sangre periférica de personas sanas y de TLR2 en células espumosas, sugiriendo un papel relevante de CD14, TLR2 y TLR4 en el proceso aterogénico por lo que nos parece adecuado plantear:

¿Cuál es el papel que juegan los receptores CD14, TLR4 y TLR2 en la respuesta inflamatoria en monocitos humanos de sangre periférica al ser estimulados con LDL mínimamente modificada (LDLmm)?

HIPÓTESIS

Si los receptores CD14 TLR4 y TLR2 son activados por la LDLmm, regularán la expresión de citocinas pro-inflamatorias en monocitos provenientes de sujetos sanos.

OBJETIVO GENERAL

Demostrar que el aumento en la síntesis de citocinas pro-inflamatorias inducido por la LDLmm se debe a que dicha molécula activa a los receptores CD14, TLR4 y TLR2 en monocitos provenientes de sujetos sanos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Demostrar que la LDLmm es reconocida por CD14, TLR2 y TLR4 en monocitos.
- Determinar que el reconocimiento de LDLmm por CD14, TLR2 y TLR4 inducirá la síntesis de TNF- α en monocitos de sujetos sanos.
- Analizar si el estímulo de LDLmm induce una redistribución de CD14, TLR4 y TLR2 en la membrana celular de monocitos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de LDLn.

Para la obtención de la lipoproteína LDL nativa (LDLn) se partió de 20 ml de sangre venosa (Na_2EDTA 1.4mg/ml (Sigma-Aldrich, Virgin Islands, USA) de donadores sanos, la cual se centrifugó a 350 x g durante 20 minutos. El plasma recobrado se ajustó a una densidad de 1.2 g/ml a 4°C por adición de KBr (J.T. Baker, New Jersey, USA)-NaCl (Caledon Laboratories Ltd, Georgetown, USA). Posteriormente se realizó un gradiente de densidad a 4°C que consistió en 2.5 ml de la densidad de 1.1 g/ml de plasma y 2.5 ml de solución salina a una densidad de 1.006 g/ml en tubos de policarbonato a 4°C. Las densidades se corroboraron por el método del picnómetro. El gradiente se centrifugó 4 h a 323,000 x g a 4°C en microultracentrífuga (Sorvall Discovery M150 SE en rotor S80AT3). Después se separó la banda localizada a una densidad de 1.006 g/ml correspondiente a la VLDL y se adicionaron 2 ml de solución salina ajustada a una densidad de 1.065 g/ml por adición de KBr (J.T. Baker, New Jersey, USA), el gradiente se centrifugó 4 h a 323,000 x g a 4°C. La banda recuperada (LDLn) en la superficie se concentró y dializó usando 4 L de regulador de fosfatos-cloruro de sodio (PBS) 1X libre de EDTA (Sigma-Aldrich) a un pH de 7.4 durante toda la noche a 4°C. A la LDLn dializada se le determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford.

Oxidación de LDLn.

La concentración de proteínas de la LDLn se ajustó a 300µg/ml con PBS libre de EDTA (Sigma-Aldrich), adicionándole 1mM de CuSO_4 (Sigma-Aldrich) quedando una concentración final de 10µM de CuSO_4 (Sigma-Aldrich). La muestra se incubó a 37°C, durante 1 h. Al terminar el tiempo de incubación se detuvo la reacción colocando el tubo en hielo, la LDLmm se dializó en 4 L de PBS-EDTA 0.5 mM a un pH de 7.4 durante toda la noche a 4°C. La medición de la oxidación de la LDL se realizó por la determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (Sigma-Aldrich).

Análisis de LDLn.

El análisis del colesterol total se analizó por el método de colesterol esterasa y oxidasa de colesterol (Dade Behring, Deerfield, Illinois, USA). La concentración de triglicéridos se determinó por la actividad de la glicerol cinasa (Dade Behring). Para la medición de HDL se aplicó la técnica de precipitación de sulfodextrano y sulfato de magnesio (Dade Behring). La concentración de LDL se obtuvo empleando la fórmula de Friedewald:
$$\text{LDL} = \text{Colesterol Total} - (\text{HDL} + \text{Triglicéridos}/5).$$

Electroforesis de LDL

Se preparó un gel concentrador al 5% de acrilamida y un gel de resolución al 7% de acrilamida. Los pozos se llenaron con 100µg/ml de LDL obtenida en el laboratorio y LDL comercial con una pureza del 98%. Las muestras se corrieron a 90 V.

Determinación de la oxidación por sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.

En tubos por separado se colocaron LDLn y LDLmm y se les adicionaron 2 ml de H_2SO_4 4M (Caledon Laboratories Ltd) y 0.25 ml de ácido fosfotúngstico al 10% (Caledon Laboratories Ltd) se mezcló y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. A

continuación se centrifugó a 1500 x g durante 10 min., se descartó el sobrenadante y al paquete se le adicionó 1 ml de H₂SO₄ 4 M (Caledon Laboratories Ltd) más 0.15ml de ácido fosfotúngstico al 10 % (Caledon Laboratories Ltd), la mezcla se incubó a temperatura ambiente. Al término de la incubación, se centrifugó a 1500 x g por 10 min., se removió el sobrenadante y el paquete se resuspendió con 2 ml de agua destilada adicionada de 0.5 ml de 2-ácido tiobarbitúrico (Sigma-Aldrich). La mezcla se incubó 1 h en baño de agua a 95°C, posteriormente los tubos se colocaron en hielo y se adicionaron 2.5 ml de butanol y se centrifugó a 350 x g. Se preparó una curva estándar de malondehaldéido (MDA) (Sigma-Aldrich) con cantidades equimolares de MDA bajo las condiciones de reacción utilizando TBA (Sigma-Aldrich) como estándar. A las muestras y estándares se les determinó la densidad óptica a 535 nm.

Detección de endotoxinas por el ensayo de lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL).

A todas las preparaciones de LDLn y LDLmm, se les realizó la detección de endotoxinas utilizando el kit de LAL por el método de “gel clot” (Charles River Endosafe, Charleston, S.C.). Brevemente, el estándar de endotoxinas (LPS de *Escherichia coli*) y el reactivo de LAL se reconstituyeron con agua libre de endotoxinas. En un tubo por separado se colocaron 100µL de LDLn y LDLmm a cada tubo se les adicionó 100µL del reactivo LAL, posteriormente se incubaron a 37°C 1 h en un baño maría. Se realizó una curva estándar con el LPS de *Escherichia coli* de 0.5 EU/ml a 0.03 EU/ml bajo las condiciones de reacción para las lipoproteínas. Las lecturas de las muestras y estándares se realizaron invirtiendo cada tubo en un ángulo de 180°. Si se forma un gel intacto que no se desprende del tubo, entonces se considera positivo, cualquier otra condición se interpretó como un resultado negativo. Las muestras positivas a la prueba se descartaron y sólo se usaron las que resultaron negativas en los experimentos.

Prueba de polimixina B.

Se preincubaron 50µg/ml de LDLmm, 70µg/ml de LDLmm y 100ng/ml de LPS (Sigma-Aldrich) por separado con polimixina B a una concentración de 1µg/ml, durante 1 h. Posteriormente, se estimularon monocitos con cada uno de los tratamientos durante 24 h a 37°C. Finalizado el tratamiento se recuperó el sobrenadante y se determinó TNF-α por el método de ELISA.

Obtención de células mononucleares.

Las células mononucleares fueron obtenidas de concentrados celulares (“buffy coats”), se diluyeron 1:5 en PBS 1X pH=7.4 y se adicionaron 15 ml sobre una capa de lymphopredTM (Axis-Shield, Liverpool, UK) posteriormente se centrifugaron a 350 x g durante 30 min. Las células mononucleares fueron removidas de la interfase y se lavaron dos veces con PBS a 125 x g durante 10 min, después fueron resuspendidas en 2 ml de PBS 1X pH=7.4-BSA 0.5%-EDTA 0.05mM (Sigma-Aldrich).

Purificación de monocitos.

La purificación de monocitos se realizó de acuerdo a las especificaciones del fabricante, utilizando el Kit II para aislamiento de monocitos por selección negativa (Miltenyi Biotec MACS, Bergish Gladbach, Germany). Brevemente, se resuspendieron las células mononucleares en regulador PBS-BSA (0.5%-EDTA (2mM) (Sigma-Aldrich) a 10⁷ células/mL en 80µL de PBS-BSA (0.5%-EDTA (2mM) (Sigma-Aldrich), y se adicionaron

20µL del cocktail anticuerpo-hapteno se incubó a 4°C durante 10 min en oscuridad, se lavaron dos veces con 1 ml de regulador, y se centrifugó a 125 x g durante 5 min. El paquete celular se resuspendió en 80µL del regulador y se adicionaron 20µL de anti-hapteno MACS, se incubó a 4°C durante 15 min en oscuridad. Posteriormente, el paquete celular se lavó con regulador y se resuspendió en 500µL de regulador y se pasaron por la columna de separación LS MACS (Miltenyi Biotec MACS). Se lavó la columna y se recuperó la fracción negativa. Se determinó la viabilidad celular por exclusión con azul tripan.

Ensayo de inhibición de señalización de la LDLmm a CD14, TLR4 y TLR2.

Para los experimentos de bloqueo, los monocitos humanos fueron tratados con anticuerpos anti-CD14 (10µg/ml) (Clona MEM10, BD Biosciences, San Jose, California, USA) o anti-TLR4 (10µg/ml) (clona HTA125, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA), o la combinación de ambos durante 1 h a 37°C. Mientras tanto, en otro ensayo los monocitos fueron tratados con anticuerpo anti-TLR2 (clona TL2.1, eBioscience Inc, San Diego, California, USA) a 10µg/ml por 1 h a 37°C. Las células se lavaron 3 veces con PBS, se resuspendieron en medio de cultivo y se estimularon con 50µg/ml de LDLmm durante 24 h a 37°C. Como testigos positivos de la activación de TLR4 y TLR2, se estimularon monocitos humanos con LPS de *Escherichia coli* serotype O111:B4 (100 ng/ml) (Sigma, St. Louis, MO, USA) y con Pam3CSK4 (20ng/ml) (Alexis Biochemicals, Plymouth Meeting, PA, USA) a 37°C durante 24 h. Como control de anticuerpo, las células fueron tratadas con anticuerpos no relacionados seguida de los agonistas para TLR y LDLmm. Como testigo negativo, los monocitos fueron incubados sólo con medio de cultivo o con anticuerpos no relacionados pero sin agonistas o LDLmm.

Determinación de TNF-α

A partir de los sobrenadantes se determinaron los niveles de TNF-α por ELISA (eBioscience Inc), acorde con las instrucciones del fabricante. Brevemente, se adicionaron 100µL del anticuerpo de captura toda la noche a 4°C, posteriormente se lavó 5 veces con PBS-Tween 0,05%, después se adicionaron 200µL de regulador de bloqueo durante 1h a temperatura ambiente y se lavó 5 veces la placa con PBS-Tween 0,05%, se adicionaron 100µL de las muestras y estándares 1h a temperatura ambiente, se lavó 5 veces la placa con PBS-Tween 0,05% y se adicionaron 100µL de avidina HRP 30 min a temperatura ambiente, después se adicionaron 100 µL de sustrato y se realizó la lectura a 450 nm.

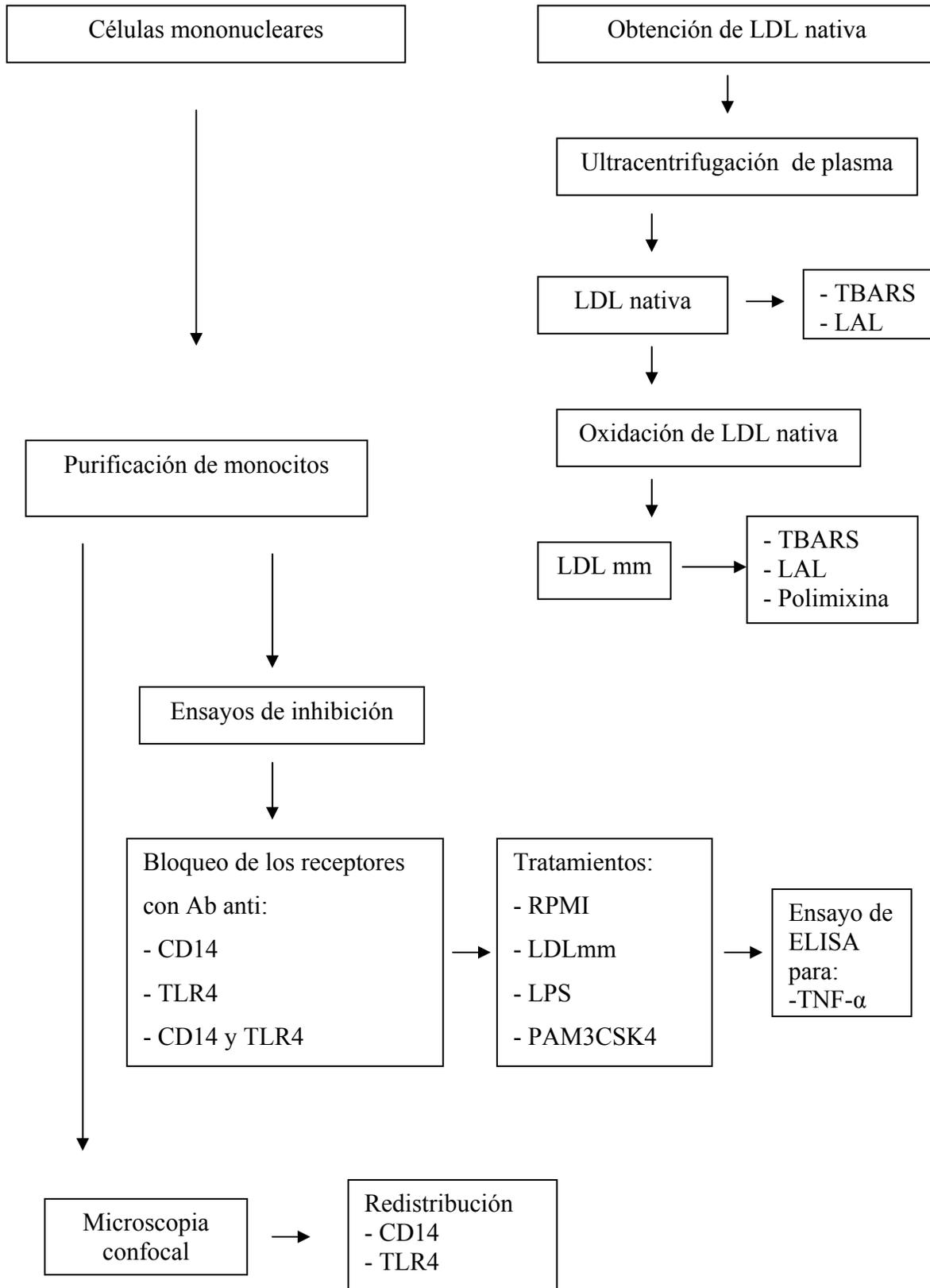
Microscopía confocal.

Se cultivaron monocitos en medio libre de suero por 24 horas a 37°C, posteriormente se estimularon con LDLmm a una concentración de 50µg/ml durante 1 h a 37°C. Por otro lado, en forma separada, se estimularon monocitos humanos con LPS 100ng/ml (Sigma) y Pam3CSK4 20ng/ml (Alexis Biochemicals) como testigos positivos, como testigo negativo monocitos fueron cultivados solo con medio de cultivo. Finalizado el tiempo de incubación, las células se tiñeron con los anticuerpos anti-CD14-PE (BD Biosciences) y anti-TLR4-FITC (Santa Cruz Biotechnology). Las imágenes se obtuvieron con el microscopio confocal Carl Zeiss LSM510 (Carl Zeiss, Göttingen, Germany) y se analizaron con el programa LSM510.

Análisis estadístico.

El análisis estadístico se determinó mediante la prueba de ANOVA. El nivel de significancia en todos los casos fue una $p < 0.05$. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa de cómputo SPSS 12.0 para WINDOWS.

Esquema general de trabajo



RESULTADOS

Fue necesario obtener y caracterizar la lipoproteína de baja densidad (porque la LDL comercial presentó altos niveles de oxidación), para lo cual se necesitó estandarizar la técnica de obtención a partir de plasma humano mediante ultracentrifugación. La LDL obtenida se denominó nativa (LDLn) y presentó un patrón electroforético de una sola banda indicando que se obtuvo sólo una proteína en las distintas extracciones. Como estándar de oro se utilizó LDL comercial (Sigma-Aldrich) con una pureza del 98%. Ambas presentaron un patrón electroforético idéntico (Figura 5a). Adicionalmente, se cuantificó la lipoproteína de alta densidad (HDL), la lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) y la LDL a través de métodos enzimáticos obteniendo una pureza mayor al 95% de LDL (Figura 5b).

Entonces, la LDL se oxidó con sulfato de cobre y se determinó el grado de oxidación por el método de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. El nivel de oxidación en promedio fue de $0.039\mu\text{M}$ para la LDL modificada oxidativamente a la cual designamos como LDL mínimamente modificada (LDLmm), la LDLn presentó siempre un menor nivel de oxidación que la LDLmm (Figura 6). Sólo hasta que se obtuvo el nivel de oxidación adecuadamente no tóxico, se realizaron los ensayos.

Una vez obtenida las LDL, se estandarizó la activación de monocitos con LDLn y LDLmm. Se encontró que la LDLn no fue capaz de activar a los monocitos en ninguna de las concentraciones utilizadas, medido a través de la secreción de TNF- α . En contraste, las células que fueron estimuladas con la LDLmm presentaron una activación celular en las distintas concentraciones. Con base en la curva estándar obtenida, se decidió utilizar una concentración de $50\mu\text{g/ml}$ en los experimentos posteriores (Figura 7). En todos los experimentos se determinó la viabilidad celular por exclusión de azul tripano obteniendo siempre una viabilidad mayor al 90%.

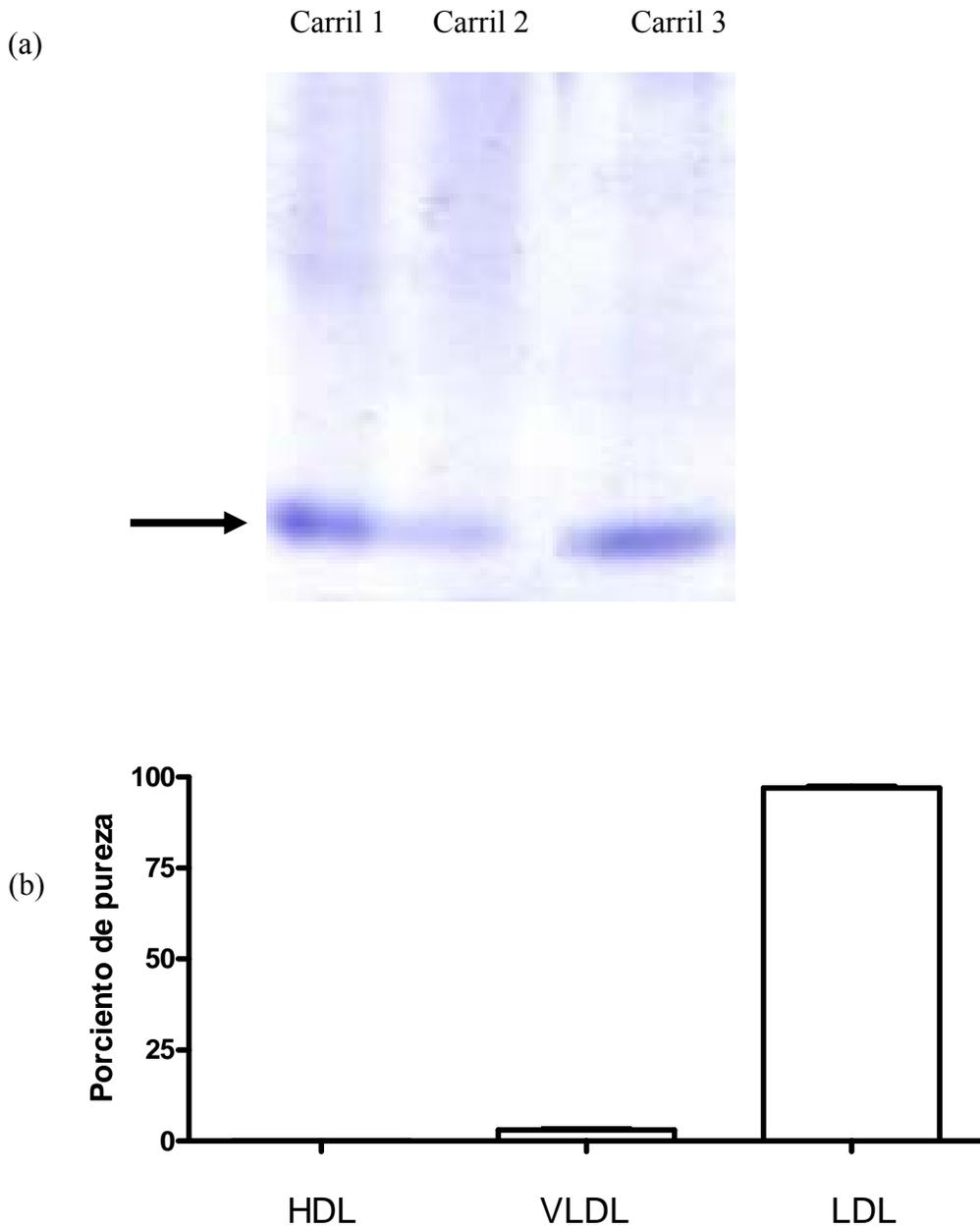


Figura 5. Caracterización de la lipoproteína de baja densidad obtenida por ultracentrifugación a partir de plasma de sujetos clínicamente sanos. (a) Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7 % en condiciones no desnaturalizantes. Carril 1: LDL nativa (LDL_n) 100 /ml, carril 2: LDL_n 100 µg/ml mezcla de seis obtenciones de LDL y carril 3: LDL_n comercial (Sigma) 100µg/ml con una pureza del 98%. (b) cuantificación de las moléculas de lipoproteína de alta densidad (HDL), lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) y lipoproteína de baja densidad (LDL) de 5 extracciones de LDL_n obtenidas de forma independiente.

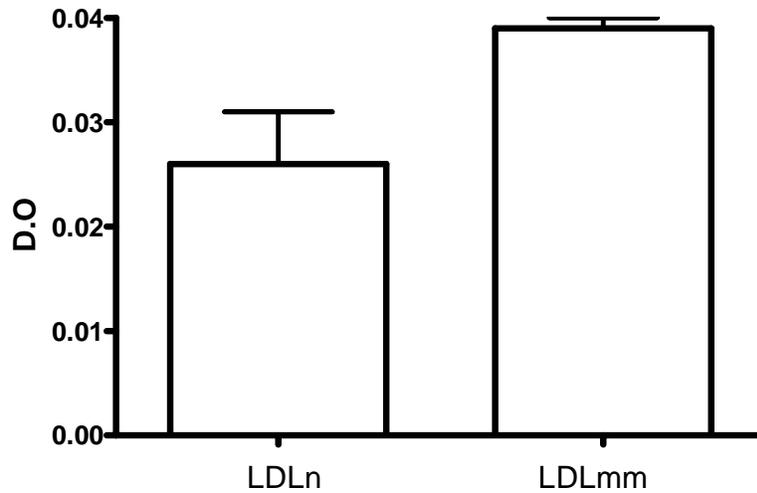


Figura 6. Grado de oxidación de LDL nativa (LDLn) y LDL mínimamente modificada (LDLmm) por el método de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. LDLn 300µg/ml en PBS fue oxidada con sulfato de cobre a una concentración final de 10 µM durante una hora a 37°C. La LDLn presentó en promedio 0.025 µM de equivalentes de malondealdehído y la LDLmm 0.039 µM equivalentes de malondealdehído. El grado de oxidación se determinó en 100µg/ml de LDLn y LDLmm, por el método de TBARS. La reacción se midió a 535 nm.

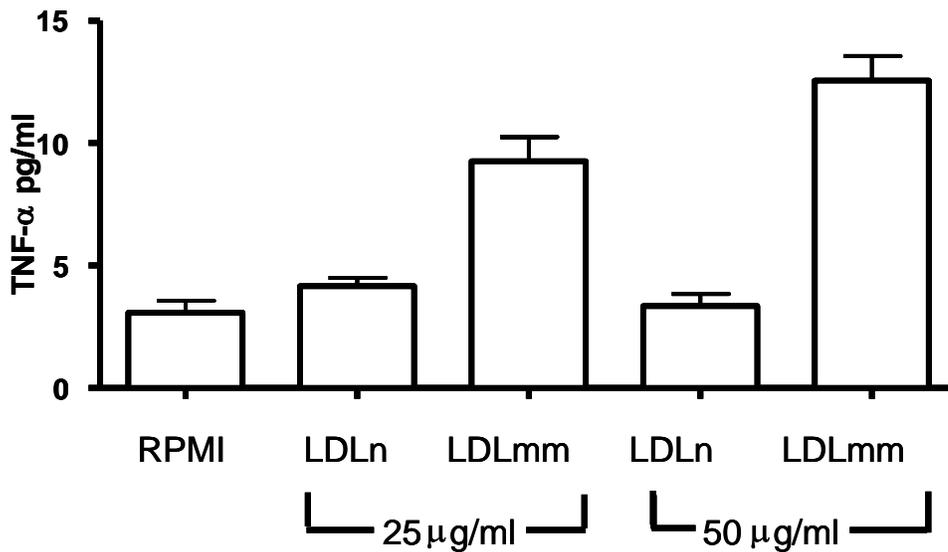


Figura 7. Actividad biológica de la LDL nativa y LDL mínimamente modificada sobre monocitos humanos. Se incubaron monocitos con LDL nativa (LDLn) y LDL mínimamente modificada (LDLmm) a concentraciones de 25µg/ml y 50µg/ml durante 24 horas a 37°C. En ambas condiciones se determinó TNFα del sobrenadante por la técnica de ELISA. La grafica es el resultado de tres experimentos independientes.

Los monocitos se purificaron a partir de células mononucleares humanas por selección negativa usando perlas magnéticas. La pureza celular se evaluó por citometría de flujo, marcando las células con el anticuerpo monoclonal anti-CD14 humano PE. El porcentaje de células CD14+ fue superior al 90% (Figura 8), la viabilidad celular se determinó por exclusión de azul tripano, la cual fue mayor al 90% en todos los casos.

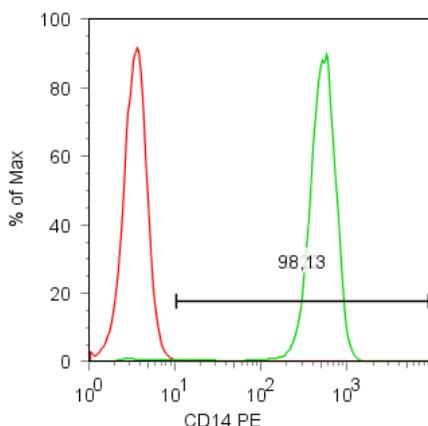


Figura 8. Determinación de la pureza de monocitos a través de citometría de flujo. Al finalizar el proceso de purificación de monocitos por perlas magnéticas, las células se tiñeron con anticuerpo anti-CD14 PE. En color rojo se muestra el testigo de isotipo y en verde las células marcadas con anti-CD14 PE. Se obtuvieron purezas mayores al 90% (Análisis representativo de las purezas realizadas).

Antes de realizar los ensayos para determinar el efecto biológico de la LDLmm sobre los receptores CD14, TLR4 y TLR2, fue necesario descartar la probable contaminación de LPS, por lo que se realizó la prueba de detección de endotoxinas a las preparaciones de LDL a través del ensayo de lisado de limulus y resultaron negativas. Además, se les realizó una segunda prueba en la cual se bloqueó el efecto biológico del LPS y así se confirmó que el efecto biológico fue exclusivo de la LDLmm. Al mezclar LPS como testigo positivo en presencia de polimixina B provocó una inhibición en la secreción de TNF- α con respecto al estímulo del LPS sin polimixina B (Figura 9a). En contraste, al mezclar LDLmm con polimixina B y estimular monocitos durante 24 horas con la mezcla, no se presentó modificación alguna en la secreción de TNF- α al compararlo con la LDLmm sin polimixina B (Figura 9b).

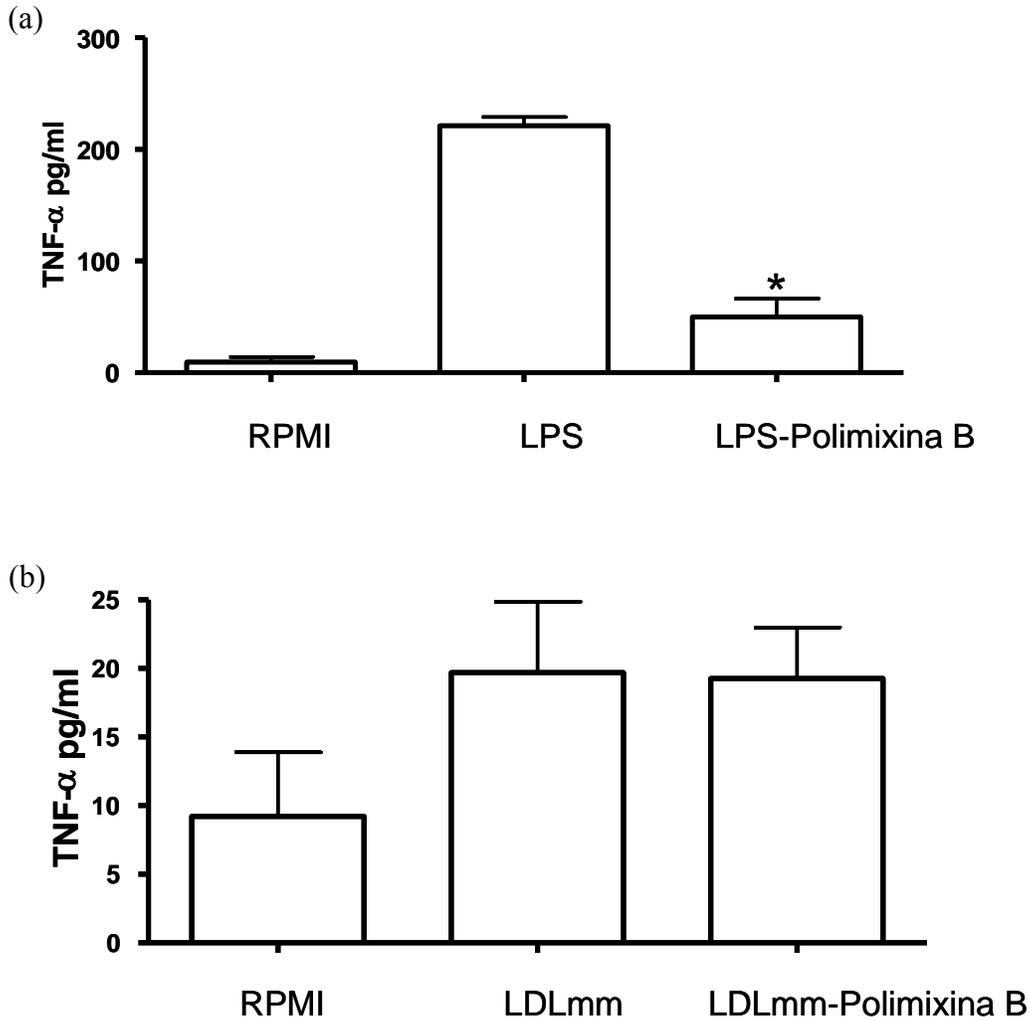


Figura 9. Efecto biológico del LPS y LDLmm en presencia de polimixina B. (a) Monocitos humanos se incubaron con LPS o la mezcla LPS-polimixina B durante 24 h a 37°C. (b) Los monocitos se incubaron con LDLmm o con la mezcla LDLmm-polimixina B durante 24 h a 37°C. La barra RPMI denota las células con medio. A partir de los sobrenadantes de cultivo se determinó TNF- α por el método de ELISA. (* $p < 0.05$).

Para las pruebas de inhibición de los receptores CD14, TLR4 y TLR2, se usaron anticuerpos monoclonales dirigidos contra estos receptores. Como testigo positivo de la vía de señalización de CD14/TLR4 se usó LPS. Los monocitos puros se preincubaron con los anticuerpos anti-CD14, anti-TLR4 y/o ambos. Posteriormente, se estimularon con LPS, al cabo de 24 horas se determinó TNF- α en el sobrenadante de cultivo y se encontró que el estímulo de LPS induce una fuerte secreción de TNF- α al compararlo con las células solo con medio (Figura 10a). El bloqueo del receptor CD14 con el anticuerpo anti-CD14 provocó un efecto inhibitorio en la secreción de TNF- α cercano al 32 %. En el mismo sentido, se bloqueó el receptor TLR4 e indujo una inhibición del 43 % en la producción de TNF- α , lo que fue estadísticamente significativo. Al bloquear ambos receptores se

determinó una reducción significativa en la síntesis de TNF- α del 55 %. En la Figura 10b se muestra el porcentaje de inhibición de TNF- α . Una vez establecido el modelo de activación celular vía LPS, se trasladó el sistema a nuestra molécula de estudio. Se estimularon monocitos humanos con LDLmm (50 μ g/ml) lo que provocó un incremento en la síntesis de TNF- α de alrededor de 30pg/ml con respecto a las células incubadas solo con RPMI (Figura 11a). En contraste, cuando se bloqueó el receptor CD14 en los monocitos con anticuerpo anti-CD14 (10 μ g/ml) y posteriormente se estimuló con LDLmm, se indujo una disminución del 60% en la secreción de TNF- α que fue estadísticamente significativa; de forma similar se encontró una inhibición del 63% cuando se bloqueó el receptor TLR4 y en el mismo sentido se encontró una inhibición del 68% en la síntesis de TNF- α al bloquear ambos receptores. Estos resultados demuestran que la LDLmm está siendo reconocida por CD14 y TLR4, lo cual concuerda con datos anteriormente reportados [56] y dicha unión involucra una respuesta en la síntesis de TNF- α en monocitos. En la Figura 11b se muestra el porcentaje de inhibición del TNF- α .

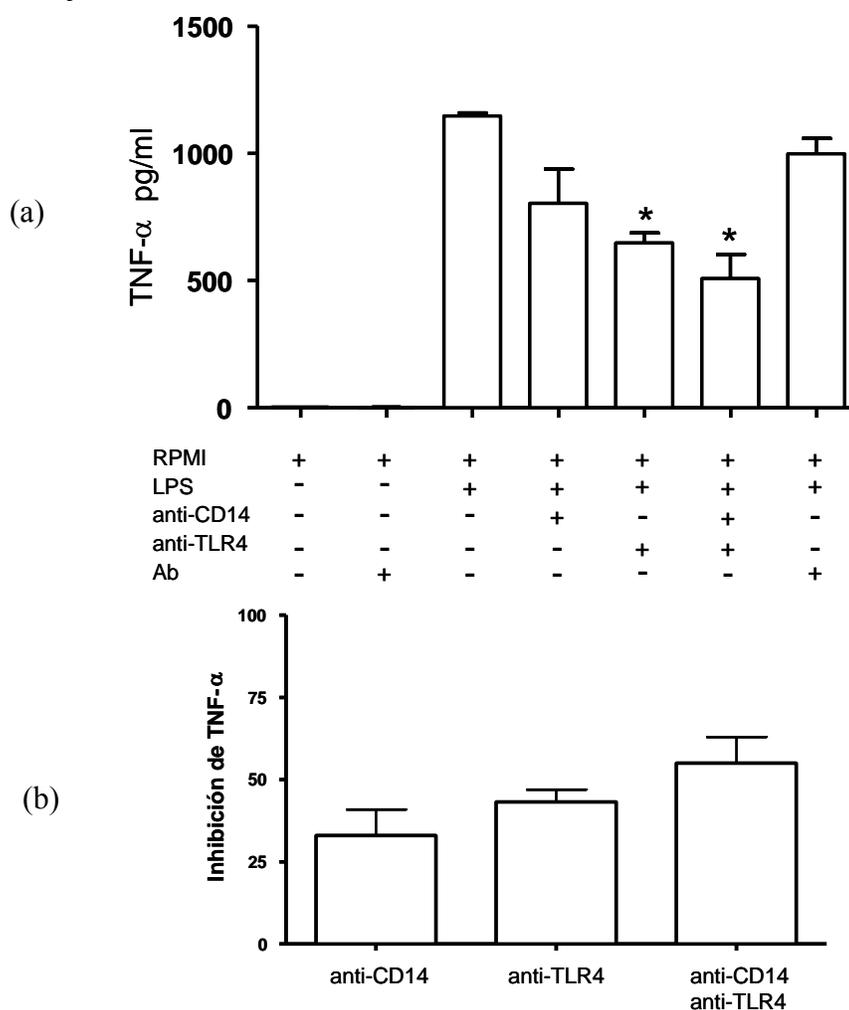


Figura 10. Participación de los receptores CD14 y TLR4 al estímulo de LPS. (a) Se incubaron monocitos en medio y con anticuerpo no relacionado, anticuerpo anti-CD14, anti-TLR4 y la combinación de los anti-CD14 y anti-TLR4. A los monocitos se les adicionó LPS como se indica en (a). Los monocitos se trataron durante 24 h y del sobrenadante de cultivo se determinó TNF- α por ELISA. (b) Porcentaje de inhibición de TNF- α al bloquear los receptores CD14, TLR4 y ambos en presencia de LPS. (* p <0.05).

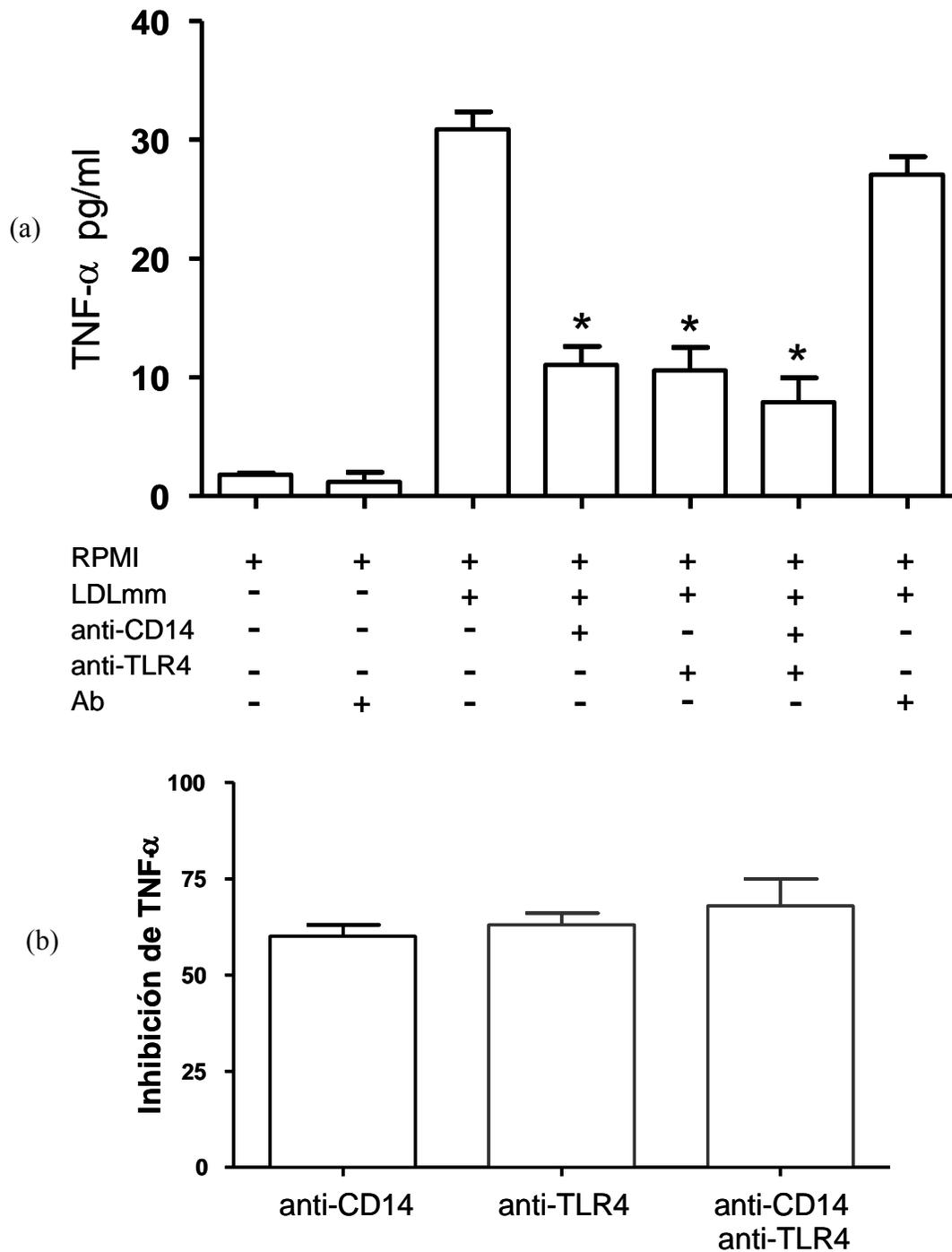


Figura 11. Participación de los receptores CD14, TLR4 o ambos en respuesta a LDLmm. (a) Se incubaron monocitos en medio RPMI y en presencia de anticuerpo no relacionado, anticuerpo anti-CD14, anticuerpo anti-TLR4 y la combinación de los anticuerpos anti-CD14 y anti-TLR4. Los monocitos se incubaron con LDLmm durante 24 h como se indica en (a) y a los sobrenadantes de cultivo se les determinó TNF- α por ELISA. (b) Porcentaje de inhibición de TNF- α al bloquear los receptores CD14, TLR4 y su combinación en presencia de LDLmm. (* $p < 0.05$).

Para determinar el efecto de la LDLmm sobre TLR2 se utilizó como testigo positivo el lipopéptido Pam3CSK4, agonista específico de TLR2. Nuevamente, los monocitos humanos purificados se preincubaron con el anticuerpo anti-TLR2. Posteriormente, se estimularon con Pam3CSK4 durante 24 horas y al sobrenadante de cultivo se le determinó TNF- α , encontrándose que el estímulo del Pam3CSK4 induce un incremento en la secreción de TNF- α al compararlo con los monocitos cultivados con medio solamente (Figura 12a), el bloqueo del receptor TLR2 con el anticuerpo anti-TLR2 provocó un efecto inhibitorio en la secreción de TNF- α cercano al 57%, que fue estadísticamente significativo. En la Figura 12b se muestra el porcentaje de inhibición de TNF- α al bloquear el TLR2.

Al estimular monocitos con LDLmm (50 μ g/ml) provocó un incremento en la síntesis de TNF- α de alrededor de 30 pg/ml con respecto a las células incubadas solo con medio (Figura 13a). Cuando se bloqueó el receptor TLR2 en los monocitos con anticuerpo anti-TLR2 (10 μ g/ml) y posteriormente se estimuló con LDLmm, se indujo una disminución del 60% en la secreción de TNF- α que fue estadísticamente significativa. Dicho resultado demuestra que la LDLmm posiblemente también se una a TLR2 y dicha unión involucra una respuesta en la síntesis de TNF- α en monocitos. En la Figura 13b se muestra el porcentaje de inhibición de TNF- α cuando se bloqueó el TLR2.

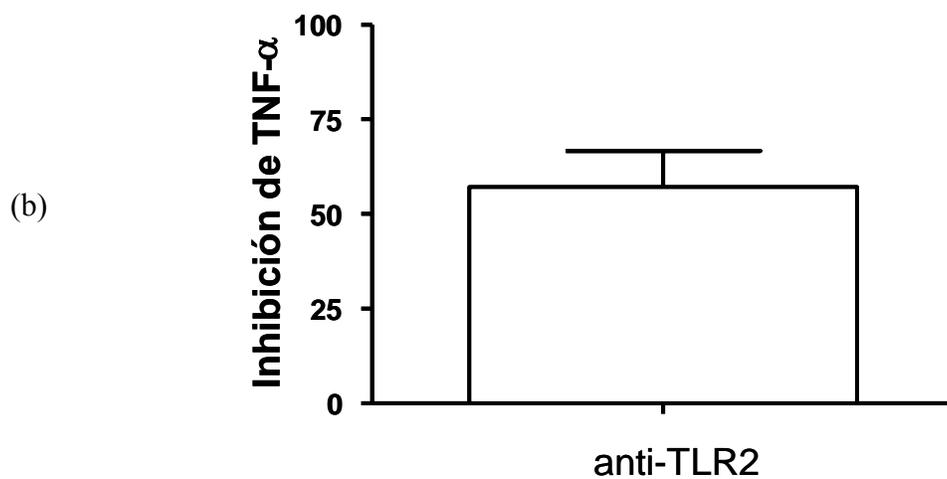
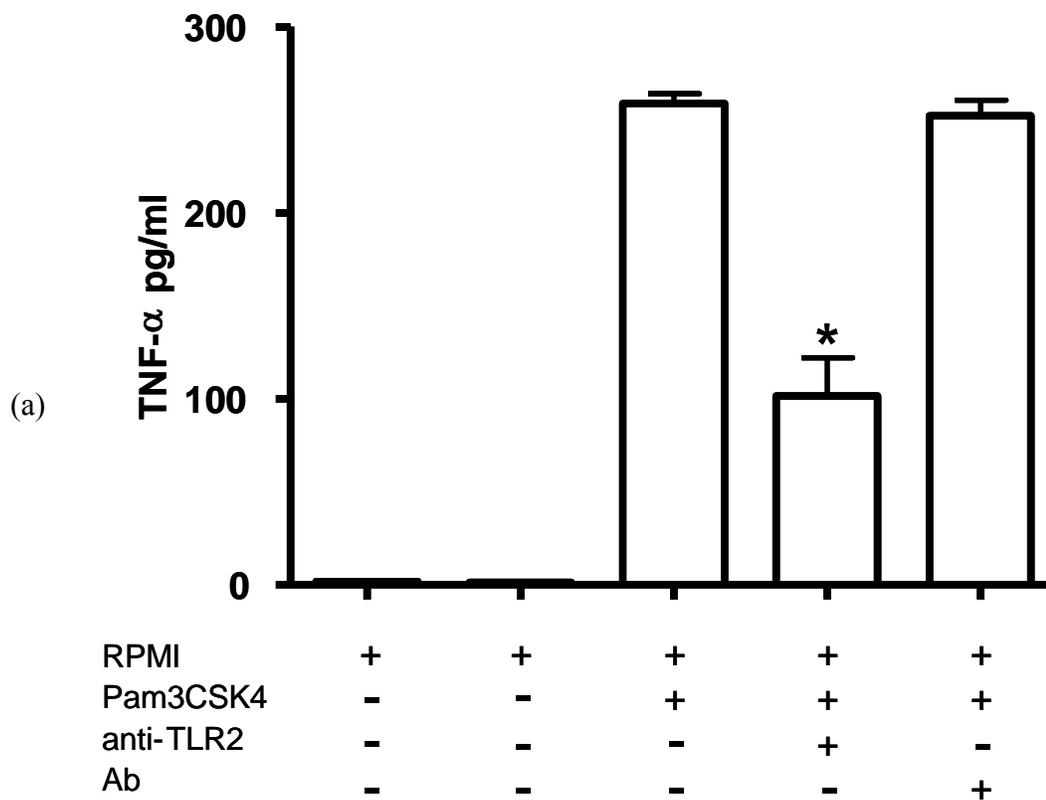


Figura 12. Producción de TNF- α bloqueando el receptor TLR2 en monocitos en presencia de Pam3CSK4. (a) Se incubaron monocitos humanos en medio RPMI, medio más anticuerpo no relacionado (10 μ g/ml), medio más anticuerpo anti-TLR2 (10 μ g/ml), a todos los tratamientos se les adicionó 20ng/ml del lipopéptido Pam3CSK4. Las células se incubaron durante 24 horas a 37°C, de los sobrenadantes de cultivo se determinó TNF- α por ELISA. (b) Porcentaje de inhibición de TNF- α al bloquear el receptor TLR2 al estímulo de Pam3CSK4 (*p<0.05).

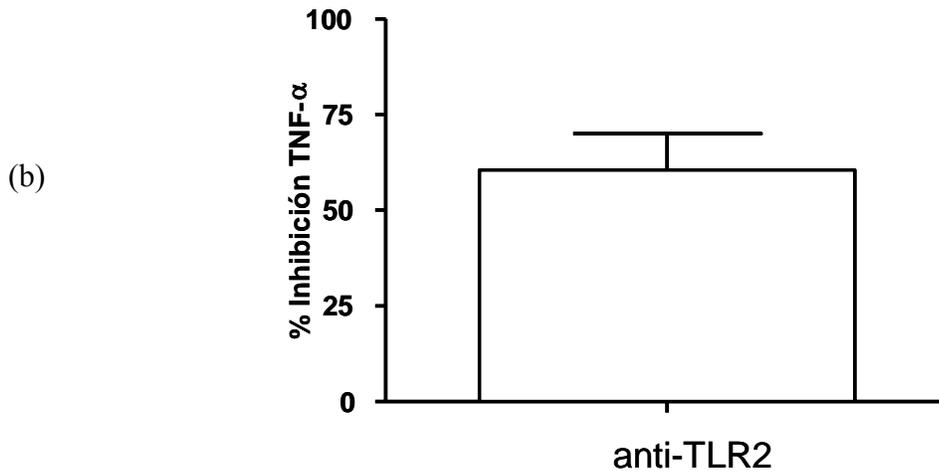
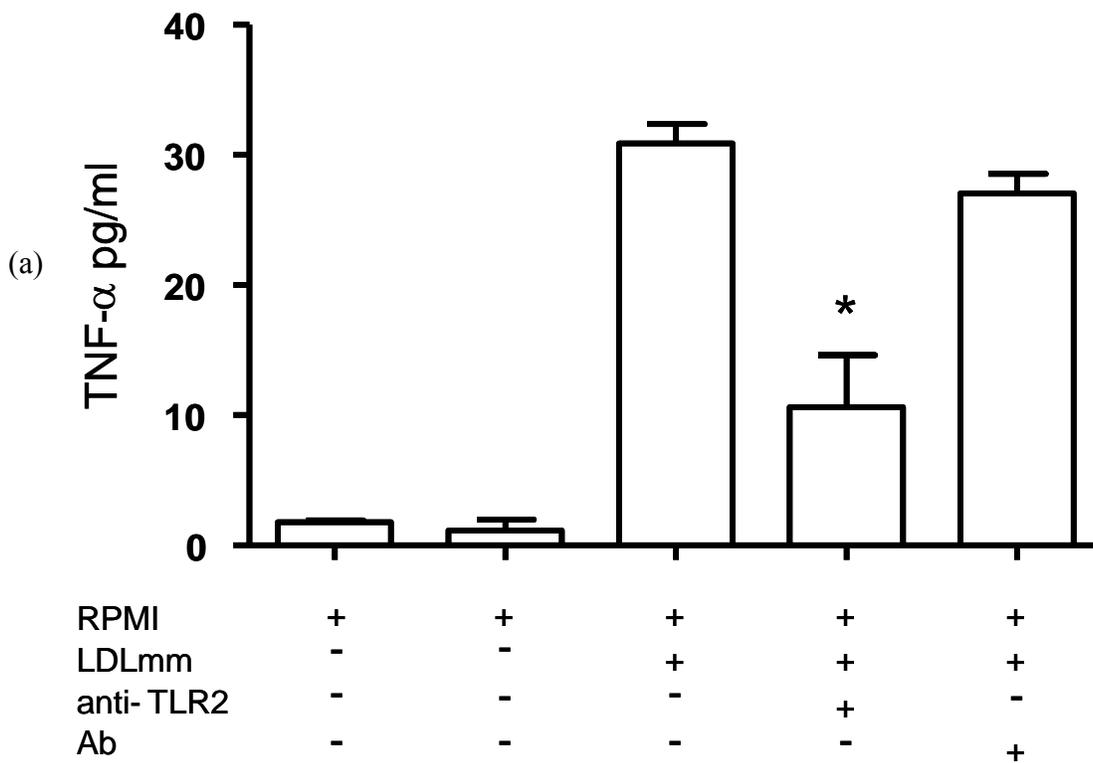


Figura 13. Participación de TLR2 en respuesta a LDLmm. (a) Se incubaron monocitos humanos en medio RPMI, medio más anticuerpo no relacionado (10µg/ml), medio más anticuerpo anti-TLR2 (10µg/ml), a todos los tratamientos se les adicionaron 50µg/ml de LDLmm. Las células se incubaron durante 24 horas a 37°C y del sobrenadante de cultivo se determinó TNF-α por ELISA. (b) Porcentaje de inhibición en la síntesis de TNF-α al bloquear el receptor TLR2 en presencia de LDLmm. (*p<0.05).

Por otro lado se determinó si la LDLmm era capaz de inducir la redistribución de CD14, TLR4 y TLR2 en la superficie celular de monocitos. Los monocitos sin estímulo presentaron una redistribución homogénea de los receptores CD14, TLR4 y TLR2 en la superficie celular como se muestran en la figura 14 (c, d y l). En contraste, al ser estimulados con LPS se indujo la redistribución de CD14 y TLR4 (Figura 14f, 14g) así como la co-localización de CD14/TLR4 (Figura h). La presencia de Pam3CSK4 provocó la redistribución de TLR2 (Figura 14m). El estímulo de LDLmm indujo redistribución de CD14 (Figura 14i), TLR4 (Figura 14j) y TLR2 (Figura 14n) y co-localización de CD14/TLR4 (Figura 14k) en la superficie celular de monocitos.

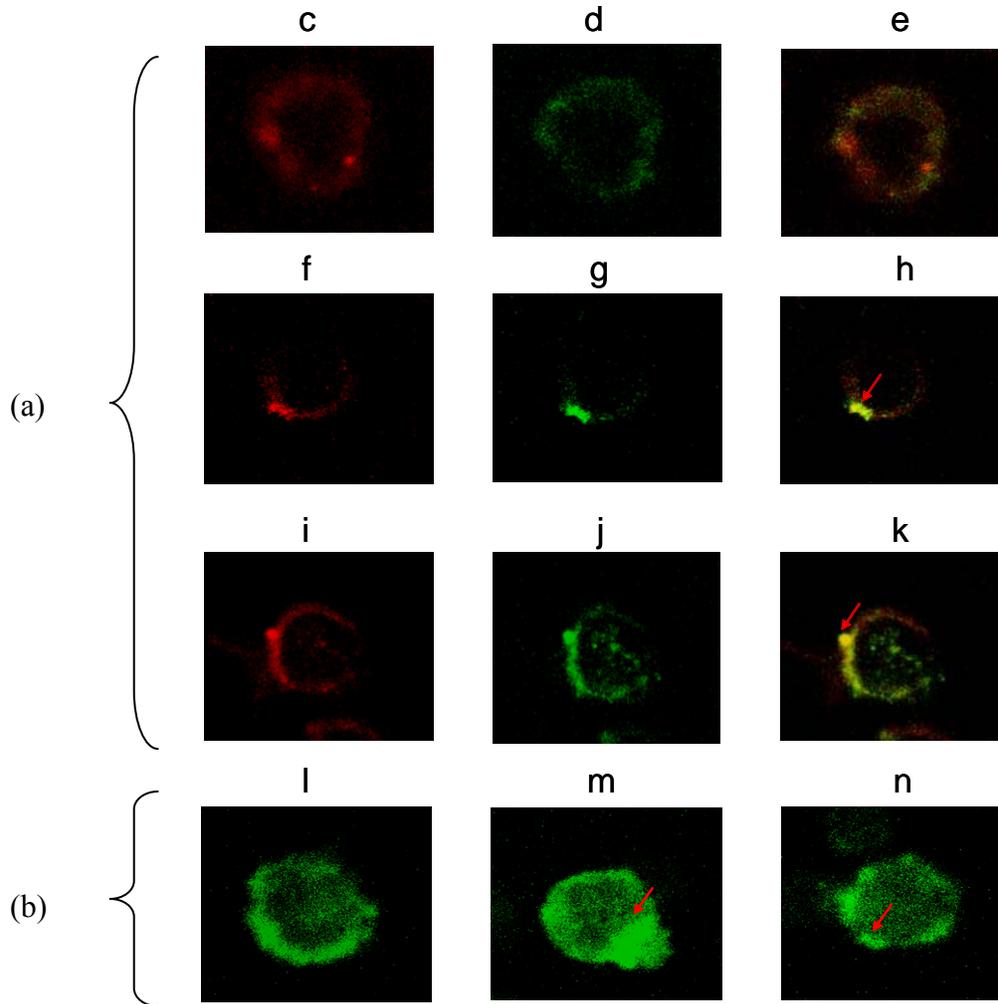


Figura 14. Redistribución de CD14, TLR4 y TLR2 en la superficie celular en monocitos. (a) Las células fueron teñidas con anticuerpos anti-CD14 PE (rojo), anti-TLR4 FITC (verde). (b) Las células se incubaron con anticuerpo anti-TLR2 seguido del anticuerpo anti-cabra conjugado a FITC (verde). Los monocitos incubados solo con medio de cultivo mostraron una redistribución homogénea de CD14 (c), y TLR4 (d) en la superficie celular. La sobreposición de imágenes (c) y (d) muestra una redistribución homogénea de CD14 y TLR4 en la superficie celular (e). El tratamiento con LPS indujo una redistribución de CD14 (f) y TLR4 (g) así como la co-localización de ambos receptores en la superficie celular que se muestra de color amarillo al sobreponer las imágenes (h). El estímulo con LDLmm provocó la redistribución de CD14 (i) y TLR4 (j) así como la co-localización de ambos receptores (k). Los monocitos incubados solo con medio de cultivo presentaron una distribución homogénea de TLR2 (l). Al incubarse monocitos con Pam3CSK4 presentaron una fuerte redistribución de TLR2 (m). El estímulo de LDLmm ocasionó la redistribución de TLR2 en la superficie celular (n). La flecha indica la redistribución y co-localización de los receptores.

DISCUSIÓN

La aterosclerosis se considera una enfermedad inflamatoria, en la cual están involucrados diversos factores de riesgo; uno de los más importantes son las altas concentraciones de LDL en plasma. Estudios recientes han involucrado a receptores de la inmunidad innata con los eventos inflamatorios, especialmente TLR2 y TLR4 claves en la respuesta a patógenos, se ha demostrado un incremento en la expresión de estos receptores en la placa aterosclerosa y se ha considerado la posibilidad que los receptores TLR2 y TLR4 señalicen por reconocimiento de microorganismos o antígenos endógenos como la lipoproteína de baja densidad modificada oxidativamente provocando o acelerando el fenómeno inflamatorio [42-44].

Primero, se establecieron los controles positivos de nuestro modelo donde el LPS se usó como testigo positivo de la vía CD14/TLR4 y el Pam3CSK4 para la vía de TLR2. Ambos reactivos son capaces de estimular a los monocitos induciendo un aumento en la secreción de TNF- α . Al bloquear los receptores CD14, TLR4 por separado o juntos indujeron un efecto inhibitorio en la secreción de TNF- α ; el mismo efecto se encontró al bloquear TLR2. A diferencia de la mayoría de los reportes de la literatura [42,43] donde usan microorganismos o PAMPs para poner de manifiesto que la activación celular de las vías CD14/TLR4 y TLR2 involucradas en los procesos aterosclerosos, en nuestro modelo de estudio se trabajó con la LDLmm para demostrar la funcionalidad de estas vías (CD14/TLR4 y TLR2).

Los resultados presentados aquí muestran que la LDLmm induce un incremento en la síntesis de TNF- α en monocitos de sujetos sanos, con respecto a las células con RPMI como se muestra en la figura 7; dicho aumento concuerda con datos obtenidos en monocitos de pacientes con diagnóstico de angina de pecho inestable, los cuales expresan un aumento en la secreción de TNF- α bajo el estímulo con LDLox [62,63]. Cuando se bloqueó el receptor CD14 se produjo un efecto de inhibición del 60 % en la secreción de TNF- α comparado con la síntesis de TNF- α cuando las células solo se incubaron con la LDLmm, lo que demuestra que la LDLmm se une al CD14, similar a lo reportado por Miller y col que demuestran que la LDLmm se une a CD14 lo que induce a la polimerización de f-actina [56].

El reconocimiento de la LDLmm por CD14 implica que la respuesta celular se debe a la vía de señalización de TLR4 porque CD14 no tiene un dominio de señalización [64]. Sin embargo, cuando está presente el LPS, el CD14 se asocia al TLR4 y se dispara un proceso de señalización intracelular que incluye la activación de NF- κ B y se ha demostrado que la activación de NF- κ B regula la síntesis de TNF- α [47,65]. Los resultados obtenidos en nuestro grupo de trabajo y datos de la literatura que involucran a CD14, y por ende la vía de activación de TLR4, aún son controversiales. Björkbacka reporta que los ratones con un fondo genético Apoe^{-/-} CD14^{-/-} presentan una lesión aterosclerosa similar a los ratones propensos a generar aterosclerosis con un fondo genético Apoe^{-/-} CD14^{+/+}, por lo tanto, los autores interpretan que el complejo CD14/TLR4 no participa en el desarrollo de la placa aterosclerosa [54].

Al probar el efecto de la LDLmm bloqueando TLR4 con el anticuerpo anti-TLR4, se encontró un efecto inhibitorio en la secreción de TNF- α . Esto probablemente indica que la señalización de la LDLmm es través de TLR4. Por otro lado, cuando se bloqueó el complejo CD14/TLR4 se determinó una inhibición en la síntesis de TNF- α . Estos datos concuerdan con los obtenidos por Miller y col, quienes reportan que la LDLmm se une a TLR4 y al complejo CD14/TLR4 [56]. Un estudio *in vivo* apoya la posibilidad que algunos antígenos endógenos señalicen a través del complejo CD14/TLR4 en la aterosclerosis. El estudio reporta una reducción del 24% de la placa aterosclerosa en ratones Apoe^{-/-} TLR4^{-/-} que solo fueron alimentados con una dieta alta en grasas y mantenidos en condiciones libres de pirógenos [53]. Por lo tanto, es muy posible que antígenos endógenos como la LDLmm estén participando en la señalización del complejo CD14/TLR4.

Otro receptor tipo Toll que se ha considerado que juega un papel importante en la lesión aterosclerosa es TLR2. Nuestros datos muestran que posiblemente la LDLmm es capaz de ser reconocida por TLR2, debido a que, cuando se bloqueó el receptor TLR2, se encontró una respuesta inhibitoria en la secreción de TNF- α , comparado con la síntesis de TNF- α cuando las células solo se incubaron con LDLmm. Sin embargo, el papel de este receptor es muy controversial. Un grupo de investigadores reportó que el TLR2 no está presente en la lesión aterosclerosa, ellos también demostraron que el incubar macrófagos en presencia de LDLox no induce un aumento en la expresión del transcrito para TLR2 pero sí para TLR4 [49]. En contraste otros estudios han evidenciado la presencia de TLR2 en macrófagos y células endoteliales en la lesión aterosclerosa [50]; también se ha abordado la posibilidad de que antígenos endógenos regulen la expresión de TLR2 ó participen en su señalización. Un estudio reciente realizado por Mullick y col, demuestra el papel potencial de TLR2 en la enfermedad aterosclerosa, al reportar que los ratones LDLR^{-/-} TLR2^{-/-}, al ser alimentados con una dieta alta en grasas, presentan una disminución de la aterosclerosis aórtica de más del 50% al compararlo con ratones testigos con un fondo genético LDLR^{-/-}, lo cual establece un papel claro de TLR2 en la aterosclerosis [52]. También se ha reportado un incremento en la expresión de TLR2 y de su RNA mensajero en la placa aterosclerosa que correlaciona de forma positiva con el aumento de LDLox [66].

En el proceso de activación celular vía CD14 y TLR4, se ha demostrado que la inducción del complejo CD14/TLR4 es crucial para la señalización inducida por LPS. Al probar el efecto de la LDLmm en la redistribución celular de CD14 y TLR4, los resultados demuestran que la LDLmm es capaz de inducir una redistribución de CD14 y TLR4 en la superficie celular de monocitos, lo que sugiere que la LDLmm señala a través de este complejo. Resultados similares fueron observados cuando se incubaron células en presencia de LPS [67]. La activación del TLR2 al estímulo del ácido lipoteicoico induce la redistribución y formación de parches de TLR2 en la superficie celular [68]. La LDLmm también indujo la redistribución de TLR2 en la superficie celular sugiriendo la participación de TLR2 en respuesta a la LDLmm.

CONCLUSIÓN

- Los resultados demuestran que los receptores CD14, TLR4, y TLR2 participan en la respuesta a la LDLmm, induciendo la producción de TNF- α en monocitos. La activación de estos receptores por LDLmm pueden contribuir al proceso inflamatorio en aterosclerosis.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Levi F**, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C. **2002**. Trends in mortality from cardiovascular and cerebrovascular diseases in Europe and other areas of the World. *Heart*. 88:119-124.
2. **Fuster V**. **1996**. Atherosclerosis and coronary artery disease. Lippincott-Raeven Publishers. Philadelphia. 1032-1050.
3. **Thygesen K**, Alpert JS, White HD, Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction. **2007**. Universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J*. 28:2525-2538.
4. **Overbaugh KJ**. **2009**. Acute coronary syndrome. *Am J Nurs*. 109:42-52.
5. **Lloyd-Jones D**, Adams R, Carnethon M, De Simone G, Ferguson TB, Flegal K, Ford E, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, Hailpern S, Ho M, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lackland D, Lisabeth L, Marelli A, McDermott M, Meigs J, Mozaffarian D, Nichol G, O'Donnell C, Roger V, Rosamond W, Sacco R, Sorlie P, Stafford R, Steinberger J, Thom T, Wasserthiel-Smoller S, Wong N, Wylie-Roserr J, Hong Y, American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. **2009**. Heart disease and stroke statistics_2009 update: A Report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*. 119 ;e21-e181.
6. <http://inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2006/muertos06.pdf>
7. **Ruesga Zamora EA**. **2005**. Cardiología. 1a Ed. El Manual Moderno. México. 535-540.
8. **Nicoletti A**, Caligiuri G, Hansson K. **2000**. Immunomodulation of atherosclerosis: myth and reality. *J Intern Med*. 247:397-495.
9. **Ross R**. **1999**. Mechanisms of disease. *New Engl J Med*. 340:115-126.
10. **Libby P**. **2002**. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 420:868-874.
11. **Jeon H**, Blacklow SC. **2005**. Structure and physiologic function of the low density lipoprotein receptor. *Annu Rev Biochem*. 74:535-562.
12. **Steinberg D**. **1997**. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation*. 95:1062-1071.
13. **Goldstein JL**, Ho YK, Basu SK, Brown MS. **1979**. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci USA*. 76:333-337.
14. **Morgan J**, Leake D. **1995**. Oxidation of low density lipoprotein by iron or copper at acidic pH. *J Lipid Res*. 36:2504-2512.
15. **Damasceno NR**, Sevanian A, Apolinario E, Oliveira JM, Fernandes I, Abdalla DS. **2006**. Detection of electronegative low density lipoprotein (LDL(-)) in plasma and atherosclerotic lesions by monoclonal antibody-based immunoassays. *Clin Biochem*. 39:28-38.
16. **Ylä-Herttuala S**, Palinski W, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Carew TE, Butler S, Witztum JL, Steinberg D. **1989**. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest*. 84:1086-1095.
17. **Bobryshev YV**. **2006**. Monocyte recruitment and foam cell formation in atherosclerosis. *Micron*. 37:208-222.

18. **Haberland ME**, Fong D, Cheng L. **1988**. Malondialdehyde-altered protein occurs in atheroma of Watanabe heritable hyperlipidemic. *Science*. 241:215-218.
19. **Liu KZ**, Cuddy TE, Pierce GN. **1992**. Oxidative status of lipoproteins in coronary disease patients. *Am Heart J*. 123:285-290.
20. **Greaves RD**, Channon MK. **2002**. Inflammation and immune responses in atherosclerosis. *Trends Immunol*. 23:535-541.
21. **Mehrabian M**, Allayee H. **2003**. 5-lipoxygenase and atherosclerosis. *Curr Op Lipid*. 14:447-457.
22. **Ley K**, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. **2007**. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Rev Immunol*. 7:678-689.
23. **Davies MJ**, Gordon JL, Gearing AJ. **1993**. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol*. 171:223-229.
24. **Winter PJM**, Hofker M. **2000**. Scavenging new insights into atherogenesis. *J Clin Invest*. 105:1039-1041.
25. **Mazzone T**. **2000**. Scavenger receptors in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 20:2506-2508.
26. **Netea GM**, Kullberg JB, Demacker NMP, Liesbeth EH, Verver-Jansen JG, Hijmans A, van Tits HJ, Hoenderop GJ, Willems GM, Van der Meer WM, Stalenhoef FH. **2002**. Native LDL potentiate TNF- α and IL-18 production by human mononuclear cells. *J Lipid Res*. 43:1065-1071.
27. **Kurt-Jones EA**, Beller DI, Mizel SB, Unanue ER. **1985**. Identification of a membrane-associated interleukin-1 in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*. 82:1024-1208.
28. **Kiri H**, Niwa T, Yamada Y, Wada H, Saito K, Iwakura Y, Asano M, Moriwaki H, Seishima M. **2003**. Lack of Interleukin-1 beta decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 23:656-660.
29. **Heinrich PC**, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. **2003**. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signaling and its regulation. *Biochem J*. 374:1-20.
30. **Schieffer B**, Selle T, Hilfiker A, Hilfiker-Kleiner D, Grote K, Tietge UJ, Trautwein C, Luchtefeld M, Schmittkamp C, Heeneman S, Daemen MJ, Drexler H. **2004**. Impact of interleukin-6 on plaque development and morphology in experimental atherosclerosis. *Circulation*. 110:3493-3500.
31. **McKellar GE**, McCarey DW, Sattar N, McInnes IB. **2009**. Role for TNF in atherosclerosis? Lessons from autoimmune disease. *Nat Rev Cardiol*. 6:410-417.
32. **Bradley JR**. **2008**. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol*. 214:149-160.
33. **Tenger C**, Sundborger A, Jawien J, Zhou X. **2005**. IL-18 accelerates atherosclerosis accompanied by elevation of IFN-gamma and CXCL16 expression independently of T cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 25:791-796.
34. **Lucas A**, Greaves RD. **2001**. Atherosclerosis: role of chemokines and macrophages. *Expert Rev Mol Med*. 5:1-18.
35. **Nelken NA**, Coughlin SR, Gordon D, Wilcox JN. **1991**. Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J Clin Invest*. 88:1121-1127.
36. **Bradley JR**. **2008**. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol*. 214:149-160.

37. **Mahmoudi M**, Curzen N, Gallagher PJ. **2007**. Atherogenesis: the role of inflammation and infection. *Histopathology*. 50:535-545.
38. **Schöbeck U**, Libby P. **2001**. CD40 signaling and plaque instability. *Circ Res*. 89: 1092-103.
39. **Bruemmer D**, Riggers U, Holzmeister J. **2001**. Expression of CD40 in vascular smooth muscle cells and macrophages is associated with early development of human atherosclerotic lesions. *Am J Cardiol*. 87:21-27.
40. **Greenwald RJ**, Freeman GJ, Sharpe AH. **2005**. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol*. 23:515-548.
41. **Dopheide JF**, Sester U, Schlitt A, Horstick G, Rupprecht HJ, Münzel T, Blankenberg S. **2007**. Monocyte-derived dendritic cells of patients with coronary artery disease show an increased expression of costimulatory molecules CD40, CD80 and CD86 *in vitro*. *Coron Artery Dis*. 18:523-531.
42. **Anderson KV**, Jurgens G, Nsslein-Volhard C. **1985**. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role the *Toll* gene product. *Cell*. 42:779-789.
43. **Lemaitre B**, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. **1996**. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 86:973-983.
44. **Tobias PS**, Curtis LK. **2007**. Toll-like receptors in atherosclerosis. *Biochem Soc Trans*. 35:1453-1455.
45. **Medshinov R**, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. **1997**. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 388: 394-397.
46. **Medshinov R**. **2001**. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 1: 135-45.
47. **Trinchieri G**, Sher A. **2007**. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol*. 7:179-190.
48. **Akira S**. **2003**. Toll like receptor signaling. *J Biol Chem*. 278:38105-38108.
49. **Xu XH**, Shad PK, Faure E, Equilis O, Thomas L, Fishbein MC, Luthringer D, Xu XP, Rajavashisth TB, Yano J, Kaul S, Arditi M. **2001**. Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. *Circulation*. 104:3103-3108.
50. **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.
51. **Schoneveld AH**, Hoefler I, Sluijter JP, Laman JD, de Kleijn DP, Pasterkamp G. **2008**. Atherosclerotic lesion development and toll like receptor 2 and 4 responsiveness. *Atherosclerosis*. 197:95-104.
52. **Mullick AE**, Tobias PS, Curtiss LK. **2005**. Modulation of atherosclerosis in mice by toll-like receptor 2. *J Clin Invest*. 115:3149-3156.
53. **Michelsen KS**, Wong MH, Shah PK, Zhang W, Yano J, Doherty TM, Akira S, Rajavashisth TB, Arditi M. **2004**. Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters phenotype in mice deficient in apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101:10685-10690.
54. **Björkbaka H**, Kunjathoor VV, Moore KJ, Koehn S, Ordija CM, Lee MA, Means T, Halmen K, Luster AD, Golenbock DT, Freeman MW. **2004**. Reduced

- atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways. *Nature Med.*10:416-21.
55. **Kiechl S**, Lorenz E, Reindel M, Wiedermann CJ, Oberhollenzer F, Bonora E, Willeit J, Schwartz DA. **2002**. Toll-like receptors 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med.* 347:185-192.
 56. **Miller IY**, Viriyakosol S, Binder JC, Feramisco JR, Kirkland TN, Witztum JL. **2003**. Minimally modified LDL binds to CD14, induces macrophage spreading via TLR4/MD-2, and inhibits phagocytosis of apoptotic cell. *J Biol Chem.* 278:1561-1568.
 57. **Liu X**, Ukai T, Yumoto H, Davey M, Goswami S, Gibson FC 3rd, Genco CA. **2008**. Toll-like receptor 2 plays a critical role in the progression of atherosclerosis that is independent of dietary lipids. *Atherosclerosis.* 196:146-154.
 58. **Holvoet P**, Davey PC, De Keyzer D, Doukouré M, Deridder E, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G, Beaufort E, Bishay K, Andrieux N, Benhabiles N, Marguerie G. **2006**. Oxidized low-density lipoprotein correlates positively with toll-like receptor 2 and interferon regulatory factor-1 and inversely with superoxide dismutase-1 expression: Studies in hypercholesterolemic swine and THP-1 cell. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26:1558-1565.
 59. **Kenuefermann P**, Nemoto S, Misra A, Nozaki N, Defreitas G, Goyert SM, Carabello BA, Mann DL, Vallejo JG. **2006**. CD14-deficient mice are protected against lipopolysaccharide-induced cardiac inflammation and left ventricular dysfunction. *Circulation.* 106:2608-2615.
 60. **Hubacek JA**, Rothe G, Pit'ha J, Skodová Z, Stanek V, Poledne R, Schmitz G. **1999**. C (-260)→T polymorphism in the promoter of the CD14 monocyte receptor gene as a risk factor for myocardial infarction. *Circulation.* 99:3218-3220.
 61. **Patiño R**, Ibarra J, Rodriguez A, Yague MR, Pintor E, Fernandez-Cruz A, Figueredo A. **2000**. Circulating monocytes in patients with diabetes mellitus, arterial disease, and increased CD14 expression. *Am J Cardiol.* 85: 1288-1291.
 62. **Pasini AF**, Anselmi M, Garbin U, Franchi E, Stranieri C, Nava MC, Boccioletti V, Vassanelli C, Cominacini L. **2007**. Enhanced levels of oxidized low-density lipoprotein prime monocytes to cytokine overproduction via upregulation of CD14 and toll-like receptor 4 in unstable angina. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27:1991-1997.
 63. **Methe H**, Kim JO, Kofler S, Weis M, Nabauer M, Koglin J. **2005**. Expansion of circulation toll-like receptor 4-positive monocytes in patients with acute coronary syndrome. *Circulation.* 111:2654-2661.
 64. **Shuto T**, Kato K, Mori Y, Viriyakosol S, Oba M, Furuta T, Okiyoneda T, Arima H, Suico MA, Kai H. **2005**. Membrane-anchored CD14 is required for LPS-induced TLR4 endocytosis in TLR4/MD-2/CD14 overexpressing CHO cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 338:1402-1490.
 65. **Jiang Q**, Akashi S, Miyake K. **2000**. Lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and toll-like receptor 4 (TLR4) prior to nuclear translocation of NF-kappa B. *J Immunol.* 165:3541-3544.
 66. **Holvoet P**, Davey PC, De Keyzer D, Doukouré M, Deridder E, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G, Beaufort E, Bishay K, Andrieux N, Benhabiles N, Marguerie G. **2006**. Oxidized low-density lipoprotein correlates positively with toll-like receptor 2 and interferon regulatory factor-1 and inversely with superoxide dismutase-1

- expression: studies in hypercholesterolemic swine and THP-1 cells. *Arterioscler Throm Vasc Biol.* 26:1558-1565.
67. **Husebye H**, Halaas Ø, Stenmark H, Tunheim G, Sandanger Ø, Bogen B, Brech A, Latz E, Espevik T. **2006**. Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity. *EMBO J.* 25:683-692.
68. **Trianrafilou M**, Gamper FG, Haston RM, Mouratis MA, Morath S, Hartung T, Triantafilou K. **2006**. Membrane sorting of toll-like receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 heterodimers at the cell surface determines heterotypic associations with CD36 and intracellular targeting. *J Biol Chem.* 281:31002-31011.