



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

## FACULTAD DE QUÍMICA

PARTICIPACIÓN DE TLR2, TLR4 Y CD36 EN LA ACTIVACIÓN Y  
FORMACIÓN DE CÉLULAS ESPUMOSAS EN MACRÓFAGOS AL  
ESTÍMULO DE LA LDL<sub>ox</sub>

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:  
MONTSERRAT GUADALUPE GARZA REYES

MÉXICO, D.F. MAYO 2013





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**           **Profesor: Saturnino De León Chapa**

**VOCAL:**                 **Profesor: Patricia Elvira Berrón Ruiz**

**SECRETARIO:**       **Profesor: Luis Chávez Sánchez**

**1° SUPLENTE:**       **Profesor: Enrique Ortega Soto**

**2° SUPLENTE:**       **Profesor: Sonia Mayra Pérez Tapia**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: EL PRESENTE TRABAJO FUE DESARROLLADO EN LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOLOGÍA, UNIDAD DE ALTA ESPECIALIDAD DEL HOSPITAL DE PEDIATRÍA, CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.**

**ASESOR DEL TEMA:**

---

**DR. LUIS CHÁVEZ SÁNCHEZ**

**SUSTENTANTE:**

---

**MONTSERRAT GUADALUPE GARZA REYES**

Este trabajo fue financiado en parte con el apoyo del proyecto de Investigación Científica Básica con número 177669 de la convocatoria 2012 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y con el apoyo del programa del Fondo de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) con número FIS/IMSS/PROT/G11-2/1022.

## ÍNDICE

|  |     |
|--|-----|
| ABREVIATURAS .....   | I   |
| ÍNDICE DE FIGURAS .....  | III |
| INTRODUCCIÓN .....   | 1   |
| MARCO TEÓRICO .....  | 2   |
| Síndromes coronarios. ....   | 2   |
| Lipoproteína de baja densidad .....  | 3   |
| Aterosclerosis y el desarrollo de la placa aterosclerosa. ....                 | 4   |
| Macrófagos en aterosclerosis.....  | 5   |
| Moléculas co-estimuladoras involucradas en la aterosclerosis .....             | 7   |
| Receptores tipo Toll (TLRs).....   | 7   |
| TLRs y enfermedades cardiovasculares .....                                     | 12  |
| CD36 y enfermedades cardiovasculares.....                                      | 12  |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....   | 15  |
| OBJETIVOS.....   | 16  |
| General.....   | 16  |
| Específicos. ....  | 16  |
| HIPÓTESIS.....   | 17  |
| METODOLOGÍA .....  | 18  |
| Obtención de lipoproteína de baja densidad. ....                               | 18  |
| Análisis de la LDL.....  | 18  |
| Oxidación de la lipoproteína de baja densidad. ....                            | 19  |
| Determinación del grado de oxidación de la lipoproteína de baja densidad... .. | 19  |
| Detección de endotoxinas en la lipoproteína de baja densidad.....              | 19  |
| Obtención de células mononucleares.....  | 20  |
| Purificación de monocitos humanos por selección negativa.....                  | 20  |
| Diferenciación de monocitos humanos a macrófagos. ....                         | 21  |
| Marcadores de superficie de monocitos durante la diferenciación. ....          | 21  |
| Evaluación de la capacidad fagocítica.....                                     | 22  |
| Capacidad de inhibición de anti-TLR2, anti-TLR4 y anti-CD36. ....              | 22  |

|   |    |
|---|----|
| Ensayos de bloqueo de TLR2, TLR4 y CD36 al estímulo de la LDLox. ....                                 | 22 |
| Determinación de la expresión de moléculas co-estimuladoras.....                                      | 23 |
| Evaluación de la formación de células espumosas. ....   | 23 |
| Análisis estadístico.....   | 24 |
| DIAGRAMA DE FLUJO.....  | 25 |
| RESULTADOS.....   | 26 |
| Obtención y oxidación de la LDL.....  | 26 |
| Expresión de marcadores de superficie de los monocitos durante su<br>diferenciación a macrófagos..... | 27 |
| Funcionalidad de los macrófagos.....  | 27 |
| Capacidad de inhibición de los anticuerpos anti-TLR2 y anti-TLR4 .....                                | 29 |
| Papel de TLR2 en la expresión de HLA-DR y CD86 en respuesta a LDLox ..                                | 29 |
| El bloqueo de TLR4 afecta la expresión de HLA-DR y de CD86 en macrófagos<br>humanos.....              | 29 |
| El papel de CD36 en la expresión de HLA-DR y CD86 en respuesta LDLox .                                | 32 |
| Participación de TLR2 en la formación de células espumosas.....                                       | 33 |
| Papel de TLR4 en la formación de células espumosas.....   | 33 |
| El bloqueo de CD36 protege la formación de células espumosas.....                                     | 33 |
| DISCUSIÓN .....   | 36 |
| CONCLUSIÓN .....  | 39 |
| PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES.....   | 40 |
| REFERENCIAS.....  | 41 |
| ANEXO. ....   | 46 |

## Abreviaturas

|               |   |
|---------------|---|
| Ab            | Anticuerpo  |
| Apo B         | Apolipoproteína B   |
| Apo E         | Apolipoproteína E   |
| DNA           | Ácido desoxirribonucleico                                   |
| DC            | Célula dendrítica   |
| FITC          | Isotiocianato de fluoresceína                               |
| GM-CSF        | Factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos |
| HDL           | Lipoproteína de alta densidad                               |
| ICAM-1        | Molécula de adhesión intercelular-1                         |
| IFN- $\gamma$ | Interferón- $\gamma$  |
| IKB           | Inhibidor del factor nuclear kappa-Beta                     |
| IL            | Interleucina  |
| IRAK          | Cinasa asociada al receptor de interleucina                 |
| IRF           | Factor regulatorio de interferón                            |
| 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                       |
| M-CSF         | Factor estimulador de colonias de macrófagos                |

|                  |   |
|------------------|---|
| MDA              | Malonaldehído   |
| MHC              | Complejo mayor de histocompatibilidad                                   |
| MIP-2            | Proteína inflamatoria de macrófagos-2                                   |
| MMP              | Metaloproteinasas de matriz   |
| MyD88            | Gen de la respuesta primaria para diferenciación mieloide 88            |
| NF- $\kappa$ B   | 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              |
| RNA              | Ácido ribonucleico  |
| RNA <sub>m</sub> | Ácido ribonucleico mensajero  |
| RRL              | Repeticiones ricas en leucina.  |
| TBA              | Ácido 2-tiobarbitúrico  |
| TBK1             | Cinasa de unión a TANK1   |
| TIR              | Dominio homólogo al receptor Toll/ Interleucina-1                       |
| TIRAP            | Proteína adaptadora del dominio TIR                                     |
| TLR              | Receptor tipo Toll  |
| TNF- $\alpha$    | Factor de necrosis tumoral- $\alpha$                                    |
| TRAF             | Factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral              |
| TRIF             | Proteínas adaptadoras asociadas al dominio TIR inductoras de interferón |
| VCAM             | Molécula de adhesión de células vasculares                              |
| VLDL             | Lipoproteína de muy baja densidad                                       |

## Índice de figuras

|                   |  |    |
|-------------------|--|----|
| <b>Figura 1.</b>  | Estructura de la lipoproteína de baja densidad.  | 3  |
| <b>Figura 2.</b>  | Desarrollo de la placa aterosclerosa.  | 6  |
| <b>Figura 3.</b>  | Estructura del receptor tipo Toll.   | 8  |
| <b>Figura 4.</b>  | Representación esquemática de las vías de señalización de los TLR.                               | 11 |
| <b>Figura 5.</b>  | Estructura del receptor CD36.  | 14 |
| <b>Figura 6.</b>  | Caracterización de la lipoproteína de baja densidad obtenida por ultracentrifugación.            | 25 |
| <b>Figura 7.</b>  | Grado de oxidación de LDL y LDLox  | 26 |
| <b>Figura 8.</b>  | Expresión de CCR2 en la diferenciación de macrófagos.  | 27 |
| <b>Figura 9.</b>  | Fagocitosis de partículas de Zymosan-FITC en monocitos y macrófagos.                             | 27 |
| <b>Figura 10.</b> | Capacidad de los anticuerpos anti-TLR2 y anti-TLR4 en inhibir la expresión de CD86.              | 29 |
| <b>Figura 11.</b> | El papel de TLR2 en la expresión de HLA-DR y CD86 en respuesta a LDLox.                          | 30 |
| <b>Figura 12.</b> | El bloqueo de TLR4 inhibe la expresión de HLA-DR y CD86.   | 30 |
| <b>Figura 13.</b> | El papel de CD36 inhibe la expresión de HLA-DR y CD86.   | 31 |
| <b>Figura 14.</b> | Papel de TLR2, TLR4 y CD36 en la formación de células espumosas.                                 | 33 |
| <b>Figura 15.</b> | Cuantificación de células espumosas.   | 34 |
| <b>Figura 16.</b> | Estrategia utilizada para el análisis de las distintas moléculas determinadas en los macrófagos. | 46 |
| <b>Figura 17.</b> | Histogramas representativos de la expresión de CCR2 y fagocitosis de Zymosan-FITC.               | 46 |

|                   |  |    |
|-------------------|--|----|
| <b>Figura 18.</b> | Histograma representativo de la expresión de HLA-DR y CD86.                      | 47 |
| <b>Figura 19.</b> | Histograma representativo de la expresión de HLA-DR y CD86 al estímulo de LDLox. | 47 |

## **Introducción**

Las enfermedades cardiovasculares, en particular los síndromes isquémicos agudos son la principal causa de muerte en países desarrollados; mientras que en México, son la segunda causa de muerte de la población en general. La aterosclerosis es considerada un padecimiento inflamatorio crónico, en la que los receptores tipo Toll (TLR) y CD36 son claves. Diversos estudios in vivo han demostrado que la deficiencia de TLR2, TLR4 y CD36, reducen el desarrollo de la placa aterosclerosa, a través de una disminución de citocinas pro-inflamatorias como la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP)-1, lo que produce un menor infiltrado de macrófagos en el sitio de la lesión. Muchos estudios han mostrado que diferentes formas de lipoproteínas de baja densidad oxidada (LDLox) contribuyen al desarrollo de la lesión aterosclerosa causando una respuesta inflamatoria, la cual es caracterizada por la presencia de macrófagos en la lesión que subsecuentemente son transformados en células espumosas. Recientemente, se ha demostrado que la LDLox induce la secreción de citocinas pro-inflamatorias como interleucina (IL)-1 $\beta$  e IL-6, dependientes de TLR2 y TLR4 en macrófagos humanos.

A pesar de la evidencia existente se desconoce si la activación de TLR2, TLR4 y CD36 por la LDLox induzca la expresión de moléculas co-estimuladoras como CD86, así como su papel en la formación de células espumosas, por lo que fue adecuado plantear:

¿Cuál es el papel de los receptores TLR2, TLR4 y CD36 en la expresión de HLA-DR y CD86, así como en la formación de células espumosas al estímulo de LDLox?

## **Marco teórico**

### Síndromes coronarios.

Los síndromes isquémicos coronarios agudos 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 de la población (1), mientras que en México, los síndromes isquémicos coronarios agudos fueron la segunda causa de muerte en población general durante 2008 originando 59,579 muertes de las cuales 37,380 se presentaron en individuos mayores de 65 años y 14,968 en individuos en edad productiva.(2) Constituyen un grupo de padecimientos que abarcan las distintas formas de presentación de cardiopatía isquémica. La patogenia es compleja y se encuentra ligada con la proliferación de células del musculo liso, síntesis de tejido conectivo en la matriz, acumulación localizada de monocitos/macrófagos, infiltrados de linfocitos y acumulación lipídica tanto intracelular como extracelular.

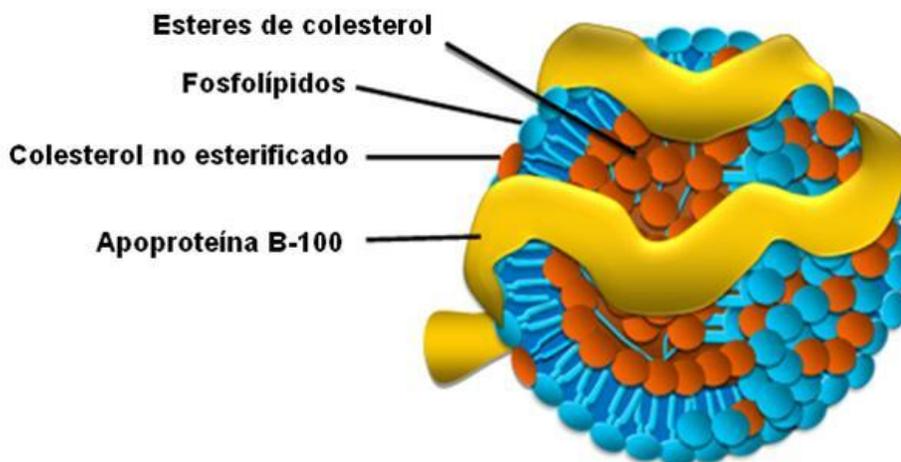
En condiciones normales la circulación arterial coronaria proporciona riego sanguíneo suficiente para satisfacer las demandas del miocardio. Un desequilibrio en el aporte y demanda puede precipitar isquemia. Diversos mecanismos patológicos pueden interferir con el flujo sanguíneo a través de las arterias coronarias e inducir de esta manera isquemia (3). La enfermedad coronaria y cerebrovascular son las formas más comunes de enfermedades cardiovasculares, cuya característica subyacente es la aterosclerosis (4), que es la alteración patológica más frecuente al presentarse estenosis (estrechamiento) de una arteria coronaria principal en más del 50% altera el flujo sanguíneo en situaciones de mayor demanda de oxígeno (3).

Los factores de riesgo asociados con las enfermedades cardiovasculares son: dislipidemias, diabetes mellitus, hipertensión arterial sistémica, tabaquismo, síndrome metabólico, obesidad e inactividad física, además de algunas infecciones por microorganismos tales como citomegalovirus, *Chlamydia pneumoniae* y *Helicobacter pylori*, entre otros (5-7); de estos, las dislipidemias y en particular niveles elevados de colesterol total en suero y elevadas

concentraciones de lipoproteína de baja densidad (LDL), así como bajas concentraciones de lipoproteína de alta densidad (HDL), han cobrado importancia como uno de los factores más importantes de riesgo de aterosclerosis.

### Lipoproteína de baja densidad

La LDL (figura 1) es una molécula pro-aterogénica que es modificada por oxidación a lipoproteína de baja densidad oxidada (LDL<sub>ox</sub>), la cual tiene un papel importante en la iniciación, progresión y desestabilización de las placas ateroscleróticas. La LDL es una molécula esférica con 2nm de diámetro y 2500 KDa de peso molecular, esta proteína 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, principalmente fosfatidilcolina, y 600 moléculas de colesterol libre, embebida en la monocapa se localiza la apolipoproteína B-100 (ApoB-100), constituida de 4536 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 500 KDa, la cual es susceptible a oxidación (8,9).



**Figura 1. Estructura de la lipoproteína de baja densidad.** La LDL es una molécula esférica compuesta por la ApoB-100, fosfolípidos, ésteres de colesterol y colesterol no esterificado (modificado de 8).

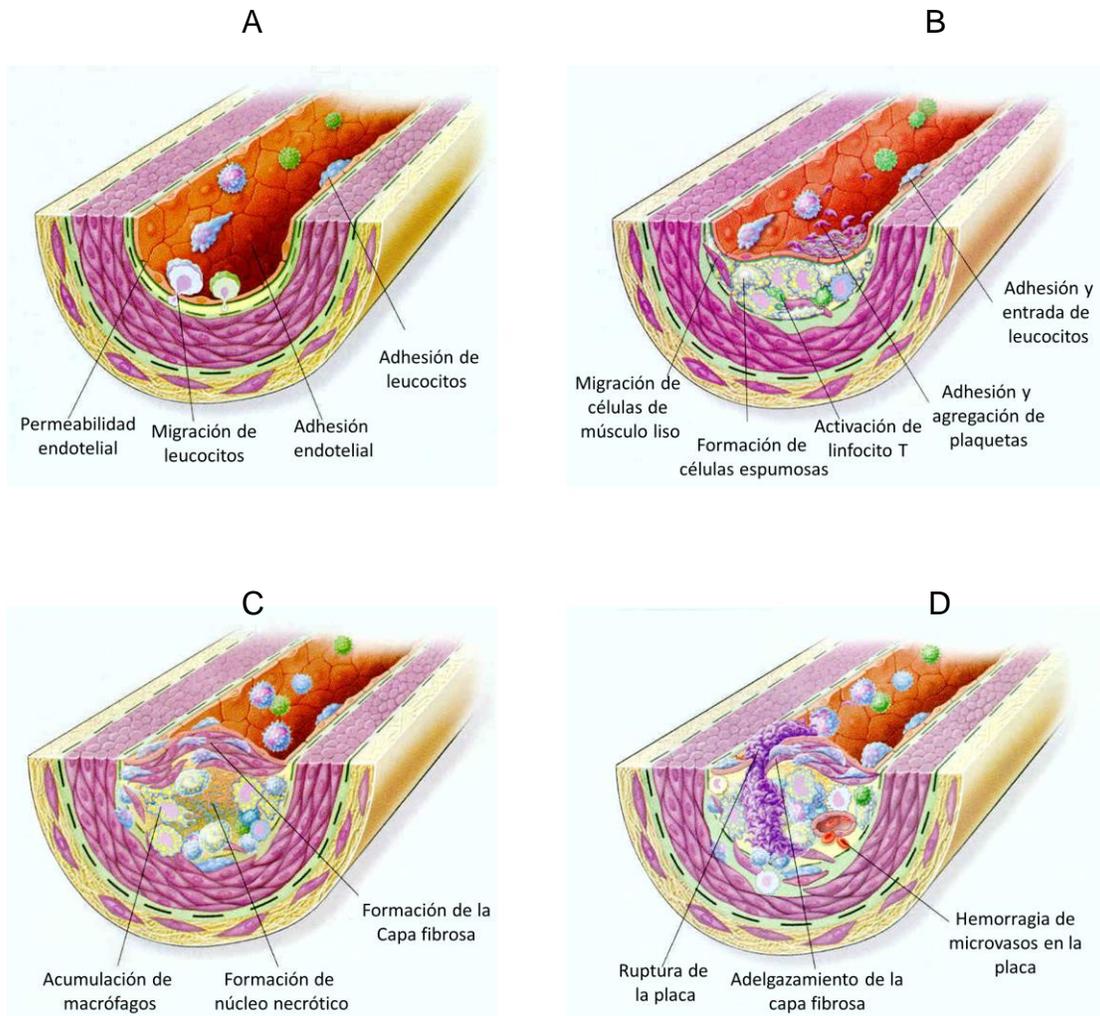
### Aterosclerosis y el desarrollo de la placa aterosclerosa.

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica que puede afectar todas las arterias, particularmente cardíacas, cerebrales y renales (5). El proceso aterogénico inicia con la disfunción endotelial que representa uno de los primeros estadios en la patogénesis. La primera fase consiste en una pérdida de las funciones homeostáticas del endotelio (anti-adhesiva, anti-agregante, anti-proliferativa, anti-oxidante, anti-trombótica y reguladora del tono vaso motor) y como consecuencia (en presencia de un endotelio disfuncional) se observa la expresión de moléculas de adhesión tales como las selectinas (E y P), moléculas de adhesión de plaquetas a células endoteliales (PECAM-1)-1, moléculas de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) y moléculas de adhesión de células vasculares (VCAM) mediante las cuales se produce la interacción entre las células T y los monocitos circulantes con las células endoteliales (figura 2A) (7,10); además, las células del endotelio liberan quimioatrayentes como la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP)-1, estimulando la migración de monocitos al sitio de la lesión (11). Estos cambios tempranos que preceden a la formación de la lesión aterosclerosa incluyen un aumento en la permeabilidad endotelial a la LDL que es retenida por interacciones de los grupos positivos de lisina y arginina que interactúan con cargas negativas de grupos sulfatos de cadenas de glicosaminoglicanos de proteoglicanos. La LDL es modificada por lipoperoxidación en el espacio subendotelial por compuestos reactivos del oxígeno, generándose una forma oxidada de LDL con propiedades quimioatrayentes de monocitos y linfocitos; el aumento de partículas de LDL en el espacio subendotelial inicia la formación de la placa aterosclerosa (6). En la lesión existe un infiltrado de macrófagos que expresan en su superficie celular receptores “scavenger” clase A tipo I y II, clase B y CD36 mediante los cuales identifican y endocitan partículas de LDL modificada oxidativamente y se transforman en células espumosas (figura 2B) (12). Otro evento que se inicia es la muerte celular de macrófagos por interferón (IFN)- $\gamma$  que puede ser generada por la acumulación de lípidos promoviendo el avance del núcleo necrótico en la placa (figura 2C). En la última etapa de la aterosclerosis ocurre ruptura o ulceración de la placa fibrosa; 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- $\gamma$  secretado por linfocitos T, los macrófagos degradan la matriz de la capa fibrosa por medio de colagenasa intersticial, gelatinasa y estromilisina. La degradación de la capa fibrosa frecuentemente se origina en los hombros de la lesión y puede conducir a una hemorragia, donde las plaquetas activadas se adhieren a la arteria lesionada ocasionando la formación de un trombo y la oclusión de la arteria (figura 2D) (6,7).

### Macrófagos en aterosclerosis

Los monocitos son de las primeras células inflamatorias que se reclutan en las lesiones aterosclerosas, los cuales a través del factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) se diferencian a macrófagos (13). Los macrófagos secretan diversos mediadores inflamatorios como la IL-1 $\beta$  y TNF, los cuales favorecen la expresión de moléculas de adhesión como la selectina-E, ICAM-1, VCAM-1 por células endoteliales, lo que contribuye al reclutamiento de leucocitos a la lesión (14,15). Los macrófagos secretan factores de crecimiento, en los que se incluye al factor de crecimiento derivado de plaquetas, que permite el crecimiento de células musculares lisas. También, secretan proteasas como las metaloproteinasas de matriz (MMP) (16), por ejemplo la MMP-1, MMP-10, las cuales causan ruptura de la placa (17). Uno de los mecanismos cruciales de los macrófagos en la patogénesis de la aterosclerosis, es la internalización de partículas de LDL oxidada, lo que induce la formación de células espumosas, lo que conlleva al desarrollo de la placa aterosclerosa (6,7).



**Figura 2. Desarrollo de la placa aterosclerosa.** (2A) La lesión se origina por un daño al endotelio, lo que permite un incremento en la permeabilidad endotelial, ocasionando la migración y adhesión de leucocitos. (2B) En la siguiente etapa de la lesión, las células de músculo liso migran a la lesión, los macrófagos se transforman a células espumosas, los linfocitos T presentes se activan, las plaquetas se adhieren y agregan a la lesión y continúa el arribo de leucocitos. (2C) En la lesión ocurre una acumulación de macrófagos los cuales mueren por apoptosis o necrosis, generándose el núcleo necrótico y formación de la capa fibrosa. (2D) En las etapas finales la lesión sufre un adelgazamiento de la capa fibrosa, ruptura de la placa y hemorragias de microvasos (modificado de 7).

### Moléculas co-estimuladoras involucradas en la aterosclerosis

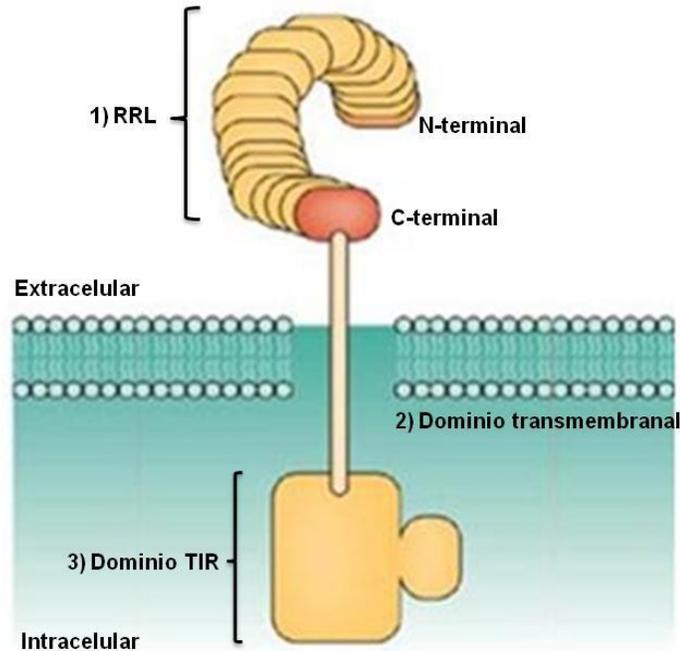
En el proceso de formación de la placa aterosclerosa, se expresan moléculas de histocompatibilidad clase II, CD40 y CD86. En particular se ha demostrado la expresión de moléculas de histocompatibilidad clase II, en macrófagos infiltrados en las placas aterosclerosas humanas (18). Las moléculas del MHC clase II juegan un papel clave en la inmunidad celular adquirida por la presentación de antígenos a linfocitos T (19); más aun se ha demostrado que la LDLox es capaz de inducir un incremento en la expresión de MHC-II en monocitos y células dendríticas (20,21). También, se ha determinado que el estímulo de monocitos con LDLox, incrementa la expresión de CD86 y se induce la 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- $\gamma$  (22). 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; este incremento correlacionó de forma positiva con factores de riesgo (23).

### Receptores tipo Toll (TLRs)

A pesar de que aún no existen conocimientos suficientes que demuestren el posible mecanismo que provoca el proceso inflamatorio en la aterosclerosis, diversos estudios han demostrado que los receptores tipo Toll (TLR) juegan un papel esencial en la respuesta inflamatoria y al parecer contribuyen de forma importante en la enfermedad aterosclerosa (24).

Los TLR son receptores transmembranales tipo I (figura 3), que se han conservado filogenéticamente y participan en la respuesta inmune innata brindando protección por el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP); estos presentan tres características estructurales: 1) tienen bloques de 16-28 motivos de aminoácidos llamados repeticiones ricas en leucina que une a diversos ligandos, 2) Dominio transmembranal corto y, 3) Dominio

citoplásmico homólogo al receptor de interleucina-1, el cual es necesario para el inicio de las cascadas de señalización (25).



**Figura 3. Estructura del receptor tipo Toll.** El TLR presenta un dominio intracelular, transmembranal y extracelular. RRL, repeticiones ricas en leucina; N-terminal, amino terminal; C-terminal, carboxilo terminal; dominio TIR, receptor Toll/IL-1R (modificado de 25).

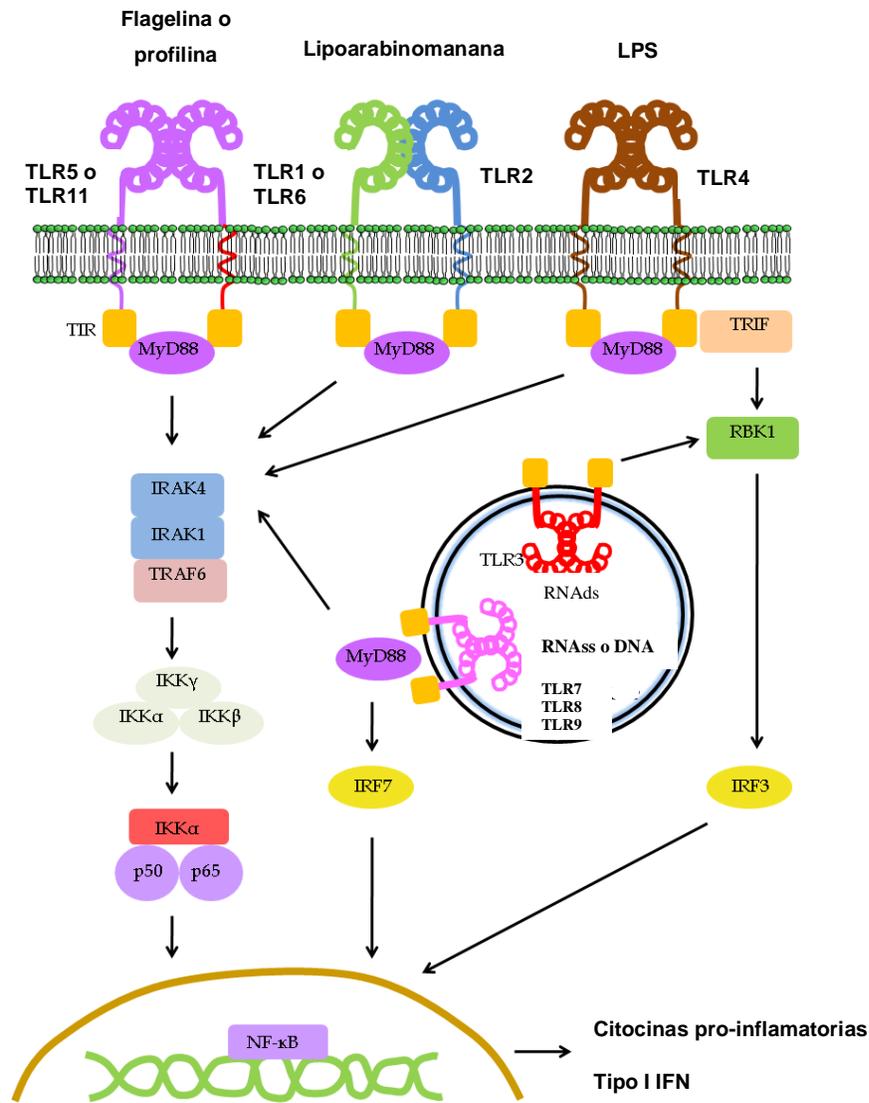
Estudios *ex vivo* establecen que los TLR están involucrados en el reconocimiento de moléculas provenientes de microorganismos (Cuadro 1).

El TLR1, TLR2, TLR4 y TLR6 se pueden encontrar en la superficie de las células y reconocen PAMPs de patógenos extracelulares. También, otros TLR (TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9) se localizan en interior de las células en endosomas y reconocen principalmente ácidos nucleicos de virus y bacterias (26).

**Cuadro 1. TLRs y sus ligandos (Modificado de 26).**

| <b>TLR</b>   | <b>Ligandos</b>  | <b>Origen Ligando</b>   |
|--------------|--|---|
| <b>TLR1</b>  | Forma heterodimero con TLR2; lipopeptidos diacetilados.  | <i>Mycobacterium tuberculosis</i>   |
| <b>TLR2</b>  | Peptidoglicano<br>Lipoarabinomanana<br>Lipopolisacárido<br>Fosfolipomanana   | <i>Staphylococcus aureus</i><br><i>Mycobacterium tuberculosis</i><br><i>Salmonella typhimurium</i><br><i>Candida albicans</i> |
| <b>TLR3</b>  | RNA viral de cadena sencilla<br>RNA de doble cadena  | Virus   |
| <b>TLR4</b>  | Lipopolisacáridos<br>Ácido lipoteicoico<br>Fibronectina<br>Proteína F de envoltura viral<br>Fosfatidilinositol manosidos | Bacterias Gram negativas<br>Bacterias Gram positivas<br>Virus sincial respiratorio<br><i>Mycobacterium tuberculosis</i>       |
| <b>TLR5</b>  | Flagelina  | <i>Salmonella typhimurium</i>   |
| <b>TLR6</b>  | Forma heterodímero con TLR2;<br>Lipopéptidos diacilados<br>Peptidoglicano<br>Zymosan                                     | Micoplasma  |
| <b>TLR7</b>  | RNA de cadena sencilla   | Virus   |
| <b>TLR8</b>  | RNA de cadena sencilla   | Virus   |
| <b>TLR9</b>  | Motivos CpG no metilados en DNA  | Bacterias y virus   |
| <b>TLR10</b> | Aún desconocido, posiblemente interactúe con TLR2  |   |
| <b>TLR11</b> | Profilina  | <i>Toxoplasma gondii</i>  |

Los TLR reconocen una gran cantidad de componentes microbianos formando heterodímeros, dímeros o colaborando con otros receptores como CD36. La activación de los TLR se inicia principalmente a través de las vías de señalización dependiente e independiente de MyD88 (figura 4). En la ruta de señalización dependiente de MyD88 (gen de la respuesta primaria para diferenciación mieloide), la proteína adaptadora del dominio TIR (TIRAP) es reclutada al dominio TIR (dominio homólogo al receptor Toll/ Interleucina-1), así como MyD88 interaccionando con la cinasa asociada al receptor de interleucina (IRAK)-4 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 del inhibidor del factor nuclear kappa-B (IKB) permitiendo la liberación y posterior translocación del factor nuclear kappa-B (NF-κB) al núcleo. Los TLR3 y TLR4 señalizan a través de la vía independiente de MyD88. En la ruta de señalización las proteínas adaptadoras asociadas al dominio TIR inductoras de interferón (TRIF) interactúan con el factor asociado al receptor de TNF (TRAF)-6 y con cinasas de unión a TANK (TBK)-1. La activación de TRIF dependiente de TBK1 conduce a la fosforilación del factor regulador de interferón (IRF)-3 y TRAF6 mediante la activación de NF-κB. La activación de IRF3 y NF-κB contribuyen a la síntesis de IFN-β, la activación de las rutas de señalización de los TLR inducen la activación de los factores NF-κB e IRF, involucrados en activar múltiples genes inflamatorios como TNF-α, IL-1β, IL-6, IFN-β, CD80, CD86, ICAM-1, VCAM-1, IL-8 y MIP1-α, entre otras moléculas (27).



**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 28).

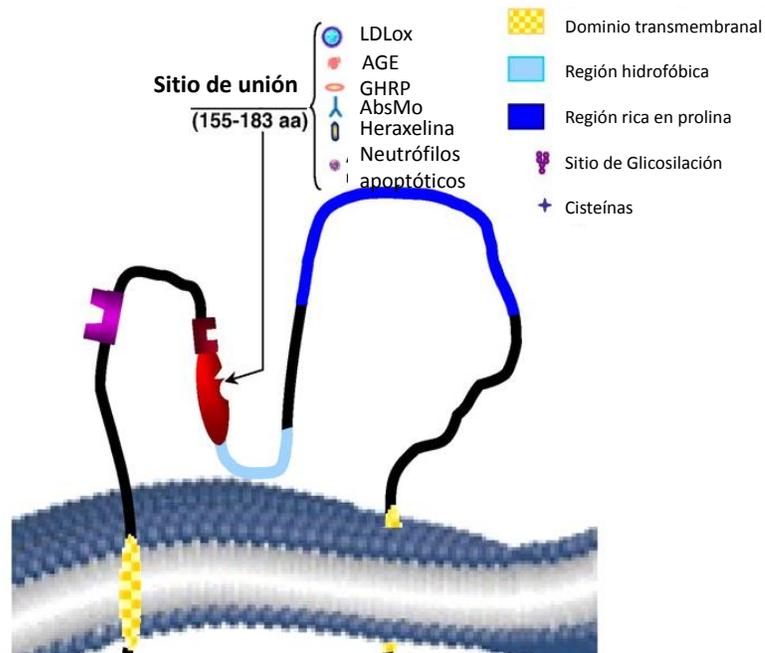
### TLRs y enfermedades cardiovasculares

Estudios previos han demostrado un incremento en la expresión de TLR2 y TLR4 en células endoteliales y macrófagos de lesiones aterosclerosas de ratón y humanas, que ha sido asociado con la respuesta inflamatoria (29,30). Evidencias *in vivo* han demostrado que una dieta rica en grasas incrementa los niveles de RNAm para TLR2 en la placa aterosclerosa de ratones ApoE<sup>-/-</sup>; en este contexto, al comparar las placas aterosclerosas de ratones ApoE<sup>-/-</sup> y ApoE<sup>-/-</sup> TLR2<sup>-/-</sup> se determinó una reducción de la placa aterosclerosa en los ratones ApoE<sup>-/-</sup>TLR2<sup>-/-</sup>, así como una disminución de la quimiocina MCP-1, lo que produjo menor infiltrado de macrófagos en el sitio de la lesión (31). Otro grupo determinó en ratones ApoE<sup>-/-</sup>TLR4<sup>-/-</sup> una reducción del 24% de la placa aterosclerosa, comparado con el ratón ApoE<sup>-/-</sup> (32). Como apoyo a estas evidencias está el hecho de la participación de la molécula MyD88 en el desarrollo de la lesión; dos reportes por separado demuestran el papel de la molécula adaptadora MyD88 en la enfermedad aterosclerosa, usando ratones ApoE<sup>-/-</sup>MyD88<sup>-/-</sup>, las investigaciones revelaron una reducción del 65% en el tamaño de la lesión (32,33). La activación de los TLR en la placa aterosclerosa, puede producirse por ligandos endógenos como la LDLox. En monocitos de sangre periférica de personas sanas, la LDLox incrementa la expresión del transcrito de TLR4 (29) y en células espumosas incrementa la expresión de TLR2 (31), también, se ha demostrado que el incremento de TLR2 correlaciona de forma positiva con el aumento de LDLox en la placa aterosclerosa [33]. Además, se ha demostrado que la LDL mínimamente modificada (LDLmm) induce la secreción de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  en macrófagos (34).

### CD36 y enfermedades cardiovasculares

El receptor “scavenger” CD36 (figura 5) es una glicoproteína de membrana, de la familia de receptores scavenger clase B, el cual consiste de un dominio extracelular grande, dos dominios transmembranales y dos colas citoplásmicas cortas (35). Diversas evidencias han de mostrado que la deficiencia de CD36 reduce el área de la lesión alrededor del 61%, así como una reducción

considerable de los niveles de citocinas circulantes en suero de ratones CD36<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>, al compararse con ratones ApoE<sup>-/-</sup> (36). El receptor CD36 se expresa en diferentes tipos celulares como son células de la microglía, endotelio microvascular, adipocitos, plaquetas y macrófagos; reconoce una amplia variedad de ligandos y es uno de los principales receptores responsables de la unión e internalización de LDLox (37). El estímulo de LDLox en macrófagos dispara la secreción de citocinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-1- $\beta$ , cuya secreción disminuye considerablemente en macrófagos humanos deficientes de CD36 en respuesta a la LDLox (38). Múltiples evidencias han demostrado que CD36 es esencial en la formación de células espumosas y que su bloqueo o deficiencia reduce la formación de células espumosas (37,39). Recientemente se ha sugerido a CD36 como correceptor de TLR2 y TLR6 en respuesta a diacilglicéridos y a ácido lipoteicoico (40,41), así como del heterodímero TLR4/6 en respuesta a LDLox (40). Por consiguiente, estos datos sugieren un papel potencial de TLR2, TLR4 y CD36 en el fenómeno inflamatorio y en la formación de células espumosas, en respuesta a la LDLox.



**Figura 5. Estructura del receptor CD36.** El CD36 presenta un dominio extracelular transmembranar y citoplásmico. La región 155–183 de aminoácidos es el sitio de unión de LDLox, productos finales de la glicosilación avanzada, péptido heraxelin de la hormona liberadora de crecimiento, anticuerpos monoclonales y neutrófilos apoptóticos (modificado de 37).

## **Planteamiento del problema**

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica, uno de los posibles factores que inducen esta respuesta es la LDLox, la cual induce la secreción de citocinas pro-inflamatorias, sobre-regulación de la expresión de moléculas co-estimuladoras como CD86, así como la formación de células espumosas. La importancia de los receptores TLR2, TLR4 y CD36 en aterosclerosis es apoyada por datos obtenidos en modelos animales con un fondo genético deficiente de estos receptores, los cuales presentan una disminución significativa de la aterosclerosis aórtica, lo cual establece un papel claro de estos receptores en la enfermedad; a pesar de que aún no existen conocimientos suficientes que demuestren el posible mecanismo que provoca el fenómeno pro-inflamatorio, diversas evidencias han demostrado que TLR2, TLR4 y CD36 juegan un papel esencial en las respuestas inflamatorias y al parecer contribuyen de forma importante en la enfermedad aterosclerosa; por lo que fue adecuado plantear:

¿Cuál es el papel que juegan los receptores TLR2, TLR4 y CD36 en disparar la activación de macrófagos, así como la participación de estos receptores en la formación de células espumosas al estímulo de la LDLox?

## **Objetivos.**

### General.

- \* Demostrar que la activación de TLR2, TLR4 y CD36 por la LDLox, induce la activación de macrófagos, así como la formación de células espumosas.

### Específicos.

- \* Determinar si los receptores TLR2, TLR4 y CD36 participan en la sobre-regulación de la expresión de HLA-DR y CD86 en macrófagos, al ser estimulados con la LDLox.
- \* Determinar si los receptores TLR2, TLR4 y CD36 participan en la formación de células espumosas.

**Hipótesis.**

La activación de TLR2, TLR4 y CD36 por la LDLox, inducirá la sobre-regulación de HLA-DR y CD86, así como en la formación de células espumosas en macrófagos humanos.

## **Metodología**

### Obtención de lipoproteína de baja densidad.

LDL se obtuvo a partir de plasma humano de 6 donadores sanos, se ajustó a una densidad de 1.2 g/ml con KBr (J.T. Baker), posteriormente se colocaron 2.5 ml de plasma (densidad: 1.2 g/ml) y 2.5 ml de solución salina (densidad: 1.006g/ml) libre de pirógenos en ocho tubos y se centrifugaron durante 4 horas a 80,000 rpm a 4°C en microultracentrifuga (Sorvall Discovery M150 SE en rotor S80ST3). Posteriormente, se separó la banda superior correspondiente a la lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) localizada a una densidad de 1.006 g/ml. El resto del volumen se colocó en otro tubo y se adicionaron 2 ml de solución salina a una densidad de 1.065 g/ml por adición de KBr (J.T. Baker), se homogenizó. Y se realizó una segunda centrifugación durante 4 horas a 80,000 rpm a 4°C. Finalizado el tiempo de centrifugación se separó la banda superior la cual corresponde a la LDL, esta se recuperó en una membrana de nitrocelulosa (Sigma) y se dializó contra 4 litros de PBS 0.01M 1X a un pH de 7.4 toda la noche a 4°C.

### Análisis de la LDL.

El análisis del colesterol total se realizó por el método de colesterol esterasa y oxidasa de colesterol (Dade Behring, Deerfiel, Illinois, USA). La concentración de triglicéridos se determinó por la actividad de la glicerol cinasa (Dade, Behring). Para la medición de la lipoproteína de alta densidad (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:

$$LDL = \text{Colesterol total} - (\text{HDL} + \text{trigliceridos}/5)$$

### Oxidación de la lipoproteína de baja densidad.

La concentración de proteína fue ajustada a 300 µg/ml, a esta se adicionó CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 1mM (Sigma-Aldrich) teniendo una concentración final de 10µM CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, posteriormente se incubó la proteína con el sulfato de cobre a 37°C, sin agitación durante 24 horas. Después del tiempo de agitación la proteína oxidada se dializó en una membrana de nitrocelulosa (Sigma) contra solución salina isotónica 0.9%-EDTA 0.5 mM en agitación a 4°C durante 24 horas.

### Determinación del grado de oxidación de la lipoproteína de baja densidad.

El grado de oxidación de la proteína se determinó mediante el método de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico. En tubos separados se colocaron 100 µg/ml de LDL y de LDLox, y se adicionaron 400 µl de amortiguador Tris-preset 7.2 mM a pH 8.0 (J.T. Baker) y 1 ml del ácido 2-tiobarbitúrico (TBA al 0.375%) (Sigma Aldrich), se mezcló y se incubó 15 minutos en baño de agua en ebullición. Posteriormente, los tubos se colocaron en hielo y se les adicionó 0.5 ml de HCl 0.2 N. Se preparó una curva estándar con malonaldehído (MDA) (Sigma-Aldrich), bajo las condiciones de reacción de las muestras y se determinó la densidad óptica a 535nm.

### Detección de endotoxinas en la lipoproteína de baja densidad.

A todas las preparaciones de LDLox, se les realizó la detección de endotoxinas de acuerdo a las especificaciones del kit de lisado de *Limulus amoebocyte* (LAL) por el método de "gel clot" (Charles River Endosafe, Charleston S.C.). El estándar de endotoxinas (LPS de *Escherichia coli*) y el reactivo de LAL se reconstituyeron en agua libre de endotoxinas. En tubos por separado se colocaron 100µl de LDLox y se adicionaron 100 µl del reactivo LAL, se incubaron las muestras a 37°C por una hora en baño maría. Se realizó una curva estándar con el LPS de 0.03EU/ml a 0.5 EU/ml bajo las condiciones del fabricante. Las lecturas de las muestras se realizó de la siguiente manera, los tubos se invirtieron 180°, si se observa la formación de

un gel intacto que no se desprende del tubo se considera resultado positivo, cualquier otra condición se interpretó como resultado negativo.

#### Obtención de células mononucleares.

Las células mononucleares fueron obtenidas de sangre periférica de 8 donadores sanos mediante un gradiente de densidades de la siguiente manera. La sangre se diluyó 1:2 en solución salina isotónica 0.9%, posteriormente a un tubo con 15 ml de Lymphoprep (Axis-Shield, Cambridgeshire, UK) se adicionó la sangre diluida y se centrifugó a 2000 rpm durante 30 minutos; concluido el tiempo de centrifugación se recuperó el anillo de la interfase correspondiente a la células mononucleares y se lavaron dos veces con solución salina isotónica 0.9% a 1200 rpm por 10 minutos y 900 rpm 15 minutos; descartando el sobrenadante, el paquete celular se resuspendió en 1 ml de medio RPMI al 10% de suero fetal bovino (SFB).

#### Purificación de monocitos humanos por selección negativa.

Los monocitos fueron purificados empleando el “kit Pan Monocyte Isolation”, para aislamiento de monocitos por selección negativa (Miltenyi Biotec MACS, Bergish Gladbach, Germany) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Brevemente, las células mononucleares  $10^7$  se resuspendieron en 30  $\mu$ l del regulador MACS y se adicionaron 7.5 $\mu$ l del reactivo para bloqueo de receptores Fc; también; se adicionaron 7.5 $\mu$ l de la mezcla de anticuerpos unidos a biotina, que están dirigidos contra antígenos no presentes en monocitos humanos; se incubaron 5 minutos a 4°C, las células se lavaron con 1ml de regulador de MACS y se centrifugó a 1500rpm durante 5 minutos. El paquete celular se resuspendió en 60 $\mu$ l de PBS-BSA al 0.5%-EDTA 2mM (Sigma-Aldrich). El paquete celular se resuspendió en 15  $\mu$ l de PBS-BSA al 0.5%-EDTA 2mM (Sigma-Aldrich) y se adicionaron 15  $\mu$ l de microesferas magnéticas acopladas a anticuerpo anti-biotina y se incubó 10 minutos a 4°C. Después, el paquete celular se lavó con PBS-BSA

al 0.5%-EDTA 2mM (Sigma-Aldrich) a 1500rpm por 5 minutos y se resuspendió en 1ml de PBS-BSA al 0.5%-EDTA 2mM (Sigma-Aldrich) y se pasaron por la columna de separación LS MACS (Miltenyi Biotec MACS), se lavó la columna y se recuperó la fracción negativa. Las células recuperadas fueron teñidas con anti-CD14-FITC y la pureza determinada por citometría de flujo fue mayor al 87%. Se determinó la viabilidad celular por exclusión con azul tripano.

#### Diferenciación de monocitos humanos a macrófagos.

Los monocitos fueron cultivados en placas de 96 pozos a una concentración de 200,000 células por pozo, con medio de cultivo RPMI (Invitrogen, Carlsbad, CA), al 10% de SFB y factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) a una concentración final de 40 ng/ml, se incubaron a 37°C durante 6 días sustituyendo el medio cada día con medio fresco de RPMI 10% SFB más GM-CSF 40 ng/ml.

#### Marcadores de superficie de monocitos durante la diferenciación.

Los monocitos y macrófagos se lavaron una vez con PBS-BSA al 0.5%-EDTA 2mM (Sigma-Aldrich), a 1500 rpm por 5 minutos, posteriormente se realizó la tinción con 10 µl de cada anticuerpo: anti-CCR2-PE, anti-CD11b-Cy7, durante 20 minutos en oscuridad a 4°C, se realizó un lavado con PBS-BSA al 0.5%-EDTA 2mM (Sigma-Aldrich) y se resuspendieron las células en paraformaldehído al 1% para su análisis mediante citometría de flujo. Anexo. Histograma representativo de la expresión de CCR2 (figura 17A). Los niveles de expresión se cuantificaron midiendo la intensidad media de fluorescencia (IMF) de cada muestra utilizando el software FlowJo (Tree Star, San Carlos, CA).

### Evaluación de la capacidad fagocítica.

Monocitos purificados y macrófagos derivados de monocitos fueron incubados con Zymosan (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) a una concentración de 20mg/ml y con CD11b-Cy7 durante una hora a 37°C, posteriormente, se lavaron las células con FACS buffer centrifugando 1500 rpm por 5 minutos, se resuspendieron en paraformaldehído al 1% para ser analizados por citometría de flujo. Anexo. Histograma representativo de la expresión de Zymosan-FITC (figura 17B). Los niveles de expresión se cuantificaran midiendo la intensidad media de fluorescencia (IMF) de cada muestra utilizando el software FlowJo (Tree Star, San Carlos, CA).

### Capacidad de inhibición de anti-TLR2, anti-TLR4 y anti-CD36.

Los macrófagos fueron pre-incubados con anti-TLR2 (Clona TL 2.1, eBioscience), anti-TLR4 (Clona HTA125, Santa Cruz Biotechnology) y anti-CD36 (Clona SMΦ, eBioscience) a 37°C por 1 hora, posteriormente se estimularon con Pam3CSK4 20 ng/ml y LPS 100 ng/ml como controles positivos, durante 24 horas.

### Ensayos de bloqueo de TLR2, TLR4 y CD36 al estímulo de la LDLox.

Al sexto día de diferenciación de los monocitos humanos a macrófagos, las células adherentes se lavaron dos veces con medio RPMI sin SFB, estas células fueron tratadas por separado con 10µg/ml de anticuerpos humanos anti-TLR2 (Clona TL 2.1, eBioscience), anti-TLR4 (Clona HTA125, Santa Cruz Biotechnology) y anti-CD36 (Clona SMΦ, eBioscience), se incubaron durante 1 hora a 37°C, concluida la incubación se lavaron con RPMI sin SFB y se colocaron los estímulos, LDLox a una concentración final de 30 µg/ml; como controles positivos LPS a 100 ng/ml (Ligando para TLR4) y Pam3CSK4 a 20 ng/ml (Ligando para TLR2) y como control negativo anticuerpos no relacionados (IgM e IgG); las células se incubaron con los estímulos durante 24 horas a 37°C.

### Determinación de la expresión de moléculas co-estimuladoras.

Las células fueron recuperadas con FACS buffer frío, se realizó un lavado a 1500 rpm por 5 minutos, posteriormente se realizó la tinción con 10 µl de cada anticuerpo, anti-CD86 PE-Cy5, anti-HLA-DR PE y CD11b-PE-Cy7 durante 20 minutos en oscuridad a 4°C, se realizó un lavado con FACS buffer y se resuspendieron las células en paraformaldehído al 1% para su análisis mediante citometría de flujo. Los niveles de expresión se cuantificaron midiendo la intensidad media de fluorescencia (IMF) de cada muestra utilizando el software FlowJo (Tree Star, San Carlos, CA). Los cambios de IMF se calcularon con la siguiente fórmula.

Cambio de IMF: Promedio de los valores de IMF del control/ Promedio de los valores de IMF de tratamiento.

Anexo. Histogramas representativos de la expresión de HLA-DR y CD86 para Pam3CSK4 bloqueando TLR2 (figura 18A y 18B), para LPS bloqueando TLR4 (figura 18C y 18D), para LDL bloqueando TLR2 (figura 19A y 19B), TLR4 (figura 19C y 19D) y CD36 (figura 19E y 19F), respectivamente.

### Evaluación de la formación de células espumosas.

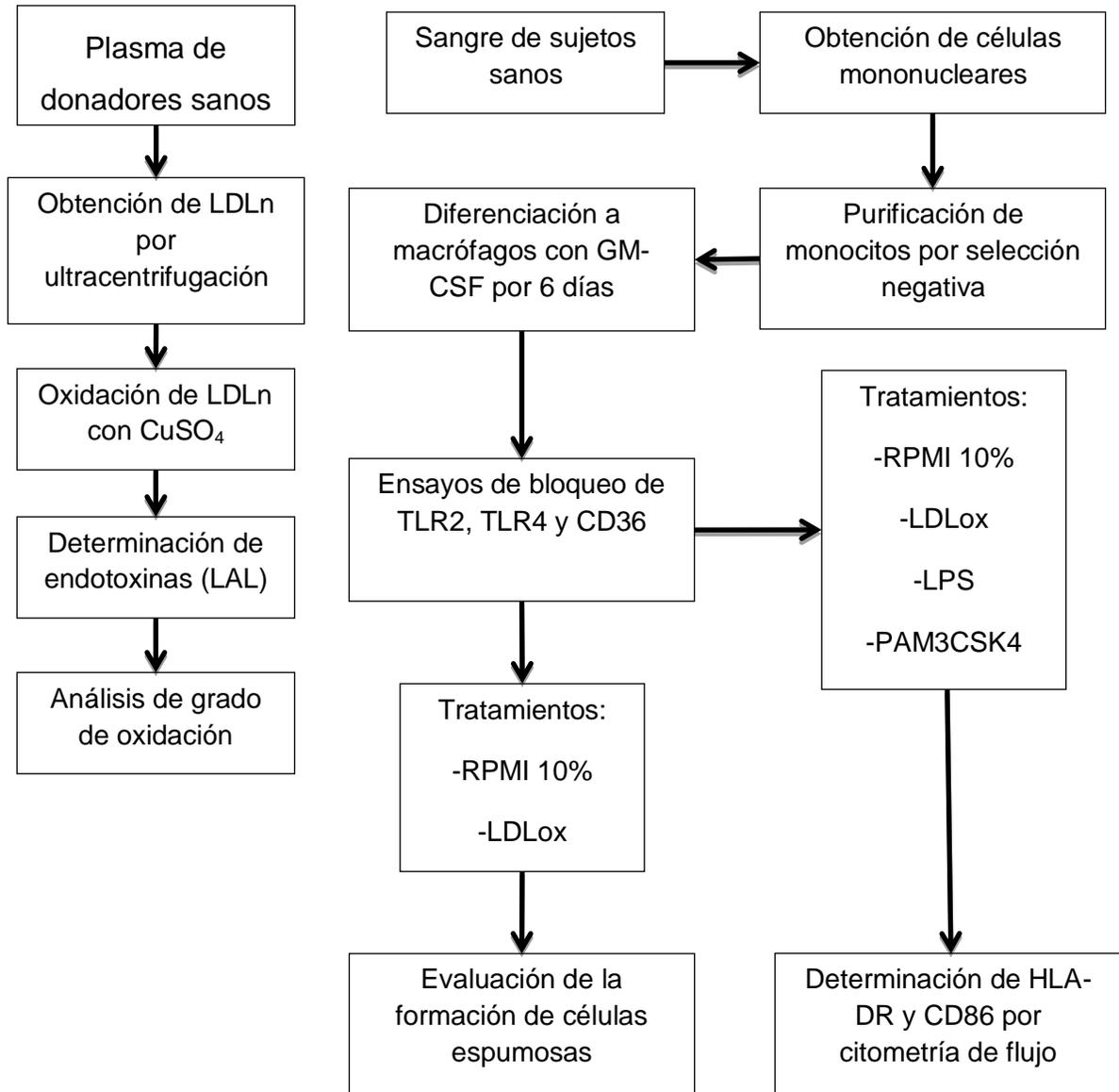
Los macrófagos se incubaron por separado con 10 µg/ml de anticuerpos humanos anti-TLR2 (Clona TL 2.1, eBioscience), anti-TLR4 (Clona HTA125, Santa Cruz Biotechnology), anti-CD36 (Clona SMΦ, eBioscience), anticuerpos no relacionados (IgM e IgG) y se incubaron durante 1 hora a 37°C, concluida la incubación se lavaron con RPMI sin SFB y a todos los tratamientos se estimularon con LDLox a una concentración final de 30 µg/ml. Como control positivo los macrófagos fueron estimulados sólo con LDLox (30 µg/ml) y como control negativo las células sólo se cultivaron con RPMI a 10%, posteriormente se incubaron durante 24 horas a 37°C. Los macrófagos se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 2% durante 10 minutos, posteriormente se realizó la tinción de lípidos con rojo oleoso al 0.3% (en isopropanol al 60%) durante 10 minutos, después se lavaron las

células con isopropanol al 60% y fueron contrastados con hematoxilina por dos minutos y se examinaron en el microscopio de luz a un aumento de 40x (microscopio Axiolab HBO; Nikon, Garden City, NY), las microfotografías fueron tomadas con la cámara “Evolution MP color”(Media Cybernetics Inc, Rockville, MD), las células espumosas positivas se observan teñidas de color rojo. El conteo celular de 5 experimentos independientes fue realizado por dos personas de manera independiente contando un total de 100 células.

#### Análisis estadístico.

El análisis estadístico fue realizado mediante la prueba de Mann-Whitney para evaluar diferencias significativas entre los grupos experimentales. Muestras con  $p < 0.05$  fueron considerados significativamente diferentes. El análisis fue realizado utilizando el programa de cómputo SPSS 12.0 para WINDOWS. Las gráficas muestran media  $\pm$  SEM.

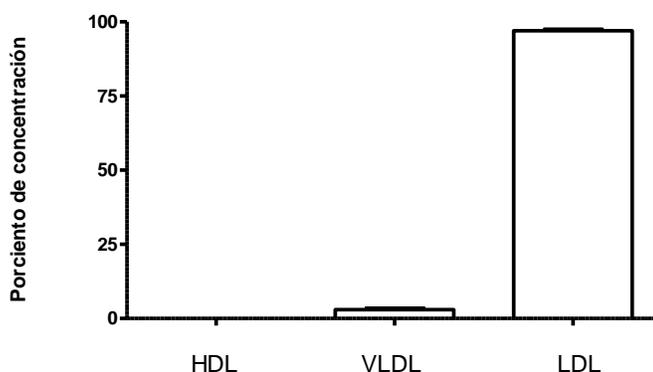
## Diagrama de flujo



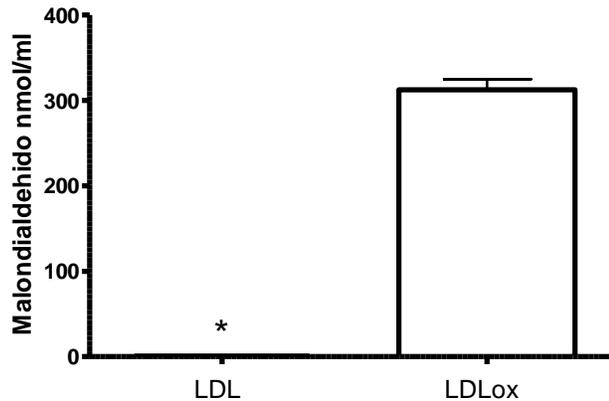
## Resultados

### Obtención y oxidación de la LDL

La LDL se obtuvo de plasma por ultracentrifugación y a las muestras obtenidas se le determinó la presencia de HDL la cual fue de 0% y de VLDL que fue en promedio del 2%, la pureza de la LDL en promedio fue de 98% (figura 6). Entonces, la LDL se oxidó con  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y se determinó el grado de oxidación por el método de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, el grado de oxidación promedio de la LDLn fue de 0.71 nmol/mL de equivalentes de malonaldehído y para la LDL modificada oxidativamente fue en promedio de 325 nmol/mL equivalentes de malonaldehído la cual se designó como LDLox (figura 7). Antes de realizar los ensayos para determinar el efecto biológico de la LDLox sobre los receptores TLR2, TLR4 y CD63, se realizó la prueba de detección de endotoxinas a las preparaciones de LDL a través del ensayo de lisado de amebocitos de *Lymulus* y resultaron negativas.



**Figura 6. Caracterización de la lipoproteína de baja densidad obtenida por ultracentrifugación.** 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 LDLn obtenidas de forma independiente. Datos representativos de 6 experimentos independientes.



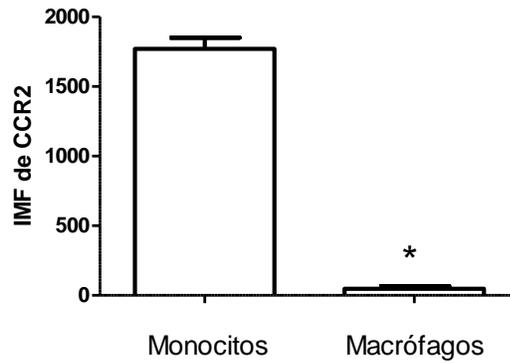
**Figura 7. Grado de oxidación de LDLn y LDLox.** 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LDL fueron oxidados con  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  a una concentración final de 10  $\mu\text{M}$  durante una hora a 37° C. El grado de oxidación se cuantificó en 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de LDL y 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  LDLox, por el método de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. Los niveles de oxidación se expresan en equivalentes de malondialdehído (La reacción se midió a 535 nm). Datos representativos de 6 experimentos independientes.

### Expresión de marcadores de superficie de los monocitos durante su diferenciación a macrófagos

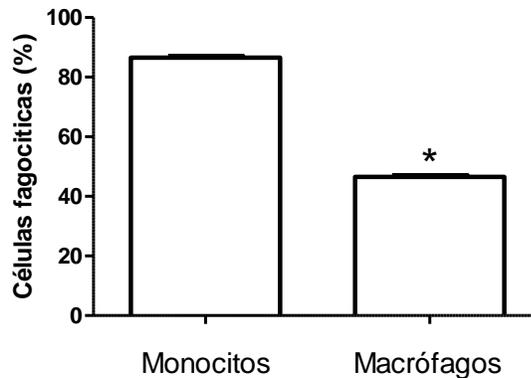
El protocolo de diferenciación de los monocitos a macrófagos, resultó en una pérdida de la expresión de CCR2 en la superficie celular de los macrófagos al compararse con monocitos (figura 8).

### Funcionalidad de los macrófagos

Los macrófagos derivados de monocitos en general retienen la capacidad de fagocitar partículas opsonizadas de Zymosan-FITC. Sin embargo, la capacidad fagocítica de los macrófagos es reducida al compararse con monocitos autólogos frescos como se muestra en la figura 9.



**Figura 8. Expresión de CCR2 en la diferenciación de macrófagos.** Gráfica representativa de la intensidad media de fluorescencia de la expresión de CCR2 en monocitos frescos y macrófagos. Los monocitos humanos se diferenciaron a macrófagos con el tratamiento de GM-CSF durante 6 días, cada 2 días se cambió el GM-CSF con medio RPMI al 10% de SFB. \* $p < 0.05$ . Datos representativos de 8 experimentos independientes por duplicado.



**Figura 9. Fagocitosis de partículas de Zymosan-FITC en monocitos y macrófagos.** Los monocitos frescos o macrófagos fueron tratados con partículas de Zymosan-FITC, durante 1 h a 37° C, el porcentaje de células fagocíticas fue determinada por citometría de flujo. \* $p < 0.05$ . Datos representativos de 8 experimentos independientes por duplicado.

#### Capacidad de inhibición de los anticuerpos anti-TLR2 y anti-TLR4

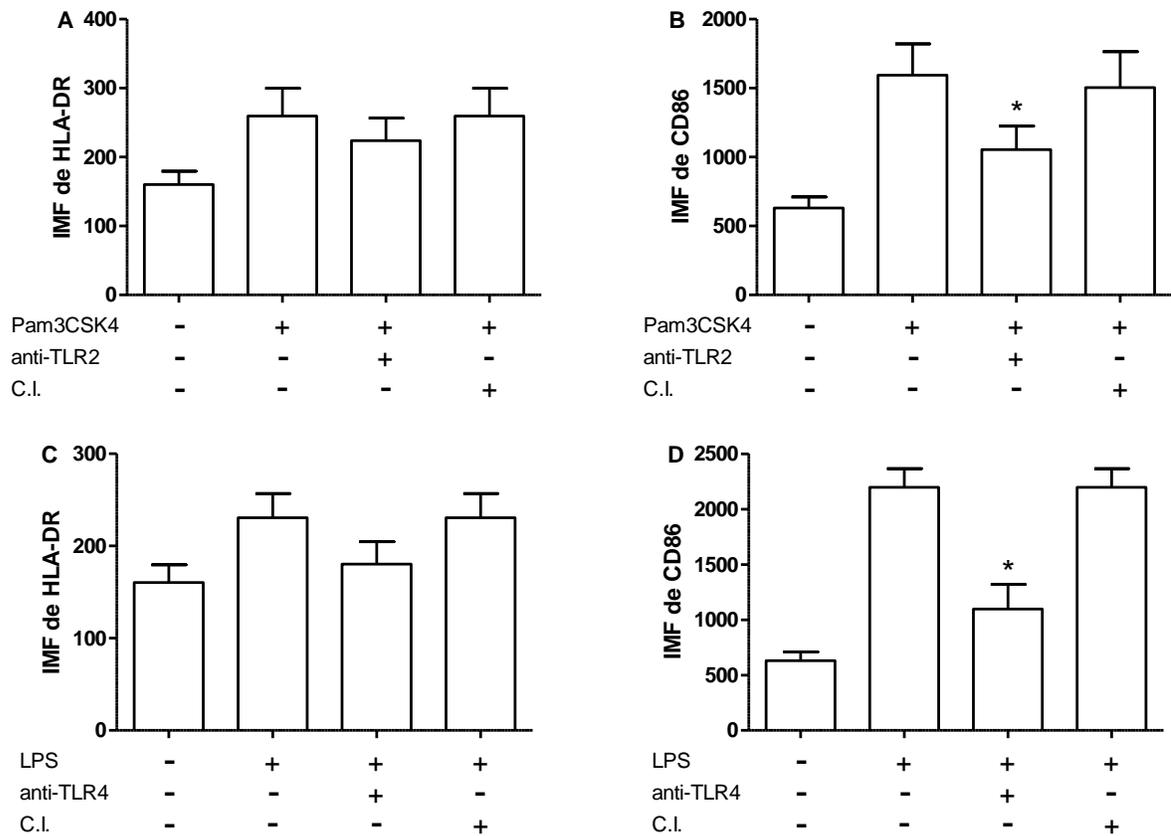
Para evaluar la capacidad de inhibición de los anticuerpos anti-TLR2 y anti-TLR4, los macrófagos fueron pre-incubados con anti-TLR2, posteriormente se estimularon con Pam3CSK4 (ligando específico) como control positivo de la activación de la vía de TLR2. Por otro lado, los macrófagos se pre-incubaron con anti-TLR4, que posteriormente se estimularon con LPS (ligando específico) como control positivo de la activación de esta vía. La capacidad de inhibición del anticuerpo anti-CD36 se evaluó en experimentos subsecuentes debido a que su ligando específico es la LDLox; se encontró que los anticuerpos anti-TLR2 disminuye la expresión de HLA-DR en 1.1 veces y para CD86 en 1.5 veces. El bloqueo de TLR4, inhiben la expresión de HLA-DR (1.2 veces) y CD86 (2 veces) como se muestra en la figura 10.

#### Papel de TLR2 en la expresión de HLA-DR y CD86 en respuesta a LDLox

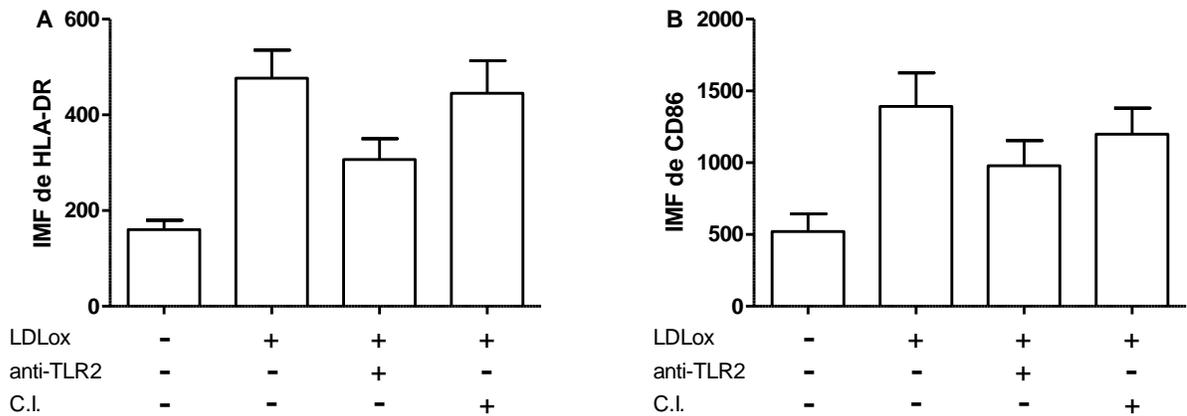
La estimulación de macrófagos con la LDLox induce una alta expresión de HLA-DR (3.6 veces) y de CD86 (3.0 veces), en comparación con las determinadas en los cultivos celulares solo cultivados con medio de cultivo. El bloqueo de TLR2 en macrófagos tratados con LDLox, disminuyo los niveles de expresión de HLA-DR (figura 11A) por 1.5 veces menos y 1.4 veces menos la expresión de CD86 (figura 11B), comparado con macrófagos estimulados solo con LDLox.

#### El bloqueo de TLR4 afecta la expresión de HLA-DR y de CD86 en macrófagos humanos

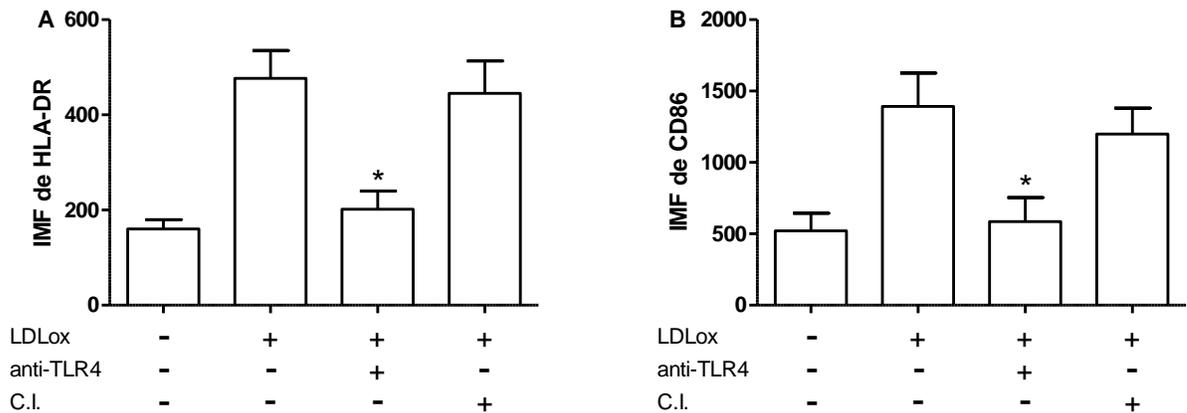
El incremento en la expresión de HLA-DR, en macrófagos tratados con LDLox fue inhibido, cuando los macrófagos fueron pre-incubados con anticuerpo anti-TLR4 induciendo una reducción de 2.4 veces menos con respecto a la LDLox (figura 12A); de manera similar la expresión de CD86 disminuyó 2 veces, al bloquear TLR4 (figura 12B).



**Figura 10. Capacidad de los anticuerpos anti-TLR2 y anti-TLR4 en inhibir la expresión de CD86.** Los macrófagos fueron tratados con anticuerpo anti-TLR2 (8A, 8B) o con anti-TLR4 (8C, 8D) (10 µg/ml) durante 1 hora a 37°C, posteriormente se estimularon con Pam3CSK4 o LPS, respectivamente. La expresión de HLA-DR y CD86 (los niveles de las moléculas se expresan como intensidad media de fluorescencia (IMF) fue determinada a las 24 horas de incubación a 37°C. El efecto del anticuerpo anti-TLR2 se compara contra las células estimuladas solo con Pam3CSK4. El efecto del anticuerpo anti-TLR4 se compara contra las células estimuladas solo con LPS. Datos representativos de 8 experimentos independientes por duplicado. (\*p<0.05).



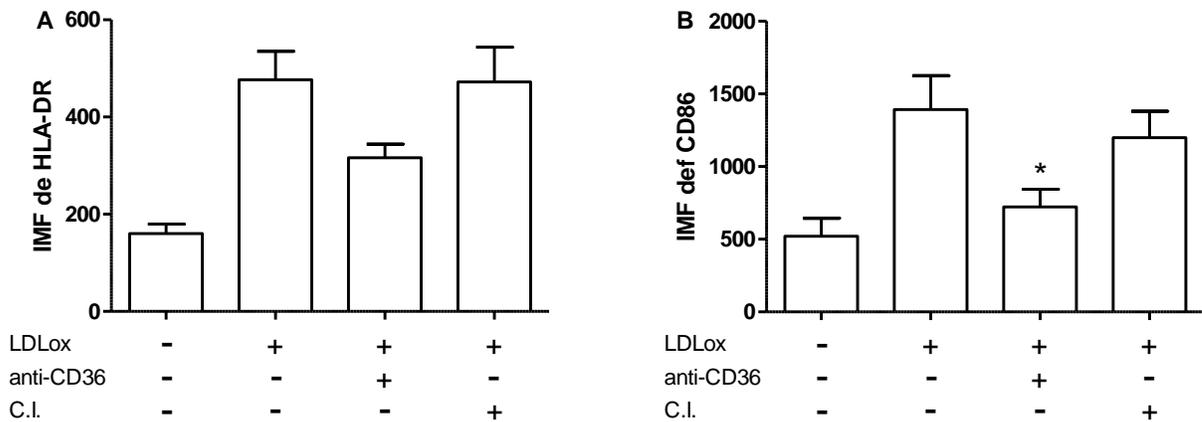
**Figura 11. El papel de TLR2 en la expresión de HLA-DR y CD86 en respuesta a LDLox.** Los macrófagos fueron tratados con anticuerpo anti-TLR2 (10 µg/ml) y con anticuerpo de isotipo IgG (10 µg/ml), por 1 hora, después fueron incubados con LDLox (30 µg/ml) durante 24 horas. También, los macrófagos fueron cultivados sólo con RPMI al 10% o sólo con LDLox (30 µg/ml). La expresión de HLA-DR (9A) y CD86 (9B) fue determinada por intensidad media de fluorescencia (IMF) a las 24 horas de incubación a 37°C. El efecto del anticuerpo anti-TLR2 se compara contra las células estimuladas solo con LDLox. Datos representativos de 8 experimentos independientes por duplicado. (\*p<0.05).



**Figura 12. El bloqueo de TLR4 inhibe la expresión de HLA-DR y CD86.** Los macrófagos fueron tratados con anticuerpo anti-TLR4 (10 µg/ml) y con anticuerpo de isotipo IgG (10 µg/ml), por 1 hora, después fueron incubados con LDLox (30 µg/ml) durante 24 horas. También, los macrófagos fueron cultivados solo con RPMI al 10% o solo con LDLox (30 µg/ml). La expresión de HLA-DR (10A) y CD86 (10B) fue determinada por intensidad media de fluorescencia (IMF) a las 24 horas de incubación a 37°C. El efecto del anticuerpo anti-TLR2 se compara contra las células estimuladas solo con LDLox. Datos representativos de 8 experimentos independientes por duplicado. (\*p<0.05).

### El papel de CD36 en la expresión de HLA-DR y CD86 en respuesta LDLox

Los macrófagos tratados con LDLox incrementan la expresión HLA-DR y CD86, en comparación con lo observado en las células cultivadas solo con medio de cultivo. El bloqueo de CD36 en macrófagos tratados con LDLox, disminuyó parcialmente la expresión de HLA-DR en 1.5 veces. En contraste, la expresión de CD86 fue drásticamente afectada por el bloqueo CD36 en 2.0 veces menos; cuando se comparó con los macrófagos estimulados sólo con LDLox (figura 13).



**Figura 13. El papel de CD36 inhibe la expresión de HLA-DR y CD86.** Los macrófagos fueron tratados con anticuerpo anti-CD36 (10 µg/ml) y con anticuerpo de isotipo IgG (10 µg/ml), por 1 hora, después fueron incubados con LDLox (30 µg/ml) durante 24 horas. También, los macrófagos fueron cultivados sólo con RPMI al 10% o sólo con LDLox (30 µg/ml). La expresión de HLA-DR (10A) y CD86 (10B) fue determinada por intensidad media de fluorescencia (IMF) a las 24 horas de incubación a 37°C. El efecto del anticuerpo anti-TLR2 se compara contra las células estimuladas solo con LDLox. Datos representativos de 8 experimentos independientes por duplicado. (\*p<0.05).

### Participación de TLR2 en la formación de células espumosas

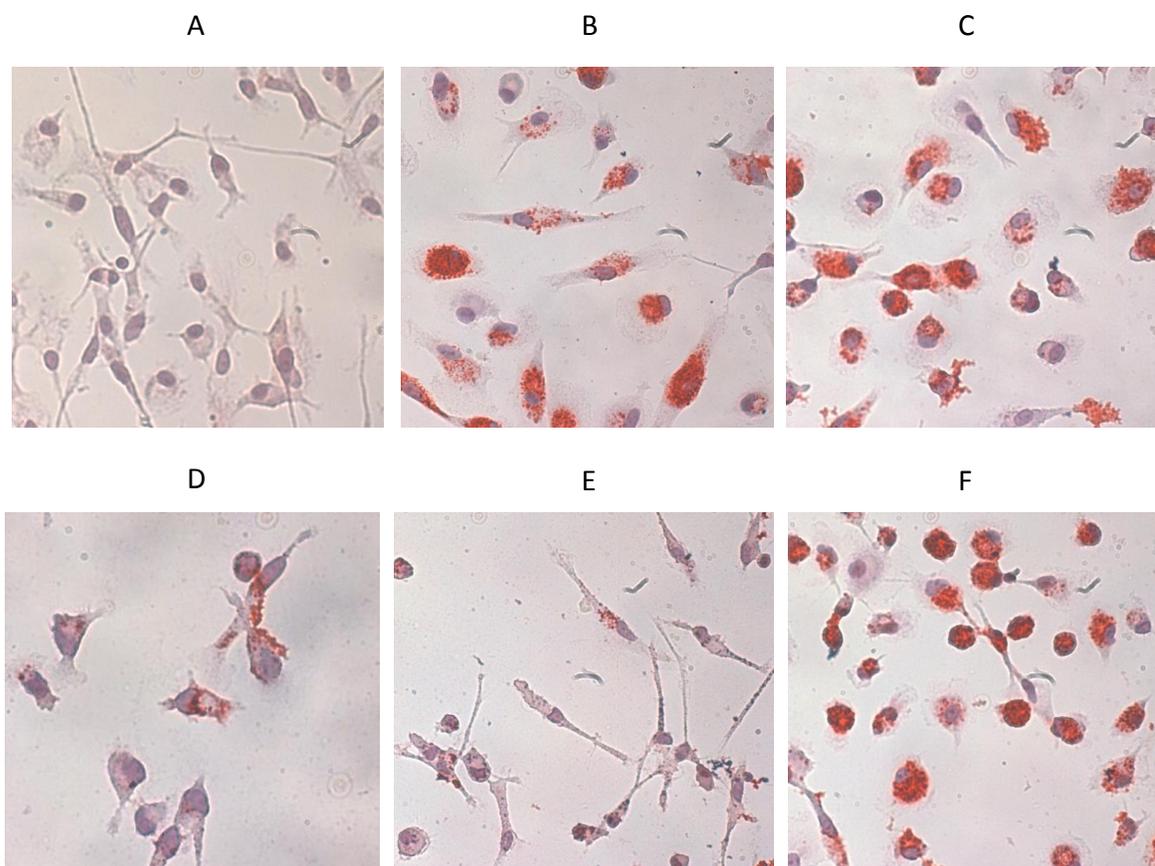
La formación de células espumosas juega un papel importante en el desarrollo de la aterosclerosis. Se diferenciaron monocitos a macrófagos con GM-CSF por 7 días; entonces los macrófagos fueron tratados con anticuerpo anti-TLR2 y posteriormente fueron estimulados con oxLDL (30 µg/ml) por 24 horas. La tinción de rojo oleoso, reveló que los macrófagos tratados con anticuerpo anti-TLR2, exhiben un alto contenido de “droplest” de lípidos (figura 14C), así como un alto número de células espumosas (figura 15); resultados similares fueron obtenidos en los macrófagos tratados con LDLox en ausencia de anticuerpo anti-TLR2 (figura 14B).

### Papel de TLR4 en la formación de células espumosas

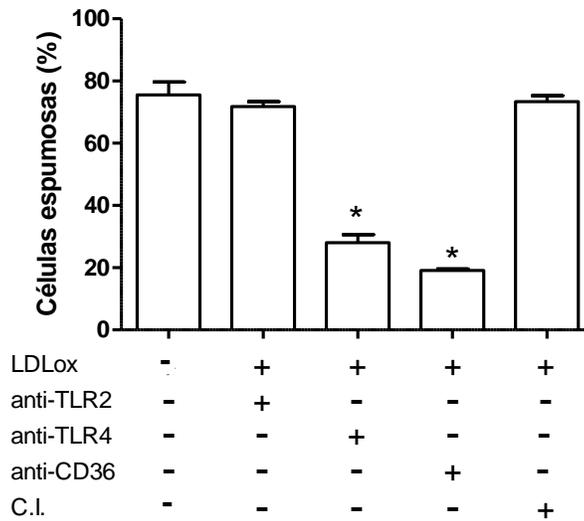
Los macrófagos humanos fueron tratados inicialmente con anticuerpo anti-TLR4 por 1 hora y después fueron estimulados con LDLox durante 24 horas. La tinción de rojo oleoso, mostró una dramática reducción en el contenido de “droplest” de lípidos y en la formación de células espumosas (figura 14D). Los datos obtenidos muestran una reducción en promedio del 64 % en la formación de células espumosas en relación con los macrófagos estimulados solo con LDLox (figura 15).

### El bloqueo de CD36 protege la formación de células espumosas

Finalmente, se evaluó la participación de CD36 en la formación de células espumosas. Los macrófagos humanos fueron tratados con anticuerpo anti-CD36 por 1 hora y posteriormente estimulados con LDLox durante 24 horas; donde macrófagos estimulados solo con LDLox muestran el mayor número en la diferenciación de macrófagos a células espumosas (figura 14B). En contraste, cuando los macrófagos fueron previamente tratados con anticuerpo anti-CD36 y posteriormente estimulados con LDLox, mostraron una fuerte reducción del 77 % en la formación de células espumosas como se muestra en la figura 14E y 15.



**Figura 14. Papel de TLR2, TLR4 y CD36 en la formación de células espumosas.** Imágenes representativas de la tinción de rojo oleoso, las células espumosas contienen una alta granularidad y son positivas a la tinción de rojo oleoso. A) Los macrófagos fueron cultivados en medio RPMI 10% en ausencia de LDLox. B) Los macrófagos fueron tratados con LDLox. C) Los macrófagos fueron tratados con anticuerpo anti-TLR2 y posteriormente se estimularon con LDLox. D) Los macrófagos fueron tratados con anticuerpo anti-TLR4 y posteriormente se estimularon con LDLox. E) Los macrófagos fueron tratados con anticuerpo anti-CD36 y posteriormente se estimularon con LDLox. F) Los macrófagos fueron tratados con anticuerpo no relacionado como control de isotipo y posteriormente se estimularon con LDLox. Datos representativos de 5 experimentos independientes por duplicado.



**Figura 15. Cuantificación de células espumosas.** El tratamiento con LDLox induce la formación de células espumosas. El bloqueo de TLR2 no afecta la formación de células espumosas. El bloqueo de TLR4 redujo en un 64 % la diferenciación a células espumosas. El bloqueo de CD36 ocasionó una reducción del 77 % en la formación de células espumosas. El control de isotipo no afectó la diferenciación de células espumosas. Datos representativos de 5 experimentos independientes por duplicado. (\* $p < 0.05$ )

## **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. Diversos estudios muestran que la LDLox influye en el desarrollo de la lesión aterosclerosa, promoviendo la respuesta inflamatoria (6,7). Estudios recientes han involucrado a receptores de la inmunidad innata con los eventos inflamatorios, especialmente TLR2, TLR4 y CD36 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, TLR4 y CD36 se activen por microorganismos o ligandos endógenos como la LDLox provocando o acelerando el fenómeno inflamatorio (32,42).

Inicialmente, fue establecida la capacidad de inhibición de los anticuerpos usados. Se determinó que los anticuerpos anti-TLR2 y anti-TLR4 son capaces de inhibir la expresión de HLA-DR y CD86 en presencia de Pam3CSK4 o LPS.

Los resultados presentados en este trabajo muestran que la LDLox induce un incremento en la expresión de HLA-DR en macrófagos; dicho aumento concuerda con datos obtenidos en monocitos y células dendríticas, los cuales expresan un aumento en la expresión de HLA-DR bajo el estímulo con LDLox (20,21). Más aún, la activación celular a través de PAMP como CpG-DNA o LPS disparan la activación de TLR, lo que induce a una sobreexpresión de MHC-II (43,44). En este contexto, al bloquear TLR2, TLR4 y CD36 resultó en una reducción en la expresión de HLA-DR en macrófagos expuestos a LDLox, sugiriendo que la expresión de HLA-DR, en parte depende de la activación de TLR2, TLR4 y CD36 al estímulo de la LDLox.

Posteriormente decidimos investigar la participación de TLR2, TLR4 y CD36 en la expresión de CD86 en respuesta a la LDLox en macrófagos. Previamente se ha demostrado que la LDLox sobregula la expresión de CD86 en monocitos y DCs (20,21).

Los resultados obtenidos muestran que al bloquear TLR2, TLR4 y CD36 en macrófagos disminuye la expresión de CD86 inducida por la LDLox, lo que demuestra que la expresión de CD86 es dependiente de la activación de TLR2, TLR4 y CD36. Reportes previos han demostrado que DC inmaduras TLR2<sup>-/-</sup> al ser activadas con ligandos específicos de TLR2, carecen de la capacidad de incrementar la expresión de CD86, lo que demuestra que TLR2 es requerido para inducir la sobrerregulación de CD86 (45,46); en el mismo sentido se ha demostrado que el bloqueo de TLR4 en DCs resulta en una disminución significativa de CD86 (47). La participación de CD36 en la expresión de CD86, probablemente implica que la respuesta celular se debe a la vía de activación de TLR2 o TLR4, porque CD36 es un receptor que tiene un dominio de señalización corto (35). Evidencias recientes han demostrado que CD36 se asocia al TLR2 y TLR4 y se dispara un proceso de señalización intracelular que incluye la activación de NF-κB (40,41).

Estudios previos han demostrado que la activación de TLR2 favorece la formación de la placa aterosclerosa. En contraste, la pérdida de la activación de TLR2 disminuye el tamaño de la lesión (42), lo que establece un papel claro de TLR2 en la modulación de la severidad de la aterosclerosis *in vivo*. En este contexto, las células espumosas juegan un papel central en el desarrollo y progresión de la aterosclerosis (5-7). Por lo que se decidió evaluar el papel de TLR2 en la formación de células espumosas. Interesantemente, los resultados muestran que el bloqueo de TLR2 no reduce el número de células espumosas en relación a las inducidas por LDLox, lo que sugiere que TLR2 no juega un papel esencial en la formación de células espumosas en macrófagos humanos. Los datos obtenidos son apoyados por evidencias previas que demuestran que macrófagos derivados de ratones *Tlr2<sup>-/-</sup> ApoE<sup>-/-</sup>*, exhiben niveles similares en la formación de células espumosas que los macrófagos derivados de ratones *ApoE<sup>-/-</sup>* (48). También, demostramos que el bloqueo de TLR4 reduce drásticamente la formación de células espumosas. Estos resultados, son apoyados por estudios *in vivo* que demuestran que la deficiencia de TLR4 reduce de tamaño la placa aterosclerosa, así como el contenido de células espumosas en la lesión (49). Más aún, recientemente se ha demostrado que el bloqueo de TLR4 en macrófagos de

ratones C3H/HeN reduce la formación de células espumosas, lo que fue consistente en macrófagos obtenidos de ratones C3H/HeJ (50). Los resultados obtenidos, sugieren que TLR4 es crucial para la internalización de la LDLox y subsecuente formación de células espumosas humanas. Al bloquear de CD36 inhibe la formación de células espumosas, lo cual está de acuerdo con reportes previos que han establecido que CD36 es el mayor receptor de LDLox (37,39). Además, se ha demostrado que la deficiencia o el bloqueo de CD36 afecta la formación de células espumosas (39). Estas evidencias y nuestros resultados sugieren que CD36 es un receptor esencial en la formación de células espumosas, lo cual podría afectar el desarrollo de las lesiones ateroscleróticas.

## **Conclusión**

Nuestros resultados sugieren que TLR2, TLR4 y CD36 participan en la respuesta inmune contra de LDLox, al inducir la sobre-regulación de la expresión de HL-ADR y CD86. Sin embargo, TLR2 no contribuye a la formación de células espumosas en relación TLR4 y CD36, los cuales parecen ser claves en este mecanismo. Estos resultados sugieren que la activación de estos receptores por la LDLox, contribuyen en la patogénesis de la aterosclerosis.

### **Propuestas y/o recomendaciones**

En base a estos resultados se propone analizar como la activación de TLR2, TLR4 y CD36 por la LDLox, contribuyen en la colaboración de linfocitos T, a través de la secreción de IFN- $\gamma$ .

## Referencias.

1. Levi F, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C. Trends in mortality from cardiovascular and cerebrovascular diseases in Europe and other areas of the World. *Heart*. 2002; 88: 119-124.
2. Sistema Nacional de Información en Salud. Principales causas de mortalidad en edad productiva (de 15 a 64 años) y Principales causas de mortalidad en edad posproductiva (65 años y más). Modificado el 01 de Julio de 2011. [Consultado el 19 de enero de 2013]. Disponible en: <http://www.sinais.salud.gob.mx/mortalidad/index.html>
3. Bosque R. Alejandra. Síndromes coronarios agudos. *Rev Fac Med UNAM*. 2005; 2: 66-68.
4. Keller P, Carballo S, Carballo D. Present and future of secondary prevention after an acute coronary syndrome. *EPMA Journal*. 2011; 2: 371-379.
5. Nicoletti A, Caligiuri G, Hansson K. Immunomodulation of Atherosclerosis: Myth and reality. *J Intern Med*. 2000; 247:397-495.
6. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 2002; 420:866-874.
7. Ross R. Mechanisms of disease. *New Engl J Med*. 1999; 340:115-126.
8. Segrest JP, Jones MK, De Loof H, Dashti. Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. *J Lipid Res* 2001; 42: 1346-1367.
9. Krisko A, Etchebest C. Theoretical model of human apolipoprotein B-100 tertiary Structure. *Proteins* 2007; 66: 358-432.
10. Dai G, Kaazempur-Mofrad MR, Natarajan S, Zhang Y, Vaughn S, Blackman BR, Garcia-Cardena G, Gimbrone MA Jr. Distinct endothelial phenotypes evoked by arterial waveforms derived from atherosclerosis-susceptible and resistant regions of human vasculature. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101: 14871-14876.
11. Brauersreuther V, Mach F, Steffens S. The specific role of chemokines in atherosclerosis. *Trimb Haemost* 2007; 97: 714-721.
12. Rahaman SO, Lennon DJ, Febbrario M, Podrez EA, Hazen SL, Silverstein RL. A CD36- dependent signaling cascade is necessary for macrophage foam cell formation. *Cell Metab* 2006; 4: 211-221.

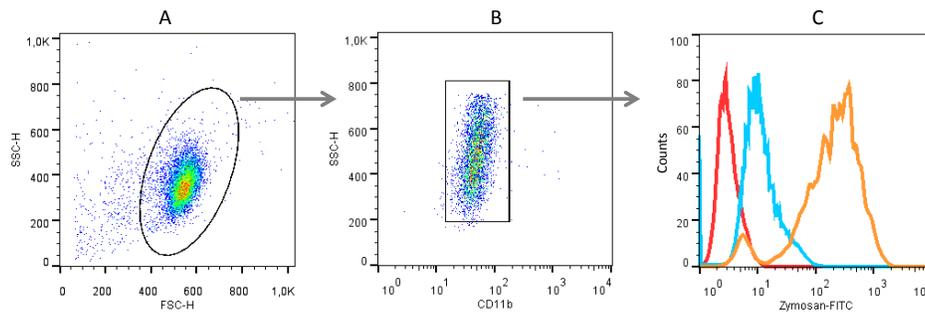
13. Johnson, J.L., and Newby, A.C. Macrophage heterogeneity in atherosclerotic plaques. *Curr. Opin. Lipidol.* 2009; 20: 370–378
14. Kurt-Jones EA, Beller DI, Mizel SB, Unanue ER. Identification of a membrane-associated interleukin-1 in macrophages. *Proc Natl Acad Sci* 1985; 82:1024-1208.
15. Fan J, Watanabe T. Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 2003; 10: 63-71.
16. Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev.* 2000; 14(17): 2123-33.
17. Huang WC, Sala-Newby GB, Susana A, Newby AC. Classical macrophage activation up-regulates several matrix metalloproteinases through mitogen activated protein kinases and nuclear factor- $\kappa$ B. *PLoS One* 2012; 7: e42507.
18. Stöger JL, Gijbels MJ, van der Velden S, Manca M, van der Loos CM, Biessen EA, Daemen MJ, Lutgens E, de Winther MP. Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2012; 225(2): 461-8.
19. Hansson GK, Jonasson L. The discovery of cellular immunity in the atherosclerotic plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; 29(11): 1714-7.
20. Fortun A, Khalil A, Gagné D, Douziech N, Fölöp T. Jr. Monocytes influence the fate of T cells challenged with oxidised low density lipoproteins towards apoptosis or MHC-restricted proliferation. *Atherosclerosis.* 2001; 156: 11-21.
21. Zaguri R, Verbovetski I, Atallah M, Trahtemberg U, Krispin A, Nahari E, Leitersdorf E, Mevorach D. 'Danger' effect of low-density lipoprotein (LDL) and oxidized LDL on human immature dendritic cells. *Clin Exp Immunol.* 2007; 149: 543-52.
22. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol.* 2005; 23:515-548.
23. Dopheide JF, Sester U, Schlitt A, Horstick G, Rupprecht HJ, Münzel T, Blankenberg S. 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.* 2007; 18:523-531.

24. Zhang Z, Schluesener HJ. Mammalian. Toll-like receptors: from endogenous ligands to tissue regeneration. *Cell Mol Life Sci* 2006; 24: 2901-2907.
25. Nicholas G, Monique G, Alexander W. Toll-like receptors as molecular switches. *Nat Rev Immunol* 2010; 6: 693-968.
26. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006; 124:783-801.
27. Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 179-190.
28. Chávez L, Chávez K, Legorreta MV, Montoya E, Blanco F (2012). The Innate Immune Response Mediated by TLRs in Atherosclerosis, Inflammation, Chronic Diseases and Cancer. En *Cell and Molecular Biology, Immunology and Clinical Bases*; Dr Mahin Khatami, ISBN: 978-953-51-0102-4, InTech, DOI: 10.5772/25632.  
Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/inflammation-chronic-diseases-and-cancer-cell-and-molecular-biology-immunology-and-clinical-bases/the-innate-immune-response-mediated-by-tlrs-in-atherosclerosis>.
29. Xu XH, Shad PK, Faure E, Equilis O, Thomas L, Fishbein MC, Luthringer D, Xu XP, Rajavashisth TB, Yano J, Kaul S, Arditi M. et al. Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. *Circulation* 2001; 104: 3103-3108.
30. Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson GK, Yan ZQ. Expression of Toll-like receptors in human atherosclerotic lesions. A possible pathway for plaque activation. *Circulation* 2002; 105: 1158-1161.
31. Holvoet P, Davey PC, De Keyser D, Doukouré M, Deridder E, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G, Beaufort E, Bishay K, Andrieux N, Benhabiles N, Marguerie G. Oxidized low-density lipoprotein correlates positively with Toll-like receptor 2 and interferon regulatory factor-1 as inversely with superoxide dismutase-1 expression: Studies in hypercholesterolemic swine and THP-1 cell. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 1558-1565.
32. Michelsen KS, Wong MH, Shah PK, Zhang W, Yano J, Doherty TM, Akira S, Rajavashisth TB, Arditi M. Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation

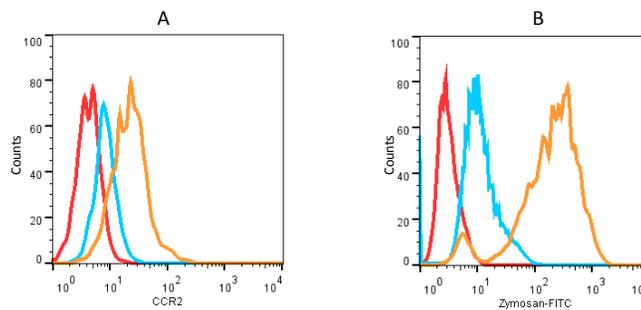
- factor 88 reduces atherosclerosis and alters phenotype in mice deficient in apolipoproteína E. *Proc Natl Acad Sci* 2004;101: 10685-10690.
33. Björkbacka H, Kunjathoor VV, Moore KJ, Koehn S, Ordija CM, Lee MA, Means T, Halmen K, Luster AD, Golenbock DT, Freeman MW. Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways. *Nature Med* 2004; 10: 416-421.
34. Chávez L, Chávez K, Legorreta MV, Zenteno E, Ledesma Y, Montoya E, Tesoro E, Madrid A, Blanco F. The activation of CD14, TLR4, and TLR2 by mmLDL induces IL-1 $\beta$ , IL-6, and IL-10 secretion in human monocytes and macrophages. *Lipids Health Dis.* 2010; 14;9: 117. doi: 10.1186/1476-511X-9-117.
35. Tao N, Wagner SJ, Lublin DM. CD36 is palmitoylated on both N- and C-terminal cytoplasmic tails. *J Biol Chem.* 1996; 271(37): 22315-20.
36. Kuchibhotla S, Vanegas D, Kennedy DJ, Guy E, Nimako G, Morton RE, Febbraio M. Absence of CD36 protects against atherosclerosis in ApoE knock-out mice with no additional protection provided by absence of scavenger receptor A I/II. *Cardiovasc Res.* 2008; 78(1): 185-96.
37. Collot-Teixeira S, Martin J, McDermott-Roe C, Poston R, McGregor JL. CD36 and macrophages in atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* 2007; 75(3): 468-77.
38. Janabi M, Yamashita S, Hirano K, Sakai N, Hiraoka H, Matsumoto K, Zhang Z, Nozaki S, Matsuzawa Y. Oxidized LDL-induced NF-kappa B activation and subsequent expression of proinflammatory genes are defective in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20(8): 1953-60.
39. Endemann G, Stanton LW, Madden KS, Bryant CM, White RT, Protter AA. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem.* 1993; 268(16): 11811-6.
40. Zamora C, Cantó E, Nieto C, Angels Ortiz M, Juarez C, Vidal S. Functional consequences of CD36 downregulation by TLR signals. *Cytokine.* 2012; 60: 257-265.

41. Hoebe K, Georgel P, Rutschmann S, Du X, Mudd S, Crozat K, Sovath S, Shamel L, Hartung T, Zähringer U, Beutler B. CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature*. 2005; 433(7025): 523-7.
42. Mullick AE, Tobias PS, Curtiss LK. Modulation of atherosclerosis in mice by toll-like receptor 2. *J Clin Invest*. 2005; 115: 3149-3156.
43. Barrachina M, Goñalons E, Celada A. LPS upregulates MHC class II I-A expression in B lymphocytes at transcriptional and at translational levels. *Tissue Antigens* 1999; 54: 461-70.
44. Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 709-60.
45. Asai Y, Makimura Y, Ogawa T. Toll-like receptor 2-mediated dendritic cell activation by a *Porphyromonas gingivalis* synthetic lipopeptide. *J Med Microbiol* 2007; 56: 459-65.
46. Hertz CJ, Kiertscher SM, Godowski PJ, Bouis DA, Norgard MV. Microbial lipopeptides stimulate dendritic cell maturation via Toll-like receptor 2. *J Immunol* 2001; 166: 2444-50.
47. Broos S, Lundberg K, Akagi T, Kadowaki K, Akashi M, Greiff L, Borrebaeck CA, Lindslet M. Immunomodulatory nanoparticles as adjuvants and allergen-delivery system to human dendritic cells: Implications for specific immunotherapy. *Vaccine* 2010; 28: 5075-85.
48. Liu X, Ukai T, Yumoto H, Davey M, Goswami S, Genco CA. Toll-like receptor 2 plays a critical role in the progression of atherosclerosis that is independent of dietary lipids. *Atherosclerosis* 2008; 196: 146-54.
49. Higashimori M, Tatro JB, Moore KJ, Mendelsohn ME, Galper JB, Beasley D. Role of toll-like receptor 4 in intimal foam cell accumulation in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31: 50-7.
50. Howell KW, Meng X, Fullerton DA, Jin C, Reece TB, Cleveland JC Jr. Toll-like receptor 4 mediates oxidized LDL-induced macrophage differentiation to foam cells. *J Surg Res* 2011; 171: e27-31.

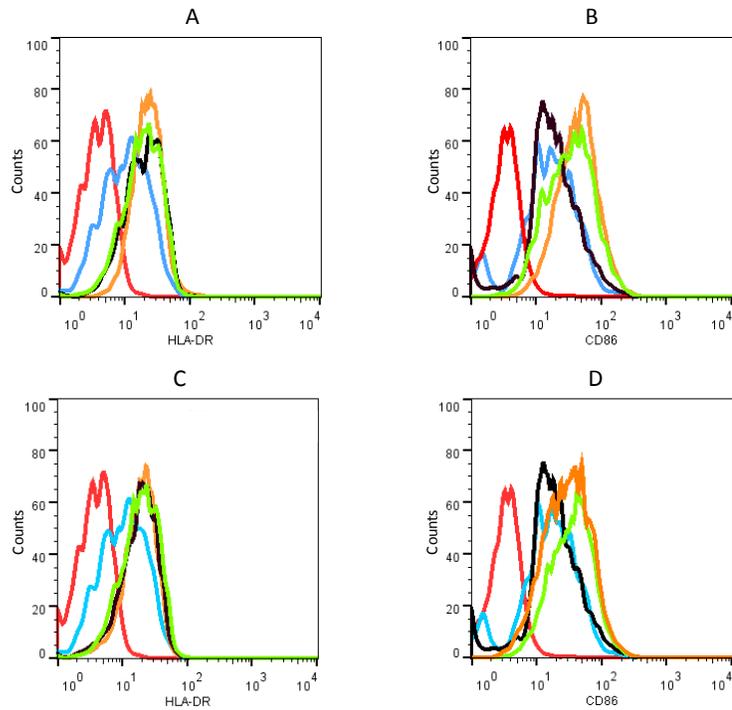
## Anexo.



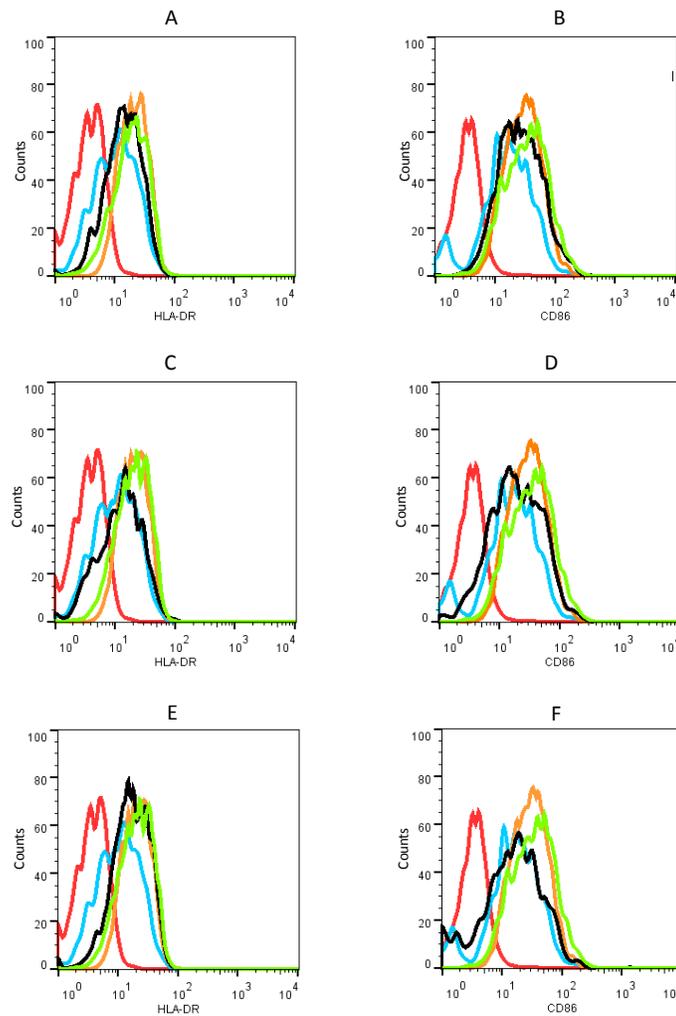
**Figura 16. Estrategia utilizada para el análisis de las distintas moléculas determinadas en los macrófagos.** 16A) A partir de un gráfica de puntos de tamaño contra granularidad se realizó una ventana que permitió identificar a los macrófagos positivos para CD11b. 16B) En los macrófagos positivos para CD11b se realizó una segunda ventana para el análisis de las distintas moléculas (CCR2, Zymosan, HLA-DR y CD86). 16C) Histograma representativo del análisis de Zymosan-FITC.



**Figura 17. Histogramas representativos de la expresión de CCR2 y fagocitosis de Zymosan-FITC.** Los monocitos y macrófagos se incubaron con 10  $\mu$ l de cada anticuerpo: anti-CCR2-PE, anti-CD11b-Cy7 (17A) y Zymosan-FITC (17B), anti-CD11b-Cy7 por separado. Los niveles de expresión se cuantificaran midiendo la intensidad media de fluorescencia de cada muestra utilizando el software FlowJo. Rojo: control de isotipo, azul: macrófagos y naranja: monocitos.



**Figura 18. Histogramas representativos de la expresión de HLA-DR y CD86.** Los macrófagos fueron pre-incubados con anticuerpo anti-TLR2 (Clona TL 2.1, eBioscience), anticuerpo anti-TLR4 (Clona HTA125, Santa Cruz Biotechnology) a 37°C por 1 hora, posteriormente se estimularon con Pam3CSK4 20 ng/ml (figura 18A y 18B) y LPS 100 ng/ml (figura 18C y 18D), respectivamente, durante 24 horas. Como control de anticuerpo los macrófagos fueron incubados con 10 µg de IgG (BD Biosciences). A las 24 horas se recuperaron las células y se incubaron con anticuerpos anti-HLA-DR-PE, anti-CD86-PECy5 y anti-CD11b-PECy7. Los niveles de expresión se cuantificaron midiendo la intensidad media de fluorescencia de cada muestra utilizando el software FlowJo. Rojo: control de isotipo, azul: macrófagos no estimulados, naranja: Pam3CSK4 o LPS, negro: anticuerpo anti-TLR2 más Pam3CSK4 o anti-TLR4 más LPS, verde: Pam3CSK4 o LPS más anticuerpo de control de isotipo.



**Figura 19. Histogramas representativos de la expresión de HLA-DR y CD86 al estímulo de LDLox.** Los macrófagos fueron pre-incubados con anticuerpo anti-TLR2 (Clona TL 2.1, eBioscience), anticuerpo anti-TLR4 (Clona HTA125, Santa Cruz Biotechnology) a 37°C por 1 hora, posteriormente se estimularon con LDLox 30 µg/ml durante 24 horas. Como control de anticuerpo los macrófagos fueron incubados con 10 µg de IgG (BD Biosciences). A las 24 horas se recuperaron las células y se incubaron con anticuerpos anti-HLA-DR-PE, anti-CD86-PECy5 y anti-CD11b-PECy7. Los niveles de expresión se cuantificaron midiendo la intensidad media de fluorescencia de cada muestra utilizando el software FlowJo. Rojo: control de isotipo, azul: macrófagos no estimulados, naranja: LDLox, negro: anticuerpo anti-TLR2, anti-TLR4 o anti-CD36 más LDLox, verde: LDLox más anticuerpo de control de isotipo. 19A y 19B: efecto anticuerpo anti-TLR2. 19C y 19D: efecto anticuerpo anti-TLR4. 19E y 19F: efecto anticuerpo anti-CD36.