



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Iztacala

TLR4 y NF- κ B como posibles indicadores de daño endotelial temprano en aorta de conejo con dieta grasa.

T E S I S

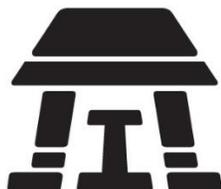
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

Juan Antonio González Rojas

DIRECTOR DE TESIS: Dr. José Rafael Jiménez Flores



Los Reyes Iztacala, Edo. de México, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Tabla de contenido

INTRODUCCIÓN	8
Endotelio	10
Disfunción endotelial	11
Estrés oxidativo	12
Estrés metabólico	13
Inmunología en la disfunción endotelial	14
Receptores Tipo Toll (TLR)	16
JUSTIFICACIÓN:	20
OBJETIVOS	21
Objetivos Generales	21
Objetivo Particulares:	21
MATERIAL Y MÉTODOS:	22
RESULTADOS	26
Histología	26
Bioquímica Sanguínea	29
Peso	30
Inmunohistoquímica (IHQ)	31
DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES	44
PERSPECTIVAS	45
APÉNDICE	46
REFERENCIAS	47

Dedico este trabajo a mi madre Juana Rojas Ramírez, quien me enseñó el valor del trabajo duro y nunca rendirme para alcanzar mis metas, a mi padre Antonio González Peña, quien me enseñó que el cambio de una persona es posible con amor y constancia, a mi hermana Jimena González Rojas, quien me enseñó el amor y la sinceridad, cualidades poco apreciadas por la gente, gracias no solo por su apoyo económico sino también emocional. A todos gracias por aguantar mis ausencias y las noches de vela, gracias por permitirme llamarlos... Mi Familia.

A Mariana, mi amor gracias por tu apoyo, comprensión y tolerancia en los momentos más difíciles.

Agradecimientos

“Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM: IN223133”

Agradezco a mi tutor el Dr. José Rafael Jiménez Flores por ser más que un guía, fue un mentor en toda la extensión de la palabra, gracias por su apoyo y conocimientos más allá del campo científico.

Gracias también al M. en C. Santiago Cristóbal Sigríst Flores no solo por la gran cantidad de conocimientos y experiencias compartidas, mi 2do tutor no oficial y aquel que también me motivo para seguir estudiando y brindarme su amistad.

Gracias a todos los miembros del laboratorio 7 de Inmunología de la UMF por su apoyo a este trabajo.

Gracias a mis Sinodales por el tiempo y consejos dedicados a este trabajo para hacer de este un trabajo de calidad.

Gracias a los organismos utilizados en este proyecto, que sin saberlo hicieron este trabajo posible.

Y a todos aquellos que han tocado mi vida de diferente manera y que formaron parte de mi formación académica y personal, GRACIAS.

“La mente de un biólogo se forja en el crisol de la ciencia. Eliges entrar en el fuego voluntariamente. Las llamas podrían destruirte; pero, si sobrevives, cada golpe del martillo servirá para moldear tu ser, cada gota de agua extraída de ti te dará temple y fortaleza”

“¿He hecho mi mejor esfuerzo el día de hoy?”

“La frase más excitante que se puede oír en ciencia, la que anuncia nuevos descubrimientos, no es “¡Eureka!” (¡Lo encontré!) sino “Es extraño” ”

-Isaac Asimov-

RESUMEN

Dietas con contenido energético elevado en combinación con una vida sedentaria, son factores de riesgo para el desarrollo de trastornos metabólicos, diversos factores influyen en el desarrollo de estas patologías, destacando las alteraciones del endotelio vascular, dislipidemias y presencia de un fenómeno inflamatorio crónico de bajo grado, todos relacionados con un aumento de receptores tipo toll (TLR, por sus siglas en inglés "Toll-like receptors"). Se ha descrito que TLR-4 puede reconocer ácidos grasos libres y desencadenar un proceso inflamatorio que culmina en la activación del factor de transcripción nuclear kappa B (NF- κ B, por sus siglas en inglés "Nuclear Factor kappa B"). Se evaluó la expresión de TLR4 y NF- κ B (p65) en arteria aorta de conejo (*Oryctolagus cuniculus*) tratados por 6 y 12 meses con ácido palmítico 3% (FAT) y el uso ácido acetilsalicílico (ASA), a dosis antiinflamatorias. Se observó incremento de TLR-4 a 12 meses en el grupo FAT así como presencia de NF- κ B a 6 meses y un aumento a 12 meses. Por otro lado, en el grupo FAT/ASA disminuye la expresión de TLR-4 a 12 meses así como NF- κ B a 6 y 12 meses. Se sugiere que la ausencia de alteraciones en los parámetros bioquímicos, peso de los organismos y morfología de la aorta, elementos comúnmente empleadas son procesos tardíos, pues el aumento de NF- κ B en tratamientos FAT desde 6 meses y un aumento de NF- κ B y TLR4 a 12 meses sugiere una alteración de forma temprana con respecto a los parámetros tradicionales utilizados en el diagnóstico de alteraciones metabólicas.

INTRODUCCIÓN

El estilo de vida del ser humano ha cambiado como consecuencia de diferentes factores: sociales, económicos, culturales y obviamente por los avances tecnológicos, en los cuales se busca la comodidad y bienestar con el mínimo esfuerzo posible, sin considerar que estas comodidades y falta de actividad física predispone a una vida sedentaria, combinada con una dieta rica en carbohidratos y lípidos favorece el desarrollo de alteraciones metabólicas causantes de enfermedades cardiovasculares (ECV).

Podemos describir a las ECV como patologías crónicas que aparecen después de una prolongada fase inflamatoria de bajo grado que afectan al sistema circulatorio (vasos sanguíneos y corazón). En 2008 la Organización Mundial de la salud (OMS) las declaró como las principales causas de muerte a nivel mundial, en 2012 la OMS calculó que las ECV cobraron la vida de 17.5 millones de personas, en segundo lugar se estableció el cáncer y en tercer lugar diabetes mellitus tipo 2 (OMS, 2012). En México la situación no parece modificarse, de acuerdo a datos del INEGI en 2012 se reporta que la principal causa de muerte fueron las ECV, seguida de diabetes mellitus tipo 2 y en tercer lugar tumores malignos (INEGI, 2012). Las cifras aquí expuestas plantean un panorama alarmante, de mantenerse supondrán un enorme problema económico-social, debido a que el gasto destinado al sector salud para controlar y tratar estos padecimientos aumentará de forma considerable, de igual forma la población afectada incrementará y las pérdidas económicas y de las personas serán severas.

El desarrollo de las ECV requiere de una serie de factores físico-ambientales durante un periodo prolongado, estos factores incluyen el tipo de alimentación (dietas abundantes en carbohidratos y lípidos), una escasa o nula actividad física y de factores genéticos. En México la encuesta nacional de salud y nutrición 2012 (ENSANUT) reporta que el 71.3% de la población de adultos mexicanos tiene problemas de sobrepeso u obesidad así como la tercera parte de los niños y jóvenes, posicionando a México como el país con mayor población con sobrepeso u obesidad a nivel mundial.(Gutiérrez et al., 2012).

En Diferentes estudios controlados, se ha identificado al colesterol elevado en sangre como uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de cardiopatía isquémica. En 1985 el instituto nacional de salud de la unión América se constituyó el Programa Nacional de Educación sobre Colesterol con el objetivo de educar a la población en general y la comunidad médica sobre la necesidad de identificar y tratar los altos niveles de colesterol en sangre, con la finalidad de reducir el riesgo de enfermedades coronarias formándose The Adult Treatment Panel (ATP), panel que fue representado por expertos de los principales asociaciones médicas y de salud, voluntarios en el cuidado de la salud, programas comunitarios y agencias gubernamentales con la finalidad de desarrollar guías para la detección, evaluación y tratamiento de las altas cantidades de colesterol en sangre, siendo una de las guías más aceptadas para el control de hipercolesterolemia, siendo la primera (ATP I) publicada en 1988, estas guías se han actualizado periódicamente.

The Adult Treatment Panel III (ATP III) en el año 2002, denominó síndrome metabólico a la agrupación de al menos 3 de 5 variables antropométricas, hemodinámicas y bioquímicas (grasa visceral, hiperglucemia, hipertrigliceridemia, hipocolesterolemia-HDL e hipertensión arterial) (Castelli et al., 1986; Morales Villegas, 2006). Aunque incluye criterios generales de otras definiciones, para este caso el ATP III considera fundamental la presencia de obesidad sin ser necesaria la presencia de resistencia a la insulina, pues la obesidad requiere de diferentes puntos de corte dadas las diferentes poblaciones, etnias y nacionalidades; poseen una distribución diferente de peso corporal y circunferencia y su relación entre los valores de circunferencia y el riesgo de diabetes mellitus tipo 2 y enfermedades cardiovasculares es diferente entre poblaciones. La generación de este concepto fue concebida con el fin de poder orientar al profesional de la salud sobre como poder identificar y generar estrategias con el fin de prevenir, minimizar o posponer el daño que pueden generar estos trastornos metabólicos si no se controlan oportuna y apropiadamente.

Se considera que alteraciones metabólicas como la dislipidemia en la cual se presenta un aumento en triglicéridos (hipertrigliceridemia), una disminución el colesterol HDL, un aumento en la concentración de LDL, así como un aumento en la concentración de ácidos grasos libres y el aumento de apolipoproteína B es altamente aterogénico. HDL bajo y alta concentración de triglicéridos pueden predecir de forma independiente el riesgo cardiovascular en pacientes con síndrome metabólico. Cuando se combinan perfiles de HDL bajo e hiperglucemia se promueve el daño vascular, uno de los elementos que se ven modificados por estas alteraciones es el endotelio vascular, su disrupción ha sido identificado como un factor importante en el desarrollo de ECV así como de Diabetes Mellitus 2 (DM2). (Badimón & Martínez-González, 2002).

Endotelio

La primera descripción histológica del endotelio fue realizada por el alemán Jacob Henle, hace 100 años, sin embargo los avances fueron poco significativos. Posteriormente Lord Howard Walter Florey estudió la arterioesclerosis, en 1966 se refirió exclusivamente a la estructura y a la fisiología del endotelio como barrera, sin embargo propone que esta estructura aportara "nuevos conocimientos sobre las células que se interponen entre la corriente sanguínea o linfática y las células tisulares", también aseguro que "la permeabilidad endotelial sería de gran importancia para aclarar la fase inicial del desarrollo de la arterioesclerosis"(de Berrazueta Fernández & de Arana, 2005). El endotelio es un tipo de epitelio plano simple (de una sola capa) que se conforman por células endoteliales de núcleo paralelo, filamentos contráctiles, pocas mitocondrias y vesículas pinocíticas y endocíticas. Esta monocapa de células recubre el interior de todos los vasos sanguíneos incluido el corazón, en donde reciben el nombre de endocardio.

El endotelio es un tejido que posee aproximadamente 6×10^{13} células, cubriendo una superficie aproximadamente de 100m^2 y pesando aproximadamente 1 Kg (Cines et al., 1998) sin embargo, hoy en día ha dejado de ser considerado como una simple monocapa celular que recubre la parte interna de los vasos sanguíneos, delimitando el flujo sanguíneo de la capa muscular lisa, a ser un órgano altamente especializado con varias funciones esenciales en los procesos fisiológicos, los cuales han sido

clasificados en 3 categorías: trófica (modulando la homeostasis metabólica) caracterizado por controlar el acceso a las células del excedente de glucosa, ácidos grasos y otros metabolitos; tónica (hemodinámica vascular) en la cual el endotelio realmente controla el tono vascular por acción del óxido nítrico y otras secreciones hormonales y moleculares que regulan la contracción vascular del musculo liso y por consiguiente el grado de vasoconstricción y vasodilatación. Por último el control del tráfico de células como macrófagos y leucocitos que requieren pasar a través de la capa endotelial para realizar sus funciones en el intersticio así como ejercer acciones antiagregantes plaquetarios, anticoagulantes y fibrinolítico (permeabilidad vascular, coagulación y extravasación celular) (Davidson, 2010). Las células endoteliales (CE) controlan la liberación de varios factores vasodilatadores y vasoconstrictores como el óxido nítrico, prostaciclina y endotelina, que mantienen el tono vascular, la presión y flujo sanguíneo así como una participación crucial en la regulación de la coagulación.(Moncada & Higgs, 2006).

Pero el endotelio no solo se limita a las funciones fisiológicas que se acaban de mencionar, este también juega un papel importante en las funciones inmunológicas ya que por su localización, las CE son una de las primeras células que interactúan con componentes microbianos en la circulación, para cumplir las funciones de reconocimiento y respuesta, las CE están integrados al sistema de activación de la respuesta inmune innata.(Badimón & Martínez-González, 2002). Cuando se altera el equilibrio en este tejido se genera un estado que se conoce como disfunción endotelial.

Disfunción endotelial

La disfunción endotelial fue descrita por primera vez en 1986 por Ludmer y colaboradores empleando técnicas invasivas en arterias epicardicas coronarias ateroscleróticas donde administraron vasodilatadores dependientes del endotelio observando la ausencia de contracción (Ludmer et al., 1986). En trabajos previos se buscaba el enlace "perdido" entre el riesgo cardiovascular y la aterosclerosis, observándose que los factores de riesgo como el envejecimiento, fumar e historial

familiar con ECV predisponen a la disfunción endotelial (Bonetti, Lerman, & Lerman, 2003). Estudios más recientes han asociado que la obesidad y una elevada concentración de proteína C reactiva también juegan un rol importante en la disfunción endotelial (Fichtlscherer et al., 2000; Sorensen et al., 1995; Thøgersen et al., 1998). Badimón y colaboradores definen a la disfunción endotelial como un desequilibrio en la biodisponibilidad de sustancias generadas en las CE, lo que predispone a la inflamación, vasoconstricción y el incremento de la permeabilidad vascular facilitando la agregación plaquetaria (Badimón & Martínez-González, 2002), si bien existen diferentes definiciones para la disfunción endotelial, es importante resaltar que la disfunción endotelial es un factor de importancia en el desarrollo de ECV.

Se vuelve un asunto de importancia reconocer y estudiar aquellos factores que alteran o dañan a las CE, entre estos factores se han reportado el estrés del retículo endoplásmico que provoca un plegamiento defectuoso en la estructura secundaria de las proteínas, lo cual activa las rutas de muerte celular en el endotelio. Otro proceso que daña a las CE es el estrés genotóxico, en el cual, una de las posibles causas de estrés se deba a las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) que pueden dañar el ADN celular, lo que activaría mecanismos de muerte celular y activaría la proteína p53, que regula la transcripción de diferentes genes que participan en la reparación, arresto del ciclo celular y apoptosis (Riley, Sontag, Chen, & Levine, 2008). En el presente trabajo, se considera que el estrés metabólico y el estrés oxidativo participa en la generación de ROS por parte de las mitocondrias de CE, contribuyendo a la disfunción de las CE y posteriormente a un fenómeno inflamatorio crónico de bajo grado, esto debido a que se modifiquen sistemas de regulación y control del metabolismo celular, en el cual las CE pueden sufrir un proceso de estrés a partir del metabolismo anormal por altas concentraciones de glucosa y lípidos en sangre, (Poerber, Min, & Bradley, 2009)

Estrés oxidativo

Las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés "Reactive oxygen species") son un grupo de moléculas muy reactivas generadas a partir de reducciones parciales de oxígeno molecular, de forma biológica se genera ROS en

los siguientes organelos y células: en los peroxisomas (organelos del citosol con gran cantidad de oxidasas) que generan peróxido de hidrogeno (H_2O_2); en los neutrófilos, que poseen en sus membranas la enzima NADPH oxidasa, que genera O_2 , en presencia de hierro se transforma en OH^- , este proceso se da principalmente en los procesos inflamatorios; en endotelio donde se encuentra la enzima xantina deshidrogenasa, que genera O_2 y por último la mitocondria, que constituye la fuente principal de especies reactivas de oxígeno, donde se efectúa en la cadena transportadora de electrones. ROS también puede funcionar como segundo mensajero en la regulación, crecimiento y proliferación de las CE, así como las funciones de barrera, vaso relajación y remodelación vascular (Rhee, Bae, Lee, & Kwon, 2000). Se ha demostrado que las anomalías metabólicas se encuentran relacionadas con la disfunción mitocondrial, lo que da paso al incremento de estrés oxidativo.

En los procesos de apoptosis celular el sistema inmune innato y adaptativo juega un rol importante en ¿suprimir? tejido dañado, sin embargo en ocasiones puede infringir daño en tejido circundante del hospedero como las CE que se encuentran expuestas a células circulantes y moléculas efectoras de la respuesta inmune, por lo que las CE son frecuentemente objeto de los efectos adversos de la respuesta inmune.

Estrés metabólico

Las CE aportan nutrición y oxígeno a los tejidos, debido a que estas se encuentran presentes en todos los vasos sanguíneos del sistema vascular y por lo tanto dentro de diferentes órganos, por lo que pueden experimentar estrés a partir de un metabolismo anormal debido a los altos niveles de glucosa y lípidos, que se asocia con la disminución de energía o hipoxia. Las altas concentraciones de ácidos grasos libres pueden activar a una familia de proteínas serina-treonina cinasa, conocidos como Proteína Cinasa C (PKC, por sus siglas en inglés) que fosforila residuos de serina y treonina de los receptores de insulina, disminuyendo la respuesta celular a insulina. Uno de los sustratos que no se fosforila es el sustrato del receptor de insulina 1, el cual no activa a fosfatidilinositol 3 cinasa – Akt (PI3K-Akt, por sus siglas en inglés) también conocido como proteína cinasa B que puede ocasionar resistencia a la insulina, en las CE. Otra de las moléculas que depende de la activación de Akt

es la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS, por sus siglas en inglés) si Akt no se activa, esta no puede fosforilar a la eNOS humana en la serina 1177, en consecuencia se inhibe la producción de ON e impide la vasodilatación.

La hiperglicemia también afecta la estructura, abundancia y composición de la matriz extracelular, ocasionando glicación de las proteínas de la matriz, exceso en la producción de proteínas e incremento de proteínas procoagulantes, inhibiendo la fibrinólisis, incrementando la apoptosis y disminuyendo la proliferación de CE. De forma similar los ácidos grasos libres inhiben la proliferación de CE e incrementan la apoptosis de las mismas, algunos estudios sugieren que la hiperglicemia y los ácidos grasos libres provocan estrés oxidativo así como una señalización proinflamatoria de manera similar. (Pober et al., 2009).

Inmunología en la disfunción endotelial

La relación que existe entre la inflamación y la respuesta inmune se puede explicar gracias al entendimiento de la respuesta inmune innata y adaptativa, la respuesta inmune se inicia cuando se reconocen patrones asociados a patógenos o daños en el organismo; estas moléculas pueden ser de origen microbiano (patrones moleculares asociados a patógenos PAMPs por sus siglas en inglés), o moléculas propias que no deberían de ser expresadas o entrar en contacto con el sistema inmune a menos que se trate de un patrón de daño o muerte celular (patrones moleculares asociados a daño DAMPs por sus siglas en inglés) (Witztum & Lichtman, 2013). Las moléculas DAMPs se pueden encontrar normalmente secuestradas dentro de las células y que pueden ser liberadas en respuesta a daño como la proteína de choque térmico (HSP por sus siglas en inglés). Sin embargo actualmente se ha asociado una serie de moléculas modificadas por el mismo organismo a través de varios procesos no enzimáticos como la formación de productos terminados de glicación avanzada. Esta serie de modificaciones a moléculas por el propio organismo pueden ser identificadas por varias proteínas solubles, receptores de superficie celular o intracelular (receptores de reconocimiento de patrones PRRs por sus siglas en inglés). Los mamíferos cuentan con un sistema de defensa compuesto por al menos 50 PRRs, los cuales se dividen en 3 grupos, receptores de genes inducibles de ácido retinoico I (RLRs, por sus siglas en inglés), receptores de

dominios de oligomerización unidos a nucleótidos (NLRs, por sus siglas en inglés) y los receptores tipo toll (TLR), juntos estos receptores proveen un sistema de vigilancia intra (RLR, NLR y TLR) y extra celular (TLR).(Cole et al., 2013)

La respuesta que se genera al estimular estos receptores es homeostática: erradicar microbios, estimular la eliminación de residuos celulares, reparar el tejido afectado y participa en la inflamación. En algunas ocasiones la respuesta innata puede dañar al organismo, debido a que el estímulo es persistente, excesivo o difícil de erradicar (Witztum & Lichtman, 2013). En estudios relacionados con la aterogénesis se ha sugerido que los estímulos que inician la respuesta inmune son la sumatoria de reacciones oxidativas, en particular la peroxidación lipídica. Tomando en cuenta que uno de los factores que favorece el desarrollo de la disfunción endotelial es el aumento en las concentraciones de lípidos y carbohidratos, esto ejemplifica lo que puede pasar dentro de los vasos sanguíneos cuando se presenta hipercolesterolemia e hiperglucemia durante tiempos prolongados.

Sin embargo existen moléculas que contrarrestan las actividades de los productos oxidados por estas altas concentraciones de compuestos derivados de la peroxidación lipídica, si estos mecanismos anti-oxidantes fallan, la respuesta inmune innata tiene la capacidad para remover estas moléculas oxidadas y modificadas, sin embargo, si esta remoción de moléculas no se lleva a cabo, se puede mantener y sostener una respuesta proinflamatoria. Actualmente se tiene evidencia de que uno de los principales mecanismos por los cuales se reconoce el daño oxidativo molecular es la identificación de epitopes específicos de oxidación (OSEs por sus siglas en inglés), una clase importante de DAMPs que constituyen un objetivo de la respuesta inmune innata (Miller et al., 2011); se ha reportado que la LDL oxidada corresponde con algunos de estos OSEs pueden mostrar una identidad molecular similar a algunos PAMPs, lo que explicaría porque existe una respuesta inmune innata, específicamente por los PRRs.

Se han reportado un gran número de PRRs que juegan un rol importante en la identificación de PAMPs y DAMPs de importancia en la génesis de una respuesta inflamatoria, entre los que podemos mencionar a los TLR.

Receptores Tipo Toll (TLR)

Dentro de la familia de los PRRs, los TLR juegan un papel crucial en el sistema inmune innato, el cual detecta la presencia y naturaleza de los patógenos microbianos, descritos por primera vez en la mosca *drosophila melanogaster* (Garfias & Gualito, 2005). Los TLR forman parte de las primeras líneas de defensa del hospedero (componen una familia de receptores transmembranales tipo I), caracterizados por un dominio extracelular rico en leucina (LRR por sus siglas en inglés) y un dominio intracelular Toll/IL1 (TIR), que muestra una homología con el receptor de la interleucina 1 (IL1) (Könner & Brüning, 2011). El dominio TIR es necesario para el reclutamiento de varios adaptadores moleculares y así poder activar las diferentes cascadas de señalización de los TLRs (O'Neill, 2008), se conocen al menos 13 TLRs en mamíferos, casi todos los TLR (exceptuando TLR3) emplean vías de señalización que se basan en el adaptador de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (MyD88 por sus siglas en inglés) que genera la activación del factor de transcripción nuclear- κ B (NF- κ B) y miembros del factor de respuesta de interferones (IRF, por sus siglas en inglés) (Cole et al., 2013).

En general los TLR se pueden dividir de acuerdo con su distribución, siendo TLR 1, 2, 4, 5 y 6 moléculas que se localizan en la membrana celular, el resto de los TLRs se ubican en las membranas del lisosoma y endosoma (Kumar, Kawai, & Akira, 2009). La única excepción es TLR-4, que puede translocarse desde la superficie del endosoma hacia la membrana celular e inducir una señalización con todos los adaptadores de señalización (Kagan et al., 2008).

Se ha reportado que cada TLR tiene un ligando específico que desencadena los mecanismos de señalización, siendo la mayoría de estos ligandos exógenos, sin embargo, han sido reportado numerosos ligandos agonistas endógenos que pueden ser reconocidos por TLR, generando daño celular, lesión y oxidación (Rifkin, Leadbetter, Busconi, Viglianti, & Marshak-Rothstein, 2005), ejemplos de ligandos endógenos son el grupo de caja de alta movilidad (HMGB-1), cristales de colesterol, fragmentos de lípidos modificados (Kondo et al., 2013; Panigrahi et al., 2013) así como ácidos grasos libres.(Schaeffler et al., 2009)

El reconocimiento de un ligando por parte de TLR inicia el reclutamiento de una serie de adaptadores con dominios TIR como MyD88, TIRAP, TRIF y TRAM, cuando el TLR se une a su ligando se recluta a la molécula MyD88, en adición a este proceso TLR-4 recluta otra molécula TIRAP, que sirve como unión entre el dominio TIR y la unión TLR-MyD88 y posteriormente reclutar a la molécula TRIF, este reclutamiento inicia la cascada de señalización en la que se activa el factor de transcripción nuclear NF- κ B e IRFs, lo que estimula la producción de citosinas inflamatorias. (Kumar et al., 2009)

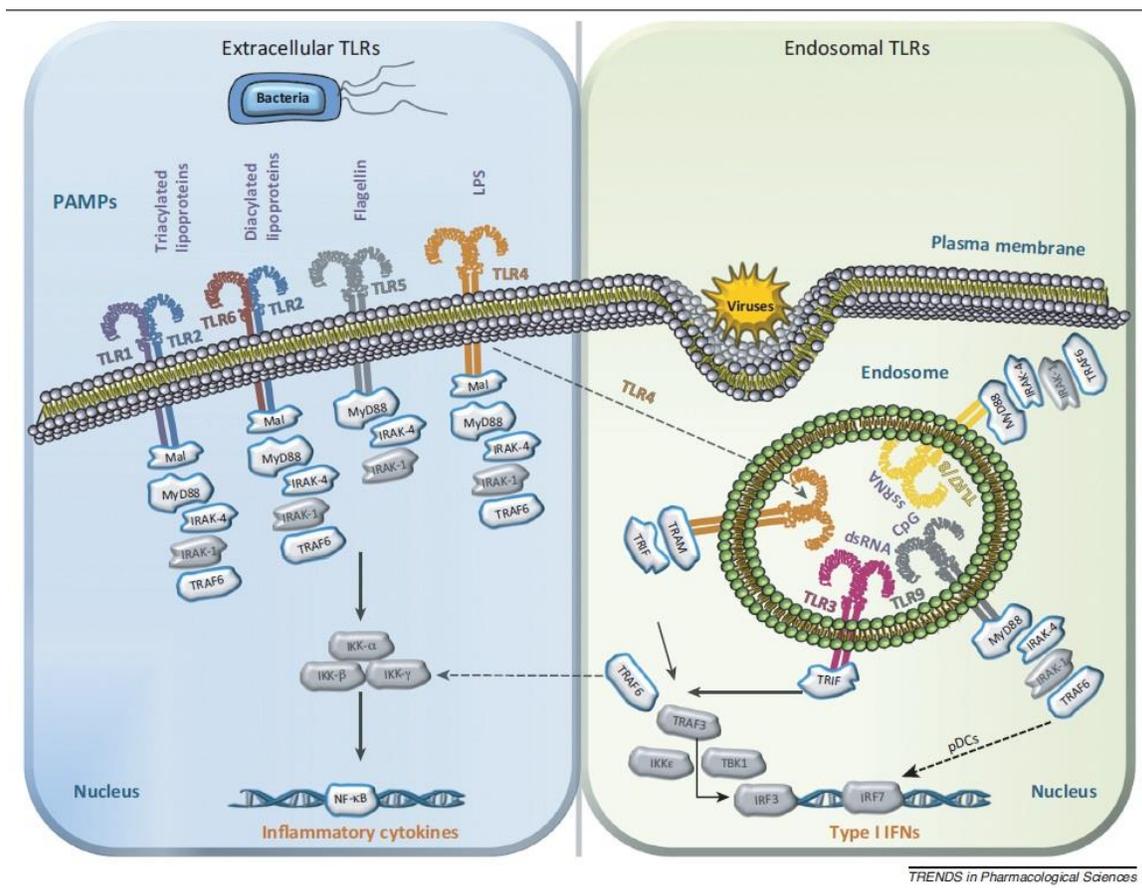


Imagen tomada de (Cole, Kassiteridi, & Monaco, 2013)

NF- κ B, es un dímero/monómero constituido por proteínas de la familia Rel, este factor se encuentra en el citoplasma unido a proteínas inhibitoras (I κ B), de los diferentes tipos de factores nucleares que existen, NF- κ B-p65 es un monómero que se ve relacionado estrechamente con el TLR-4, cuando TLR4 se ve activado este monómero es fosforilado, ubiquitinizado y degradado por el proteosoma, permitiendo

así la liberación de NF- κ B, este factor se trasloca al núcleo, donde regula la transcripción de diferentes genes diana (Echeverri, Nancy, & Mockus, 2008). De tal manera que los ácidos grasos libres saturados inducen inflamación endotelial, incluyendo un incremento en la señalización de NF- κ B, a través de la activación de los receptores tipo toll, previamente señalados (F. Kim et al., 2007).

Al considerar a las alteraciones metabólicas como patologías inflamatorias crónicas de bajo grado, dentro del ámbito clínico se ha hecho frecuente el uso de fármacos antiinflamatorios, entre ellos los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) como el ácido acetil salicílico (AAS), que es un inhibidor de la enzimas ciclooxigenasas (COX), inhibiendo de forma irreversible a COX-1 y modificando la cinética enzimática de COX-2, enzima encargada de la síntesis de tromboxanos, prostanoïdes y prostaglandinas, estos últimos mediadoras de la inflamación. En humanos adultos es frecuente el uso de 75 a 150 mg/día (dosis antiagregante) con la finalidad de evitar trombosis, dado que a estas dosis se impide la agregación plaquetaria. Sin embargo no hay antecedentes sobre la administración de dosis antiinflamatorias por tiempos prolongados y sus repercusiones en aterosclerosis. Siendo que existe un logaritmo de diferencia entre dosis antiagregantes y antiinflamatorias, el uso de dosis antiagregantes es común para evitar trombosis dentro de vasos que ya tienen aterosclerosis, no para prevenirla. Debido a que se carece completamente de información sobre el uso de tratamientos con AAS a dosis antiinflamatorias para prevenir o disminuir el daño vascular, es importante evaluar su eficacia en la prevención del daño vascular durante las etapas iniciales de la enfermedad. .

Es importante señalar que en el siglo pasado se comenzaron a realizarse una serie de estudios en los cuales se ha reportado la presencia TLR-4 en personas que presentaban cuadro clínico de aterosclerosis avanzada, otros estudios han resaltado que la ausencia de estos TLR puede beneficiar al organismos, ya que animales deficientes de TLR (knockout) a los cuales se les ha eliminado este receptor presentan una protección contra el desarrollo de la aterosclerosis, sin embargo estos organismos han sido sometidos a dietas con un alto contenido de colesterol (> 1%), el cual no representan la realidad de un sistema biológico como lo es el ser humano, pues en la vida cotidiana los alimentos y productos que se consumen de

manera habitual no contienen estas cantidades de elementos calóricos. El objetivo principal del presente trabajo es el estudio en un modelo experimental (*Oryctolagus cuniculus*) con un perfil lipídico similar al ser humano (Xiangdong et al., 2011) que fue sometido a una dieta que represente a la dieta humana (bajas concentraciones de lípidos, pero de una forma constante) durante periodos prolongados de consumo (6 y 12 meses de tratamiento). Se propone que el ácido palmítico incrementa la concentración de ácidos grasos, lo que promueve un incremento de ROS, este incremento genera un proceso inflamatorio que, de mantenerse por periodos prolongados de tiempo genera daño vascular, en este entendido, establecemos el uso de un antiinflamatorio para poder evitar este daño vascular antes de que se presente un proceso ateromatoso.

JUSTIFICACIÓN:

Las enfermedades cardiometabólicas y cerebrovasculares representan un serio problema de salud pública (INEGI, 2012; OMS, 2012), ya que constituyen las principales causas de muerte a nivel nacional. Se acentúan y aceleran al combinarse con un estilo de vida sedentario e inmerso en un medio ambiente con numerosos factores de estrés psicológico. México, es el país número 2 en obesidad a nivel mundial (Gutiérrez et al., 2012) y la asociación con dislipidemias, DM2, HAS y aterosclerosis tiene una elevada prevalencia por lo que es importante un diagnóstico temprano. Uno de los procesos que interviene de manera temprana en el desarrollo de estas patologías es la disfunción endotelial... , en este sentido han sido descritas una serie de moléculas que se ven relacionadas con la disfunción endotelial, entre estas moléculas se encuentran los TLR, específicamente la activación de TLR-4 reconociendo ácidos grasos libres que ha sido asociado con: la resistencia a la insulina, dislipidemia y obesidad que favorecen la aterosclerosis (Cole et al., 2013; J. J. Kim & Sears, 2010; Shi et al., 2006). La identificación de marcadores de daño endotelial permitirá establecer diagnósticos tempranos de alteraciones metabólicas para un mejor control y tratamiento de dichas enfermedades.

OBJETIVOS

Objetivos Generales

1. Identificar la presencia de receptores TLR-4 y NF- κ B (p65) en aortas de conejo alimentados con 3% de ácido palmítico
2. Evaluar el efecto del Ácido acetilsalicílico (ASA) en dosis antiinflamatoria (28.5mg/Kg/día).

Objetivo Particulares:

- Identificar por inmunohistoquímica de receptores tipo TLR-4 en arteria aortas de conejos a 6 y 12 meses de dieta con 3% de ácido palmítico.
- Identificación por inmunohistoquímica de NF- κ B (p65) en arteria aorta de conejos a 6 y 12 meses de dieta con 3% de ácido palmítico.
- Análisis de parámetros bioquímicos séricos de conejos a 6 y 12 meses de dieta con 3% de ácido palmítico.
- Análisis de peso corporal de conejos a 6 y 12 meses de dieta con 3% de ácido palmítico
- Identificar los cambios estructurales de la pared vascular en aortas de conejo a 6 y 12 meses con una dieta enriquecida con 3% de ácido palmítico.
- Comparar los cambios en la morfología vascular en el tratamiento que se le administra ASA.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Modelo experimental: Se utilizaron 48 conejos macho de la cepa Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus* NZW) de 30 días de nacidos con 300gr de peso, provenientes de la granja de la facultad de veterinaria y zootecnia de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. Los animales se mantuvieron a 23 ± 5 °C en un ciclo de 12 h de oscuridad y 12 h de luz en el bioterio de F.E.S. Iztacala.

Los animales se distribuyeron aleatoriamente en 8 grupos compuestos de 6 conejos, 4 grupos fueron nombrados y tratados de la siguiente forma:

1. Grupo control (CN), con alimento convencional y agua *Ad libitum*.
2. Grupo con dieta grasa (FAT), 3% de ácido palmítico adicionado al alimento,
3. Grupo grasa ácido acetilsalicílico (FAT/ASA) 3% de ácido palmítico adicionado al alimento más una dosis antiinflamatoria (28.5mg/kg/día) de Ácido acetilsalicílico en bebedero.
4. Grupo ácido acetilsalicílico (ASA) con alimento convencional y una dosis antiinflamatoria de Ácido acetilsalicílico (28.5mg/kg/día) en su bebedero.

Esta serie de tratamientos fue administrado durante 6 meses, a los 4 grupos restantes se les aplico el mismo esquema de tratamiento previamente descrito durante un periodo de 12 meses, transcurrido este tiempo los animales fueron sacrificados.

Los animales fueron sacrificados por dosis letal intraperitoneal de pentobarbital sódico (63mg/2.5kg de peso), previo a la anestesia general por punción de la vena marginal de la oreja se les extrajo una muestra sanguínea, se obtuvo el suero por centrifugación a 3500 rpm por 10min, a los sueros obtenidos se les realizó la cuantificación de glucosa, insulina, colesterol total, colesterol-HDL, colesterol-LDL y triglicéridos, procesada por un laboratorio de referencia internacional (CARPERMOR, S.A. de C.V.). La aorta fue disecada y colocada en PBS 1x frio durante 5 minutos, con el fin de lavar el exceso de sangre.

Preservación del tejido: El cayado aórtico se fijó en paraformaldehído al 4% por 1 hora, se lavó con PBS 1x 3 veces por 10 minutos y se colocó en una solución de sacarosa al 30% durante toda la noche, al día siguiente se montó en polivinil alcohol-polietilén glicol comercial (Tissue-tek) congelada en nitrógeno líquido y almacenada a -70°C. Se realizaron cortes a -20 C a 7µm de espesor, los portaobjetos que fueron utilizados fueron previamente desengrasados y tratados con 3-aminopropiltriétoxissilano al 1%, las laminillas se almacenaron a -20 C para su posterior uso en técnicas histológicas y pruebas de inmunohistoquímica.

Tinción histológica de Hematoxilina y Eosina (H y E): con el fin de ubicar posibles daños estructurales en el tejido aórtico, se utilizaron cortes hechos en frío, previo a realizar el procedimiento, la muestra se lavó con PBS 1x por 10 minutos, después fueron hidratadas a partir de alcohol al 100%, 96%, 90%, 80%, 70% y 50% después de esto, la muestra se colocó por 1 minuto en hematoxilina de Harris, se lavó por 1 minuto en agua corriente y después se colocó por 2 minutos 30 segundos en eosina ácida, posteriormente se lavó la laminilla por 5 minutos en alcohol 50% y se deshidrató a partir de alcoholes de 50% 70%, 80%, 90% 96% y 100% posteriormente fueron montadas con resina sintética para ser observadas al microscopio.

Inmunohistoquímica (IHQ): las pruebas IHQ se realizaron sobre los tejidos que fueron cortados en frío, se hidrataron por 10 minutos, se lavó la muestra con PBS y se dejaron secar por 10 min a 37°C, posteriormente se utilizó una técnica de recuperación de antígeno con citrato de sodio 10mM calentando el citrato de sodio a 60°C, se colocaron las laminillas por 10 minutos y posteriormente se ambientaron en PBS 1x frío durante 10 minutos, después de esto se colocaron en una cámara húmeda, se permeabilizaron con Triton 100x 0.25% en PBS 1x durante 60 minutos, posteriormente se lavaron con PBS 1x 3 veces 10 minutos cada vez en agitación suave.

Se realizó bloqueo de peroxidasa endógena en los tejidos con H₂O₂ al 1.5% en PBS1X en cámara húmeda por 5 minutos, se lavaron con PBS 1x, se realizó un bloqueo inespecífico con BSA al 10%, durante 30 minutos, se lavó con PBS 1x 2

veces 2 minutos, un bloqueo con suero total de conejo por 30 minutos, se lavó con PBS 1x 2 veces 2 minutos, todos ellos en cámara húmeda.

Finalmente se incubo el anticuerpo primario (TLR-4 monoclonales ratón anti humano (SCBT, sc-13593)) y NF-kB monoclonal ratón antihumano (SCBT, sc-8008)). Durante toda una noche a 4 C. (Todas las pruebas de IHQ contaron con un control negativo en donde se omite el anticuerpo primario y un control de isotipo en donde se utilizó un anticuerpo control que no reconoce proteínas de conejo). La dilución de los anticuerpos primarios TLR 2 y TLR4 fue (40µg/mL, 1:50), diluido en Triton x100 al 0.1 % en PBS 1X.

Después de la incubación del anticuerpo primario, se lavó con Triton x100 al 0.1 % en PBS 1X. 3 veces en agitación suave 10 minutos en cada lavado. Se incubo el anticuerpo secundario (chivo anti ratón biotinado (SCBT)) en una dilución 1:1000 (0.4µg/mL) Triton x100 al 0.1 % en PBS 1X esto en una cámara húmeda durante 60 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se lavó con Triton x100 al 0.1 % en PBS 1X. 3 veces por 10 minutos cada vez, se le coloco a las muestras estreptavidina peroxidasa (SAV/POX) y se incubo en cámara húmeda por 30 minutos, se lavó y se reveló con diamino bencidina (DAB) por 90 segundos.

Se realizó una contra tinción con hematoxilina de Harris, se lavó con agua destilada y deshidrato con alcoholes del 50-100%, cada vez por 10 segundos, finalmente se montó con resina sintética para su observación a microscopio y posterior obtención de fotografías para su posterior análisis.

Con el fin de realizar un análisis adecuado se propuso una semi-cuantificación de marca presente en todos los tejidos en diferentes zonas del tejido vascular (cuantificación de la marca total, cuantificación en musculo liso y cuantificación en células endoteliales). Las fotografías obtenidas fueron analizadas con el programa de manipulación de imágenes de GNU GIMP v 2.8.14., para este objetivo se decidió cuantificar los pixeles que representan la marca positiva presentes en cada tejido por duplicado, esto en 3 zonas diferentes de cada tejido. Posteriormente se realiza una relación de pixeles totales que conforma el tejido entre la cantidad de pixeles que

representan la marca, se obtuvo un promedio de estos datos y fueron sometidos a pruebas estadísticas (T de student, $P < 0.05$).

RESULTADOS

Histología

Se observan las microfotografías más representativas con tinción H y E, resultado de la exploración de arterias aorta de los tratamientos y control en busca de posibles alteraciones morfológicas, a 6 y 12 meses de tratamiento (Fig. 1 y Fig. 2 respectivamente), podemos observar que en esta tinción los núcleos celulares se tiñen de un color morado, mientras que el citoplasma celular se tiñe de un color rosado, se realizó la comparación del grosor de la capa media, (Fig. 3) en el cual no se presentan diferencias medias significativas entre los tratamientos ni entre los tiempos de tratamiento.

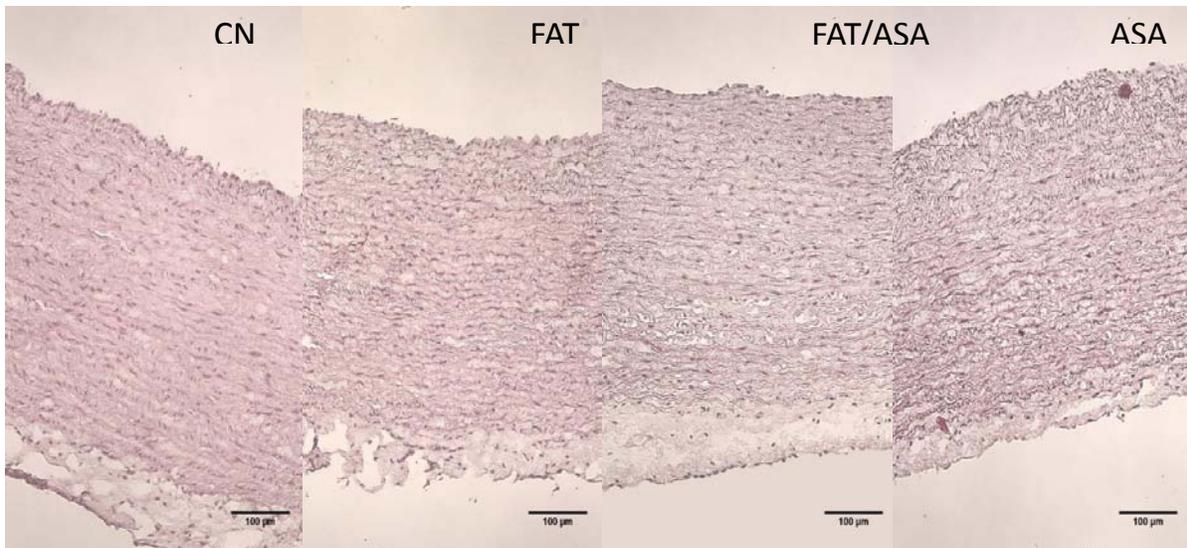


Fig. 1 Técnica histológica de H y E en aorta de conejo con 6 meses de tratamiento. (CN= control, FAT= Grasa 3%, FAT/ASA= Grasa 3% Aspirina, Asp= Aspirina, 40x).

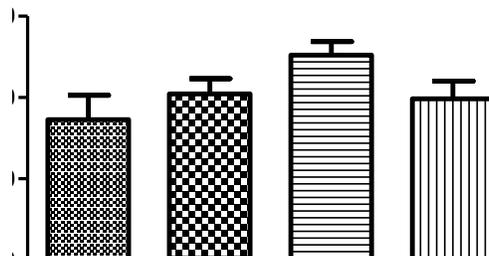


Fig. 1. Se observa el grosor de la capa media de aorta de conejo a 6 meses de tratamiento no se observan diferencias medias significativas

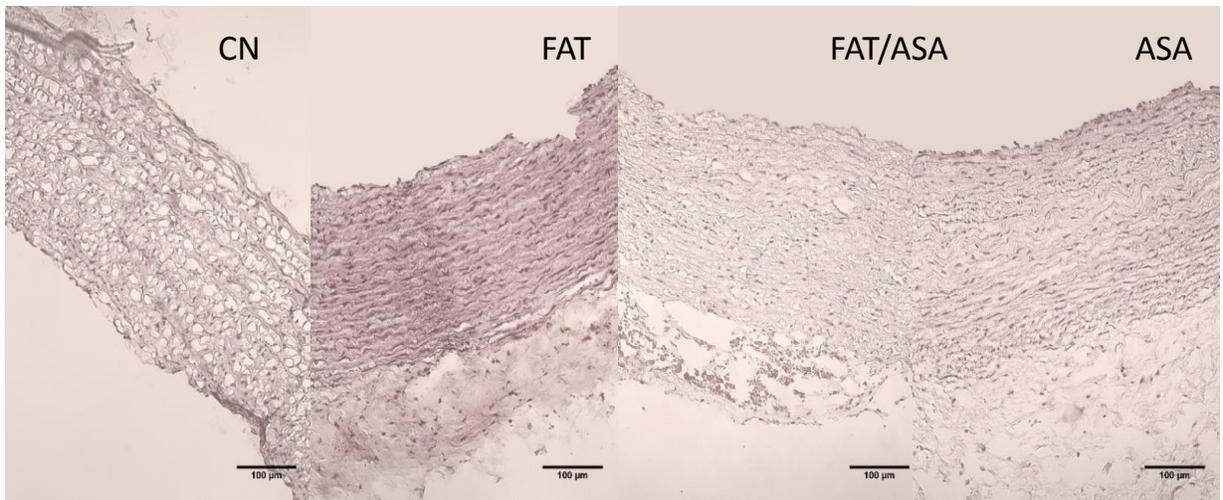


Fig. 2 Se observan la técnica histológica de H y E en aorta de conejo con 12 meses de tratamiento. (CN= control, FAT= Grasa 3%, FAT/ASA= Grasa 3% Aspirina, Asp= Aspirina, 40x).

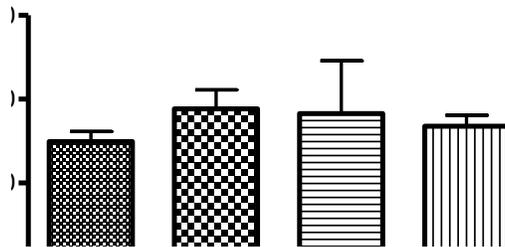


Fig. 2. Comparación de los promedios del grosor de la capa media a 12 meses de tratamiento. (Valor promedio +/- SEM), (CN= control, FAT= Grasa 3%, FAT/ASA= Grasa

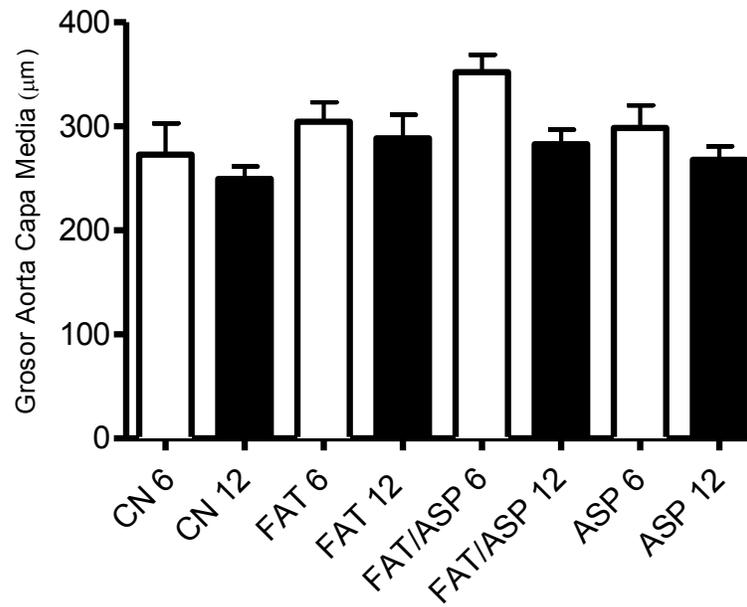


Fig. 3 Comparación de los promedios del grosor de la capa media a 6 y 12 meses de tratamiento. (Valor promedio +/- SEM), (CN= control, FAT= Grasa 3%, FAT/ASA= Grasa 3% Aspirina, Asp= Aspirina).

Bioquímica Sanguínea

Posteriormente se realizó el análisis de los elementos de la bioquímica sanguínea de los organismos a 6 y 12 meses, (Glucosa, Insulina, Colesterol total, Triglicéridos, Colesterol HDL, Colesterol LDL), empleando T de Student y error estándar de la media, en la cual no se presentan diferencias medias significativas entre 6 y 12 meses de tratamiento. (Fig. 4)

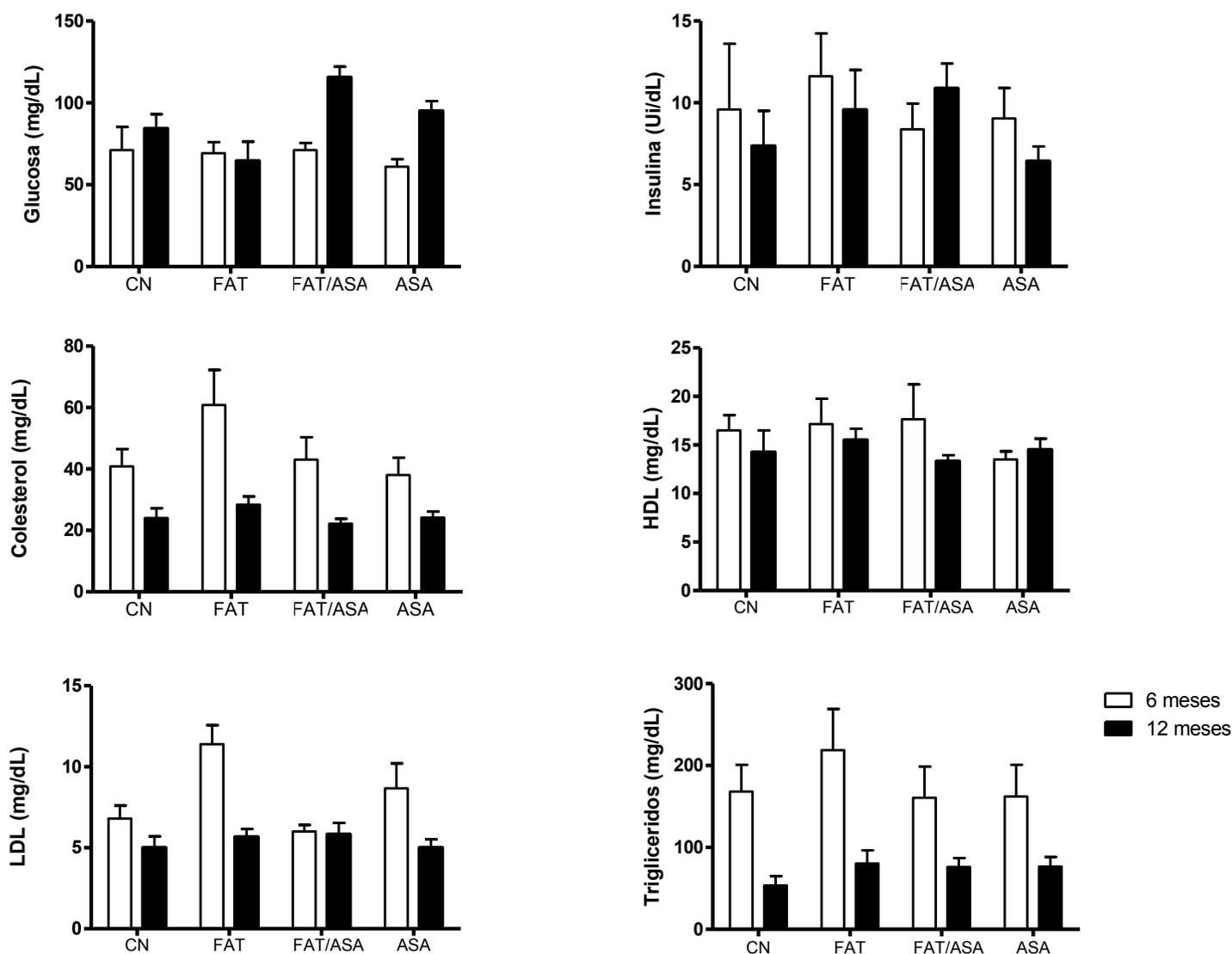


Fig. 4 Comparación de los parámetros de bioquímica sanguínea a 6 y 12 meses de tratamiento, en el cual no se presentan diferencias medias significativas (Valor promedio +/- SEM), (CN= control, FAT= Grasa 3%, FAT/ASA= Grasa 3% Aspirina, Asp= Aspirina).

Peso

Al analizar el peso de los organismos con los diferentes tratamientos a través del tiempo que duro el experimento, se observar un aumento en el peso de los organismos en los primeros 6 meses del experimento, sin embargo no se presentan diferencias medias significativas entre los tratamientos, (Fig. 5)

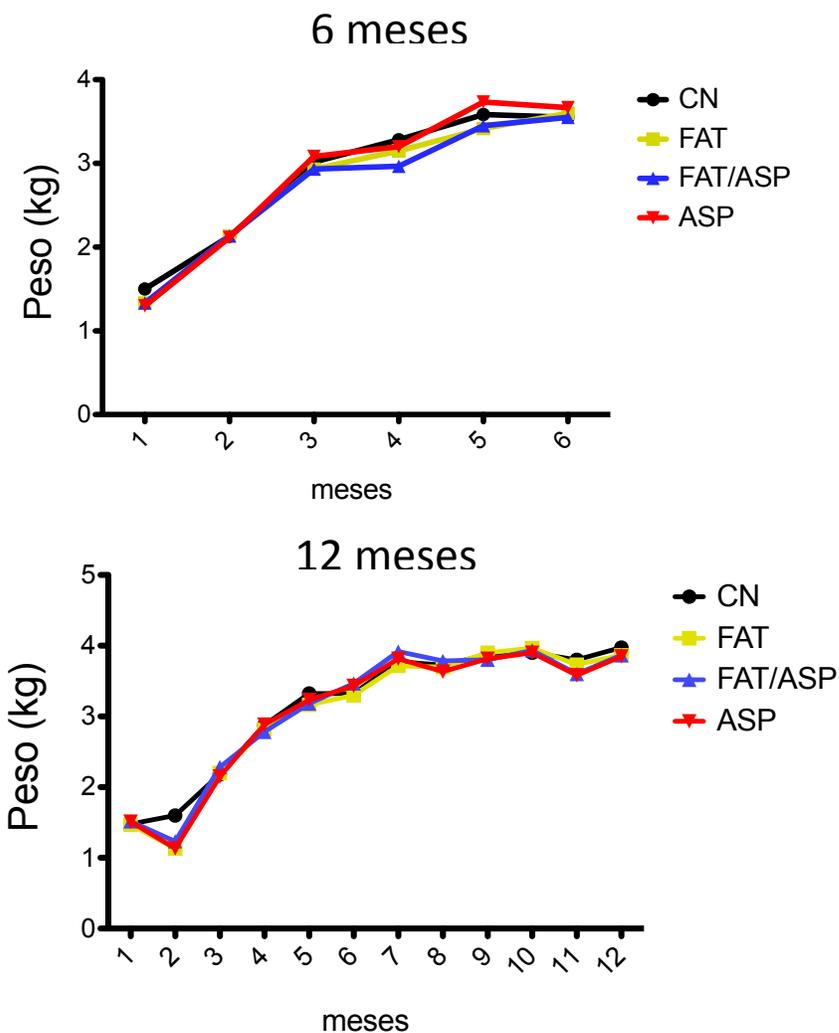


Fig. 5 Comparación pesos a 6 y 12 meses de tratamiento, en el cual no se presentan diferencias medias significativas, (CN= control, FAT= Grasa 3%, FAT/ASA= Grasa 3% Aspirina, Asp= Aspirina).

Inmunohistoquímica (IHQ)

Podemos observar las microfotografías más representativas de IHQ, en primer lugar podemos observar el control de isotipo y un control sin ningún tipo de anticuerpo (Fig. 6), solo se observa una pequeña marca de color marrón en el control de isotipo, posteriormente utilizando anticuerpos monoclonales de ratón contra TLR-4 en arteria aorta con 6 y 12 meses de tratamiento (Fig. 7 y Fig. 8 respectivamente), se puede apreciar la marca positiva de color marrón intenso, presente en el endotelio vascular y disperso en el tejido muscular liso, así mismo se observa de color morado los núcleos de las células endoteliales y musculares, esto a 40X.

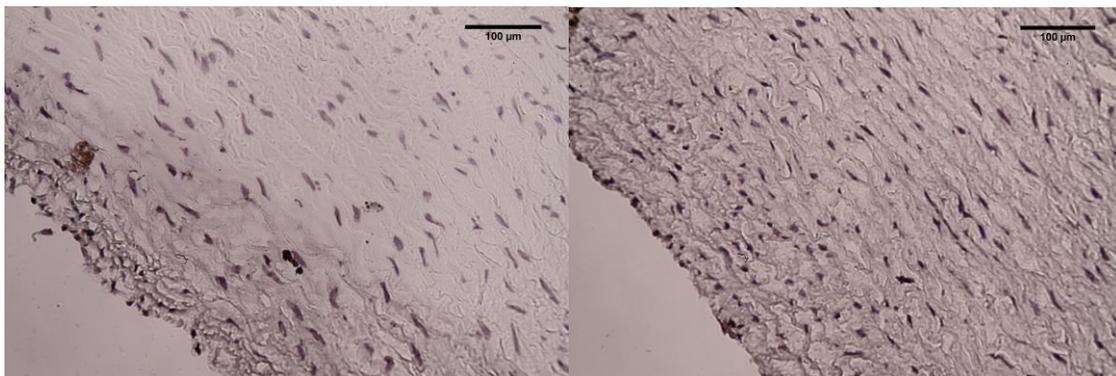


Fig. 6 se observa el control de isotipo y tejido sin anticuerpo 40X

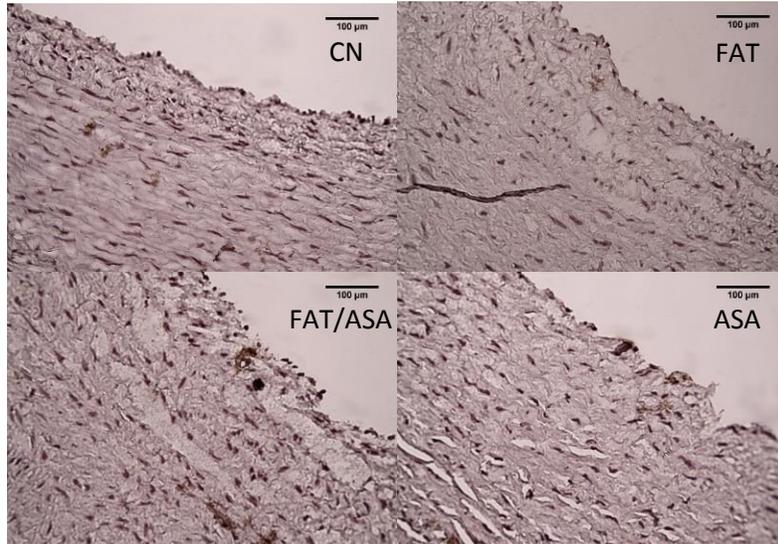


Fig. 7 Se observan la inmunodetección de TLR4 en aorta de conejo con 6 meses de tratamiento. (CN= control, FAT= Grasa 3%, FAT/ASA= Grasa 3% Ácido acetilsalicílico, ASA= Ácido acetilsalicílico, 40x)

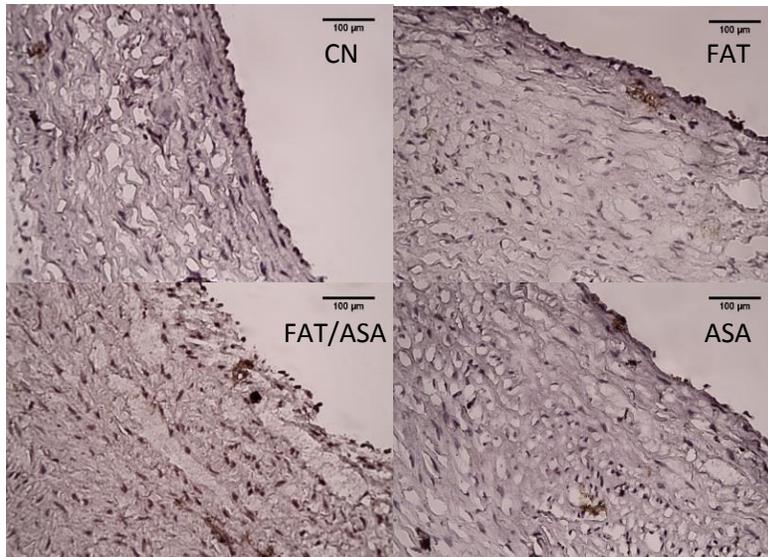


Fig. 8 Se observan la inmunodetección de TLR-4 en aorta de conejo con 12 meses de tratamiento. (CN= control, FAT= Grasa 3%, FAT/ASA= Grasa 3% Ácido acetilsalicílico, ASA= Ácido acetilsalicílico, 40x).

En estas microfotografías podemos observar las imágenes más representativas de IHQ utilizando anticuerpos monoclonales de ratón contra NF- κ B en arterias aorta con 6 y 12 meses de tratamiento (Fig. 9 y Fig. 10 respectivamente) donde el color marrón intenso representa la marca que identifica la presencia de NF- κ B en el tejido, así mismo podemos observar de color morado los núcleos de las células endoteliales y musculares lisas.

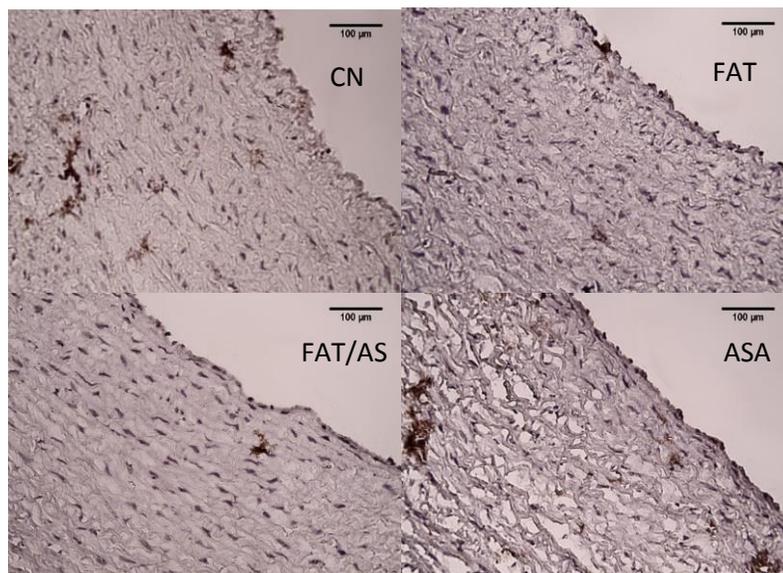


Fig. 9 Se observan la inmunodetección de NF- κ B (p65) en aorta de conejo con 6 meses de tratamiento. (CN= control, FAT= Grasa 3%, FAT/ASA= Grasa 3% Ácido acetilsalicílico, ASA= Ácido acetilsalicílico, 40x).

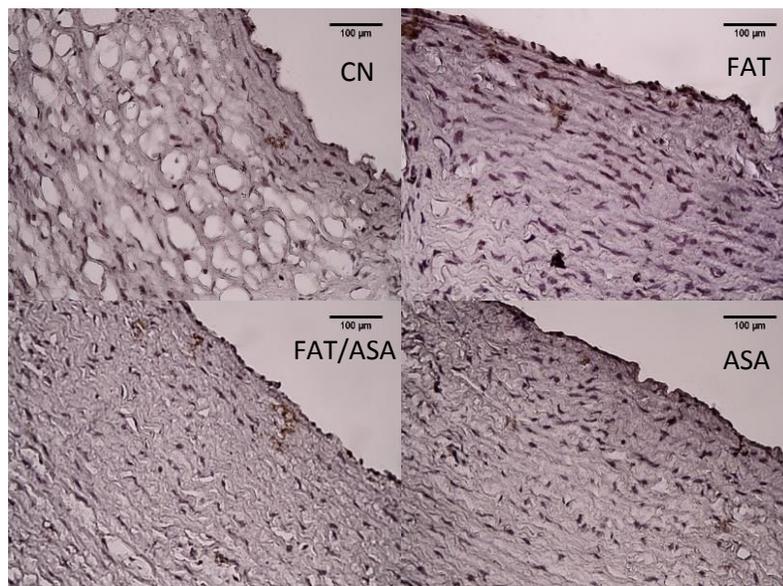


Fig. 10 Se observan la inmunodetección de TLR4 en aorta de conejo con 12 meses de tratamiento. (CN= control, FAT= Grasa 3%, FAT/ASA= Grasa 3% Ácido acetilsalicílico, ASA= Ácido acetilsalicílico.40x).

Con el fin de poder realizar un análisis más detallado de las marcas obtenidas en la IHQ, se realizó una semi-cuantificación, posteriormente se realizaron pruebas estadísticas T de student, con el fin de observar si existían diferencias medias significativas entre los tratamientos en diferentes estratos del tejido vascular (endotelio y capa media muscular). No se observan diferencias medias significativas en la capa media muscular, sin embargo, en el tejido endotelial se presentan diferencias medias significativas entre los grupos CN y FAT a 12 meses de tratamiento. (Fig. 11)

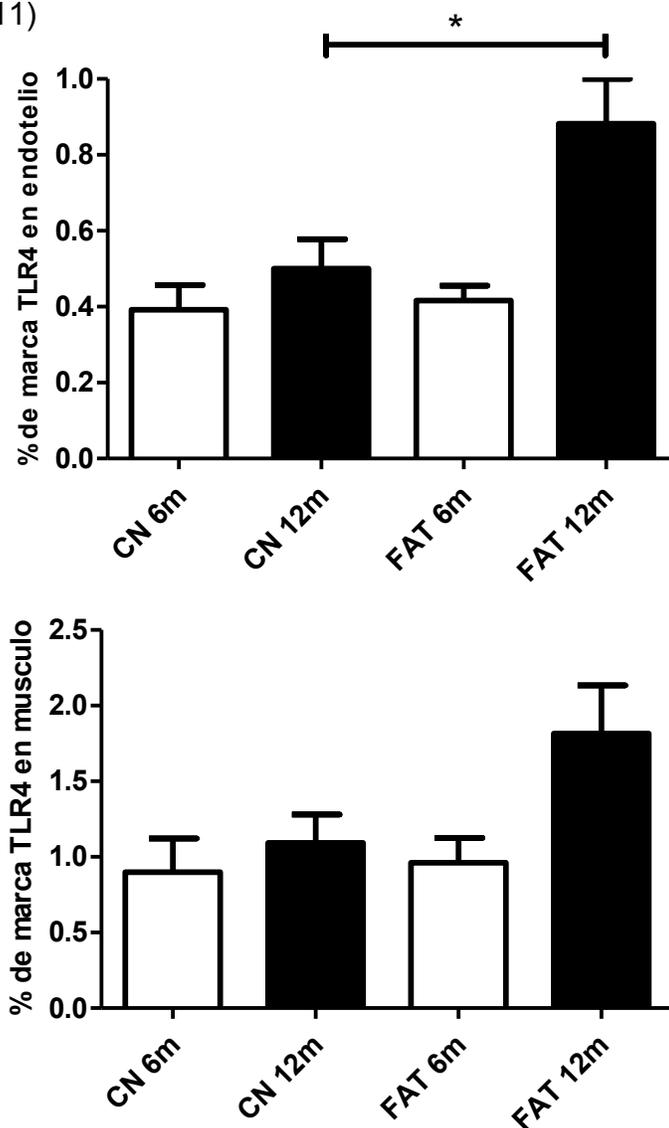


Fig. 11 Semi-cuantificación de marca TLR4 por pixeles en los tejidos de aorta a 6 y 12 meses, (Valor promedio +/- SEM), (CN= control, FAT= Grasa 3%).

Se analizó semicuantitativamente la expresión de TLR-4 a 6 y 12 meses de la capa endotelial entre los grupos FAT y FAT/ASA a 6 meses, presentando una disminución de TLR-4 en el grupo FAT/ASA a 12 meses, estadísticamente significativa ($P < 0.05$), en cuanto a la capa media muscular no se presentan diferencias medias significativas. (Fig. 12).

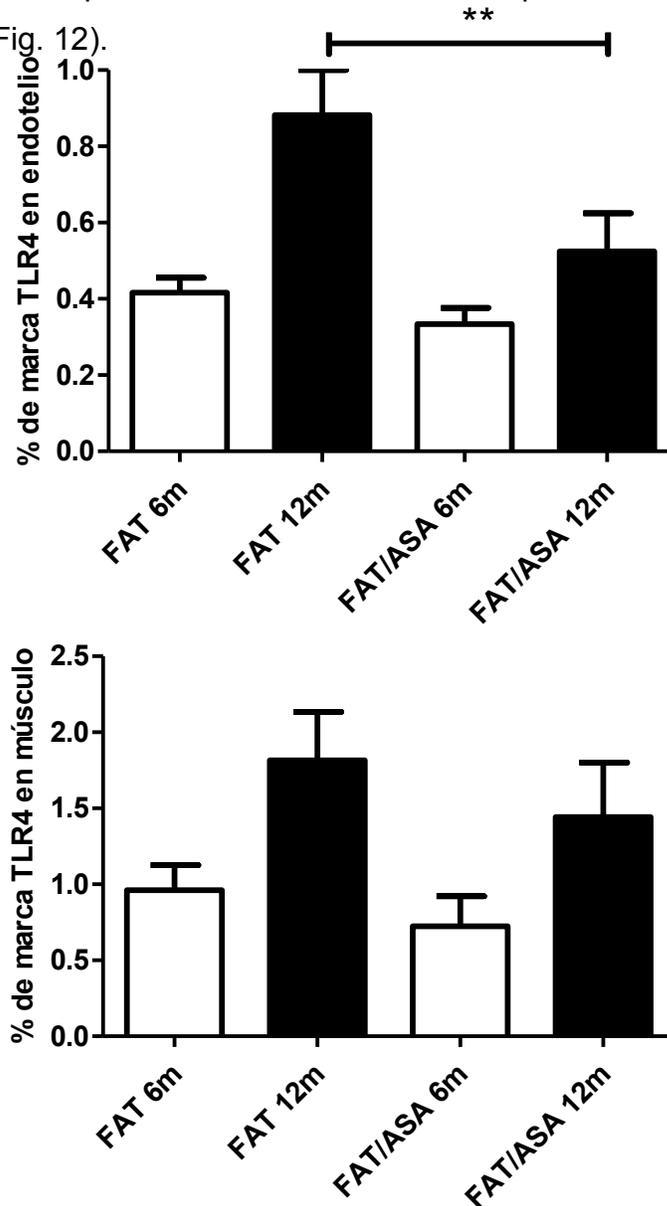


Fig. 12 Análisis semicuantitativo de la expresión de TLR-4 por pixeles en los tejidos de aorta a 6 y 12 meses, ($P < 0.05$) (Valor promedio +/- SEM), (Error estándar de la media, SEM), (FAT= Grasa 3%, FAT/ASA= Grasa 3%).

Al observarse la semicuantificación de NF-κB (p65) a 6 y 12 meses de la capa endotelial entre los grupos de CN y FAT (Fig. 13), se observaron diferencias medias significativas entre los grupos a 6m ($P < 0.05$) y 12 meses; al analizar la semicuantificación correspondiente a la capa media muscular no se presentan diferencias medias significativas.

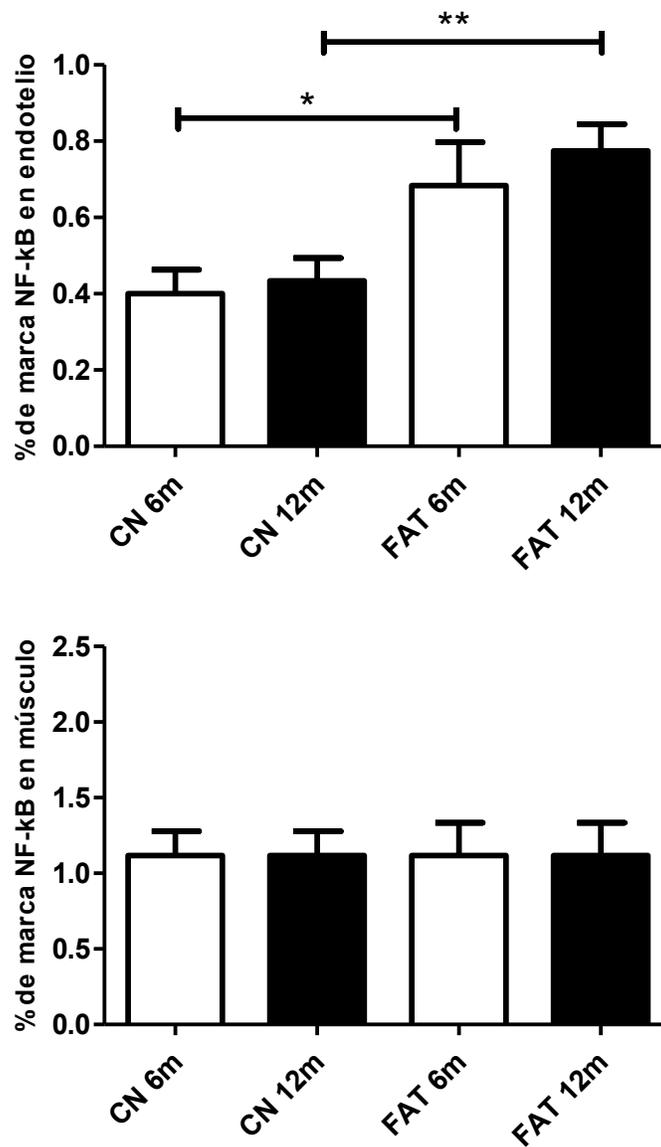


Fig.13 Semi-cuantificación de marca NF-κB por pixeles en los tejidos de aorta a 6 y 12 meses, ($P < 0.05$), (Valor promedio \pm SEM), (CN= control, FAT= Grasa 3%).

Al comparar la expresión de NF-κB (p65) a 6 y 12 meses en la capa endotelial entre los grupos FAT y FAT/ASA se observó una disminución estadísticamente significativa ($P < 0.05$) de NF-κB (p65) a los 6 meses, este comportamiento se mantiene a 12 meses, en contraste en la capa media muscular no se observaron diferencias medias significativas. (Fig. 14).

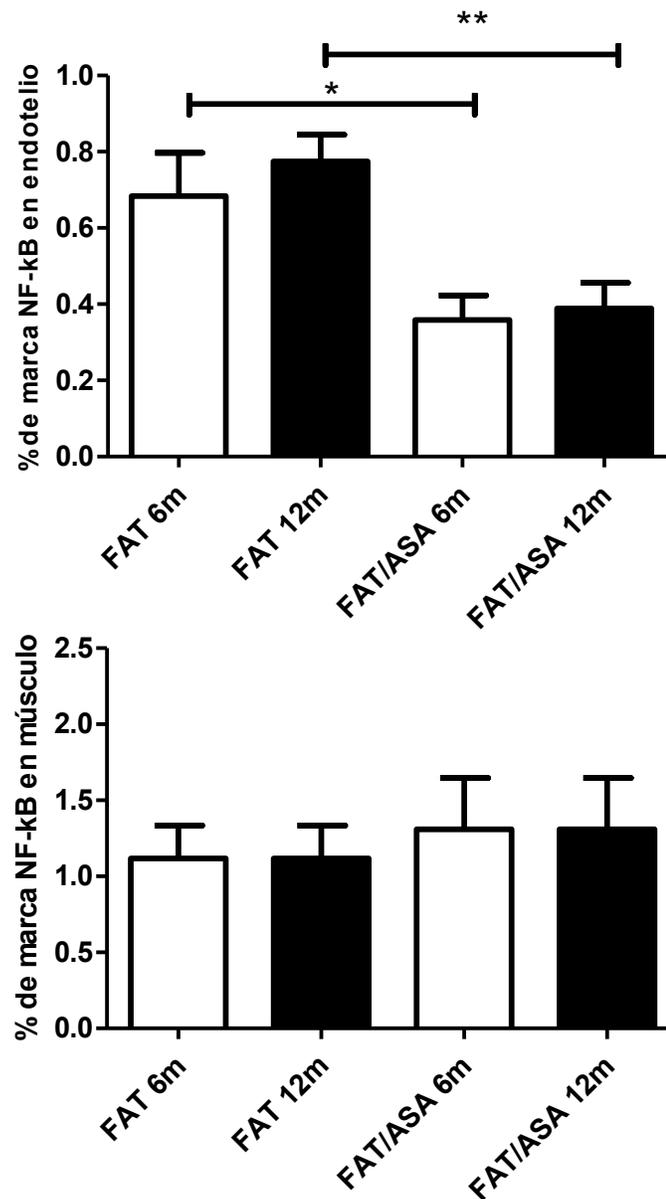


Fig. 14 Semi-cuantificación de marca NF-κB por pixeles en los tejidos de aorta a 6 y 12 meses, ($P < 0.05$), (Valor promedio \pm SEM), (FAT= Grasa 3%, FAT/ASA= Grasa 3% Aspirina).

El análisis entre el grupo CN y el grupo ASA no presenta diferencias medias significativas en la expresión de TLR4 y NF- κ B a 6 y 12 meses de tratamiento. (Fig. 15 y 16 respectivamente).

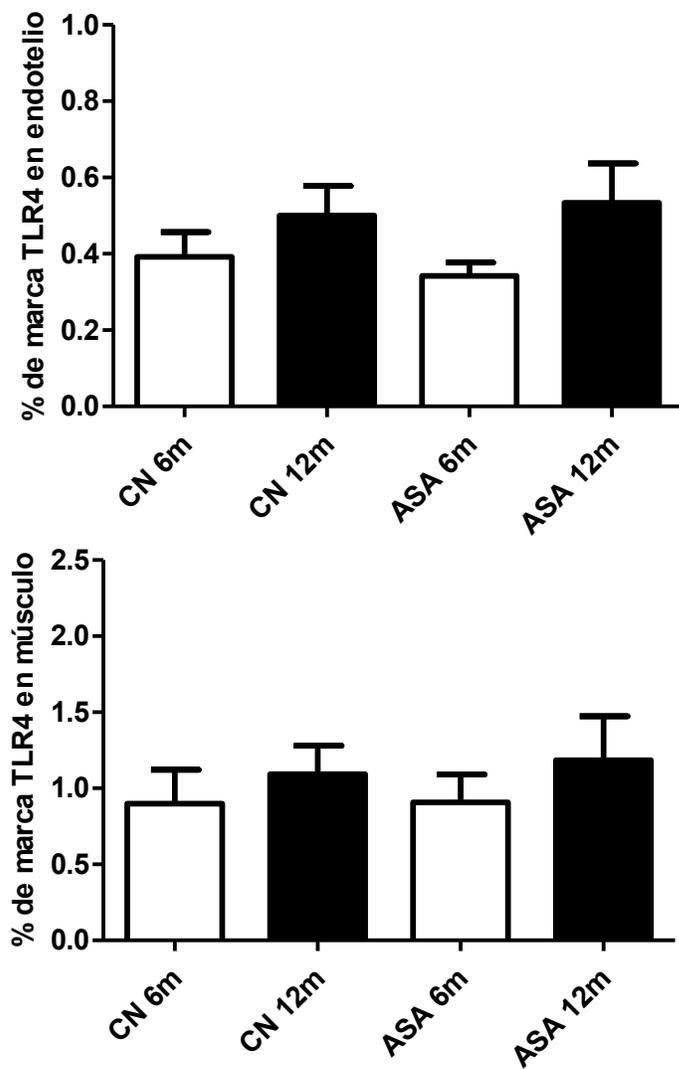


Fig.15 Semi-cuantificación de marca TLR4 por pixeles en los tejidos de aorta a 6 y 12 meses, ($P < 0.05$), (Valor promedio \pm SEM), (CN= control, ASA= Ácido acetilsalicílico).

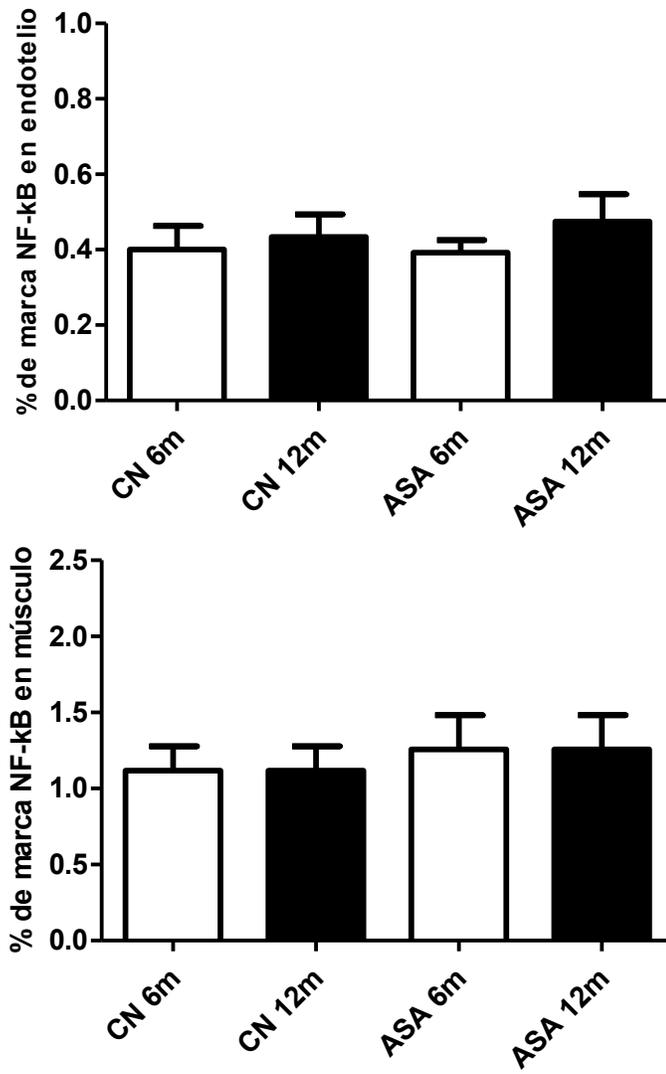


Fig. 16 Semi-cuantificación de marca NF-κB por pixeles en los tejidos de aorta a 6 y 12 meses, ($P < 0.05$), (Valor promedio \pm SEM), (CN= Control, ASA= Ácido acetilsalicílico).

DISCUSIÓN

Los parámetros de bioquímica sanguínea no presentan diferencias: glucosa, insulina, colesterol HDL, colesterol LDL y triglicéridos (Fig.4), parámetros que se utilizan en el campo médico y que son referencia para el diagnóstico. Así también cuando observamos el peso (Fig. 5) y la morfología histológica del tejido vascular no percibimos diferencias medias significativas,(Fig. 1 y fig. 2). En primera instancia puede interpretarse que los organismos experimentales se encontraban sanos, a pesar de la ingesta leve y constante de lípidos. Sin embargo la expresión diferencial de las moléculas TLR-4 y NF- κ B en los tejidos de las arterias aortas de los diferentes grupos experimentales demuestran la presencia de alteraciones tempranas en el endotelio vascular.

Los resultados observados por IHQ para TLR-4 en las diferentes capas del tejido vascular (capa endotelial y capa muscular), muestran que en la capa endotelial es en donde se presentan los cambios más tempranos. Es muy probable que el contacto estrecho de las células endoteliales con los componentes celulares y solubles del tejido sanguíneo permitan que el endotelio responda de manera temprana de tal manera que cuando analizamos los resultados del grupo CN con el grupo FAT a los 6 meses (Fig. 10), la presencia de TLR4 en ambos grupos es similar, sin embargo, cuando observamos el comportamiento del grupo CN con respecto al grupo FAT a 12 meses de tratamiento se puede observar un aumento significativo de TLR-4 en el grupo FAT, sugiriendo que la dieta enriquecida con 3% de ácido palmítico aumenta la presencia del receptor TLR-4 en células endoteliales. Esta diferencia estadísticamente significativa, permite concluir que dosis moderadas de ácido palmítico en la dieta durante un año es suficiente para incrementar la expresión de TLR-4 en las células endoteliales. TLR4 es un receptor capaz de ser activado por ácidos grasos libres (Schaeffler et al., 2009) por lo que la ingesta crónica de ácidos grasos saturados puede provocar dicha situación. Los reportes que se tienen del reconocimiento de ácidos grasos libres por TLR4 han sido con altas concentraciones, así como procesos inflamatorios ya establecidos y tardíos (Schaeffler et al., 2009) (Dasu & Jialal, 2011). El objetivo general de estos trabajos es acelerar alteraciones

metabólicas y facilitar su estudio, no obstante se deben realizar estudios con un modelo experimental que asemeje lo que ocurre en seres humanos, así que comparar estos trabajos con el presente estudio, sugiere que el enfoque general de los trabajos experimentales sobre alteraciones metabólicas deberían de centrarse en los efectos tempranos de alteraciones metabólicas, pues a pesar de ser una cantidad muy baja de ácido palmítico la que fue administrada en este trabajo, puede ser suficiente para fomentar una respuesta por parte de TLR4, lo que nos hace suponer que los procesos inflamatorios no requieren necesariamente de altas concentraciones, sino que parece estar relacionado con el consumo constante de ácidos grasos.

Al comparar la presencia de TLR-4 en la capa muscular en el grupo control a 6 y 12 meses (fig. 10) no se observan diferencias significativas. Las diferencias entre el grupo control y el grupo con ácido palmítico a 12 meses no son significativas, sin embargo la tendencia que se puede observar es francamente sugerente que la administración prolongada y moderada de ácido palmítico favorece la inducción de TLR4 sin embargo se requieren de futuros estudios para evaluar tiempos más prolongados y dosis mayores de ácidos grasos. No obstante TLR4, al ser un receptor constitutivo de membrana (Vaure & Liu, 2014) nos puede indicar que, probablemente en tiempos prolongados no solo afecta a las células endoteliales, sino que, por vecindad se vaya alterando la capa endotelial y luego la muscular generando una respuesta inflamatoria generalizada al total del tejido vascular.

Con relación a la molécula NF- κ B en el área endotelial a 6 meses podemos observar que el grupo alimentado con ácido palmítico presenta un mayor porcentaje en la expresión de NF- κ B que es un factor que se libera como consecuencia de la señalización principalmente de TLR-4. No obstante, la presencia de TLR-4 a 6 meses en el grupo FAT no se ve modificada, probablemente porque la expresión basal de TLR-4 sea suficiente para atender cambios mínimos en la concentración de ácidos grasos libres en sangre o existen otras moléculas capaces de activar NF- κ B que son inducidas por el consumo de ácido palmítico. En contraste a los a 12 meses se observó un aumento significativo de NF- κ B y de TLR-4, resultados similares se reportaron por (Maloney et al., 2009) en donde administraron 100 μ mol/L de palmitato

en cultivos de células endoteliales y tejido vascular *in vivo* y presentaron un rápido proceso inflamatorio que culmina en la activación de NF- κ B, cabe destacar que la concentración administrada de ácido palmítico es por mucho, superior a la administrada en el presente trabajo; probablemente la activación de NF- κ B que estamos observando a los 12 meses puede deberse al establecimiento de un proceso inflamatorio iniciado por el receptor TLR-4, pues al comparar los grupos FAT observamos un aumento semejante entre TLR4 y NF- κ B (p65) como reporto (F. Kim et al., 2007)..En la capa de musculo liso al comparar NF- κ B (p65) en los grupos CN y FAT a 6 y 12 meses, no se observaron diferencias medias significativas, se puede explicar por la ausencia de cambios en la expresión de TLR-4 en dicho tejido durante el tiempo evaluado. Los valores observados corresponden a la expresión constitutiva de NF- κ B, pues de forma normal, esta molécula se encarga de la regulación de proliferación celular entre otras funciones biológicas, incluso la capa de células endoteliales juegan un papel importante en la protección de la capa muscular, al ser la primera línea de contacto entre la sangre.

Cuando observamos el gráfico de la figura 11, el comportamiento de TLR-4 en el endotelio en el grupo FAT/ASA en comparación con el grupo FAT a 6 meses se puede apreciar que no existen diferencias significativas, pero cuando observamos estos grupos a 12 meses se puede apreciar una disminución de TLR-4 en el grupo FAT/ASA, sugiriendo que el ácido acetilsalicílico disminuye la expresión de TLR4. En el presente trabajo se administraron dosis antiinflamatorias del fármaco ASA, sin embargo nuestro conocimiento sobre ASA es principalmente su efecto inhibitorio sobre la enzima COX-1 y COX-2, estudios de toxicidad y de administración a dosis antiinflamatoria por largos periodos de tiempo es aún desconocido, esto sin mencionar que desconocemos los mecanismos y productos del metabolismo de la aspirina que pueden probablemente influir en la disminución de TLR4.

Un efecto semejante se observa con la molécula NF- κ B (p65) en los grupos tratados con FAT/ASP, pues es evidente una disminución significativa de NF κ B con respecto al tratamiento de FAT a 6 meses y 12 meses, Kopp & Ghosh en 1994 reportan que el ácido acetilsalicílico impide la degradación del factor de inhibición de NF κ B, sin embargo no se sabe con certeza cuál de los metabolitos de la aspirina puede estar

evitando la activación de NF-κB (p65). Por otro lado la administración de ASA a dosis antiinflamatorias por periodos largos de tiempo parece no ejercer una respuesta toxica negativa, pero dada la disminución de NF-κB y TLR4 se puede suponer que además del afecto antiinflamatorio, posiblemente pueda tener un efecto protector vascular, se requieren más estudios para comprender este proceso, pues desconocemos muchos procesos sobre la actividad del ASA a dosis antiinflamatorias por largos periodos de tiempo, así como los metabolitos que pueden estar interactuando con diferentes rutas de señalización celular y la toxicidad, pues los datos que se tienen sobre el uso de dosis antiinflamatorias por largos periodos de tiempo se han reportado en fenómenos inflamatorios establecidos como enfermedades cardiovasculares (Tohgi, Konno, Tamura, Kimura, & Kawano, 1992). No se tienen reportes sobre estudios en los que se haya empleado el ASA a dosis antiinflamatorias antes de que se establezca algún fenómeno inflamatorio.

CONCLUSIONES

1. El incremento de TLR-4 evidencia un proceso inflamatorio ocasionado por el consumo de una dieta con 3% de ácido palmítico por 12 meses.
2. La disminución de TLR-4 por la administración de aspirina en animales alimentados con ácido palmítico por 12 meses sugiere una posible función inmuno-moduladora.
3. El consumo de 3% de ácido palmítico ocasiona incremento de NF- κ B, lo que evidencia el desarrollo del fenómeno inflamatorio observado a partir de 6 meses y que se incrementa a 12 meses.
4. La reducción de NF- κ B ocasionada por la aspirina en el tratamiento con ácido palmítico a 6 y 12 meses, concuerda con lo descrito al evitar la degradación del factor de inhibición de NF- κ B.
5. La ausencia de alteraciones morfológicas en las arterias aortas, peso y parámetros bioquímicos en los diferentes tratamientos no traducen las alteraciones causadas por la ingesta crónica de una dieta adicionada con 3% de ácido palmítico.
6. Si tratáramos de extrapolar estos resultados con el humano, parece que los referentes bioquímicos sanguíneos, insulina, antropometría e histología clásica inclusive se alteran de manera tardía.

PERSPECTIVAS

- Evaluar el fenómeno inflamatorio causado por ácido palmítico y la activación de NF- κ B (p65) mediante la expresión de moléculas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β)
- Evaluar la función vascular de la arteria mediante pruebas de contracción y relajación del vaso como indicativo de disfunción endotelial.
- Esclarecer la participación de otros receptores TLR en el proceso de daño vascular.
- Evaluar la cinética de expresión de TLR-4 y NF- κ B con cantidades crecientes de ácido palmítico para determinar si a mayor consumo graso existe una aceleración del daño endotelial.

APÉNDICE

Solución amortiguadora salina-fosfato 10x (PBS)

80g de NaCl

2g de KCl

14.4g de Na₂HPO

Se agrega H₂O destilada, se ajusta el pH a 7.4 y se afora a 1000ml. Se filtra y se guarda a temperatura ambiente

Paraformaldehido 4% (10ml)

0.4 g de paraformaldehido

6 mL de PBS 1x, se lleva a 60°C para homogenizar con barra magnética

Se afora a 10mL con PBS 1x.

DAB (200 µL)

4.4 µL de DAB 50x

4.4 µL de H₂O₂

192 µL de Tris HCl pH 7.4

Se prepara 30 minutos antes de ser utilizado.

Sacarosa 30% (10mL)

3 g de Sacarosa

10 mL de PBS 1x

Se mezcla la solución y se refrigera posterior a su uso.

REFERENCIAS

- Badimón, Lina, & Martínez-González, José. (2002). Endotelio en la protección vascular: nuevos conocimientos. *Rev Esp Cardiol*, 55(Supl 1), 17-26.
- Bonetti, Piero O, Lerman, Lilach O, & Lerman, Amir. (2003). Endothelial dysfunction a marker of atherosclerotic risk. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 23(2), 168-175.
- Castelli, William P, Garrison, Robert J, Wilson, Peter WF, Abbott, Robert D, Kalousdian, Sona, & Kannel, William B. (1986). Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels: the Framingham Study. *Jama*, 256(20), 2835-2838.
- Cines, Douglas B, Pollak, Eleanor S, Buck, Clayton A, Loscalzo, Joseph, Zimmerman, Guy A, McEver, Rodger P, . . . Schwartz, Bradford S. (1998). Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*, 91(10), 3527-3561.
- Cole, Jennifer E, Kassiteridi, Christina, & Monaco, Claudia. (2013). Toll-like receptors in atherosclerosis: a 'Pandora's box' of advances and controversies. *Trends in pharmacological sciences*, 34(11), 629-636.
- Dasu, Mohan R, & Jialal, Ishwarlal. (2011). Free fatty acids in the presence of high glucose amplify monocyte inflammation via Toll-like receptors. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 300(1), E145-E154.
- Davidson, Sean Michael. (2010). Endothelial mitochondria and heart disease. *Cardiovascular research*, 88(1), 58-66.
- de Berrazueta Fernández, José Ramón, & de Arana, José María Segovia. (2005). *El endotelio, ese órgano desconocido. Estudio de su principal molécula de síntesis, el óxido nítrico, y de la función endotelial*: Real Academia Nac. Medicina.
- Echeverri, R, Nancy, P, & Mockus, S. (2008). Factor nuclear κB (NF- κB): signalosoma y su importancia en enfermedades inflamatorias y cáncer. *Revista Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia*, 56(2), 133-146.
- Fichtlscherer, Stephan, Rosenberger, Gunter, Walter, Dirk H, Breuer, Susanne, Dimmeler, Stefanie, & Zeiher, Andreas M. (2000). Elevated C-reactive protein levels and impaired endothelial vasoreactivity in patients with coronary artery disease. *Circulation*, 102(9), 1000-1006.
- Garfias, Carlos Ramón Bautista, & Gualito, Juan Joel Mosqueda. (2005). Papel de los receptores tipo toll en la inmunidad innata y su implicación en medicina veterinaria Role of toll-like receptors in innate immunity and their implication in veterinary medicine. *Vet. Méx*, 36, 4.
- Gutiérrez, JP, Rivera-Dommarco, J, Shamah-Levy, T, Villalpando-Hernández, S, Franco, A, & Cuevas-Nasu, L. (2012). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. Instituto Nacional de Salud Pública, 2012.
- INEGI. (2012). Mortalidad, causas de defunción. from <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/temas/default.aspx?s=est&c=17484>
- Kagan, Jonathan C, Su, Tian, Horng, Tiffany, Chow, Amy, Akira, Shizuo, & Medzhitov, Ruslan. (2008). TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon- β . *Nature immunology*, 9(4), 361-368.
- Kim, Francis, Pham, Matilda, Luttrell, Ian, Bannerman, Douglas D, Tupper, Joan, Thaler, Joshua, . . . Schwartz, Michael W. (2007). Toll-like receptor-4 mediates vascular inflammation and insulin resistance in diet-induced obesity. *Circulation research*, 100(11), 1589-1596.
- Kim, Jane J, & Sears, Dorothy D. (2010). TLR4 and insulin resistance. *Gastroenterology research and practice*, 2010.

- Kondo, Yuji, Ikeda, Kazutaka, Tokuda, Noriyo, Nishitani, Chiaki, Ohto, Umeharu, Akashi-Takamura, Sachiko, . . . Taguchi, Ryo. (2013). TLR4–MD-2 complex is negatively regulated by an endogenous ligand, globotetraosylceramide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(12), 4714-4719.
- Könner, A Christine, & Brüning, Jens C. (2011). Toll-like receptors: linking inflammation to metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 22(1), 16-23.
- Kumar, Himanshu, Kawai, Taro, & Akira, Shizuo. (2009). Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and biophysical research communications*, 388(4), 621-625.
- Ludmer, Paul L, Selwyn, Andrew P, Shook, Thomas L, Wayne, Richard R, Mudge, Gilbert H, Alexander, R Wayne, & Ganz, Peter. (1986). Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *New England Journal of Medicine*, 315(17), 1046-1051.
- Maloney, Ezekiel, Sweet, Ian R, Hockenbery, David M, Pham, Matilda, Rizzo, Norma O, Tateya, Sanshiro, . . . Kim, Francis. (2009). Activation of NF-κB by palmitate in endothelial cells a key role for NADPH oxidase-derived superoxide in response to TLR4 activation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 29(9), 1370-1375.
- Miller, Yury I, Choi, Soo-Ho, Wiesner, Philipp, Fang, Longhou, Harkewicz, Richard, Hartvigsen, Karsten, . . . Que, Xuchu. (2011). Oxidation-specific epitopes are danger-associated molecular patterns recognized by pattern recognition receptors of innate immunity. *Circulation Research*, 108(2), 235-248.
- Moncada, S, & Higgs, EA. (2006). Nitric oxide and the vascular endothelium *The Vascular Endothelium I* (pp. 213-254): Springer.
- Morales Villegas, Enrique. (2006). Síndrome X vs síndrome metabólico: Entendiendo sus coincidencias y sus diferencias hacia una " nueva cardiología". *Archivos de cardiología de México*, 76, 173-188.
- O'Neill, Luke AJ. (2008). The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunological reviews*, 226(1), 10-18.
- OMS. (2012). Las 10 causas principales de defuncion en el mundo. from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/es/index2.html>
- Panigrahi, Soumya, Ma, Yi, Hong, Li, Gao, Detao, West, Xiaoxia Z, Salomon, Robert G, . . . Podrez, Eugene A. (2013). Engagement of platelet toll-like receptor 9 by novel endogenous ligands promotes platelet hyperreactivity and thrombosis. *Circulation research*, 112(1), 103-112.
- Pober, Jordan S, Min, Wang, & Bradley, John R. (2009). Mechanisms of endothelial dysfunction, injury, and death. *Annual Review of Pathological Mechanical Disease*, 4, 71-95.
- Rhee, Sue Goo, Bae, Yun Soo, Lee, Seung-Rock, & Kwon, Jaeyul. (2000). Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. *Science Signaling*, 2000(53), pe1-pe1.
- Rifkin, Ian R, Leadbetter, Elizabeth A, Busconi, Liliana, Viglianti, Gregory, & Marshak-Rothstein, Ann. (2005). Toll-like receptors, endogenous ligands, and systemic autoimmune disease. *Immunological reviews*, 204(1), 27-42.
- Riley, Todd, Sontag, Eduardo, Chen, Patricia, & Levine, Arnold. (2008). Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(5), 402-412.
- Schaeffler, Andreas, Gross, Philipp, Buettner, Roland, Bollheimer, Cornelius, Buechler, Christa, Neumeier, Markus, . . . Falk, Werner. (2009). Fatty acid-induced induction of Toll-like receptor-4/nuclear factor-κB pathway in adipocytes links nutritional signalling with innate immunity. *Immunology*, 126(2), 233-245.
- Shi, Hang, Kokoeva, Maia V, Inouye, Karen, Tzamelis, Iphigenia, Yin, Huali, & Flier, Jeffrey S. (2006). TLR4 links innate immunity and fatty acid–induced insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, 116(11), 3015.

- Sorensen, Keld E, Celermajer, David S, Spiegelhalter, David J, Georgakopoulos, Dimitri, Robinson, Jacqui, Thomas, Odette, & Deanfield, John E. (1995). Non-invasive measurement of human endothelium dependent arterial responses: accuracy and reproducibility. *British heart journal*, 74(3), 247-253.
- Thögersen, Anna M, Jansson, Jan-Håkan, Boman, Kurt, Nilsson, Torbjörn K, Weinehall, Lars, Huhtasaari, Fritz, & Hallmans, Göran. (1998). High plasminogen activator inhibitor and tissue plasminogen activator levels in plasma precede a first acute myocardial infarction in both men and women Evidence for the fibrinolytic system as an independent primary risk factor. *Circulation*, 98(21), 2241-2247.
- Tohgi, Hideo, Konno, Shu, Tamura, Kenichi, Kimura, Bunsho, & Kawano, Katsumi. (1992). Effects of low-to-high doses of aspirin on platelet aggregability and metabolites of thromboxane A2 and prostacyclin. *Stroke*, 23(10), 1400-1403.
- Vaure, Céline, & Liu, Yuanqing. (2014). A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. *Frontiers in immunology*, 5.
- Witztum, Joseph L, & Lichtman, Andrew H. (2013). The influence of innate and adaptive immune responses on atherosclerosis. *Annual review of pathology*, 9, 73-102.
- Xiangdong, Li, Yuanwu, Liu, Hua, Zhang, Liming, Ren, Qiuyan, Li, & Ning, Li. (2011). Animal models for the atherosclerosis research: a review. *Protein & cell*, 2(3), 189-201.