



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

## “PAPEL DE LAS MICROPARTÍCULAS EN LA ENFERMEDAD ARTERIAL CORONARIA”

### TESIS

%) 1 PARA OS( ° & \$#&EL TITUŽ# DE:

! ° 1' ( &# 1" ĸ ħ " ĸ Ē ' ! C ĸ ĸ °'

PRESENTA:

**DR. OSCAR MILLÁN ITURBE**  
RESIDENTE DE CARDIOLOGÍA INTERVENCIONISTA

TUTOR DE TESIS:

**DRA. AURORA DE LA PEÑA DÍAZ**  
FACULTAD DE MEDICINA

CIUDAD DE MÉXICO, MARZO 2016



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.

**RESPONSABLE DE LA UNIDAD ACADÉMICA  
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA "IGNACIO CHAVEZ" (INCICH)**

---

**DR. PEDRO ANTONIO REYES LÓPEZ**

**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO (UNAM)**

---

**DRA. AURORA DE LA PEÑA DÍAZ**

**MEDICO RESIDENTE DE CARDIOLOGIA INTERVENCIONISTA**

---

**DR. OSCAR MILLÁN ITURBE**



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MEDICAS

TESIS DE TITULACIÓN DE MAESTRIA EN CIENCIAS MEDICAS

TITULO:

**“PAPEL DE LAS MICROPARTICULAS EN LA ENFERMEDAD ARTERIAL  
CORONARIA”**

P R E S E N T A :

**DR. OSCAR MILLÁN ITURBE**  
RESIDENTE DE CARDIOLOGÍA INTERVENCIONISTA

**TUTOR DE TESIS:**

**DRA. AURORA DE LA PEÑA DÍAZ**  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

## INDICE

	<b>Página</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>5</b>
<b>Resumen</b>	<b>6</b>
<b>Marco teórico</b>	
<b>Capítulo I: Síntesis de las micropartículas</b>	<b>8</b>
<b>Capítulo II: Composición de las micropartículas</b>	<b>12</b>
<b>Capítulo III: Función de las micropartículas</b>	<b>18</b>
<b>Capítulo IV: Micropartículas y aterosclerosis</b>	<b>25</b>
<b>Justificación</b>	<b>48</b>
<b>Variabilidad del Problema a Resolver</b>	<b>49</b>
<b>Antecedentes amplios sobre el tema</b>	<b>50</b>
<b>Preguntas de investigación</b>	<b>51</b>
<b>Hipótesis</b>	<b>52</b>
<b>Objetivos</b>	<b>53</b>
<b>Metodología</b>	<b>54</b>
<b>Resultados</b>	<b>65</b>
<b>Discusión y conclusiones</b>	<b>81</b>
<b>Referencias</b>	<b>86</b>

## AGRADECIMIENTOS

**A DÍOS**, por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.

**A MIS PADRES**, por apoyarme en todo momento, por los valores que me han inculcado, y por haberme dado la oportunidad de darme una excelente educación en el transcurso de mi vida. Sobre todo por ser un ejemplo de vida a seguir.

**A MI HERMANO Y MARÍ**, por ser parte importante de mi vida y representar la unidad familiar

**A LA DRA. DE LA PEÑA DÍAZ**, por su paciencia, dedicación, motivación, criterio y aliento. Ha hecho fácil lo difícil, ha sido un privilegio contar con su guía y ayuda.

**AL DR. PEÑA DUQUE**, por el apoyo que me ha brindado a lo largo de mi carrera, por su tiempo y amistad. Y por dejarme realizar el trabajo en el departamento de hemodinamia del INCICH

**AL DR. PEDRO REYES**, Por su confianza desde el inicio del posgrado y su crítica siempre constructiva para beneficio a mi formación.

**AL DR. ANGLÉS CANO**, por haberme permitido estar en su laboratorio en Paris, Francia, y hacerme ver que no hay imposibles, gracias .

**AL H. DE CARDIOLOGIA CMN SXXI**, por darme la oportunidad de formarme como cardiólogo interevencionista a lado de grandes maestros que me han hecho ser mejor persona y profesional.

**A MIS PACIENTES**, en quienes por sobre todas las cosas me han hecho ver la medicina de una forma humanista y por confiar en mi.

*“Daría todo lo que sé, por la mitad de lo que ignoro” – Rene Descartes*

## RESUMEN

Las Micropartículas (MPs) fueron descritas por primera vez en 1967 cuando Wolf informó de fragmentos de membranas de plaquetas en el plasma humano y las llamó "polvo de plaquetas" a estos[1]. Las MPs son vesículas de menos de 1  $\mu$  de diámetro liberadas a partir de las membranas plasmáticas celulares que son lesionadas, activadas, o que sufren apoptosis.[2] Estas MPs llevan proteínas de superficie y material citoplasmático de sus células de origen, permitiendo que su origen pueda ser identificado.[3] Las MPs encontradas en el plasma se originan predominantemente de plaquetas, megacariocitos y en menor proporción de células tales como endoteliales, leucocitos y eritrocitos. Su liberación esta estrechamente regulada y sus proteínas de superficie les permiten funcionar como mensajeros involucrados en muchos procesos biológicos.

En las últimas décadas se ha hecho evidente que en muchos tipos de células se liberan MPs y que estas MPs pueden no sólo ser efectos secundarios de los procesos celulares, también pueden participar activamente en la fisiología y la fisiopatología. *In vitro*, la liberación de MPs se ha demostrado a partir de células endoteliales, células musculares lisas vasculares, plaquetas, leucocitos, linfocitos y eritrocitos. Algunas de estas poblaciones de MPs se producen en la sangre de individuos sanos y enfermos. Hay cambios obvios en los números de origen celular y la composición de las poblaciones de MPs en diversos estados de enfermedad. El impacto, sin embargo, de estos cambios en su efecto *in vivo* está todavía insuficientemente conocido.

Las MPs se han implicado en la inflamación, la coagulación y la función vascular.[4]

Esta tesis presenta los resultados obtenidos hasta la fecha de la concentración de MPs de pacientes con cardiopatía isquémica coronaria agudos ( angina inestable e infarto agudo del

miocardio con y sin elevación del segmento ST) y los compara con los resultados obtenidos en pacientes con angina estable. Teniendo en consideración en el análisis que la administración de algunos fármacos pueden modificar la presencia de MPs.



## **MARCO TEÓRICO**

### **CAPÍTULO I**

#### **Formación y estructura básica de Macropartículas:**

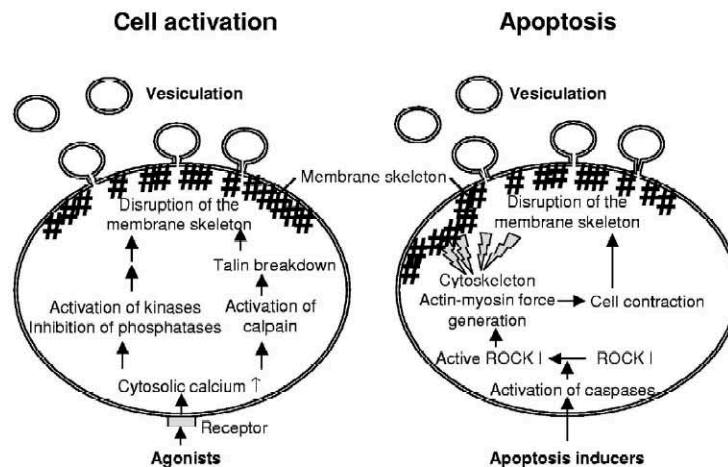
La membrana celular es una capa bifosfolipídica formada de fosfatidilcolina y esfingomielina en la superficie exterior y en la superficie interior por fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina. En reposo (sin estimulación), la superficie externa no tiene carga mientras que la superficie interna está cargada negativamente. Cuando una célula es activada o lesionada, el calcio intracelular aumenta rápidamente, causando que las enzimas activadoras permitan la externalización de la superficie interna cargada negativamente (principalmente fosfatidilserina) y la reorganización del citoesqueleto. Esta alteración origina vesículas en las membranas y liberación (gemación exocítica) de MPs. Además de su carga negativa en la porción fosfolipídica del material envuelto, las MPs también contienen elementos de sus células progenitoras. Mediante el uso del citómetro de flujo y combinaciones de marcadores antigénicos, los niveles de varias MPs pueden ser cuantificadas, así como su procedencia.[4]

#### **Formación de Micropartículas**

Hay dos procesos celulares bien conocidos que pueden conducir a la formación de MPs, la activación celular y la apoptosis. En la actualidad no se sabe si la activación celular y la apoptosis conduce a la formación de MPs similares, en términos de tamaño, lípidos y composición de proteínas así como de sus efectos fisiológicos o patológicos. Sin embargo hay diferencias en los mecanismos resultantes en su formación..[2]

## Activación de las células

Las MPs se pueden formar durante la activación celular por muchos agonistas (Fig. 1, panel izquierdo). Las plaquetas, por ejemplo, se activan por la trombina, ionóforo de calcio A23187, además de colágeno ADP, el complemento terminal complejo C5b-9 o el estrés de estiramiento.[5] Los monocitos, células endoteliales, hepatocitos y células musculares lisas arteriales liberan MPs tras la activación por lipopolisacáridos bacterianos, citoquinas tales como factor de necrosis tumoral- $\alpha$  o interleucina-1, complejo C5b-9 o el hidróperóxido. [6] En general, la liberación de MPs de células asociadas a la activación tiempo dependiente de calcio. Su liberación se inicia en cuestión de minutos después de la adición de un agonista.[7] Una de las primeras señales de activación de las células es el aumento en la concentración de calcio citosólico, especialmente en el sitio de vesiculación.[8] Posteriormente, el aumento de calcio citosólico activa quinasas, inhibe fosfatasa y activa la calpaína.[8] La quelación de iones de calcio extracelulares por EGTA bloquea el aumento de calcio citosólico, así como la liberación de MPs. Por lo tanto, el aumento en el calcio citosólico es esencial para la liberación de MPs.[8]



**FIG 1: Representación esquemática de los mecanismos involucrados en la formación de micropartículas durante la activación celular (panel izquierdo) y apoptosis (panel derecho).[2]**

La formación de MPs requiere la ruptura del esqueleto de la membrana, el sistema subcelular que proporciona a la membrana celular su estabilidad estructural.[9] Este esqueleto de la membrana se compone principalmente de actina, vinculina y talina. La interacción exacta entre la membrana celular y el esqueleto de la membrana la cual prohíbe la formación de MPs se desconoce actualmente. La Talina es degradada por la calpaína que es una de las vías directas a través del cual el aumento de la concentración de calcio citosólico facilita la formación de MPs (Fig. 1, panel izquierdo).[10]

La formación de MPs de plaquetas esta también de alguna manera relacionada con el complejo IIb-IIIa. Este complejo, en su conformación activa es el principal receptor de fibrinógeno sobre la superficie de las plaquetas. El sitio de unión más importante dentro de la molécula de fibrinógeno por la unión a la glicoproteína IIb-IIIa es la secuencia de aminoácidos Arg-Gly-Asp (RGD). Se ha demostrado que la adición de péptidos que contienen RGD artificiales no sólo bloquea la unión de fibrinógeno a las plaquetas activadas, sino también la liberación de MPs.[11] Por lo tanto, la unión del fibrinógeno al complejo de glicoproteína IIb-IIIa activado facilita la liberación de MPs. El papel del complejo IIb-IIIa en la formación de MPs de plaquetas está apoyada por estudios de las plaquetas de los pacientes con trombastenia de Glanzmann. Estas plaquetas han reducido las cantidades o la ausencia completa de la glicoproteína IIb-IIIa funcional y un deterioro de la capacidad vesicular.[11] Por lo tanto, la tendencia a la hemorragia de estos pacientes puede no sólo ser causada por el defecto en unión de las plaquetas con el fibrinógeno, sino también por su disminución de la capacidad para generar MPs.

### **Apoptosis celular**

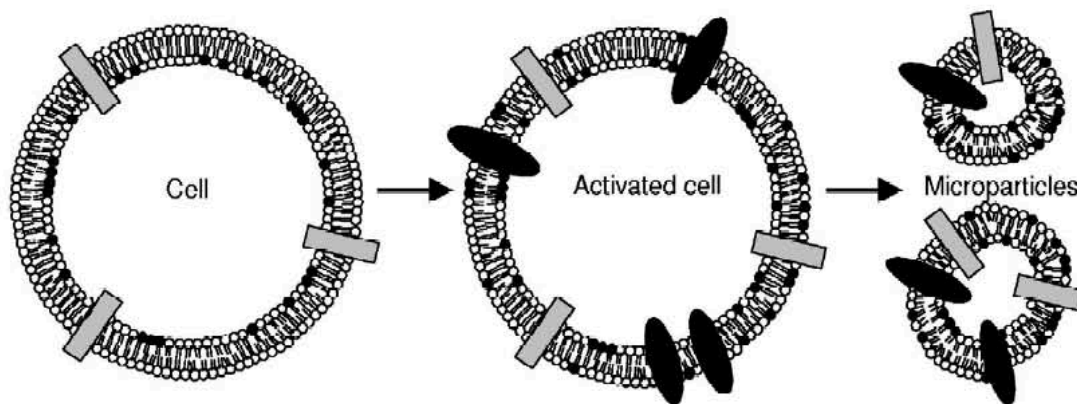
La apoptosis se caracteriza por la contracción celular, fragmentación del ADN y la dinámica de formación de vesículas en la membrana.[9] Estas vesículas pueden diferir de MPs formadas

por la activación de células en cuanto a su tamaño, composición de lípidos y proteínas así como por sus efectos pato y fisiológicos. La fuerza contráctil generada por estructuras del citoesqueleto actina-miosina se cree que contribuyen para la formación de vesículas de membrana (Fig. 1, panel derecho).[12] La formación de vesículas apoptóticas en la membrana depende de la activación asociada a la Rho-quinasa, ROCK I. La ROCK I promueve el aumento de generación de fuerzas actina-miosina y a filamentos de actina-miosina a la membrana plasmática.[13] Durante la apoptosis la ROCK I es escindida por caspasas activadas y se convierte en activa. La actividad de ROCK I como consecuencia ocasiona que las vesículas de membrana necesariamente redistribuyan al ADN fragmentado a partir de la región nuclear en vesículas de membrana y cuerpos apoptóticos.[14] Por lo tanto, la formación de MPs durante la apoptosis resulta de la actividad ROCK I y la desorganización de la estructura del esqueleto de la membrana. Tales MPs pueden contener ADN fragmentado (Fig. 1, panel derecho).

## CAPITULO II

### Composición de Micropartículas

Las MPs de membranas se componen principalmente de lípidos y proteínas. Su composición depende del origen celular y los procesos celulares que provocan su formación. Casi toda la información está disponible sobre el contenido intravesicular de las MPs. Una representación esquemática de la composición de las membranas de MPs se presenta en la figura. 2.



**FIG 2: Representación esquemática de la generación y composición de Micropartículas.** Fosfolípidos cargados negativamente son presentados por los puntos negros. En la célula en reposo los fosfolípidos cargados negativamente tales como fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina, se encuentra sólo en la capa interna. Los rectángulos de color gris representan antígenos específicos de células, por ejemplo, CD4 para células T cooperadoras. En las células activadas y Micropartículas los fosfolípidos cargados negativamente son reubicado y también están presentes en la capa exterior.[2]

## **Lípidos**

Las MPs están rodeadas por una bicapa de fosfolípidos. En las células en reposo las diversas especies de fosfolípidos se distribuyen de forma asimétrica en la bicapa. Esta distribución asimétrica de fosfolípidos suele alterarse durante la formación de MPs, dando lugar a la exposición de los fosfolípidos de carga negativa como fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina en las MPs. Esta exposición probablemente juega un papel en los efectos in vivo en donde la fosfatidilserina de MPs se une de manera eficiente los factores de coagulación.[15]

La información es limitada sobre la composición de fosfolípidos en MPs en la salud y la enfermedad. La composición de fosfolípidos de MPs de seres humanos sanos se compone principalmente de fosfatidilcolina (aproximadamente 60%), y el resto se compone de esfingomielina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina [34]. A pesar de que estas MPs se derivan principalmente de las plaquetas,[15] su composición de fosfolípidos difiere claramente de la de las membranas plasmáticas de las plaquetas. Esto podría ser debido por la contaminación de las MPs con otras células y / o de la liberación selectiva de los fosfolípidos en las membranas de MPs.

Fourcade y colaboradores; informaron que las MPs de líquido sinovial de las articulaciones inflamadas de pacientes con artritis contienen fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, esfingomielina, y lisofosfolípidos (20-25%) y pequeñas cantidades de fosfatidilserina.[16] Esta composición se diferencia claramente de la de MPs aisladas de la sangre de seres humanos sanos. Las MPs en el líquido sinovial se derivan principalmente de los leucocitos en lugar de las plaquetas.[2] Esto puede indicar que la composición de fosfolípidos de MPs se diferencia entre distintos tipos de células, o alternativamente que los estímulos inflamatorios producen MPs con una composición de fosfolípidos diferente. Huber y colaboradores

informaron recientemente la presencia de fosfolípidos oxidados en MPs a partir de células endoteliales que habían sido expuestas a un estímulo de estrés oxidativo, mientras que dichos fosfolípidos estaban ausentes en MPs de ionóforo de calcio estimuladas por células endoteliales.[2] Por lo tanto, la composición de fosfolípidos y su estado de oxidación difieren entre MPs.

### **Proteínas**

Las MPs exponen antígenos de membrana que son específicos para la célula madre de procedencia. Esta identificación de antígenos están siempre presentes en la superficie celular, con independencia del estado de activación o apoptosis de la célula madre, y permiten la determinación de su origen celular, por ejemplo, CD4 para MPs de células T-cooperadoras. [17]

Las membranas de MPs también pueden contener moléculas que han sido expresadas o translocadas por la activación celular o la apoptosis. Las MPs plaquetarias exponen moléculas como la P-selectina y glicoproteína 53, ambas se originan en las membranas de gránulos intracelulares.[18] Estas MPs también son ricas en gránulos- $\alpha$ derivados del factor Va.[18] Similares observaciones se realizaron en MPs de células T derivadas de glicoproteína que muestran 53 de origen endocítico.

Varias diferencias en la exposición al antígeno entre MPs y su célula madre no parecen directamente relacionados con la activación. Por ejemplo, las MPs de células T derivadas de la falta de proteínas CD28 y CD45 (antígeno leucocitario común), se encuentran entre las más presentes en abundancia en las proteínas de la membrana celular madres.[2] La estimulación de las plaquetas con el complejo complemento C5b-9 produce MPs que en comparación con

las plaquetas, son altamente enriquecidas en el C9-neoantígeno[18] y tienen una densidad superficial mayor de 1000 veces de C5b-9, lo que sugiere que estas MPs se desprenden de el sitio de inserción del complejo C5b-9 [11]. Además, las MPs derivadas de eritrocitos se enriquecen específicamente en diferentes antígenos y receptores.[19] Tomados en conjunto, estas diferencias indican que el derramamiento de MPs debe ser un proceso bien regulado. Esto se ilustra por el hallazgo que algunas proteínas presentes en lugares de lípidos o subdominios específicos de la membrana celular están enriquecidos en colesterol y esfingomielina, así como proteínas particulares de la membrana de los eritrocitos se transfieren en MPs mientras que otros no. [2]

La composición de MPs es también dependiente de agonistas. Las células T producen MPs que se enriquecen en CD3 $\epsilon$ -y- $\zeta$  cadenas originadas sólo después de la activación del receptor de antígeno de células T y no a la activación por ionomicina más clorhidrato de p-metoxianfetamina.[20] Las MPs de plaquetas por trombina o activadas por colágeno exponen complejos de glicoproteína IIb-IIIa que se unen a fibrinógeno, en contraste con MPs producidas por plaquetas incubadas con C5b-9 que no se unen fibrinógeno.[18] Por último, incluso las MPs liberadas por un tipo de célula en respuesta a un único agonista todavía pueden formar una población heterogénea. Por ejemplo las MPs liberadas de plaquetas después de la estimulación con suero de pacientes con trombocitopenia inducida por heparina son heterogéneas en tamaño y en la exposición de la glicoproteína IIb-IIIa. Por lo tanto, las MPs varían de tamaño, fosfolípido y composición de proteínas; por lo tanto también varían en cuanto a su capacidad y actividad funcional.



### **Micropartículas plaquetarias**

Las MPs de origen plaquetario son las más abundantes en la circulación. Las MPs de plaquetas expresan varios receptores presentes también en las plaquetas.[3] Estos receptores incluyen la integrina glicoproteína IIb/IIIa, glicoproteína IX (CD42a), y glicoproteína Ib (CD42b) así como P-selectina y CD40, entre otros. Las MPs de plaquetas también contienen varias proteínas plaquetarias procoagulantes. Estas características le dan a las MPs plaquetarias la habilidad de facilitar la aterogénesis por el aumento de moléculas de adhesión molecular, promoviendo la proliferación de células de músculo liso, y estimulando la inflamación.[3]

### **Macropartículas endoteliales**

A través de la síntesis y liberación de sustancias vasoactivas, el endotelio es crítico en la regulación del tono vascular, permeabilidad y hemostasia. Las MPs endoteliales pueden afectar cualquiera de estos procesos. Muchos fenotipos de MPs endoteliales han sido descritos. Algunos estudios definen a estas por la presencia de CD31 (factor de crecimiento derivado de plaquetas) y la ausencia de CD41 o CD42. Otros marcadores endoteliales que han sido usados incluyen CD144 (cadherina vascular), 17-19 CD105 (endogлина), y CD54 (molécula-1 de adhesión intercelular).[21]

### **Efectos biológicos**

Tanto las porciones de fosfolípidos negativamente cargados y las porciones de proteínas de las MPs pueden tener efectos biológicos vasculares mediante varios mecanismos (FIGURA 1). Las MPs pueden unirse a factores de la coagulación, activar plaquetas o células endoteliales, o aumentar la adhesión de macrófagos.[22] Las MPs circulantes pueden estimular la angiogénesis, aumentar el tono vascular, alterar la relajación vascular, o activar la formación de radicales libres.[22] Las MPs pueden estimular a células que producen citosinas y otros

mediadores inflamatorios así como mediar interacciones intercelulares.[22] In vitro e in vivo los datos experimentales sugieren que las MPs juegan un role en la coagulación. Las cargas negativas de la membrana exterior de fosfolípidos de las MPs proveen una superficie de membrana procoagulante en la cual los factores de la coagulación pueden unirse. In vitro los estudios han mostrado que las MPs de plaquetas poseen mas sitios de unión a factores de la coagulación por superficie de área que las plaquetas activadas.<sup>2</sup> Dependiendo del origen celular, las MPs pueden también expresar moléculas de adhesión y factor tisular, la proteína transmembrana que en interacción con el factor VII(a) es el iniciador primario de la coagulación.[22]

## **CAPÍTULO III**

### **Función de las Micropartículas**

Las MPs circulantes se derivan principalmente de plaquetas, sin embargo también a partir de eritrocitos, leucocitos y células endoteliales.[23] Estas MPs inician la generación de trombina in vitro. Las MPs también se han estudiado en diversos estados de enfermedad en la que se alteran los números, fuente y composición celular. Aunque muchos aspectos de la función de MPs aún no están claros, se sabe que juegan un papel importante en la inflamación, la coagulación, y función vascular (disfunción). Teóricamente, las MPs pueden tener varias funciones patofisiológicas y fisiológicas, es decir el transporte de componentes de la membrana de la célula de origen a otras células y activación directa de la inflamación, coagulación o la función vascular. Dado que la inflamación, coagulación y la función vascular están involucrados en la patogénesis de las enfermedades cardiovasculares, se va a discutir algunos mecanismos, que explican como las MPs están involucradas en estos procesos (ver fig. 3).[23]

## **INFLAMACIÓN**

### ***Evidencia in vivo***

Durante varias condiciones sistémicas inflamatorias el número de MPs se incrementa en la circulación sistémica. Además, existe evidencia directa del papel de MPs en los procesos inflamatorios disponibles a partir de los estudios in vivo. Mesri y colaboradores describen una población heterogénea de MPs en los seres humanos sanos, cuyo número se duplicó mediante la administración de N-formil-Met-Leu-Phe, un estímulo inflamatorio. La población de MPs resultante contenía ambas MPs derivadas de leucocitos y de plaquetas.[24] Las MPs de leucocitos en esta población mixta estimularon las células endoteliales en cultivo lo que

resultó en la producción de la interleucina-6, proteína-1 de monocitos quimioatrayente y factor tisular.[24]

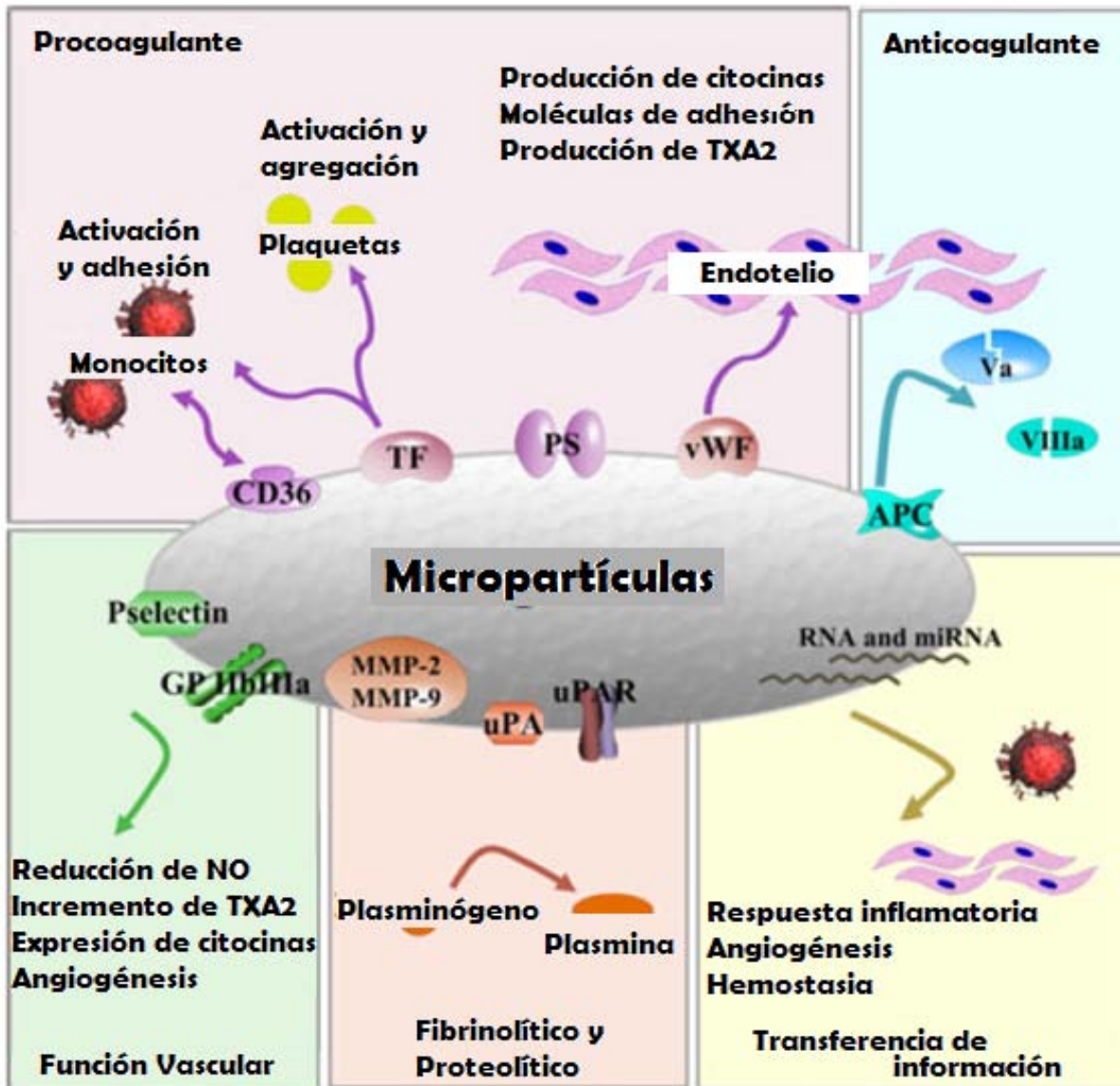


FIG 3: Representación esquemática de las funciones atribuidas a las micropartículas.[2]

### ***Los componentes de MPs implicados en la inflamación***

Los fosfolípidos oxidados pueden formar componentes biológicamente activos de MPs que causan la adhesión de los monocitos a las células endoteliales y la activación de neutrófilos.[10] Patel y colaboradores mostraron que las MPs de las células endoteliales tratadas con hidroperóxido contienen fosfolípidos oxidados. Estos fosfolípidos oxidados están presentes en MPs liberadas de las células endoteliales sometidas a estrés oxidativo, pero ausentes en MPs liberadas en respuesta a un estímulo no oxidativo, tales como con el empleo de un ionóforo de calcio.[10] También la apoptosis está acompañada por el estrés oxidativo,[25] y las MPs que se forman a partir de células endoteliales sometidas a la apoptosis contiene fosfolípidos oxidados.[10] El estrés oxidativo y la apoptosis es un fenómeno bien conocido en muchas enfermedades cardiovasculares, tales como la cardiomiopatía, miocarditis, infarto agudo de miocardio, y la aterosclerosis, así como la preeclampsia. Por otra parte, los fosfolípidos oxidados en las lipoproteínas de baja densidad están implicados en la patogénesis de la aterosclerosis. Por lo tanto, la participación de fosfolípidos oxidados en MPs apoptóticas y en MPs formadas en la presencia de estrés oxidativo pueden ser un mecanismo importante en la patogénesis de estas enfermedades.

Los fosfolípidos oxidados ejercen sus acciones a través del factor activador de receptores en plaquetas (PAF), este está expuesto tanto en células endoteliales y leucocitos. Las vías exactas aún no se aclaran, y pueden o pueden no ser similares a las acciones del PAF sobre su receptor. Las MPs también son capaces de suministrar el ácido araquidónico en las células endoteliales, monocitos y plaquetas.[26] Por lo tanto, las MPs se involucran activamente en los procesos inflamatorios y por lo tanto en las enfermedades cardiovasculares.

## **COAGULACIÓN**

### ***Evidencia in-vivo***

La evidencia de que las MPs en efecto contribuyan a la coagulación in vivo es principalmente circunstancial. En primer lugar, los números de MPs son elevados en diferentes tipos de enfermedades que implican hipercoagulación, tales como trombocitopenia idiopática, la hemoglobinuria paroxística nocturna, anticoagulante lúpico y síndromes coronarios agudos. En segundo lugar, la generación de MPs se reduce en varios trastornos de la coagulación como el síndrome de Scott, defecto de Castaman y la enfermedad de Glanzmann.[2] Las plaquetas de los pacientes con el síndrome de Scott y la enfermedad de Glanzmann tienen una disminución de la capacidad de generación de MPs en respuesta a los agonistas y han reducido los números y la función de los receptores de factor Va inducibles.[11] En tercer lugar, MPs exponen factor tisular en varios estados clínicos que están fuertemente asociadas con hipercoagulabilidad, tales como la sangre por herida de pericardio, sangre de pacientes con coagulación intravascular diseminada y el líquido sinovial de las articulaciones artríticas inflamadas. [23]

Ya que la hipercoagulabilidad es una característica de las enfermedades cardiovasculares, las alteraciones de MPs en número así como del comportamiento procoagulante se ha informado en varias enfermedades cardiovasculares, las MPs es probablemente desempeñan un papel causal en el desarrollo de la hipercoagulabilidad en la enfermedad cardiovascular.

## **FUNCION VASCULAR**

### ***Evidencia in vivo***

Sólo evidencia circunstancial está actualmente disponible para el papel de MPs en la disfunción vascular in vivo. Las cifras de MPs están elevadas o la composición de la población

de MPs se altera en las enfermedades cardiovasculares que se caracterizan por la disfunción endotelial, tales como los síndromes coronarios agudos, hipertensión, aterosclerosis y pre-eclampsia. Además, los altos niveles de MPs apoptóticas presumiblemente están presentes en las placas ateroscleróticas.[27] Estas MPs se derivan principalmente de los monocitos y linfocitos. Casi toda la actividad del factor tisular en la placa se encuentra en estas MPs. Por lo tanto, la actividad procoagulante de las placas ateroscleróticas se puede explicar por acción de sus MPs.

### ***Componentes de MPs***

Se tiene conocimiento escaso acerca de los componentes de MPs que deterioran las funciones endoteliales. Se tiene la sospecha de que los fosfolípidos oxidados pueden estar involucrados sobre todo porque la fosfatidilcolina oxidada induce disfunción endotelial en arterias aisladas.[28] Sin embargo se necesitan investigaciones futuras para abordar esta cuestión.

### ***¿Las Micropartículas son causa o consecuencia de las enfermedades cardiovasculares?***

En los párrafos anteriores se ha resumido la evidencia de que las MPs contribuyen a la patogénesis de la enfermedad cardiovascular, debido a: su potente efecto proinflamatorio, su promoción de en la coagulación y su efecto sobre la función vascular. Sin embargo, queda por establecer si las MPs juegan un papel causal en la patogénesis de estas enfermedades o si son una consecuencia de la enfermedad. Se han mencionado varios hechos que indican un el papel causal activo de las MPs en la patogénesis de las enfermedades cardiovasculares. La evidencia más fuerte para esta hipótesis se proporciona por los estudios que mostraron un efecto directo de MPs en la función endotelial. Por otra parte, el hecho de que tanto en estudios in vivo como in vitro las MPs inducen un aumento de la adhesión de los leucocitos a las células endoteliales, la producción de citoquinas y la exposición del factor tisular o P-selectina,

sugiere fuertemente un papel activo de las MPs en la inflamación y la coagulación. Sin embargo, el aumento del número de MPs también pueden resultar de la inflamación, hipercoagulabilidad o disfunción vascular. Por ejemplo, las citoquinas así como la trombina pueden desencadenar la generación de MPs o mejorar la generación de MPs ya existentes.[2] Por lo que se considera que ambos postulados son posibles.

### ***Efectos de las terapias utilizadas actualmente en Micropartículas***

El reconocimiento de un papel de MPs no sólo puede ser importante para la comprensión de la patogénesis de la enfermedad cardiovascular, pero también puede tener implicaciones para la prevención y el tratamiento de estas enfermedades. Algunas terapias utilizadas actualmente se sabe que afectan a la generación de MPs. Por ejemplo, abciximab (ReoPro®), un antagonista de los receptores IIb-IIIa que actualmente se utiliza como un fármaco antiplaquetario en la prevención de complicaciones isquémicas tras la intervención coronaria percutánea, bloquea casi completamente la vesiculación plaquetaria in vitro.[29] Por lo tanto, el efecto anticoagulante de abciximab no puede ser únicamente debido a la inhibición de la unión del ligando a la glucoproteína IIb-IIIa, pero también puede resultar de la reducción de la liberación de MPs de plaquetas. Hasta ahora, no hay estudios in vivo, que se hayan realizado para investigar este mecanismo. El tratamiento de los pacientes que sufren de ataques isquémicos transitorios con bloqueadores de los canales de calcio también reducen la generación de MPs.[29] Además, un ensayo doble ciego, aleatorizado controlado con placebo mostró que el tratamiento de los pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva (NYHA clase II o superior) con vitamina C disminuyó el número de MPs circulantes.[30] Después de un bolo de 2,5-g intravenoso, seguido de 3 días de tratamiento con 2 g dos veces al día los números de MPs se redujeron al 70% en el quinto día. Dado que la vitamina C es un antioxidante, la prevención de la generación de fosfolípidos oxidados en MPs también puede



ser un efecto de esta terapia. Sin embargo, no hay datos disponibles sobre estos efectos. Por lo tanto, hay algunas terapias que se utilizan actualmente para el tratamiento de enfermedades que también afectan a los números de MPs. Ya sea que estos efectos sobre MPs contribuyen a la acción terapéutica queda aun por establecer.

## **CAPÍTULO IV**

### **Micropartículas y aterosclerosis**

La aterosclerosis es una condición patológica subyacente en varios eventos importantes adversos vasculares, como la enfermedad coronaria, accidente cerebrovascular y enfermedad arterial periférica. En la actualidad, es responsable de la mayor parte de la morbilidad y mortalidad cardiovascular en el mundo occidental. Los estudios epidemiológicos indican que la prevalencia de aterosclerosis está aumentando en todo el mundo debido a la adopción del estilo de vida occidental y es probable que alcance proporciones de epidemia en las próximas décadas.

La aterosclerosis se describe como un proceso proliferativo, con la deposición pasiva de desechos de lípidos en la pared arterial. Dentro de las últimas tres décadas, la aterosclerosis surgió como una enfermedad inflamatoria crónica, que implica aumento de la permeabilidad de células endoteliales, acumulación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en el espacio subendotelial, seguido por la diapedesis de leucocitos y la formación de células espumosas, la migración y la proliferación de las células del músculo liso, la producción de tejido conectivo, y neovascularización. El punto culminante del desarrollo lento de esta enfermedad es la ruptura de placa o la erosión, lo que resulta en la trombosis y la oclusión arterial.

#### **Generación de Micropartículas y factores de riesgo cardiovascular**

El consenso general es que la mayoría de los tipos de células, incluidas las células circulantes y las células presentes en la pared del vaso, son capaces de formar vesículas y liberar fragmentos de membrana en un arreglo característico para formar MPS que se liberan al medio extracelular en respuesta a la activación celular o apoptosis.

Varios factores que intervienen en el desarrollo de lesiones ateroscleróticas, tales como lipoproteínas, citoquinas, estrés oxidativo, nivel de tensión del vaso sanguíneo, aumenta in vitro la liberación de MPs de células endoteliales y/o de células circulantes.

Basado en el conocimiento adquirido a partir de experimentos sobre las plaquetas, la formación de MPs en la membrana plasmática de la célula parece requerir algunas modificaciones específicas. En primer lugar, el calcio intracelular y los mecanismos de la caspasa-dependientes son los principales determinantes de la pérdida de asimetría de la membrana. La interrupción de la asimetría en la membrana de fosfolípidos conduce a la exposición de fosfatidilserina en la capa externa. Esto es una consecuencia de la regulación por incremento dependiente de calcio de escramblasa e inhibición flipase/ABC1 así como de actividades de la translocasa/flipasa. En segundo lugar, la formación de vesículas requiere la reorganización del citoesqueleto. Durante la apoptosis, la formación de la vesícula depende de la actina del citoesqueleto y de la contracción actina-miosina, que está regulada por la caspasa 3 inducida por activación de Rho-cinasa I y II. La actividad de las caspasas se han identificado en diferentes MPs, y por lo tanto podrían representar un intento para que las células escapen a la apoptosis celular.[31]

La formación de MPs endoteliales y su liberación han recibido mucha atención en los recientes años, y diferentes vías de señalización se han identificado dependiendo de los estímulos. Claramente, la liberación de MPs endoteliales puede ocurrir independientemente de la apoptosis endotelial. Curtis et al,[32] identificaron a la proteína quinasa p38 activada por mitógenos como un factor clave para la eliminación de las células endoteliales bajo estimulación de factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ). En oposición, la estimulación de trombina

a las células endoteliales induce una liberación bifásica. Varios mecanismos diferentes concurren a vesiculación. En primer lugar, la trombina se une a su receptor activado por proteasa-1, seguido por la activación de Rho quinasa II. En segundo lugar, una vía más tarde implica TRAIL/Apo2L, una citoquina que pertenece a la superfamilia de TNF- $\alpha$ , seguido por la liberación de interleucina (IL) -1 y activación del receptor IL-1. La segunda fase se caracteriza la amplificación basada en la liberación y estimulación de células endoteliales por trombina en las formas solubles de TRAIL y de IL-1 que actúan de una manera autocrina o paracrina sobre las células endoteliales y estimulan la liberación de MPs.[33] Interesantemente, estos resultados demuestran que la activación inducida por trombina de células endoteliales conduce a la liberación de MPs de diferente composición. El óxido nítrico endógeno parece jugar un papel protector contra la formación de MPs endoteliales por un mecanismo que implica a la tetrahidro-biopterina, tal como se observa después de la activación endotelial de proteína C reactiva. Ningún otro estudio ha abordado los posibles efectos del óxido nítrico endotelial en la formación de MPs y su liberación. Los Monocitos-macrófagos también liberan MPs durante su activación,, las endotoxinas estimulan la formación de MPs que derivan de macrófagos a través de una vía que requiere la activación inducible de óxido nítrico sintasa. El humo del tabaco provoca la generación de MPs monocíticas altamente procoagulantes en un proceso que requiere activación ERK1/2 y de la caspasa 3-dependiente de apoptosis.

Aunque las células anucleadas, tales como los eritrocitos y las plaquetas, no pueden someterse a la apoptosis clásica asociada con la fragmentación nuclear, MPs expresando marcadores específicos de plaquetas o eritrocitos de la sangre se han detectado en el plasma. Contrariamente a la liberación de MPs de plaquetas, hay poca información disponible sobre los mecanismos moleculares que conducen a la exposición de fosfatidilserina y la formación de MPS en los eritrocitos.[33] El aumento de calcio intracelular y el estrés oxidativo

promueven la liberación MPs de eritrocitos. Además, la senescencia de los eritrocitos así como de las plaquetas, conduce a la exposición de fosfatidilserina en la capa externa de la membrana celular y la liberación de MPs. En las plaquetas senescentes, la liberación de las MPs depende de la liberación del citocromo c y la posterior activación de la caspasa 3 y la Rho quinasa I.[33]

### **Iniciación de la lesión**

Un evento primario en el desarrollo de lesiones ateroscleróticas es la acumulación de lipoproteínas de baja densidad en la matriz subendotelial. Esto ocurre en sitios precisos dentro de las arterias, tales como ramificación o curvatura donde las fuerzas hemodinámicas y el estrés de estiramiento endotelial está alterado. En estas áreas las células endoteliales no están alineadas en la dirección del flujo, sino más bien tienen formas poligonales y ninguna orientación en particular. La permeabilidad endotelial también se incrementa, lo que permite la difusión de macromoléculas tales como LDL a través de uniones de las células endoteliales. Las LDL sufren varias modificaciones, incluyendo la oxidación, lipólisis, proteólisis, o agregación en el espacio subendotelial, donde son eliminados por los macrófagos y células espumosas. La implicación de cualquiera de las MPs en estas etapas iniciales de la aterosclerosis nunca ha sido evaluadas directamente, pero varios hallazgos indican que puede ser probable.[34]

a) En primer lugar, las MPs y particularmente MPs endoteliales, son liberadas y sus niveles circulantes aumentan temprano en el proceso aterosclerótico. Los factores de riesgo cardiovascular pueden provocar la liberación de MPs endoteliales, además de los efectos bien conocidos de citosinas, estímulos proapoptóticos y procoagulantes. Por ejemplo, fumar, así como ser fumador pasivo o la inactividad física, se asocian con el aumento de circulación MPs

endoteliales en sujetos sanos. Los incrementos en plasma de MPs endoteliales también se observan después de las comidas altas en grasa con aumento de niveles circulantes de LDL modificadas y triglicéridos; mientras que un régimen de dieta mediterránea reduce los niveles circulantes de MPs endoteliales. [33]

b) En segundo lugar, un efecto parácrino de MPs derivadas del endotelio en las zonas propensas a la aterosclerosis es posible. Los factores mecánicos pueden estar involucrados en la regulación de la liberación MPs endoteliales. Estudios *in vitro* y en *in vivo* demuestran que la turbulencia en la tensión de estiramiento se acompaña de apoptosis endotelial, mientras que la tensión de estiramiento laminar protege a las células endoteliales de la apoptosis. La apoptosis es un estímulo muy conocido en la liberación de MPs, las que provienen de células endoteliales son probablemente liberadas en las zonas de estiramiento turbulento o de bajo estiramiento. Esta hipótesis se ve reforzada por la correlación inversa observada en los pacientes con enfermedad renal en etapa terminal entre MPs endoteliales y el estrés arterial basal de estiramiento laminar. Debido a que la liberación de MPs endoteliales originadas de células cultivadas endoteliales apoptóticas tienen actividad caspasa-3, las células endoteliales de las zonas de tensión de bajo estiramiento pueden utilizar MPs para expulsar las proteínas pro-apoptóticas de su cuerpo celular en un último intento por escapar de la muerte celular programada.[33]

Por tanto, esta interpretación apoyaría un papel benéfico de MPs endoteliales mediante el mantenimiento de un revestimiento endotelial de protección de la pared del vaso sanguíneo. Sin embargo, debido a que la tensión de estiramiento es baja en las zonas propensas a aterosclerosis, las concentraciones de MPs endoteliales locales son propensas a ser elevadas y podrían afectar a las células endoteliales vecinas.

c) En tercer lugar, varios hallazgos recientes indican que las MPs endoteliales obstaculizan la función ateroprotectora del revestimiento endotelial de los vasos sanguíneos. MPs endoteliales afectan la biodisponibilidad de óxido nítrico endotelial, ya sea estimulando la generación de radicales libres o disminuyendo la fosforilación endotelial de óxido nítrico sintasa Ser1179. Por otra parte, las MPs endoteliales pueden aumentar directamente la permeabilidad endotelial. Este efecto se informó inicialmente en los capilares pulmonares de ratones C57BL/6 inyectados con MPs endoteliales, pero no se observó para las MPs que llevan receptor de proteína C endotelial generado después de la exposición de las células endoteliales a la activación exógena proteína C activada. El aumento de la permeabilidad también podría derivarse del aumento de la expresión de CD11b en la superficie de los leucocitos expuestos a MPs endoteliales. Interesantemente, varios hallazgos sugieren que la liberación de MPs endoteliales pueden ser concomitantes con el aumento de la permeabilidad endotelial. Los estímulos tales como trombina o TNF- $\alpha$  inducen tanto la generación de MPs y permeabilidad endotelial. Los estímulos que inhiben la formación de MPs también disminuyen la permeabilidad. Además, la proteína asociada Rho-quinasa y la proteína quinasa p38 activada por mitógenos han sido implicadas en tanto la liberación MPs endotelial y a la hiperpermeabilidad endotelial. Por último, la formación de MPs y cambios en la permeabilidad endotelial requieren reorganización de proteínas del citoesqueleto.[33]

d) En cuarto lugar, las MPs de origen no endotelial también pueden contribuir a la pérdida del efecto de protección vascular de las células endoteliales. Por ejemplo, las MPs circulantes en pacientes con enfermedad de la arteria coronaria alteran la relajación endotelial dependiente de óxido nítrico en las arterias sanas, lo que sugiere que las MPs del plasma pueden contribuir a la generalización de la disfunción endotelial en esta enfermedad. Resultados similares se

observan con las MPs de linfocitos generadas in vitro. Por otra parte, la permeabilidad endotelial puede verse afectada por MPs que no sean MPs endoteliales circulantes. Dean et al han demostrado recientemente que las MPs de plaquetas de gran diámetro alteran la integridad de barrera de células endoteliales, mientras que las MPs que proviene de plaquetas más pequeñas tienen un efecto opuesto.[33]

En resumen, estos hallazgos sugieren que MPs endoteliales circulantes así como MPs de origen no endotelial, puede contribuir al fenotipo proaterogénico general de las células endoteliales en las zonas de la vasculatura susceptibles a aterosclerosis.

## **Progresión de la Placa**

### ***Endotelio y reclutamiento de células inflamatorias***

Evidencia considerable apoya la participación temprana de los monocitos/macrófagos, los componente celulares más prominentes de la respuesta inmune innata durante la aterogénesis. Las observaciones en muestras arteriales en humanos y muchos modelos experimentales de aterosclerosis han identificado al reclutamiento de monocitos como un evento temprano en la aterogénesis. Este reclutamiento implica la unión a las células endoteliales activadas por moléculas de adhesión de leucocitos, tales como molécula de adhesión intercelular (ICAM) -1, molécula de adhesión vascular-1, E-selectina y P-selectina. Varias citoquinas incluyendo la proteína quimiotáctica de monocitos-1, IL-6, e IL-8, dirigen la migración directa de los monocitos a la íntima. La entrada de los monocitos a las placas ateroscleróticas no sólo se produce durante las etapas iniciales de la formación de la lesión, sino también continúan incluso en las lesiones establecidas. [33]



Varios estudios in vitro utilizando en MPs originadas de diferentes líneas celulares apoyan el concepto de que las MPs aumentan la síntesis y liberación de citocinas proinflamatorias por las células endoteliales y los leucocitos.[26] La liberación de IL-6 e IL-8 podría favorecer posteriormente el reclutamiento de leucocitos en el sitio de la lesión e incluso la quimiotaxis de monocitos. Curiosamente, la lipoproteína de alta densidad afecta la unión de MPs a las células endoteliales, por lo tanto limita su efecto proinflamatorio. Esta observación podría contribuir al efecto beneficioso de la lipoproteína de alta densidad en la aterosclerosis.

Las MPs generadas in vitro también estimulan la expresión de moléculas de adhesión, en particular ICAM-1, en la superficie de las células endoteliales. Las MPs también aumentan la expresión de moléculas de adhesión contra los receptores, tales como CD11a, en monocitos. Los mecanismos implican al ácido araquidónico o fosfolípidos oxidados liberados por las MPs. La transferencia in vitro de quimiocinas proaterogénicas RANTES (CCL5) de las MPs derivadas de plaquetas a las células endoteliales podría conducir a la atracción de monocitos y a la activación, posiblemente promoviendo su reclutamiento en las lesiones. MPs de plaquetas que expresan P-selectina también pueden contribuir a la infiltración de monocitos al favorecer la interacción de leucocito-leucocito en condiciones de flujo desfavorables. sigue siendo desconocido.[35] si estas observaciones se producen durante las primeras etapas de desarrollo de la placa aterosclerótica

Un estudio reciente utilizando MPs humanas, aisladas a partir de placas ateroscleróticas avanzadas, confirmó algunos de estos resultados obtenidos con MPs generados in vitro, apoyando la hipótesis de que los efectos proinflamatorios de las MPs pueden ocurrir en todo el desarrollo de las lesiones ateroscleróticas.[35] Las placas ateroscleróticas contienen grandes cantidades de MPs, en su mayoría procedentes de leucocitos. Aunque los mecanismos

que conducen a la formación de las MPs en las lesiones ateroscleróticas son desconocidos, la oxidación o modificación lipídica así como el estrés oxidativo y las citocinas proinflamatorias pueden contribuir localmente a la liberación de MPs a partir de células endoteliales o a partir de monocitos. En seres humanos, las MPs aisladas a partir de placas aumentan la expresión endotelial de ICAM-1 y subsecuentemente aumenta la adherencia de monocitos y la trans migración en condiciones de flujo, mientras que las MPs aisladas a partir del plasma no tienen tales efectos. El aumento de la ICAM-1 inducida por MPs de la placa resulta de la transferencia de la molécula de adhesión de MPs de las células endoteliales en una manera dependiente de fosfatidilserina. Contrariamente a MPs generadas in vitro, MPs aisladas a partir de placas avanzadas en humanos no afecta la liberación endotelial de la IL-6, IL-8, proteína quimiotáctica-1, la expresión endotelial de monocitos de la molécula de adhesión vascular-1 o E-selectina. El efecto de las MPs de la placa sobre el reclutamiento de ICAM-1-dependiente de las células inflamatorias podría ser particularmente relevante al nivel de la vasa vasorum invadida por las lesiones ateroscleróticas avanzadas, dado que los neovasos de la íntima expresan niveles mucho mayores de proteínas de adhesión de células vasculares que el endotelio luminal arterial. Estos microvasos anormales se caracterizan por la ramificación desorganizada y tubos endoteliales inmaduros con fugas en sus cubiertas imperfectas. Por lo tanto, las MPs que llevan ICAM-1 presente en las placas pueden difundirse dentro de corriente de la sangre y por lo tanto la transferencia de ICAM-1 a la superficie celular endotelial de una manera "paracrina". Ya sea que las MPs de la placa promuevan el reclutamiento de monocitos en estrías de grasa en las primeras etapas de desarrollo de la placa aterosclerosis es aún desconocido.

La falta de efecto de MPs circulantes en el reclutamiento de monocitos puede deberse a los efectos proinflamatorios y antiinflamatorios concomitantes de las MPs. Por ejemplo, las MPs

de neutrófilos aumentan la liberación de la citoquina antiinflamatoria del factor transformador de crecimiento-1 a partir de macrófagos, lo que sugiere que las MPs modulan la activación celular en los macrófagos. Además, la exposición de MPs derivadas de leucocitos a receptores en los leucocitos antes de que fluyan sobre la monocapa de células endoteliales inhibe significativamente su adhesión en una forma dependiente de anexina-1. Cabe señalar que las MPs de placa aisladas a partir de placas en humanos contienen anexina-1, pero no hay información disponible que indique si esta proteína es bioactiva o en una cantidad suficiente para conferir a las MPS de la placa propiedades antiinflamatorias o actividad inhibitoria de la fosfolipasa A2.

### ***Los monocitos / macrófagos***

La transformación de los monocitos reclutados en los macrófagos cargados de lípidos o "células espumosas" por LDL modificada u oxidada atrapada en el subendotelio es fundamental para el desarrollo de lesiones ateroscleróticas. La desregulación en la absorción de LDL modificada a través de receptores "scavenger" tales como CD36 determina la formación de células espumosas in vivo. Los receptores "scavenger" también pueden estar implicados en la absorción de MPs y la fagocitosis, porque se ha informado que MPs unidas a CD36 de plaquetas causan su activación. Sin embargo, no hay información sobre la interacción MPS con los monocitos-macrófagos CD36 en las lesiones ateroscleróticas y sus potenciales consecuencias funcionales. [35]

Hallazgos recientes demuestran que la población de monocitos no es homogénea con respecto a sus propiedades proinflamatorias. Además de la clásica activación M1 de monocitos responsables de una actividad proinflamatoria, la activación alterna M2 esta asociada con una respuesta antiinflamatoria y también está implicada en la aterosclerosis. No existe ningún

estudio que haya evaluado el papel de las MPs en la regulación de subconjuntos de monocitos / macrófagos. Otra área que requiere más investigaciones es el efecto potencial de las MPs en la proliferación de monocitos, lo que contribuiría al aumento de la celularidad de la placa y por lo tanto a la progresión de la placa.[33]

Los macrófagos y células espumosas a continuación se someten a la muerte celular que conduce a la deposición de una masa creciente de lípidos extracelulares que forman el núcleo de lípidos. Varios informes han sugerido que las MPs podrían contribuir a la apoptosis de los monocitos y macrófagos.[33] Esto fue demostrado en lesiones ateroscleróticas avanzadas, entonces las MPs podrían contribuir a una característica de las lesiones propensas a la ruptura. Se han propuesto dos mecanismos para el efecto proapoptótico de MPs.

El primero implica la fagocitosis de las MPs derivadas de monocitos o derivadas de linfocitos T por los monocitos y macrófagos, que conduce a un aumento del contenido de fosfolípidos de la membrana celular lo que probablemente se escinden por las fosfolipasas A2 en ácido araquidónico. El ácido araquidónico es un fuerte activador del ácido esfingomielinasa que metaboliza la esfingomielina en ceramidas proapoptóticas, resultando en la muerte celular dependiente de caspasas y la caspasa independiente. El segundo mecanismo se basa en la presencia en las MPs derivadas de células del endotelio, eritrocitos, plaquetas, monocitos y células dendríticas de la caspasa-3 o la caspasa-1, que pueden inducir la apoptosis de las células diana. La encapsulación de MPs parece necesaria para la inducción de la apoptosis debido a que la interrupción de la integridad en las MPs suprime la actividad apoptótica. El aumento de la apoptosis de los monocitos y macrófagos es probable que esté asociado con la liberación de las MPs, lo que aumenta la acumulación de MPs en la placa. Esto conduce a un círculo vicioso responsable en el reclutamiento de más monocitos y más apoptosis de

macrófagos. La gran concentración de MPs en la placa aterosclerótica humana también puede ser consecuencia de la disminución de la actividad fagocítica de macrófagos en las placas. Por lo menos en condiciones normales, los macrófagos parecen jugar un papel clave en el aclaramiento de MPS a través de lactadherina y fosfatidilserina.[33]

Estos datos, obtenidos con las MPs derivadas de plaquetas y de eritrocitos, deben ser confirmados con otras MPs de origen celular, particularmente con células endoteliales y monocitos. Los ratones con apolipoproteína E/de ratón con deficiencia de lactoadhesina tienen más extensas lesiones ateroscleróticas y tienen mayores niveles de circulación de MPs. El mecanismo de esta disminución de la actividad fagocítica de los macrófagos en las placas podría ser una competencia de MPs con cuerpos apoptóticos y LDL oxidada.

### ***Las células dendríticas, linfocitos y mastocitos***

En la aterosclerosis, la respuesta innata es seguida rápidamente por una respuesta inmune adaptativa a una serie de posibles antígenos presentados a linfocitos T efectores por células presentadoras de antígenos, como las células dendríticas. Las células dendríticas pueblan las placas ateroscleróticas y los ganglios linfáticos regionales de drenaje, donde pueden presentar antígenos a las células T con moléculas coestimuladoras. Su maduración requiere la acción coordinada de un número de citoquinas y factores de crecimiento. Varias moléculas incluyendo CD40, receptor de TNF, y receptor de IL-1 han demostrado que activan a las células dendríticas y para acelerar su transición de células inmaduras en la captura de antígenos para madurar a células presentadoras de antígeno. Curiosamente, las MPs endoteliales generadas in vitro, pero no las MPS derivadas de las plaquetas o de linfocitos inducen la maduración plasmocitoide de células dendríticas con la producción de citoquinas inflamatorias (IL-6 e IL-8). Sin embargo, el efecto contrario se ha comunicado con las MPs

derivadas de neutrófilos polimorfonucleares. El posible papel de las MPs en la capacidad migratoria de las células dendríticas se desconoce. Varios estudios coinciden en demostrar el papel de las MPs en la proliferación de linfocitos. Tanto generados in vitro- y de MPs en placas ateroscleróticas en humanos son capaces de estimular la proliferación de linfocitos T. Un mecanismo probable podría implicar la expresión del complejo principal de histocompatibilidad clase II; junto con moléculas coestimuladoras potentes tales como el ligando de CD40 en la superficie de las MPs aisladas a partir de placas en humanos. Los macrófagos o células dendríticas han de ser la fuente para las MPs que albergan al complejo principal de histocompatibilidad de clase II, que son responsables de la proliferación de linfocitos. Las MPs también pueden promover la diferenciación de los linfocitos hacia un linaje T - cooperador proaterogénico. Las células T CD4 vírgenes en la presencia de células dendríticas plasmocitoides maduras con MPs endoteliales producen principalmente citoquinas de células T tipo 1 cooperadoras (interferón- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ). Sin embargo, estos datos deben ser confirmados con MPs en placas de humanos. Esta respuesta proaterogénico es controlado por varias células T-reguladoras y de citocinas T cooperadoras 2 relacionadas. A excepción de los estudios con MPs derivadas de tumor no se ha evaluado la respuesta de las células T reguladoras a MPs.[33]

### ***Migración de células musculares lisas, proliferación y fenotipo***

Las células del músculo liso juegan un papel clave en la aterosclerosis tanto en la primeras y en las últimas etapas. En las primeras etapas, las células del músculo liso migran desde la media a la íntima, donde son atrapadas y proliferan para contribuir al desarrollo de la placa. Los estímulos que inician la migración de células del músculo liso y la proliferación no son bien dilucidadas. Los efectos de MPs en la proliferación de células del músculo liso dependen de su origen celular. Las MPs de plaquetas generadas in vitro aumentan la proliferación de

células del músculo liso por el mecanismo independiente de factor de crecimiento derivado de plaquetas, pero tienen una actividad en la migración de menor importancia. Las MPs de monocitos estimuladas por endotoxina contienen caspasa-1 funcional e inducen la muerte de las células del músculo liso. Los estudios que utilizan las MPs obtenidas en las placas ateroscleróticas pueden ser útiles para aclarar este punto. Dada la alta proporción de factor tisular positivo en MPs en las placas humanas, se espera un efecto pro-migratorio de MPs de placa. De hecho, las células del músculo liso vascular expresan proteasa activadora del receptor-2 que pueden ser activados por el factor de coagulación del tipo factor tisular -VIIa, que conduce a la migración de células del músculo liso vascular. En las últimas etapas, las células del músculo liso de la íntima difieren significativamente de sus contrapartes y tienen propiedades aterogénicas únicas que las hacen un terreno fértil para la iniciación de las placas. Mientras que las células musculares lisas en humanos predominantemente de la media expresan proteínas implicadas en la función contráctil, tales como miosina de cadena pesada o  $\alpha$ -actina, estas células de músculo liso que se encuentran en la íntima expresan niveles más bajos de estas proteínas, tienen un índice de proliferación superior y tienen una mayor capacidad de sintetizar matriz extracelular, particularmente colágeno, proteasas, y citoquinas. El papel potencial de las MPs en esta transición al estado "sintético" que facilita muchos de los papeles patogénicos de las células musculares lisas vasculares no se ha investigado.[33]

### ***Formación de neovasos***

La capa íntima de las arterias humanas normales carecen de vasa vasorum, mientras que la adventicia y la media externa poseen una red vascular. A medida que la aterosclerosis progresa, la íntima se engruesa y aumenta la neoangiogénesis de la íntima, probablemente originada a partir de la adventicia. Esta red de neovasos permite la extravasación de eritrocitos en la lesión aterosclerótica, proporcionando colesterol libre derivado de eritrocitos

en el núcleo lipídico favoreciendo excesiva infiltración de macrófagos y por lo tanto promoviendo la transición de la placa de un estado estable a un inestable. La densidad intraplaca de los neovasos aumenta el riesgo de rotura de la placa y es un predictor independiente de eventos cardiovasculares sistémicos.

Los mecanismos moleculares responsables de la formación de neovasos se refieren predominantemente a la hipoxia debido a la difusión de oxígeno en la alteración de la placa gruesa, pero también podrían ser impulsados por la inflamación y la activación de los receptores Toll-like.

Las MPs pueden contribuir a la neovascularización intraplaca a diferentes pasos del proceso: la interrupción del contacto célula-célula, la degradación de la matriz extracelular, proliferación, migración y formación del tubo capilar de las células endoteliales. En primer lugar, como se ha discutido, las MPs pueden aumentar la permeabilidad endotelial, aunque los datos son escasos y controvertidos. En segundo lugar, la proteólisis de componentes celulares de la membrana basal de la matriz se requieren para promover la invasión endotelial en la matriz intersticial que la rodea. Las MPs de placas en humanos albergan proteasas activas y MPs de diferentes orígenes celulares que son capaces de inducir la liberación de metaloproteasas. En tercer lugar, las MPs regulan la proliferación endotelial y la formación del tubo capilar. Las MPs de placas en humanos aisladas a partir de muestras de endarterectomía obtenidas quirúrgicamente de pacientes aumentan la proliferación celular endotelial in vitro, así como in vivo en tapones de matrigel. Este efecto se basa en la presencia de ligando de CD40 en la superficie de las MPs de las placas, interactuando con CD40 endotelial para mediar la proliferación a través de un receptor del factor de crecimiento endotelial vascular y PI3 vía dependiente -kinase/Akt. La mayoría de las MPs de placas CD40 ligando-positivos parecen



originarse de los macrófago. El efecto proliferativo de las MPs aisladas de lesiones humanas es más potente de los que se obtienen a partir de los síntomas (es decir, pacientes que experimentaron ictus o ataque isquémico transitorio) de pacientes asintomáticos. Curiosamente, las lesiones de los pacientes sintomáticos tienen significativamente más MPs ligando CD40-positivas que las de pacientes asintomáticos. El efecto de las MPs generadas in vitro sobre la proliferación de células endoteliales depende del tipo de células endoteliales utilizadas, así como la concentración y el origen celular de MPs. Las MPs plaquetarias estimulan la angiogénesis tanto in vitro como in vivo a través de factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento endotelial vascular. Por el contrario, las MPs de linfocitos inhiben la proliferación de células endoteliales mediante el aumento de la generación de especies reactivas de oxígeno e interfiriendo con las vías de señalización del factor de crecimiento endotelial. Las MPs endoteliales también disminuyen la proliferación de células endoteliales mediante la reducción de la actividad sintasa de óxido nítrico endotelial o mediante el aumento de estrés oxidativo. Conclusiones opuestas fueron extraídas de experimentos con las MPs derivadas de las células endoteliales que sobre expresión altos niveles de factor tisular o de T-cadherina. La composición de MPs de la placa aterosclerótica humana concilia los diferentes resultados obtenidos en los estudios que utilizan la placa en humanos y en MPs generadas in vitro. No hay MPs de plaquetas que pudiesen haber sido identificadas en la placas de humanos, y las MPs endoteliales y linfocitarias representan sólo el 8% y el 15% de todas las MPs de la placa. Por el contrario, el efecto de las MPS sobre la proliferación celular endotelial generado a partir de eritrocitos, macrófagos / granulocitos, y MPs de células de músculo liso (que representan, respectivamente, 27%, 37%, y 13% de todas las PM placa) nunca ha sido probado. Las MPs circulantes de pacientes con aterosclerosis avanzada no tienen ningún efecto sobre la proliferación celular endotelial. En estos pacientes, la proporción de MPs de plaquetas, linfocitos, y células endoteliales se encuentran en el

mismo rango (29%, 13% y 9%, respectivamente), lo que sugiere un equilibrio entre las actividades proangiogénicas y antiangiogénicas de MPs de diferente origen celular presente en el plasma de humanos.[33]

## **Complicaciones y mecanismos de reparación**

### ***Debilitamiento de la capa fibrosa***

Las placas ateroscleróticas existen bajo dos fenotipos principales: (1) placas estables, caracterizadas en su mayor parte por una capa fibrosa gruesa que aísla relativamente un pequeño núcleo lipídico de la luz, están asociadas con un riesgo muy bajo de complicaciones tromboembólicas y (2) placas inestables, la mayoría de las cuales se caracterizan por un gran núcleo lipídico cubierto por una capa fibrosa fina propensas a la ruptura, formación de trombos y se cree que están asociados con un mayor riesgo de complicaciones tromboembólicas. El debilitamiento de la capa fibrosa presumiblemente es resultado de la degradación de proteínas de matriz extracelular y de desaparición de células de músculo liso probablemente después de la apoptosis de las células.

Las MPs de las placas probablemente contribuyen a la degradación de la matriz. Las placas ateroscleróticas humanas llevan proteasas. La enzima convertidora de TNF- $\alpha$  (ADAM-17) ha sido identificada pero otras proteasas también están presentes en las MPs de placa porque estas MPs son capaces de escindir un péptido dirigido por un gran panel de metaloproteinasas de la matriz (MMP), tales como la MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-16, y otra preferentemente escindida por MMP-3 y MMP-10. Las proteasas también se han detectado en los MPs generadas in vitro a partir de diversos tipos de células. Por ejemplo, las MPs generadas in vitro de células endoteliales llevan MMP-2, MMP-9, y proenzima MT1-MMP así como también inhibidores de proteasas (inhibidor tisular de la

MMP-1 y el inhibidor tisular de SDMFM-2). Por otra parte, las MPs derivadas de adipocitos llevan MMP-2 y MMP-9; las MPs de neutrófilos exponen activamente MMP-9. Además, las MPs de placa pueden estimular la liberación de MMP por las células presentes en las placas ateroscleróticas como se muestra para otras MPs. Las MPs derivadas de plaquetas estimulan la secreción activa de MMP-2 por células del cáncer de próstata. Además, las células T y MPs de monocitos inducen la síntesis de MMP-1, MMP-3, MMP-9 y MMP-13 en fibroblastos. Finalmente, las MPs derivadas de células T aumentan la expresión genética de MMP-1, MMP-3, MMP-9 y MMP-13 en las células estrelladas hepáticas. Aún queda por determinar si las MPs de placa también pueden contribuir al debilitamiento de la capa fibrosa a través de la inducción de la apoptosis de las células del músculo liso. Como se ha mencionado, datos contradictorios han sido reportados en relación con el efecto de MPs en la supervivencia de las células del músculo liso.[33]

### **Ruptura de la Placa y Trombosis**

Los estudios en ratones deficientes de apolipoproteína E han demostrado que las células endoteliales activadas que cubren la lesión o están presentes en los neovasos, podrían promover la formación de trombos y depósitos de fibrina por el incremento de P-selectina soluble, que a su vez aumenta los niveles circulantes de factor tisular positivo en MPs. La disrupción física de las placas también puede desencadenar la trombosis y promover el evento isquémico. Pueden ocurrir tres tipos de ruptura física. En primer lugar, la erosión superficial o áreas microscópicas de la descamación de las células endoteliales, que representan aproximadamente una cuarta parte de las trombosis coronarias mortales. Actualmente no existe evidencia que sugiere una implicación de las MPs en este proceso a excepción de un estudio que muestra que las MPs generadas in vitro de las células monocíticas, línea THP-1 inducen la apoptosis de las células endoteliales. En segundo lugar, la

alteración de los microvasos que se forman en las placas ateroscleróticas proporciona otro escenario para la progresión repentina de la placa.

Los nuevos vasos sanguíneos en la placa pueden ser particularmente frágiles y propensos a microhemorragias. El papel de las MPs de la placa en la neoangiogénesis intraplaca parece crucial y ha sido discutido. El tercera y más común mecanismo de rotura de la placa es una fractura de la capa fibrosa de la placa.

Esto permite que el contacto de la sangre circulante con las MPs de placa. Las MPs de placa en humanos son particularmente protrombogénicas porque generan el doble de trombina que las MPs del plasma de los mismos pacientes. Esta actividad procoagulante está relacionada con la exposición en su superficie de fosfatidilserina debido a que las plaquetas, componentes en la cascada de coagulación contienen en sus superficies de membrana fosfatidilserina. Además, un gran número de MPs de la placa humana contienen factor tisular. Este receptor transmembrana, para el factor de coagulación del plasma VII / VIIa aumenta drásticamente su actividad procoagulante. La alta concentración de MPs altamente procoagulantes en placas, apoya su papel crucial en la formación de trombos en el momento de la rotura (Figura D). La circulación de MPs y en particular MPs con factor tisular contribuyen a la trombosis arterial. Las acumulación de MPs y la posterior formación de la fibrina son dependientes de la interacción de glicoproteínas en las MPs con P-selectina ligando-1 y P-selectina de plaquetas. Las MPs liberados por las plaquetas activadas también pueden contribuir a la formación de trombos. Más detalles sobre la actividad procoagulante, aparecen en la revisión de Owens y Mackman.[33]

## **Mecanismos de reparación:**

### ***La neovascularización postisquémica***

La neovascularización después de la oclusión vascular implica células progenitoras vasculares de la médula ósea y de origen no óseo. Después de la isquemia aguda, tal como el síndrome coronario agudo o un accidente cerebrovascular agudo, los niveles circulantes MPs de plaquetas y células endoteliales se incrementan en los pacientes. Por otra parte, se detectan altas cantidades de MPs principalmente de las células endoteliales (70% de las MPs son CD144), están son detectadas en las extremidades posteriores de ratón , 48 horas después de la ligadura de la arteria femoral unilateral. Estas observaciones llevaron a la investigación del papel de las MPs en la neovascularización posnatal. Tal neovascularización se ve aumentada por las MPs procedentes de plaquetas o células progenitoras endoteliales, así como por MPs aisladas a partir la isquemia del musculo de las extremidades en el ratón. Sin embargo, se obtuvieron resultados contradictorios con las MPs a partir de linfocitos. Las MPs actúan en diferentes pasos del proceso de la neovascularización. En primer lugar, después de la isquemia, la lesión del tejido local altera el endotelio vascular para detener las células progenitoras en las regiones donde se necesita la regeneración del endotelio. Además de gradientes hipóxicos, a través del factor-1 incrementa la expresión de CXCL12 inducida por hipoxia, las MPs de plaquetas también contribuyen a la quimio-atracción de células progenitoras. Un estudio reciente ha demostrado que los cuerpos apoptóticos derivados de células endoteliales se pueden transferir a las células receptoras para inducir la expresión de CXCL12. Este efecto está mediado a través de los genes miARN-126, que están enriquecidos en los cuerpos apoptóticos y actúan alterando al regulador negativo RGS16, permitiendo al CXCR4 estimular la vía de autorregulación que mejora la fosforilación de ERK1/2 y aumenta la producción de nuevos CXCL12. Inyecciones repetidas in vivo de cuerpos apoptóticos endoteliales tienen un efecto ateroprotector para promover la movilización y la incorporación

de las células progenitoras de la placa. Las MPs también tienen miRNA, queda aún por determinar, si las MPs endoteliales tienen el mismo efecto que los cuerpos apoptóticos.

. Otro paso del proceso de la neovascularización en la que las MPs podrían interferir es la adhesión de células progenitoras al endotelio activado o componentes subendoteliales de la matriz extracelular expuestos en los sitios de lesión vascular. Las MPs de plaquetas también están implicadas en este nivel porque estas refuerzan la adhesión y migración de las células progenitoras. Este efecto parece ser atribuible a alteraciones fenotípicas de las células progenitoras expuestas a las MPs de plaquetas con aumento de la expresión de marcadores de células endoteliales y la transferencia del receptor de quimiocinas CXCR4 a las células progenitoras, lo cual mejora la capacidad de respuesta a su ligando CXCL12. Varios mecanismos celulares podrían mediar en la capacidad vasoregenerativa de las células progenitoras después de su adhesión. Las células progenitoras pueden ofrecer factores angiogénicos en los tejidos patológicos y contribuir a la neovascularización y la remodelación tejido/vaso a través de efectos paracrinos. Las MPs de células progenitoras podrían ser uno de estos factores. Estas MPs pueden ser incorporados en las células endoteliales por la interacción con integrinas  $\alpha 4 \beta 1$  expresadas en la superficie MPs. Estas MPs promueven en las de células endoteliales la supervivencia, proliferación, y la organización en estructuras similares a capilares a través de la transferencia de ARNm, con un papel crítico de PI3K y la sintasa de óxido nítrico endotelial. Por último, las células progenitoras se pueden incorporar en los vasos sanguíneos y regenerar la barrera endotelial vascular. Las MPs que contribuyen a este paso promoviendo la diferenciación de células progenitoras en células con fenotipo endotelial. El mecanismo implicado depende del origen de las MPs: una unión de MPs a las células progenitoras que cambian su fenotipo para MPs de plaquetas; las especies reactivas de oxígeno para la MPs aisladas de los músculos isquémicos; o por el activador del peroxisoma por MPs en plasma. Cabe destacar que estos efectos positivos de las MPs en la neo

vascularización post-isquémica se han documentado no sólo in vitro, sino también in vivo en la ligadura de la arteria femoral unilateral y modelos murinos con lesiones arteriales inducidas con un alambre.[33]

## **Las Micropartículas: Biomarcadores Cardiovasculares**

### ***Progresión de la enfermedad***

Las MPs procedentes de diferentes tipos de células pueden ser detectadas en el plasma de sujetos sanos, cuando se deriven del activo del balance entre la generación y depuración de MPs. Durante la última década, numerosos estudios han demostrado que los niveles circulantes de MPs aumentan en una amplia gama de enfermedades cardiovasculares y de sus factores de riesgo cardiovascular no controlados, la progresión de la lesión aterosclerótica, insuficiencia cardíaca, trombosis, arritmias y las enfermedades vasculares inflamatorias. Cambios en los niveles circulantes de MPs pueden proporcionar información clínica importante en sujetos sanos y en pacientes con trastornos cardiovasculares. Los niveles circulantes de MPs derivadas de leucocitos, posiblemente reflejan el aumento de la inflamación vascular y se asocian de forma independiente con la aterosclerosis subclínica así como a la remodelación de la arteria carótida interna en sujetos asintomáticos. Varios estudios identifican los niveles plasmáticos de MPs endoteliales como un marcador sustituto de la función vascular. En pacientes con disfunción endotelial establecida, los niveles circulantes de MPs endoteliales están inversamente correlacionados con la amplitud de la dilatación mediada por flujo, independientemente de la edad y de la presión. Los recientes hallazgos también apoyan el valor pronóstico de los niveles circulantes de MPs. Los niveles circulantes de MPs endoteliales, pero no las MPs de otro origen, parecen ser un robusto predictor de la mortalidad cardiovascular y eventos cardiovasculares adversos mayores en pacientes con enfermedad arterial coronaria, la hipertensión pulmonar o insuficiencia renal

terminal. Si la medición de los niveles plasmáticos MPs sería útil para mejorar y evaluar el riesgo cardiovascular en la prevención primaria no se conocen por el momento debido a la falta de pruebas de su valor predictivo, la discriminación, y el poder de reclasificación que se requieren para conferir utilidad clínica de un biomarcador. [33]



## **JUSTIFICACIÓN**

El estudio y las características de las MPs en la enfermedad vascular ha sido poco estudiada en la población mundial. Las MPs representan un modelo fisiopatológico que explica la generación de trombosis cuyos resultados se están definiendo y principalmente se estudian en población europea y americana. Y por consecuencia no es posible trasladar los resultados de estudios epidemiológicos existentes a todos los grupos étnicos.

Nuestro interés se centra en determinar los niveles de MPs presentes en pacientes con enfermedad cardiovascular que serán sometidos a cateterismo cardiaco en la Unidad de Hemodinámica de este Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez (INCICH). Especialmente en los pacientes que tienen Angina Estable (AE), que en este estudio, para fines de realizar el análisis estadístico serán considerados como el grupo control, en relación con los casos que tienen un Síndrome Isquémico Coronario Agudo (SICA) ya sea del tipo, angina inestable, infarto sin elevación del segmento ST e infarto con elevación del segmento ST.

Esta estrategia de estudio nos permitirá señalar las concentraciones de MPs en plasma que aún no se han establecido en la población mexicana ante dos escenarios, enfermedad cardiovascular estable y en el SICA. La medición de MPs en ambos grupos permitirá expandir el panorama de estudio como puntos angulares en la fisiopatología de la enfermedad aterosclerótica.

## **VARIABILIDAD DEL PROBLEMA A RESOLVER.**

La variabilidad el problema representa todo un reto ya que hay muy pocos estudios in vivo de las MPs en la enfermedad cardiovascular, diferentes estudios han mostrado evidencia de una asociación importante en el aumento de MPs protrombóticas en la inflamación.

Consideramos que el mejor conocimiento y medición de Micropartículas de las diferentes células que participan en la enfermedad cardiovascular puede orientarnos a comprender los biomarcadores celulares principales de esta patología.

## **ANTECEDENTES AMPLIOS SOBRE EL TEMA.**

El estudio de las MPs de la membrana plasmática se reportó hace cerca de 40 años, y durante muchos años este proceso fue descrito como la liberación del "polvo celular." Sin embargo, el pasado decenio ha despertado un gran interés en las vesículas de membrana en muchos campos de la biología, incluyendo la biología vascular y trombosis. En consecuencia, el término polvo célula ha sido remplazado por el término MPs para describir las vesículas de membrana submicrómicas que se desprenden de las células activadas o en apoptosis. Hallazgos más interesantes han demostrado la participación de las MPs en la inflamación, la trombosis y la angiogénesis.

### **PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN:**

- ¿Existe una diferencia entre la concentración de MPs en pacientes sometidos a intervencionismo coronario percutáneo con un síndrome isquémico coronario agudo en relación con pacientes con angina estable?

**HIPÓTESIS NULA:**

- En el SICA ya sea del tipo angina inestable, infarto sin elevación del segmento ST, infarto con elevación del segmento ST y en la angina crónica estable los niveles de micropartículas *no* difieren de los controles.

**HIPÓTESIS ALTERNA:**

- En el SICA ya sea del tipo angina inestable, infarto sin elevación del segmento ST, infarto con elevación del segmento ST y en la angina crónica estable los niveles de micropartículas *si* difieren de los controles.

## **OBJETIVOS**

### **- Objetivo Primario**

- Determinar las concentraciones de micropartículas en plasma de pacientes que presenten un SICA en relación con un grupo control angina estable (AE).

### **- Objetivo Secundario**

- Identificar si existe una asociación entre los niveles de concentración de Micropartículas y la severidad de lesiones encontradas en la angiografía coronaria en pacientes con un SICA y AE
  
- Identificar si existe una asociación entre los niveles de concentración de micropartículas en relación con enfermedades concomitantes, uso de medicamentos, características antropométricas y pruebas de laboratorio.

## **METODOLOGÍA**

- **METODOLOGÍA ADECUADA PARA LA SOLUCIÓN DEL PROBLEMA A RESOLVER.**

Se realizará un estudio de transversal, comparativo y analítico.

- **POBLACIÓN:**

Pacientes con enfermedad cardiovascular que sean llevados a coronariografía en la Unidad de Hemodinámica del INCICH entre el periodo de marzo de 2012 a diciembre de 2014 y que cumplan con los criterios de inclusión.

- **CALCULO DE TAMAÑO DE MUESTRA**

Los niveles de concentraciones de Micropartículas en ambos brazos de estudio no se han estudiado, por lo que no se conoce la concentración plasmática de Micropartículas en estudios previos. Es por ello que se considera el presente trabajo como un estudio piloto.

- **INFRAESTRUCTURA CON LA QUE SE CUENTA PARA DESARROLLAR EL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN.**

Laboratorio de Biología Molecular y Departamento de Hemodinámica del INCICH con la asesoría del Dr Marco Antonio Peña Duque.

## **CRITERIOS DE INCLUSION:**

Se incluyeron pacientes con enfermedad cardiovascular que comprendan los siguientes diagnósticos:

- Angina estable
- Angina inestable
- Infarto al Miocardio sin elevación del segmento ST
- Infarto con Elevación del segmento ST

**CRITERIOS DE EXCLUSION:**

- Historia de Infarto de miocardio un mes previo a la coronariografía
- Edad mayor de 80 años
- Infarto secundario a isquemia debido a desbalance entre el aporte y demanda de oxígeno
- Enfermedad inflamatoria no infecciosa reciente o crónica
- Historia de neoplasias
- Intervenciones quirúrgicas recientes (3 meses previos)
- Intervencionismo coronario percutáneo de rescate
- Antecedente de cirugía o traumatismo un mes previo
- Insuficiencia renal

**DESCRIPCION OPERATIVA:**

Se revisó la programación diaria del servicio de hemodinámica y se eligieron a los pacientes con enfermedad cardiovascular que se encontraban programados para coronariografía. Dado que se contemplo incluir en el estudio a pacientes con síndrome coronario agudo con elevación del segmento ST (SICA CEST), se mantuvo una comunicación directa con el servicio de urgencias para incluir a los pacientes con SICA CEST candidatos a intervencionismo coronario percutáneo primario.



Se entrevistó a cada paciente y se les invitó a participar explicando ampliamente y por escrito la finalidad del estudio. Cada paciente autorizó por escrito la participación en el estudio mediante consentimiento informado.

Se revisó el expediente clínico y se recolectaran datos en relación a factores de riesgo, medidas antropométricas y cuadro clínico. También se registraron los resultados de estudio angiográfico coronario.

### **MEDICION DE MICROPARTÍCULAS**

Ambos procedimientos se emplean para pacientes con un SICA y AE. Para la obtención de Micropartículas se siguieron las siguientes indicaciones:

#### **Fase 1**

- Tomar tres muestras de sangre obtenidas por método de venopunción (previo consentimiento del paciente), colocar cada muestra en tubos Vacutainer con Citrato de Sodio 0.109 M. con un volumen de 3.7ml de tapa azul (Eliminar la primera toma de muestra).

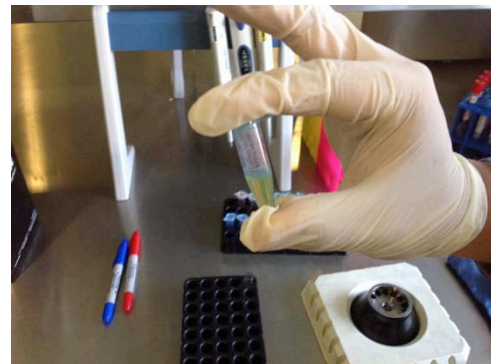
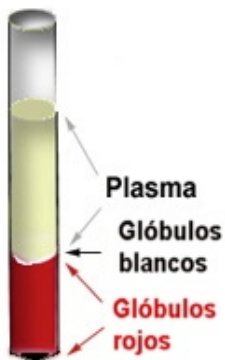


- Colocarse guantes (latex normal).
- Homogenizar la muestra: mezclando la muestra por pipeteo.

- Distribuir las muestras en tubos Eppendorf de 2ml, aproximadamente 1.5 ml de la muestra en cada tubo (se obtiene aproximadamente 3 tubos Eppendorf de cada tubo Vacutainer).
- Centrifugar en Eppendorf Cetrifuge 5417R con un rotor de 7.5 cm a 4200 rpm, por 15 minutos a una temperatura de 4 °C para obtener plasma y verificando que estén en contrapeso.



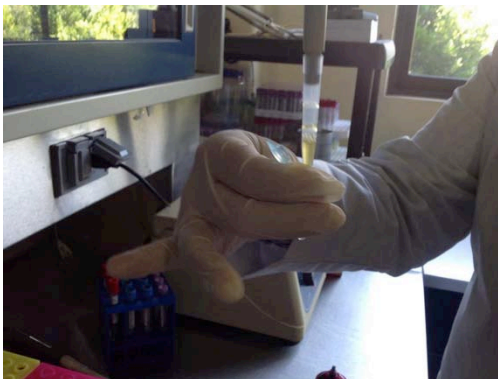
- Inmediatamente en  $\pm 5$  min separar el plasma obtenido, dejando el anillo que separa a los eritrocitos, y colocarlo en tubos nuevos Eppendorf de 1.5 ml, deshechar los tubos que contienen los eritrocitos en las bolsas rojas.



- Centrifugar el plasma obtenido en la misma centrifuga a 12 500 rpm durante 2 min a 4 °C.



- Separar el sobrenadante de todos los tubos Eppendorf en un tubo de plástico grande, sin hacer movimientos bruscos para evitar que se mezclen las micropartículas. Dejar aproximadamente en el fondo  $\pm 50 \mu\text{L}$  de cada uno de los tubos, estos tubos se desechan.



- Homogenizar con una pipeta el tubo de plástico grande, sin llegar al segundo tope para evitar la formación de burbujas.
- Hacer alícuotas en tubos nuevos Eppendorf de  $1.5 \mu\text{L}$ , cada una de  $\pm 500 \mu\text{L}$ , con el plasma del tubo de plástico grande (homogenizando aproximadamente cinco veces al hacer cada alícuota). Etiquetar: fecha, nombre, número de expediente y la leyenda PLASMA MPS
- Congelar todas las alícuotas a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  (refrigeradores primer piso) en la caja con la leyenda PLASMA MPS.



## Fase 2

- Descongelar las muestras (alícuotas) en hielo en el refrigerador gris ( $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ).



- Las centrifugaciones se realizaran en la centrifuga Optima TLx Ultracentrifuga 120000 rpm, su uso requiere de 20 min de encendido previamente (esperar a que el regulador se ponga en color verde, y encender la centrifuga). Características del rotor: tiene la capacidad para 14 tubos (Tiene tapa azul). Los tubos que se emplean en el rotor deben ser del mismo calibre con las siguientes dimensiones 0.8 cm de diámetro y 3.5 cm de alto, es preferible trabajar con los tubos transparentes (tomarlos del laboratorio).
- Homogenizar las muestras antes de agregarlas al los tubos de centrifugación.



- Agregar 500µL de plasma (previamente descongelado) en cada tubo de centrifugación (tubos transparentes).
- Ajustar el peso de las muestras, empleando la balanza analítica 62ADAPW124 (máximo 120g d= 0.0001), utilizando un trozo de gradilla (unicel), pesar primero el trozo de unicel

y después cada tubo, todos los tubos tienen que pesar lo mismo, lo cual debe coincidir con los 500 ml que cada tubo posee.

- Colocar las muestras en el rotor verificando que estén en contrapeso y centrifugar a 30 000 rpm durante 90 min a 4 °C.
- Tener previamente etiquetados dos tubos Eppendorf de 1.5 ml para cada muestra. (etiquetar: fecha, nombre, registro y leyenda PLASMA).
- Extraer 450  $\mu$ L del plasma de cada tubo de centrifugación (dejando 50 $\mu$ l), colocarlo en los tubos Eppendorf etiquetados previamente y congelar a - 80 °C en la caja con la leyenda PLASMA.
- Adicionar 450  $\mu$ L de buffer HEPES (que está en el refrigerador del laboratorio) al tubo de centrifugación lavando las paredes. Técnica de lavado: colocar todo el buffer en el tubo, homogeneizar, tomar muestra y colocar la punta de la pipeta en las paredes de tubo y dejar fluir el líquido para “lavar”, repetir 3 o 4 veces.
- Ajustar el peso de los tubos a los que se adicionó buffer. Centrifugarlos a las mismas condiciones (30 000 rpm por 90 min a 4 °C). Eliminar el sobrenadante 450 $\mu$ L (buffer y plasma) y dejar aproximadamente 50  $\mu$ L en cada tubo de centrifugación.



- De nuevo, agregar 450  $\mu$ L de buffer HEPES al tubo de centrifugación, homogeneizar y lavar. Ajustar peso. Centrifugar a las mismas condiciones (30 000 rpm por 90 min a 4°C).

- Extraer 470  $\mu\text{L}$  del tubo de centrifugación y eliminar, dejando 30  $\mu\text{L}$  en el tubo de centrifugación (que contiene Micropartículas), colocar los 30  $\mu\text{L}$  en un tubo nuevo Eppendorf de 500  $\mu\text{L}$  (Etiquetado: nombre, serie, fecha y leyenda MPs).
- Dependiendo del volumen sobrenadante (Micropartículas) ajustar el volumen a 100  $\mu\text{L}$  con el buffer HEPES, ejemplo: tomar 70  $\mu\text{L}$  del buffer y lavar el tubo de centrifugación para obtener las posibles Micropartículas que se hayan quedado en las paredes, y agregar estos 70  $\mu\text{L}$  al tubo Eppendorf que contiene 30  $\mu\text{L}$  de MPs, lo cual debe de dar 100  $\mu\text{L}$ , si falta ajustar con buffer.
- Congelar los tubos con MPs a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  en la caja con la leyenda MPs.
- Preparación de Buffer HEPES: 10  $\mu\text{M}$  (0.01 M) + NaCl (0.14 M)  
 HEPES= 0.5957 g  
 NaCl= 2.045 g  
 pH: 7.4 Aforar a 250 ml.

### **Cuantificación de proteínas**

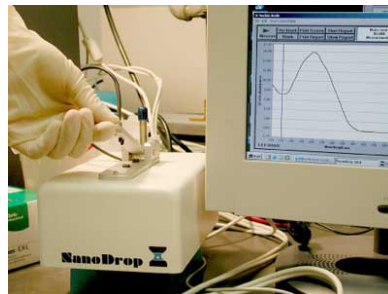
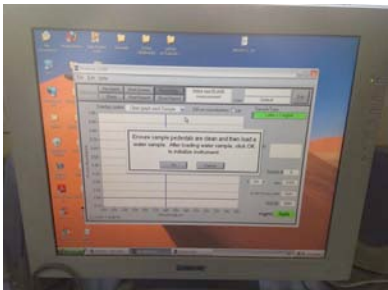
- Separar las muestras marcadas.
- Encender el aparato “Baño María”, agregar agua hasta la primera línea y programar a  $37^{\circ}\text{C}$ .



- Agregar Nitrógeno líquido a contenedor cilíndrico y depositarlo en recipiente cuadrado de unicel.



- Colocar las muestras en una gradilla de unicel tener presente el orden.
- Iniciar 5 ciclos de cambio de temperatura simultanea. Introducir muestras en “Baño María” a 37°C durante un minuto y posteriormente en Nitrógeno Líquido durante 1 minuto (Repetir 5 veces)
- Usar programa NanoDrop.



- Iniciar la cuantificación de muestras, no olvidar colocar cada muestra previamente en “Vortex” para mezclar adecuadamente el sustrato.
- Seleccionar la opción de mostrar resultados, guardar en un archivo de Microsoft Excel®, e imprimir datos obtenidos.

## **Conversión de Proteínas de Micropartículas a Concentración de Micropartículas**

De acuerdo con Freyssinet, et al. [36], existen varios métodos para la medición o cuantificación de MPs. Los medios de medición propuestos son el citómetro de flujo, la citometría de flujo basada en la impedancia, la microscopia de fuerza atómica, la dispersión de luz dinámica. Hoy en día el mejor estándar de medición o cuantificación de MPs es mediante la Microscopía de fuerza atómica, sin embargo dado su poca disponibilidad así como su alto costo ha limitado su uso de forma rutinaria. De acuerdo a los estudios de Freyssinet, et al., propone un modelo validado usando la concentración de proteína contenida en las MPs para calcular la concentración de MPs, el método propuesto es equiparable con la microscopia de fuerza atómica. De tal forma que se asume que el aproximadamente las MPs contienen el 15% de proteína (similar a las células eucariotas), un simple calculo basado en el contenido de proteína de MPS permite la estimación que por cada 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de proteína corresponde a  $8 \times 10^5$  MPs  $\mu\text{l}$ . Estos valores son consistentes con la composición de fosfolípidos de las MPs y a las concentraciones equivalentes de fosfatidilserina demostrado por una evaluación funcional tipo ELISA [36].

### **ANALISIS ESTADISTICO:**

Se realizaron cálculos de las medidas de tendencia central. Media con desviación estándar o medianas según la distribución, para variables continuas. Análisis de Varianza para determinar asociación entre niveles micropartículas y extensión de la enfermedad arterial coronaria. Se emplearon pruebas estadísticas no paramétricas, si corresponde de variables categóricas u ordinales, según sea el caso: prueba de Chi cuadrada, exacta de Fisher, U de Mann Whitney. Se usó el paquete estadístico SPSS® versión 20.0.



## **RECURSOS ECONÓMICOS**

Se utilizaron recursos económicos y de mobiliario médico proporcionado por el INCICH.

## RESULTADOS

Se presentan los resultados de los 338 sujetos de estudio. Dentro de las características demográficas, variables como la edad, género, prevalencia de diabetes, hipertensión, hábito tabáquico, índice tabáquico, dislipidemia, infarto previo, antecedente de valvulopatía, insuficiencia cardíaca, hiperuricemia e índice de masa corporal se representan en el Cuadro 1.

CUADRO 1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

CARACTERÍSTICA	VALOR (N=338)
<b>Edad en años, Media±DE</b>	60.9±10.6
<b>Sexo masculino (n, %)</b>	272 (80.5%)
<b>Diabetes (n, %)</b>	149 (44.1%)
<b>Hipertensión (n, %)</b>	213 (63%)
<b>Tabaquismo activo (n, %)</b>	106 (31.4%)
<b>Antecedente de tabaquismo (n, %)</b>	166 (44.9%)
<b>Índice tabáquico, Mediana y RIC</b>	7.1 (1.22, 19)
<b>Dislipidemia (n, %)</b>	152 (45%)
<b>Infarto previo (n, %)</b>	205 (60.7%)
<b>Antecedente de valvulopatía (n, %)</b>	26 (7.7%)
<b>Insuficiencia cardíaca (n, %)</b>	50 (14.8%)
<b>Hiperuricemia (n, %)</b>	33 (9.8%)
<b>Índice de masa corporal (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	27 (24.8, 29.4)

El cuadro 2 muestra los datos de Proteínas de micropartículas, niveles de colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL, triglicéridos, glucosa, Proteína C reactiva, niveles de troponina, Creatinina MB (CK MB), Pro-BNP, hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio

(VCM), plaquetas, volumen plaquetario medio (VPM), INR, Hemoglobina Corpuscular Media (HcM).

CUADRO 2. DATOS DE LABORATORIO

CARACTERÍSTICA	VALOR (N=338)
Proteínas micropartículas (µg/ ml)	0.126 (0.069, 0.225)
Colesterol total (mg/dl)	151.01 (120, 181.22)
Colesterol LDL (mg/dl), Mediana y RIC	90.7 (63.4, 121.2)
Colesterol HDL (mg/dl), Mediana y RIC	36.95 (30.59, 43.75)
Triglicéridos (mg/dl), Mediana y RIC	132.16 (98.75, 189.67)
Glucosa (mg/dl), Mediana y RIC	112.6 (97.55, 152)
Proteína C reactiva (mg/dl), Mediana y RIC	10.25 (1.75, 54.53)
Troponinas (U/L), Mediana y RIC	1.14 (0.11, 6.98)
CK-MB (U/L), Mediana y RIC	3.2 (1.88, 10.67)
Pro-BNP (U/L), Mediana y RIC	884.35 (227.35, 2979.75)
Hemoglobina (g/dL), Mediana y RIC	14 (12.5, 15.4)
Hematócrito (%), Mediana y RIC	41.9 (37.3, 45.85)
Volumen corpuscular medio, Mediana y RIC	91.8 (88.7, 94.35)
Plaquetas, Mediana y RIC	207.5 (167.25, 244.75)
VPM, Mediana y RIC	9.1 (8.2, 10)
INR, Mediana y RIC	1.01 (0.96, 1.1)
McH, Mediana y RIC	30.65 (29.7, 31.77)

Se presenta en el Cuadro 3 los datos de los 338 sujetos estudiados clasificados de acuerdo a su diagnóstico así como a las características angiográficas encontradas en el cateterismo cardiaco en el Tronco de la Coronaria Izquierda (TCI), Descendente Anterior (DA), arteria Circunfleja (CX) y arteria Coronaria Derecha (CD).

CUADRO 3. ENFERMEDAD CORONARIA Y HALLAZGOS ANGIOGRAFICOS

CARACTERÍSTICA	VALOR (N=338)
<b>Diagnóstico: (n, %)</b>	
<b>Angina estable</b>	100 (29.6%)
<b>Angina inestable</b>	20 (8.9%)
<b>Infarto con elevación del ST</b>	106 (31.4%)
<b>Infarto sin elevación del ST</b>	102 (30.2%)
<b>Lesión de TCI (n, %)</b>	38 (11.2%)
<b>Lesión significativa de TCI (n, %)</b>	23 (6.8%)
<b>Lesión de DA (n, %)</b>	
<b>TIMI 0</b>	44 (13%)
<b>TIMI 1</b>	11 (3.3%)
<b>TIMI 2</b>	42 (12.4%)
<b>TIMI 3</b>	241 (71.3%)
<b>Lesión significativa de DA (n, %)</b>	218 (64.5%)
<b>Lesión de CX (n, %)</b>	
<b>TIMI 0</b>	36 (10.7%)
<b>TIMI 1</b>	3 (0.9%)
<b>TIMI 2</b>	22 (6.5%)
<b>TIMI 3</b>	277 (82%)
<b>Lesión significativa de CX (n, %)</b>	165 (48.8%)
<b>Lesión de CD (n, %)</b>	
<b>TIMI 0</b>	64 (18.9%)
<b>TIMI 1</b>	3 (0.9%)
<b>TIMI 2</b>	30 (8.9%)
<b>TIMI 3</b>	241 (71.3%)
<b>Lesión significativa de CD (n, %)</b>	214 (63.3%)
<b>Calcificación coronaria (n, %)</b>	47 (13.9%)
<b>Lesiones por vaso: (n, %)</b>	
<b>Sin lesiones</b>	45 (13.3%)
<b>Univascular</b>	87 (25.7%)
<b>Bivascular</b>	84 (24.9%)
<b>Trivascular</b>	121 (35.8%)
<b>Colocación de Stent (n, %)</b>	120 (68%)
<b>Antecedente de Stent (n, %)</b>	73 (21.6%)

<b>Stent Medicado (n, %)</b>	39 (11.5%)
<b>Medicado y No medicado (n, %)</b>	9 (2.7%)

El cuadro 4 se describe el tratamiento medico de los 338 sujetos previo al cateterismo cardiaco.

CUADRO 4. TRATAMIENTO RECIBIDO

<b>CARACTERÍSTICA</b>	<b>VALOR (N=338)</b>
<b>Estatinas (n, %)</b>	250 (74%)
<b>Fibratos (n, %)</b>	25 (7.4%)
<b>Metformina (n, %)</b>	60 (17.8%)
<b>Hipoglucemiantes orales (n, %)</b>	57 (16.9%)
<b>Insulina (n, %)</b>	47 (13.9%)
<b>Betabloqueador (n, %)</b>	212 (62.7%)
<b>Calcioantagonista (n, %)</b>	80 (23.7%)
<b>Tiazidas (n, %)</b>	23 (6.8%)
<b>Diurético de Asa (n, %)</b>	60 (17.8%)
<b>IECA (n, %)</b>	212 (62.7%)
<b>ARA-II (n, %)</b>	55 (16.3%)
<b>Nitroglicerina (n, %)</b>	46 (13.6%)
<b>Isosorbide (n, %)</b>	74 (21.9%)
<b>Aspirina (n, %)</b>	268 (79.3%)
<b>Clopidogrel (n, %)</b>	169 (50%)
<b>Prasugrel (n, %)</b>	18 (5.3%)
<b>Heparina de bajo peso molecular (n, %)</b>	70 (20.7%)
<b>Heparina no fraccionada (n, %)</b>	42 (12.4%)
<b>Warfarina (n, %)</b>	3 (0.9%)

IECA: Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina,  
ARA-II: Antagonista de receptor de angiotensina II.

El cuadro 5 se describen las características generales en ambos grupos, observándose que no existen diferencias estadísticas en las características generales entre los grupos de SICA y No SICA (angina estable).

CUADRO 5. ANÁLISIS BIVARIADO DE CARACTERÍSTICAS GENERALES

CARACTERÍSTICA	No SICA (n=100)	SICA (n=238)	p
Edad en años, Media±DE	61.2±9.2	60.8±11.1	0.73
Sexo masculino (n, %)	82 (82%)	190 (79.8%)	0.64
Diabetes (n, %)	49 (49%)	100 (42%)	0.23
Hipertensión (n, %)	68 (68%)	145 (60.9%)	0.11
Tabaquismo activo (n, %)	45 (45%)	121 (51.3%)	0.29
Antecedente de tabaquismo (n, %)	28 (28%)	78 (32.8%)	0.38
Índice tabáquico, Mediana y RIC	6.3 (1, 17.5)	8 (1.3, 19.5)	0.55
Dislipidemia (n, %)	45 (45%)	107 (45%)	0.13
Infarto previo (n, %)	64 (64%)	141 (59.5%)	0.43
Antecedente de valvulopatía (n, %)	9 (9%)	17 (7.2%)	0.56
Insuficiencia cardiaca (n, %)	16 (16%)	34 (14.3%)	0.68
Hiperuricemia (n, %)	12 (12%)	21 (8.8%)	0.36
Índice de masa corporal (Kg/m <sup>2</sup> )	27 (24.8, 29.4)	27 (24.8, 29.7)	0.98

En el cuadro 6 se representa el análisis bivariado de los datos de laboratorio en ambos grupos de estudio, sujetos con SICA y No SICA. Las únicas diferencias observadas fueron en los biomarcadores de necrosis miocárdica (tropinina y CKMB), los cuales están aumentados en los pacientes con SICA, como corresponde a su definición operativa. Los niveles de VPM también se observan mayores en los pacientes con SICA. Las concentraciones de micropartículas no son diferentes entre ambos grupos.

CUADRO 6. ANÁLISIS BIVARIADO DE DATOS DE LABORATORIO

CARACTERÍSTICA	No SICA (n=100)	SICA (n=238)	p
Proteínas Micropartículas (µg/ ml)	0.111 (0.064, 0.204)	0.136 (0.069, 0.228)	0.12
Colesterol total (mg/dl)	151.2 (120.4, 183.7)	150.8 (120, 180.2)	0.84
Colesterol LDL (mg/dl), Mediana y RIC	84.9 (60.9, 117.5)	94 (64.5, 123.2)	0.20
Colesterol HDL (mg/dl), Mediana y RIC	38.2 (31.6, 44.4)	36.6 (30.4, 46.6)	0.35
Triglicéridos (mg/dl), Mediana y RIC	146.9 (98, 212)	129 (99, 183.5)	0.18
Glucosa (mg/dl), Mediana y RIC	108.1 (96.2, 151.7)	113 (98.5, 152)	0.57
Proteína C reactiva (mg/dl), Mediana y RIC	4.9 (1.28, 45.3)	14 (1.84, 59.4)	0.09
Troponinas (U/L), Mediana y RIC	0.1 (0.1, 0.57)	2.04 (0.3, 9.8)	<b>&lt;0.001</b>
CK-MB (U/L), Mediana y RIC	2.36 (1.48, 3.56)	4.45 (2.07, 13.53)	<b>&lt;0.001</b>
Pro-BNP (U/L), Mediana y RIC	457.2 (206, 1298.7)	1180 (224.4, 3240.2)	0.09
Hemoglobina (g/dL), Mediana y RIC	14.1 (13.1, 15.5)	13.9 (12.4, 15.3)	0.45
Hematócrito (%), Mediana y RIC	42.1 (39.3, 46.1)	41.3 (36.8, 45.6)	0.31
Volumen corpuscular medio, Mediana y RIC	92.3 (89.1, 94.2)	91.5 (88.5, 94.4)	0.51
Plaquetas, Mediana y RIC	216 (178.2, 253.5)	206 (163.2, 239.7)	0.06
VPM, Mediana y RIC	8.8 (8, 9.4)	9.1 (8.4, 10.1)	<b>0.003</b>
INR, Mediana y RIC	1 (0.94, 1.1)	1.01 (0.96, 1.1)	0.39
MCH, Mediana y RIC	30.8 (29.7, 31.6)	30.6 (29.7, 31.8)	0.87

En el cuadro 7 se presenta el análisis bivariado entre ambos grupos de estudio de acuerdo a los hallazgos angiográficos encontrados en el cateterismo cardiaco. Los pacientes con angina estable presentan mayor proporción de calcificación coronaria (20% vs 11%, p=0.03) de forma significativa. El resto de características de enfermedad coronaria no fueron diferentes entre los grupos.

CUADRO 7. ANÁLISIS BIVARIADO DE ENFERMEDAD CORONARIA

CARACTERÍSTICA	No SICA (n=100)	SICA (n=238)	p
Lesión de tronco de coronarias izquierda (n, %)	11 (11%)	27 (11.3%)	0.92
Oclusión de tronco de coronarias izquierda (n, %)	5 (5%)	18 (7.6%)	0.63
Lesión de descendente anterior (n, %)			
TIMI 0	15 (15%)	29 (12.2%)	0.73
TIMI 1	2 (2%)	9 (3.8%)	
TIMI 2	12 (12%)	30 (12.6%)	
TIMI 3	71 (71%)	170 (71.4%)	
Oclusión de descendente anterior (n, %)	69 (69%)	149 (63.1%)	0.30
Lesión de circunfleja (n, %)			
TIMI 0	11 (11%)	25 (10.5%)	0.82
TIMI 1	0	3 (1.3%)	
TIMI 2	9 (9%)	13 (5.5%)	
TIMI 3	80 (80%)	197 (82.8%)	
Oclusión de circunfleja (n, %)	48 (48%)	117 (49.6%)	0.79
Lesión de coronaria derecha (n, %)			
TIMI 0	21 (21%)	43 (18.1%)	0.57
TIMI 1	0	3 (1.3%)	
TIMI 2	10 (10%)	20 (8.4%)	
TIMI 3	69 (69%)	172 (72.3%)	
Oclusión de coronaria derecha (n, %)	63 (63%)	151 (63.7%)	0.93
Calcificación coronaria (n, %)	20 (20%)	27 (11.3%)	<b>0.03</b>
Lesiones por vaso: (n, %)			
Sin lesiones	16 (16%)	29 (12.2%)	0.66
Univascular	23 (23%)	64 (27%)	
Bivascular	27 (27%)	57 (24.1%)	
Trivascular	34 (34%)	87 (36.7%)	
Colocación de Stent (n, %)	30 (45.5%)	90 (54.9%)	0.19
Antecedente de Stent (n, %)	20 (30.8%)	53 (32.3%)	0.82
Stent medicado (n, %)	7 (38.9%)	32 (52.5%)	0.99
Mixto (n, %)	3 (16.7%)	6 (9.8%)	



En el cuadro 8 se describe el análisis bivariado del tratamiento recibido en ambos grupos de estudio SICA y No SICA previo al cateterismo cardiaco. Los pacientes con angina estable recibieron en mayor proporción beta bloqueo (74 vs 58%, p=0.01) e isosorbide (30 vs 18%, p=0.02). Los pacientes con SICA recibieron en mayor proporción nitroglicerina (16 vs 7%, p=0.02), clopidogrel (56 vs 36%, p=0.001) y HBPM (25 vs 9%, p=0.001), a pesar de que ambos grupos fueron igualmente revascularizados.

CUADRO 8. ANÁLISIS BIVARIADO DE TRATAMIENTO RECIBIDO

CARACTERÍSTICA	No SICA (n=100)	SICA (n=238)	p
Estatinas (n, %)	70 (70%)	180 (76.3%)	0.22
Fibratos (n, %)	9 (9%)	16 (6.8%)	0.47
Metformina (n, %)	22 (22%)	38 (16.1%)	0.19
Hipoglucemiantes orales (n, %)	19 (19%)	38 (16.1%)	0.26
Insulina (n, %)	16 (16%)	31 (13.2%)	0.49
Betabloqueador (n, %)	74 (74%)	138 (58.5%)	<b>0.01</b>
Calcioantagonista (n, %)	29 (29%)	51 (21.6%)	0.14
Tiazidas (n, %)	11 (11%)	12 (5.1%)	0.05
Diurético de Asa (n, %)	15 (15%)	45 (19.1%)	0.39
IECA (n, %)	64 (64%)	148 (62.7%)	0.93
ARA-II (n, %)	22 (22%)	33 (14%)	0.06
Nitroglicerina (n, %)	7 (7%)	39 (16.5%)	<b>0.02</b>
Isosorbide (n, %)	30 (30%)	44 (18.6%)	<b>0.02</b>
Aspirina (n, %)	79 (79%)	189 (80.1%)	0.82
Clopidogrel (n, %)	33 (36%)	133 (56.4%)	<b>0.001</b>
Prasugrel (n, %)	2 (2%)	16 (6.8%)	0.07
Heparina de bajo peso molecular (n, %)	9 (9%)	61 (25.7%)	<b>0.001</b>
Heparina no fraccionada (n, %)	8 (8%)	34 (14.3%)	0.10

CARACTERÍSTICA	No SICA (n=100)	SICA (n=238)	p
Warfarina (n, %)	1 (1%)	2 (0.8%)	1.00

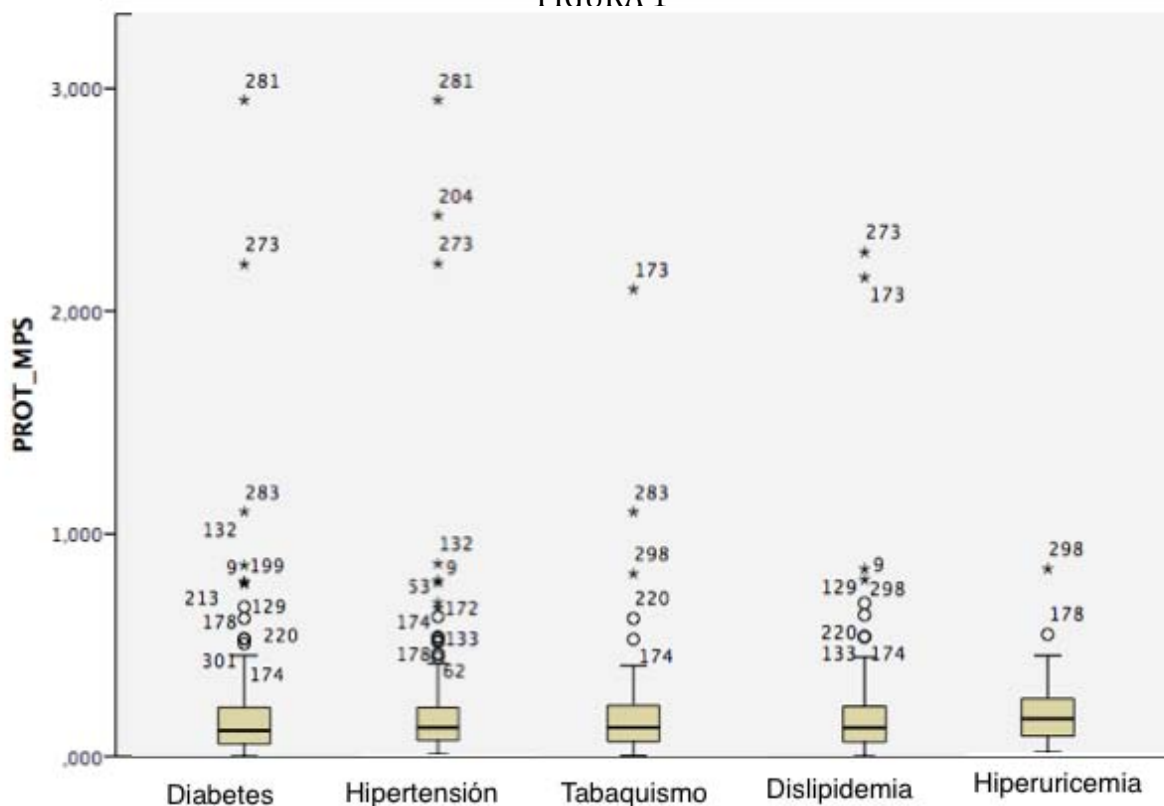
#### RELACION DE CONCENTRACIÓN DE MICROPARTICULAS Y ENFERMEDAD CORONARIA

Las concentraciones de micropartículas no difieren con la distribución de enfermedad coronaria, ni al clasificarla por su flujo TIMI (TCI,  $p=0.15$ ; DA,  $p=0.56$ ; CX,  $p=0.92$ ; CD,  $p=0.49$ ), ni al evaluarla de forma dicotómica con la presencia o no de lesiones significativas (TCI,  $p=0.18$ ; DA,  $p=0.08$ ; CX,  $p=0.44$ ; CD,  $p=0.055$ ). Tampoco se observó diferencia de las concentraciones de micropartículas entre pacientes con o sin calcificación coronaria ( $p=0.11$ ), ni dependiendo del número de vasos afectados ( $p=0.35$ ).

#### RELACION DE CONCENTRACIÓN DE MICROPARTICULAS Y ENFERMEDADES CONCOMITANTES.

No existen diferencias estadísticas en las concentraciones de micropartículas en poblaciones con diabetes ( $p=0.47$ ), hipertensión arterial ( $p=0.17$ ), tabaquismo ( $p=0.47$ ), dislipidemia ( $p=0.29$ ) o hiperuricemia ( $p=0.25$ ). Tampoco existen diferencias entre las enfermedades concomitantes entre sí ( $p=0.28$ ). Figura 1.

FIGURA 1

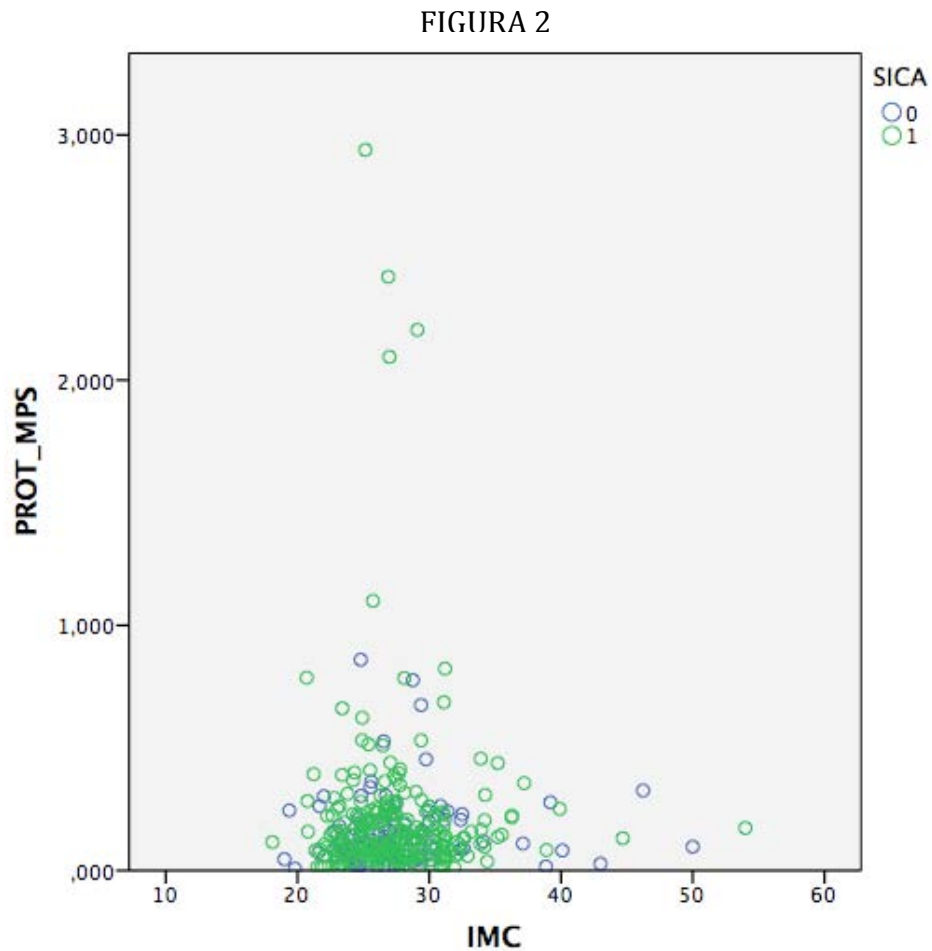


RELACION DE CONCENTRACIÓN DE MICROPARTÍCULAS Y USO DE MEDICAMENTOS

Entre los fármacos utilizados, observamos menores concentraciones de micropartículas de forma significativa en los pacientes que se medican con insulina (0.13 vs 0.10, p=0.01), beta bloqueadores (0.14 vs 0.11, p=0.05), aspirina (0.16 vs 0.11, p=0.002) y HBPM (0.13 vs 0.10, p=0.04). El resto de medicamentos no mostró diferencia de concentraciones (Estatinas p=0.09, Fibratos p=0.63, Metformina p=0.71, Biguanidas p=0.06, Calcioantagonistas p=0.77, Tiazidas p=0.38, Diuréticos de Asa p=0.24, IECA p=0.09, ARA-II p=0.97, Nitroglicerina p=0.18, Isosorbide p=0.51, Clopidogrel p=0.08, Prasugrel p=0.46, HNF p=0.07, Warfarina p=0.44).

CORRELACION DE CONCENTRACIÓN DE MICROPARTICULAS Y MEDIDAS  
ANTROPOMÉTRICAS

No existe correlación entre las concentraciones de Micropartículas y el índice de masa corporal ( $Rho=0.02$ ,  $p=0.67$ ) Figura 2.

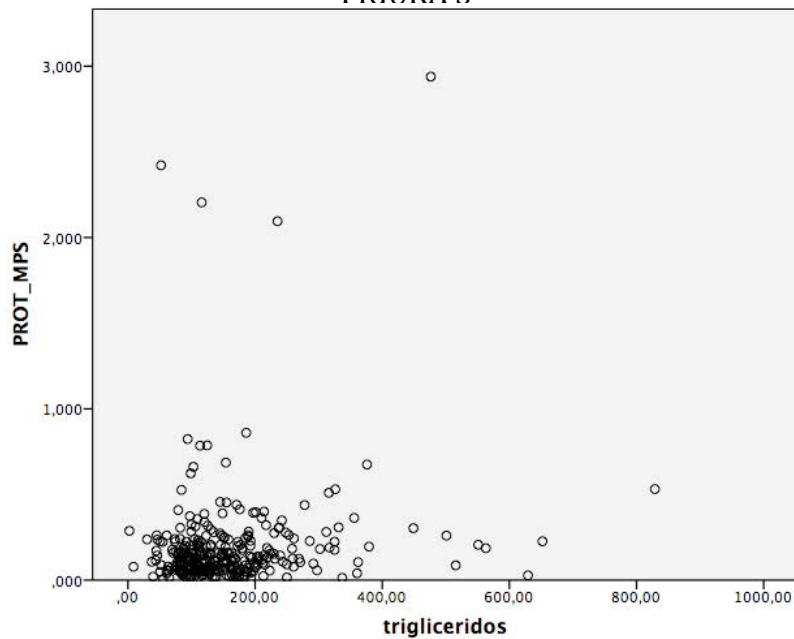


En el Cuadro 9 se presenta la correlación de Micropartículas y datos de laboratorio en los grupos en donde no existe correlación importante entre las concentraciones de Micropartículas y los resultados de laboratorio. Los triglicéridos presentan una correlación significativa, pero pobre. Figura 3.

CUADRO 9: CORRELACION DE CONCENTRACIÓN DE MICROPARTICULAS Y DATOS DE LABORATORIO

DATO DE LABORATORIO	RHO	p
Colesterol total	0.07	0.16
Colesterol LDL	0.04	0.46
Colesterol HDL	-0.07	0.22
Triglicéridos	0.13	<b>0.02</b>
Glucosa	0.03	0.47
Proteína C reactiva	0.02	0.79
Troponinas	-0.01	0.83
CK-MB	0.07	0.23
Pro-BNP	-0.02	0.76
Hemoglobina	0.02	0.61
Hematócrito	0.03	0.48
Volumen corpuscular medio	-0.05	0.36
Plaquetas, Mediana	0.03	0.52

FIGURA 3



CONVERSION DE PROTEINAS DE MICROPARTICULA A CONCENTRACIÓN DE  
MICROPARTICULAS

Tal como se describe en la metodología se emplea la formula de conversión propuesta por Freyssinet, et al, [36]. Esta formula calcula el contenido de proteína de MPS y permite la estimación en la concentración de MPS que por cada 1 µg/ml de proteína corresponde a  $8 \times 10^5$  MPs µl. Como se muestra en el Cuadro 10

CUADRO 10: CONCENTRACION DE MICROPARTICULAS DE ACUERDO A SU CONCENTRACION  
DE PROTEINA

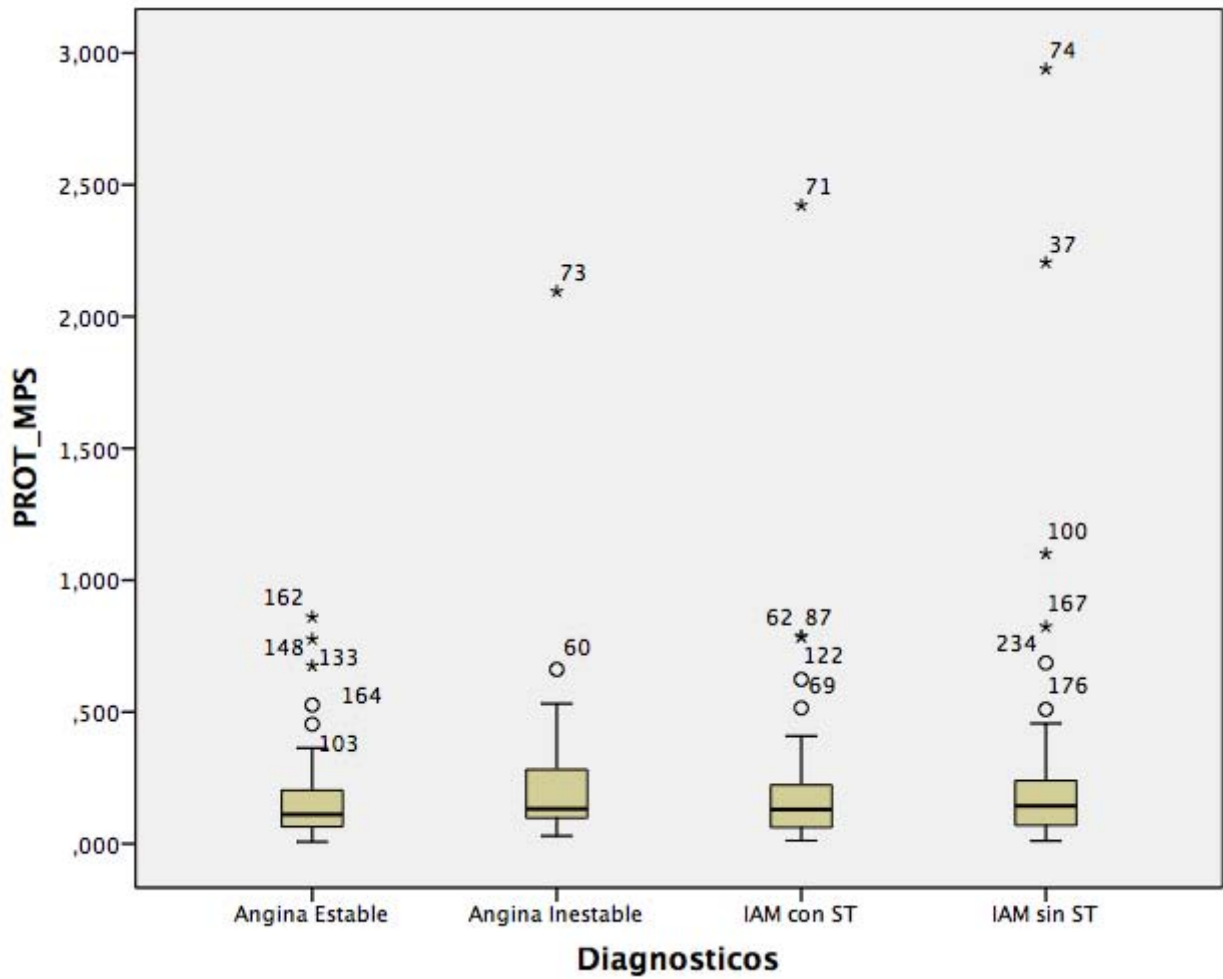
CARACTERÍSTICA	No SICA (n=100)	SICA (n=238)	p
Proteínas Micropartículas (µg/ ml)	0.111 (0.064, 0.204)	0.136 (0.069, 0.228)	0.12
Concentración de Micropartículas (MPs/µl)	3637.2 (2097.2, 6684.7)	4456.4 (2261, 7471.1)	0.12

La concentración de proteína de MPS cuantificada de acuerdo a los diagnósticos se describe en el cuadro 11 y Figura 4. Destaca la tendencia de obtener mayor cantidad de concentración de MPS en la angina inestable y el IAM SEST (0.258, 0.230) con respecto a la angina estable y el IAM CEST (0,155, 0.182).

CUADRO 11: CONCENTRACION PROTEINA DE MPS SEGUN DIAGNOSTICO

	Diagnósticos	Estadístico		
Proteína de MPs	<b>Angina Estable</b>	<b>Media</b>	<b>0,15479</b>	
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior Límite superior	0,12544 0,18415
		Mediana		0,11117
		Varianza		0,022
		Desviación estándar		0,147934
		Mínimo		0,008
		Máximo		0,860
		Rango intercuartil		0,140
		<b>Angina Inestable</b>	<b>Media</b>	<b>0,25750</b>
	95% de intervalo de confianza para la media		Límite inferior Límite superior	0,11552 0,39948
	Mediana			0,13242
	Varianza			0,145
	Desviación estándar			0,380237
	Mínimo			0,030
	Máximo			2,095
	Rango intercuartil			0,193
	<b>IAM con ST</b>		<b>Media</b>	<b>0,18185</b>
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior Límite superior	0,13157 0,23213
		Mediana		0,13017
		Varianza		0,068
		Desviación estándar		0,261074
		Mínimo		0,012
		Máximo		2,422
		Rango intercuartil		0,161
		<b>IAM sin ST</b>	<b>Media</b>	<b>0,22963</b>
	95% de intervalo de confianza para la media		Límite inferior Límite superior	0,15582 0,30345
	Mediana			0,14342
	Varianza			0,141
Desviación estándar			0,375796	
Mínimo			0,011	
Máximo			2,939	
Rango intercuartil			0,171	

Figura 4



CONVERSION DE PROTEINAS DE MICROPARTICULA A CONCENTRACIÓN DE  
MICROPARTICULAS DE ACUERDO AL DIAGNOSTICO

Se emplea la formula de conversión propuesta por Freyssinet, et al, [36] permitiendo la estimación en la concentración de MPS que por cada 1 µg/ml de proteína corresponde a  $8 \times 10^5$  MPs µl. Como se muestra en el Cuadro 11



CUADRO 11: CONCENTRACION DE MICROPARTICULAS DE ACUERDO A SU CONCENTRACION DE PROTEINA SEGÚN EL DIAGNOSTICO

	<b>Proteínas Micropartículas (µg/ ml)</b>	<b>Concentración de Micropartículas (MPs/µl)</b>
<b>ANGINA ESTABLE</b>	0,155 (0.125, 0.184)	5,079 (4,096 - 6,029)
<b>ANGINA INESTABLE</b>	0,258 (0.115, 0.400)	8,454 (3,768 - 13,107)
<b>IAM CEST</b>	0,182 (0.132, 0.232)	5,963 (4,325 - 7,606)
<b>IAM SEST</b>	0,230 (0.156, 0.303)	7,536 (5,111 - 9,928)

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

A pesar de los importantes avances en el tratamiento médico y de intervención durante las últimas décadas, la enfermedad arterial coronaria (EAC) y sus consecuencias, que incluyen infarto de miocardio, muerte súbita cardíaca e insuficiencia cardíaca crónica, siguen siendo un importante contribuyente a la mortalidad en los países occidentales.

Modificaciones del estilo de vida y medicamentos de prevención secundaria, como las estatinas o inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA), han mejorado los resultados, pero algunos pacientes experimentan eventos cardiovasculares adversos como consecuencia de una evolución de la enfermedad aterosclerótica en particular. La identificación de pacientes de alto riesgo los pacientes vulnerables sigue siendo un tema difícil.

Numerosos informes han puesto de manifiesto los cambios en los niveles circulantes de MPS en asociación con enfermedades cardiovasculares, incluyendo CAD estable e inestable, como prueba de la trombosis en curso, inflamación, lesión celular, o apoptosis. [37]

Las MPs son vesículas de membrana que miden de 0,1 a 1  $\mu\text{m}$ , estas son liberadas a el espacio extracelular tras la activación celular o apoptosis. Albergan en su superficie la mayor parte de las proteínas asociadas a membranas de las células que se derivan y se caracterizan por la pérdida de la asimetría de la membrana plasmática, lo que resulta en la exposición de fosfatidilserina en su cara externa.

Un gran número de estudios han propuesto que las MPs pueden contribuir al desarrollo de la placa aterosclerótica, la progresión y complicaciones. Es de hacer mención sobre el papel de MPS se basan en investigaciones generadas in vitro a partir de células cultivadas o MPs aisladas de la sangre o en los tejidos de los pacientes y modelos animales. A pesar de la información proporcionada por las MPs en estudios generados in vitro aportan conocimientos de gran valor, la transferencia de estos resultados in vivo podría ser limitada debido a los efectos biológicos y la composición de las MPs varían mucho en función del estímulo inicial de su liberación.

En este estudio transversal de 338 pacientes, se busco determinar la concentración de MPs circulantes en pacientes con algún tipo de Síndrome Coronario agudo (SICA) ya sea del tipo angina inestable, SICA del tipo infarto sin elevación del segmento ST (SICA SEST) o el SICA con elevación del Segmento ST (SICA CEST), en relación con controles con angina estable los cuales en el presente estudio se definen como No SICA. Se ha demostrado que los niveles de MPs circulantes en sangre periférica son mas elevados en pacientes con SICA, esto coincide con las publicaciones que resaltan la presencia de SICA y una directa relación con el aumento de MPs circulantes.

En el año 2004, Mallat et al, reportaron el incremento en niveles de MPs en pacientes con Síndrome Coronario Agudo en comparación con personas sanas y pacientes con angina estable. [38] Bernal-Mizrachi et al, observaron niveles elevados de MPs endoteliales en 71 pacientes con enfermedad arterial coronaria que en pacientes controles, y en presencia del síndrome coronario agudo en relación con pacientes con angina inestable.

Lo interesante de nuestros resultados es que dentro de los pacientes con SICA los niveles de MPs medidas fueron mucho mayores que en el grupo de la angina crónica estable sin embargo esta diferencia no logra tener significancia estadística. Una de las probables explicaciones a nuestros resultados pueden deberse a que no se encuentran balanceados los pacientes en ambos grupos de estudio, ya que para el grupo de la angina estable se analizaron 100 pacientes y para el SICA 238 pacientes. Es de mencionar, que no las características basales en ambos grupos no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las variables de estudio.

Interesantemente en nuestro estudio se observa una mayor elevación de concentración de MPS cuando se tiene angina inestable o IAM SEST en relación con la angina estable y el IAM CEST, una probable explicación es que tanto la angina inestable como el IAM SEST son entidades que se engloban en un Síndrome Isquémico Coronario Agudo; su elevación pudiera estar relacionada al recambio celular y a la inestabilidad de la placa aterosclerótica. Observamos que pese a las concentraciones de MPS en el IAM CEST no son significativamente mayores, consideramos que muy probablemente esta cuantificación pudiese estar relacionada con el tiempo en que se toma la muestra así como la medicación previa a la toma de muestra. Una hipótesis de estos resultados implica demostrar la función de estas MPS ya que pueden diferir de una entidad a otra y presentar actividad protrombótica o fibrinolítica en alguna de los diagnósticos estudiados.

En cuanto a los resultados de laboratorio obtenidos en ambos grupos las únicas diferencias observadas fueron en los biomarcadores de necrosis miocárdica (tropinina y CKMB), los cuales están aumentados en los pacientes con SICA. Los niveles de VPM también se observan mayores en los pacientes con SICA.

Nuestro estudio también demuestra falta de significancia en la concentración total de MPs en cuanto al diagnóstico de ingreso, por lo que niveles de MPs fueron muy similares entre pacientes con diagnósticos diferentes del grupo SICA. Este hecho resalta la necesidad de identificar el origen de las Mps, ya que poner datos que muestran las diferencias dependiendo del linaje celular. También es importante señalar como perspectiva del estudio identificar la actividad de las mismas en cuanto actividad protrombótica o profibrinolítica.

Interesantemente nuestro estudio no muestra una relación con los hallazgos encontrados en la angiografía coronaria de pacientes con SICA en relación con los No SICA, resaltando que la severidad en cuanto la alteración al Flujo TIMI no tiene una asociación marcada. Sin embargo, se observa una mayor tendencia en cuanto a la severidad de la enfermedad arterial coronaria en el grupo SICA. Nuestro estudio contempló la calcificación coronaria encontrando mayor calcificación coronaria en el grupo con SICA en relación con No SICA.

Los pacientes con angina estable recibieron en mayor proporción beta bloqueo e isosorbide. Los pacientes con SICA recibieron en mayor proporción nitroglicerina, clopidogrel, y Heparina de Bajo Peso Molecular (HBPM). Una menor concentración de MPs se observó de forma significativa en los pacientes que se medican con insulina, beta bloqueadores, aspirina y HBPM. Lo cual abre una línea de investigación para estudiar el efecto de antiagregación plaquetaria, anticoagulante y antisquemico de medicamentos en relación con la concentración de MPs.

Nuestros pacientes con angina crónica estable también tuvieron mediciones de MPs similares a las observadas en estudios con poblaciones sin muchas comorbilidades o gran enfermedad

cardiovascular. Este estudio resalta que algunos pacientes con angina crónica estable pueden tener niveles de MPs comparables con aquellos pacientes con SICA, sin embargo, creemos que estos niveles están en relación con el equilibrio fisiológico del recambio celular, activación y apoptosis fisiológica. Una limitación de este estudio es únicamente haber realizado medición de proteínas de MPs sin poder diferenciar el tipo MPs o su origen celular.

Es evidente que la investigación sobre las MPs se encuentra todavía en etapas iniciales, pero hay varias aplicaciones clínicas potenciales a tener en cuenta a medida que se avanza sobre este campo. Las MPs pueden llegar a ser un biomarcador de gran utilidad de la salud vascular general. Debido a que el endotelio es la vía final común en el que muchos factores de riesgo cardiovascular (hipertensión, hiperlipidemia, diabetes, tabaquismo) actúan, las MPs pueden pintar un panorama general del estado de la vasculatura de una persona. Como tal las MPs también pueden ser útiles en la mejora de la evaluación de riesgo de enfermedad cardiovascular (por ejemplo, riesgo predicho) para la prevención primaria, especialmente para aquellos en la categoría de riesgo intermedio. Pueden resultar aún más valiosa en la identificación de las personas con enfermedad cardiovascular conocida que se encuentran en alto riesgo de recurrencia, para los que se necesitan esfuerzos de prevención secundaria para ser más agresivo. Finalmente si las MPs son sensibles a los cambios y disminuyen con el tratamiento de los factores de riesgo de enfermedad cardiovascular, también pueden ser útiles en el seguimiento de la respuesta al tratamiento.

## Referencias

1. Wolf, P., *The nature and significance of platelet products in human plasma*. Br J Haematol, 1967. **13**(3): p. 269-88.
2. VanWijk, M.J., et al., *Microparticles in cardiovascular diseases*. Cardiovasc Res, 2003. **59**(2): p. 277-87.
3. Diamant, M., et al., *Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease?* Eur J Clin Invest, 2004. **34**(6): p. 392-401.
4. Viera, A.J., M. Mooberry, and N.S. Key, *Microparticles in cardiovascular disease pathophysiology and outcomes*. J Am Soc Hypertens, 2012. **6**(4): p. 243-52.
5. Taube, J., et al., *Activated protein C resistance: effect of platelet activation, platelet-derived microparticles, and atherogenic lipoproteins*. Blood, 1999. **93**(11): p. 3792-7.
6. Combes, V., et al., *In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant*. J Clin Invest, 1999. **104**(1): p. 93-102.
7. Gilbert, G.E., et al., *Platelet-derived microparticles express high affinity receptors for factor VIII*. J Biol Chem, 1991. **266**(26): p. 17261-8.
8. Ariyoshi, H. and E.W. Salzman, *Association of localized Ca<sup>2+</sup> gradients with redistribution of glycoprotein IIb-IIIa and F-actin in activated human blood platelets*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1996. **16**(2): p. 230-5.
9. Mallat, Z. and A. Tedgui, *Current perspective on the role of apoptosis in atherothrombotic disease*. Circ Res, 2001. **88**(10): p. 998-1003.
10. Huber, J., et al., *Oxidized membrane vesicles and blebs from apoptotic cells contain biologically active oxidized phospholipids that induce monocyte-endothelial interactions*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(1): p. 101-7.

11. Gemmell, C.H., M.V. Sefton, and E.L. Yeo, *Platelet-derived microparticle formation involves glycoprotein IIb-IIIa. Inhibition by RGDS and a Glanzmann's thrombasthenia defect.* J Biol Chem, 1993. **268**(20): p. 14586-9.
12. Mills, J.C., et al., *Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation.* J Cell Biol, 1998. **140**(3): p. 627-36.
13. Maekawa, M., et al., *Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase.* Science, 1999. **285**(5429): p. 895-8.
14. Coleman, M.L., et al., *Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I.* Nat Cell Biol, 2001. **3**(4): p. 339-45.
15. Zwaal, R.F. and A.J. Schroit, *Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells.* Blood, 1997. **89**(4): p. 1121-32.
16. Fourcade, O., et al., *Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells.* Cell, 1995. **80**(6): p. 919-27.
17. Aupeix, K., et al., *The significance of shed membrane particles during programmed cell death in vitro, and in vivo, in HIV-1 infection.* J Clin Invest, 1997. **99**(7): p. 1546-54.
18. Sims, P.J., et al., *Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity.* J Biol Chem, 1988. **263**(34): p. 18205-12.
19. Pascual, M., et al., *Release of vesicles enriched in complement receptor 1 from human erythrocytes.* J Immunol, 1993. **151**(1): p. 397-404.
20. Blanchard, N., et al., *TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex.* J Immunol, 2002. **168**(7): p. 3235-41.
21. Simak, J., et al., *Circulating endothelial microparticles in acute ischemic stroke: a link to severity, lesion volume and outcome.* J Thromb Haemost, 2006. **4**(6): p. 1296-302.



22. Amabile, N., et al., *Microparticles: key protagonists in cardiovascular disorders*. Semin Thromb Hemost, 2010. **36**(8): p. 907-16.
23. Berckmans, R.J., et al., *Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation*. Thromb Haemost, 2001. **85**(4): p. 639-46.
24. Mesri, M. and D.C. Altieri, *Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway*. J Biol Chem, 1999. **274**(33): p. 23111-8.
25. Zamzami, N., et al., *Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death*. J Exp Med, 1995. **182**(2): p. 367-77.
26. Barry, O.P., et al., *Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles*. J Clin Invest, 1998. **102**(1): p. 136-44.
27. Mallat, Z., et al., *Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity*. Circulation, 1999. **99**(3): p. 348-53.
28. Rikitake, Y., et al., *Inhibition of endothelium-dependent arterial relaxation by oxidized phosphatidylcholine*. Atherosclerosis, 2000. **152**(1): p. 79-87.
29. Lee, Y.J., et al., *Elevated platelet microparticles in transient ischemic attacks, lacunar infarcts, and multiinfarct dementias*. Thromb Res, 1993. **72**(4): p. 295-304.
30. Rossig, L., et al., *Vitamin C inhibits endothelial cell apoptosis in congestive heart failure*. Circulation, 2001. **104**(18): p. 2182-7.
31. Morel, O., et al., *Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(1): p. 15-26.
32. Curtis, A.M., et al., *p38 mitogen-activated protein kinase targets the production of proinflammatory endothelial microparticles*. J Thromb Haemost, 2009. **7**(4): p. 701-9.

33. Rautou, P.E., et al., *Microparticles, vascular function, and atherothrombosis*. *Circ Res*, 2011. **109**(5): p. 593-606.
34. Lusis, A.J., *Atherosclerosis*. *Nature*, 2000. **407**(6801): p. 233-41.
35. Rautou, P.E., et al., *Microparticles from human atherosclerotic plaques promote endothelial ICAM-1-dependent monocyte adhesion and transendothelial migration*. *Circ Res*, 2011. **108**(3): p. 335-43.
36. Freyssinet, J.-M. and Toti, F (2010), *Membrane microparticle determination: at least seeing what's being sized!.*, *J Thromb Haemost* 8: 311-314.
37. Amabile N, Rautou PE, Tedgui A, Boulanger CM. *Microparticles: key protagonists in cardiovascular disorders*. *Semin Thromb Hemost* 2010;36:907-916.
38. Mallat, Z., et al., *Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes*. *Circulation*, 2000. **101**(8): p. 841-3.