

UNIVERSIDAD DE SONORA

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

**Estudio Piloto para Estimar la Proporción de la Molécula de
Adhesión a Células Vasculares (VCAM-1) Unida a
Micropartículas Plasmáticas y de su Forma Soluble**

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el Título de

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

Mario Alejandro Aguilar Chaparro

Hermosillo, Sonora

Octubre de 2014

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del Jurado designado para revisar la Tesis Profesional de **Mario Alejandro Aguilar Chaparro**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el Título de Químico Biólogo Clínico.

Dra. Jesús Adriana Soto Guzmán
Director de Tesis

Dr. Enrique Bolado Martínez
Secretario

M. en C. Lucía Guadalupe Castellón Campaña
Vocal

Q. B. Rosa Estela Fraga Serrano
Suplente

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Bioquímica Clínica del Departamento de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad de Sonora en colaboración con el Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Sonora, bajo la dirección de la Dra. Jesús Adriana Soto Guzmán. Fue financiado por el Programa de Mejoramiento del Profesorado, Convocatoria 2013 de Apoyo a la Incorporación de Nuevos Profesores de Tiempo Completo con número de Folio UNISON-PTC-184.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por estar siempre conmigo.

A mi directora de tesis Dra. Jesús Adriana Soto Guzmán gracias por todo el apoyo, atención brindada así como sus conocimientos y consejos, además de su infinita paciencia conmigo. A mis sinodales Dr. Enrique Bolado Martínez; M.C. Lucia Guadalupe Castellón Campaña; y Q. B Rosa Estela Fraga Serrano y a los demás maestro del departamento, son un ejemplo a seguir y una motivación para seguir adelante, estaré siempre en deuda con ustedes por su tiempo, apoyo, enseñanzas y experiencia brindada.

A la Universidad de Sonora, al Departamento de Ciencias Químico Biológicas por permitirme iniciar mis estudios a pensar de un principio muy problemático pero divertido al final y desarrollar mis conocimientos durante la carrera y al Departamento de Medicina y Ciencias de la Salud por brindarme un espacio para desarrollar este trabajo.

A mis padres y familiares, Dora María y Mario, gracias por ser los pilares de mi vida, quienes gracias a su amor, cariño y apoyo incondicional, he alcanzado uno de los logros más importantes en mi vida. A mis hermanos, Esthela y Diego, gracias por haber llenado mi vida de alegrías y molestias, más de estas primeras que de estas últimas, además por enseñarme el valor de compartir, lo cual aún debo de practicar más.

Muchas gracias a la Dra. María del Carmen Candia Plata, Dr. Luis Fernando López Soto, Dr. José Manuel Galván Moroyoqui, M. en C. Miriam Denisse García Villa, M. en C. Karla Alejandra Monje Villegas, M. en C, Juan Manuel Martínez Soto, Q.B.C Martin Eduardo Almada Balderrama y Q.B.C Alan Daniel Romandia Molina por su apoyo, comentarios, tiempo y excelentes recomendaciones para la realización de este trabajo.

A los amigos, como Aarón Barragan, Aida Adelina, Denia Castro, Diana Brau, Fernanda Borrego, Fernanda Moreno, Gema Moreno, Gabriela Valenzuela, Jazhiel Acosta, María Luisa, Paceños* (Abdiel Valenzuela, Alan Rosales, Edgar Burgoin, Juan Carlos Alan, Pedro Iván), Polly Curiel, Rommel Villa, Yessica Ozuna, gracias por acompañarme y enseñarme en esta parte de mi vida; aunque los haya conocido por poco o mucho tiempo, les agradezco mucho su tiempo y amistad. Y por último pero no menos importante, gracias a Talhula, por haber recorrido este camino conmigo, sin ella, no hubiera llegado literalmente a la Universidad de Sonora.

DEDICATORIA

Pido disculpas a todas las personas que no mencione en los agradecimientos, pero la verdad, las considero importantes de cierta manera, pues determinaron quien soy ahora. Todas esas personas que se fueron, las que se quedaron y las que me enseñaron, no me queda más que estar totalmente agradecido, por haber o no estado en mi vida, por cada puerta cerrada, por cada puerta abierta, es al final consecuencias de nuestras elecciones. Y pido disculpas una segunda vez, pues no lo dedico a una persona sino a todas las personas que decidieron estar y permanecer o no estar en esta parte de mi vida.

Quiero dedicar este trabajo a las “consecuencias”, ya que la vida es el resultado de todas esas elecciones que damos sin darnos cuenta, sin diferenciar entre simples o complejas, buenas o malas, no más, no menos. Al final, esperamos tomar la mejor decisión ante todo, y creo que al final de esta parte de mi vida, hice mi mejor elección.

“Encontrar la verdad es difícil, y el camino a ella es pedregoso. Uno se debe empeñar solamente en argumentar y experimentar y no quedarse con las afirmaciones de cualquier persona. Para cualquier humano, existe la opción de caer en todas las formas de imperfección. Como buscadores de la verdad, debemos sospechar y cuestionar nuestras propias ideas mientras realizamos nuestras investigaciones para evitar caer en el prejuicio, o en el pensamiento descuidado. Tomen este camino, y la verdad les será revelada.” (Ib Al Hazen).

Semper fidelis (Del latín siempre fiel o leal hasta el fin).

CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
OBJETIVOS	v
Objetivo General	v
Objetivos Particulares	v
RESUMEN.....	vi
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	4
Endotelio Vascular	4
Anatomía del Endotelio Vascular	4
Fisiología del Endotelio Vascular	7
Células endoteliales.....	8
Células musculares lisas vasculares.....	9
Fisiopatología del Endotelio Vascular	10
Marcadores de Daño Endotelial	13
VCAM-1 como Marcador de Daño Vascular	14
Micropartículas Plasmáticas de Origen Endotelial como Marcadores de Daño	16
Micropartículas Plasmáticas	17
Mecanismo de Formación y Liberación de Micropartículas Plasmáticas a la Vasculatura.....	19
Técnicas de Estudio de las Micropartículas Plasmáticas	21
Caracterización de Micropartículas por Citometría de Flujo	21
Micropartículas de Origen Endotelial en Procesos Patológicos.....	23

MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
Diseño del Estudio	26
Descripción.....	26
Selección de Sujetos	26
Consideraciones Bioéticas	26
Obtención de Muestras Biológicas	27
Separación de las Fracciones Plasmáticas	27
Cuantificación de sVCAM-1 Plasmático	28
Análisis Citométrico de Micropartículas Plasmáticas	28
Análisis de VCAM-1 en la Superficie de Micropartículas Plasmáticas	29
Análisis de Datos.....	29
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
Selección de Sujetos y Conformación de Grupos.....	30
Análisis de los Niveles de sVCAM-1 en Plasma	30
Análisis de la Proporción de VCAM-1 de Cada una de las Fracciones Plasmáticas.....	32
Expresión de VCAM-1 en la Superficie de Micropartículas Plasmáticas por Citometría de Flujo	33
CONCLUSIONES	37
RECOMENDACIONES	38
REFERENCIAS	39
Anexo 1	51

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Propiedades de las células endoteliales y su funcionamiento	9
2. Fenotipos de micropartículas plasmáticas de origen endotelial y su asociación con diversas enfermedades	24
3. Promedios de eventos obtenidos al evaluar marcadores de identificación en micropartículas plasmáticas de origen endotelial	36

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Especializaciones regionales de los vasos sanguíneos	6
2. Respuestas de las células endoteliales a los estímulos ambientales	12
3. Engrosamiento de la íntima.....	14
4. Representación esquemática de moléculas transportadas por micropartículas plasmáticas y su actividad biológica	18
5. Representación esquemática de la membrana celular y formación de micropartículas plasmáticas	20
6. Comparación de los niveles de sVCAM-1 en plasma total y sus fracciones en los sujetos de estudio en ng/mL	31
7. Comparación de porcentajes de sVCAM-1 en las fracciones plasmáticas analizadas	32
8. Región de análisis y captura correspondiente al tamaño de 0.1 y 1.0 μm	34
9. Detección de VCAM-1 en la superficie de micropartículas plasmáticas de origen endotelial por citometría de flujo.....	35

OBJETIVOS

Objetivo General

Desarrollar un estudio piloto que permita estimar la proporción del marcador de daño endotelial VCAM-1 unido a micropartículas plasmáticas y en su forma soluble.

Objetivos Particulares

- Cuantificar la concentración plasmática de sVCAM-1 en los dos sujetos de estudio para analizar su proporción en plasma total y las fracciones de éste.
- Evidenciar la expresión de VCAM-1 en la superficie de micropartículas plasmáticas de origen endotelial en los sujetos de estudio.

RESUMEN

La molécula de adhesión a células vasculares 1 en su forma soluble (sVCAM-1, por su siglas en inglés) ha sido propuesta como marcador de daño endotelial, su incremento se correlaciona positivamente con la presencia de daño endotelial. Así mismo, se ha observado que en procesos de activación celular inducidos en el daño al endotelio vascular hay un incremento en la producción y liberación de micropartículas plasmáticas (MPs). No existen evidencias publicadas que muestren que sVCAM-1 plasmática se encuentre exclusivamente en su forma libre, sino que es factible que se encuentre formando parte de las MPs liberadas por el células de endotelio vascular como resultado del proceso de activación de las mismas. El presente estudio tuvo como objetivo desarrollar un estudio piloto que permita evidenciar la presencia de la proporción del marcador de daño endotelial VCAM-1 unido a MPs y en su forma soluble en plasma. Se consideraron a dos sujetos para este estudio, un sujeto no diabético aparentemente sano y un paciente con DM2 el cual presentó complicaciones vasculares; se realizó el fraccionamiento del plasma total en ambos sujetos de estudio empleando un sistema de filtración por centrifugación, con un filtro con un límite de exclusión de 0.1 μm , formando una fracción mayor y otra menor de 0.1 μm de la muestra de plasma total, se cuantificó sVCAM-1 mediante Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) y a cada una de las fracciones, se determinaron las proporciones sVCAM-1 y se evidenció la expresión de VCAM-1 en la superficie de MPs por citometría de flujo. Se demostró que en la fracción menor de 0.1 μm hubo una mayor proporción del marcador plasmático para ambos sujetos, asumiendo que esta última corresponde a la fracción de VCAM-1 cuantificada que se encuentra en su forma libre y no unida a MPs, la cual corresponde a la cuantificada en la fracción mayor a 0.1 μm . Además de evidenciar la presencia de VCAM-1 en la superficie de MPs de origen endotelial en los dos sujetos de estudio, por lo que se establecen las condiciones y métodos que podrán tomarse como base para posteriores estudios donde se evalué el uso de otros marcadores solubles, además de como las MPs podrían afectar las concentraciones de éstos; se recomienda que se lleve a cabo este estudio utilizando un grupo más amplio de pacientes, permitiendo obtener resultados más claros sobre las proporciones de estos marcadores solubles unidos a MPs y el estado clínico de pacientes con complicaciones vasculares.

INTRODUCCIÓN

El daño y/o la disfunción endotelial (DE) se caracteriza por contribuir a la alteración del fenotipo de las células endoteliales, lo cual deteriora la reactividad inmunitaria e induce la aparición de una superficie trombógena o anormalmente adhesiva para las células inflamatorias (Kumar, 2010). El DE ha surgido durante las últimas décadas como una alarma creciente ante las consecuencias negativas que tienen algunos padecimientos comunes como son la obesidad e hipertensión arterial (Esteller, 2005), además de ser observado en enfermedades o eventos tales como, infarto al miocardio, accidente cerebrovascular y diabetes mellitus (DM), entre otros estados dismetabólicos que se han ido encaminando como principales causas de morbilidad y mortalidad, afectando tanto a países desarrollados como en vías de desarrollo (Badimón y Martínez-González, 2006).

Estas patologías y eventos son en su conjunto, responsables de afectar a las poblaciones occidentales de mediana edad en el mundo y además de generar un enorme costo económico a las instituciones de salud que les atienden (OMS, 2013). En México, existe una alta incidencia y prevalencia de vasculopatías como el infarto agudo de miocardio, síndrome coronario agudo, enfermedad coronaria arterial, hipertensión arterial, vasculopatía diabética y accidente cerebrovascular; posicionándose como principales causas de muerte en nuestro país según datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) (Vega y col., 2008, Arauz y Ruíz-Franco, 2012; INEGI, 2013).

El DE se produce ante una perturbación del estado homeostático del endotelio, tal alteración frecuentemente induce una reducción en la vasodilatación, así como incrementos en la actividad proinflamatoria y/o protrombótica en la red vascular (Yong y col., 2012). Determinadas formas de disfunción de las células endoteliales son de comienzo rápido en cuestión de minutos, reversibles, evolucionan con independencia de la síntesis de nuevas proteínas, otros cambios se relacionan con alteraciones de la expresión génica y síntesis proteica, y pueden tardar horas o incluso días en producirse (Deanfield y col., 2007; Kumar, 2010). Durante este desequilibrio en el endotelio vascular, se secretan citocinas proinflamatorias y expresan moléculas de adhesión en diversas células que tapizan el endotelio vascular, las cuales están involucradas en el reclutamiento y diapédesis celular en el proceso inflamatorio (Morel y col., 2009).

La molécula de adhesión a células vasculares 1 (VCAM-1, por su siglas en inglés) es una glicoproteína de cadena única, perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas y

es expresada por las células del endotelio vascular entre otras líneas celulares, facilitando con ello la adhesión endotelial de leucocitos y plaquetas circulantes (Constans y Conri, 2006; Videm y Albrigtsen, 2008). Una vez iniciada la respuesta inflamatoria, la forma soluble de VCAM-1 (sVCAM-1) es liberada de la superficie celular a circulación por proteólisis y se le considera como marcador de daño vascular, ya que sus valores en plasma parecen reflejar la activación de células endoteliales, leucocitos y plaquetas (Glowinska y col., 2005; Videm y Albrigtsen, 2008; Saidi y col., 2013). Se ha demostrado que en los pacientes diagnosticados con enfermedad coronaria aguda, hay un aumento en los niveles sVCAM-1 debido a la ruptura de la placa aterosclerótica (Saidi y col., 2013).

Existen estudios en pacientes con hipertensión arterial y DM tipo 2 (DM2) encontrándose una asociación de los niveles elevados de la molécula de adhesión intercelular soluble (sICAM-1, por su siglas en inglés) y sVCAM-1, donde sVCAM-1 refleja de manera específica la activación endotelial, respecto al marcador sICAM-1 (Rubio-Guerra y col., 2009; Biasucci y Cardillo, 2012). El marcador ICAM-1 se expresa de manera constante en el endotelio, por otro lado VCAM-1 es expresada en condiciones de inflamación vascular, se ha utilizado el marcador sICAM-1 para predecir el riesgo de infarto agudo al miocardio en pacientes con DM (Guan y col., 2014), mientras que sVCAM-1 se correlaciona con riesgo de síndrome coronario agudo en pacientes con enfermedad cardiovascular (Constans y Conri, 2006).

Así mismo, se ha observado que en procesos de activación celular inducidos en el daño al endotelio hay un incremento en la producción y liberación de micropartículas plasmáticas (MPs) (Morel y col., 2009; Herring y col., 2013). Las MPs fueron identificadas en 1967 y consideradas como restos celulares en un inicio. Hoy se conoce que poseen un tamaño que varía de 0,1 a 1,0 μm de diámetro, son producidas y liberadas por células que transitan y recubren el endotelio vascular como, leucocitos (neutrófilos, linfocitos y monocitos), eritrocitos, plaquetas, células vasculares de músculo liso, células endoteliales, entre otros; y pueden ser detectadas en sangre periférica, orina, ascitis y líquido sinovial (Diamant y col., 2004; Budaj y col., 2012; Batool y col., 2013). Desde el descubrimiento de las MPs diversos grupos de investigación han reportado evidencias de una fuerte correlación positiva entre los niveles circulantes de MPs en plasma y diversos padecimientos tanto inflamatorios como infecciosos, en humanos y animales (Balducci y col., 2012; Awad y col., 2013; Curtis y col., 2013; Herring y col., 2013).

Actualmente el interés del estudio de las MPs ha ido en aumento, debido a su importante papel en procesos inflamatorios y a su capacidad de afectar directamente las funciones del endotelio provocando una serie de eventos tales como la liberación de citocinas, expresión de

moléculas de adhesión por el endotelio y leucocitos, atracción de monocitos en el proceso inflamatorio, proliferación de celular en el músculo liso y angiogénesis, además de inducir actividad procoagulante en lesiones avanzadas (Diamant y col., 2004; Morel y col., 2009; Dignat-George y Boulanger, 2011; Martínez y Andriantsitohaina, 2011). También se ha reportado que las MPs desempeñan un papel importante en la interacción con células del endotelio vascular a través de ligandos celulares, activando cascadas de señalización y transfiriendo material genético (Jeanneteau y col., 2010; Mause y Weber, 2010; Herring y col., 2013), razón por la cual se considera a las MPs como mensajeros biológicos que participan en la inducción del DE, teniendo efectos biológicos benéficos, promoviendo la producción de óxido nítrico (ON), o la formación de nuevos vasos sanguíneos (Jeanneteau y col., 2010).

Existen estudios realizados en humanos que muestran evidencia del grado de DE en enfermedades o condiciones, tales como el síndrome coronario agudo, aterosclerosis, accidente cerebrovascular, hipercolesterolemia, enfermedad arterial periférica, apnea del sueño, hipertensión e insuficiencia cardíaca, dónde se han presentado un elevado número de MPs, lo cual pone en evidencia su importancia clínica como un probable marcador y predictor de estado de salud del paciente (Wang y col., 2009; Nozaki y col., 2009; Herring y col., 2013). Los mecanismos asociados al DE en estos padecimientos incluyen la inactividad de la enzima óxido nítrico endotelial sintasa y la reducción en la biodisponibilidad de ON, resultando en una disminución de su señalización, un aumento en la nitración de proteínas en células endoteliales, y por lo tanto un aumento del estrés oxidativo (Curtis y col., 2013; Herring y col., 2013).

Aunque se ha afirmado que la presencia del marcador sVCAM-1 en plasma refleja de manera específica la activación del endotelio, todavía no hay evidencias que muestren que se encuentre únicamente en su forma libre en plasma como sVCAM-1 (Yong y col., 2012), por lo cual es factible que se encuentre formando parte de las MPs liberadas por las células de endotelio vascular como resultado del proceso de activación de las mismas. En la mayoría de los estudios realizados en la determinación de marcadores solubles, no se tiene especial cuidado en distinguir entre la proporción del marcador soluble y el unido a MPs (Horstman y col., 2004a). Con base a lo anteriormente expuesto se realizó un estudio piloto para determinar la proporción del marcador de daño endotelial sVCAM-1 tanto libre como acoplado a MPs circulantes en plasma empleando muestras de plasma de un sujeto con DM2 que presenta complicaciones vasculares y como control a un sujeto no diabético aparentemente sano.

ANTECEDENTES

Endotelio Vascular

El endotelio vascular (EV) es una monocapa de células que recubre la capa interior de todos los vasos sanguíneos y el sistema linfático, en un ser humano adulto se compone de aproximadamente 10 billones de células (10^{13}) contribuyendo cerca del 1,5 % de la masa corporal total. Los constituyentes básicos del EV son las células endoteliales (CE) y células musculares lisas, así como la matriz extracelular (MEC), que contiene elastina, colágeno y glucosaminoglucanos primordialmente (Pérez, 2005; Kumar, 2010; Triggle y col., 2012).

Además de ser reconocido como regulador clave de la homeostasis vascular, el EV participa en la transducción de señales que influyen de manera importante en la modificación del fenotipo de la pared del vaso endotelial, mediante la producción y liberación de varias moléculas vasoactivas que relajan u oprimen el vaso sanguíneo, como respuesta a una modificación de la circulación de mediadores vasoactivos, tales como bradiquinina y trombina (Constans y Conri, 2006; Burger y Touyz, 2012; Triggle y col., 2012; Wiseman y col., 2014).

Anatomía del Endotelio Vascular

La arquitectura general y composición celular de los vasos sanguíneos es similar en todo el aparato cardiovascular (Badimón y Martínez-González, 2006). Sin embargo, determinados rasgos de la vascularización varían según los distintos sitios anatómicos y reflejan las diversas exigencias funcionales de éste (Kumar, 2010). Existen cinco tipos principales de vasos sanguíneos en el ser humano: arterias, arteriolas, capilares, vénulas y venas (Tortora y Derrickson, 2006).

En la arteria, la pared arterial posee tres capas o tunicas: 1) túnica interna, 2) túnica media y 3) túnica externa (Figura 1) (Tortora y Derrickson, 2006). La capa interna, la túnica interna o intima contiene un revestimiento de epitelio pavimentoso simplemente llamado

endotelio, una membrana basal y una capa de tejido elástico llamada lamina elástica interna (Susienka y Medici, 2013). El endotelio es una capa continua de células que reviste la superficie interna de todo el sistema cardiovascular, el corazón y todos los vasos sanguíneos (Kumar, 2010). Normalmente, el endotelio es el único tejido en contacto con la sangre. La túnica interna está más cerca de la luz, el hueco central a través del cual fluye la sangre. La capa media, o túnica media, es normalmente más gruesa (Tortora y Derrickson, 2006; Rajendran y col., 2013). Está constituida por fibras elásticas y musculares lisas que se extienden en forma circular alrededor de la luz, de forma similar a como un anillo rodea un dedo. La túnica media también posee una lámina elástica externa compuesta por tejido elástico (Tortora y Derrickson, 2006). Debido a su contenido de fibras elásticas, las arterias normalmente poseen alta distensibilidad, lo cual significa que sus paredes se estiran con facilidad o que se expanden sin romperse en respuesta a leves incrementos de la presión (Tortora y Derrickson, 2006).

La capa más externa, denominada túnica externa, está compuesta en su mayor parte por fibras elásticas y colágenas (Kumar, 2010). Por otro lado, las arteriolas son un grupo de arterias muy pequeñas, con diámetros entre 10 y 100 μm , que conduce la sangre a los capilares (Kumar, 2010). Cerca de las arterias de las que nacen, las arteriolas contienen una túnica interna como la de las arterias, una túnica media compuesta por musculo liso, unas pocas fibras elásticas y colágenas (Tortora y Derrickson, 2006). En las arteriolas de menos diámetro, que están más cerca de los capilares, las túnicas están constituidas por poco más que un anillo de CE rodeadas por unas pocas fibras aisladas de musculo liso (Badimón y Martínez-González, 2006). Las arteriolas juegan un papel clave en la regulación del flujo sanguíneo desde las arterias hacia los capilares regulando la resistencia, la oposición al flujo sanguíneo (Tortora y Derrickson, 2006). En un vaso sanguíneo, la resistencia se produce principalmente por la fricción entre la sangre y las paredes internas del vaso sanguíneo (Triggle y col., 2012). Cuanto más pequeño es el diámetro del vaso sanguíneo mayor es la fricción; como la contracción y relajación del musculo liso en las paredes de las arteriolas pueden cambiar su diámetro, las arteriolas se conocen como vasos de resistencia (Kumar, 2010; Triggle y col., 2012). La contracción del musculo liso arteriolar produce vasoconstricción, que incrementa la resistencia vascular y disminuye el flujo sanguíneo aportado por esa arteriola a los capilares (Triggle y col., 2012).

La relajación del musculo liso arteriolar causa vasodilatación, que disminuye la resistencia vascular e incrementa el flujo sanguíneo hacia los capilares (Tortora y Derrickson, 2006; Kumar, 2010; Triggle y col., 2012). Un cambio en el diámetro arteriolar puede afectar

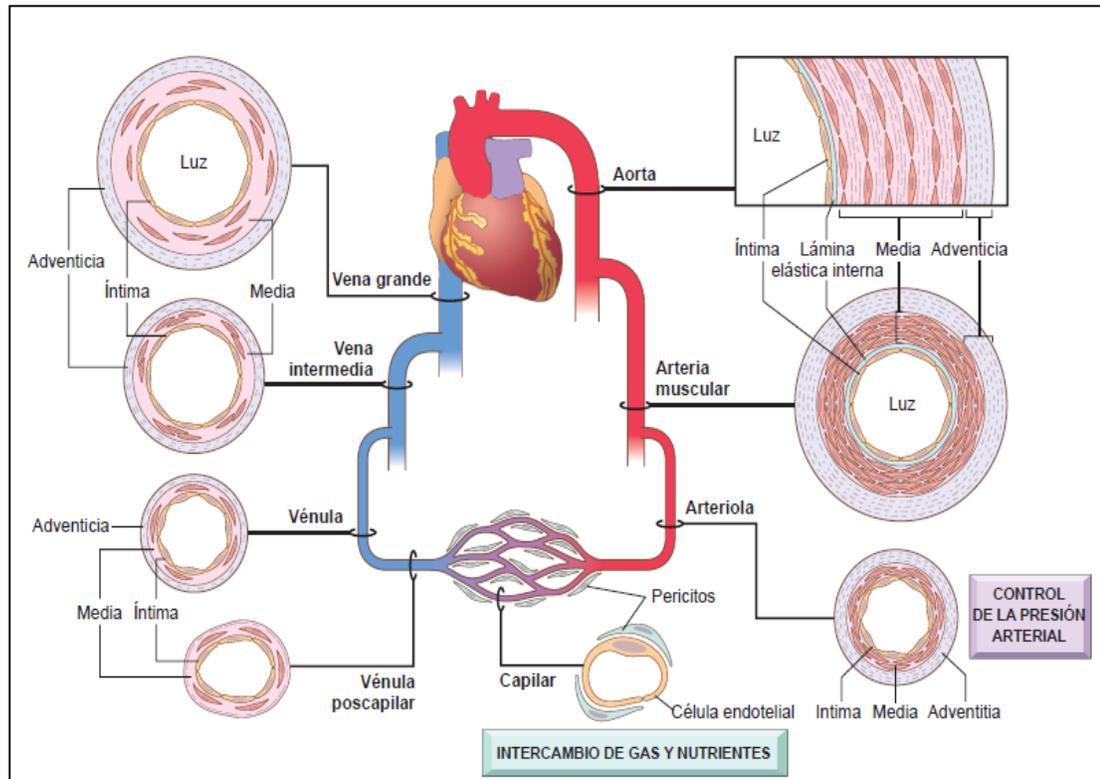


Figura 1. Especializaciones regionales de los vasos sanguíneos. Aunque su organización básica sea constante, el grosor y la composición de las diversas capas varían en función de las fuerzas hemodinámicas y las necesidades de los tejidos.

Fuente: Kumar, 2010.

también la presión arterial; la vasoconstricción de las arterias incrementa la presión arterial, mientras que la vasodilatación disminuye en las arteriolas (Badimón y Martínez-González, 2006). Por otro lado, los capilares son vasos microscópicos que conectan arteriolas con las vénulas; tienen diámetros de entre 4 y 10 μm (Tortora y Derrickson, 2006). El flujo de sangre de las arteriolas a las vénulas a través de los capilares se denomina microcirculación (Tortora y Derrickson, 2006). Los capilares se encuentran cerca de casi todas las células del organismo, pero su número varía en función de la actividad metabólica del tejido al cual irrigan (Pérez, 2005). También son conocidos como vasos de intercambio porque su principal función es el intercambio de nutrientes y desechos entre la sangre y las células tisulares a través del líquido intersticial (Badimón y Martínez-González, 2006; Kumar, 2010). Las paredes de los capilares

están compuestas solo por una capa de CE y una membrana basal. No poseen túnica media ni túnica externa (Tortora y Derrickson, 2006), el intercambio de sustancias ocurre solo a través de las paredes de los capilares y el comienzo de las vénulas; formando amplias redes ramificadas que incrementan la superficie disponible para un intercambio rápido de sustancias (Contreras y col., 2012; Susienka y Medici, 2013). En la mayoría de los tejidos, la sangre fluye a través de solo una pequeña parte de la red capilar cuando las necesidades metabólicas son bajas, pero cuando un tejido como el músculo está activo, toda la red capilar se llena de sangre (Tortora y Derrickson, 2006; Susienka y Medici, 2013).

Cuando varios capilares se unen, forman pequeñas venas llamadas vénulas. Las vénulas, poseen diámetros de entre 10 y 100 μm , recogen la sangre de los capilares y la envían hacia las venas (Tortora y Derrickson, 2006). Las vénulas más pequeñas, aquellas más próximas a los capilares, están constituidas por una túnica interna de endotelio y una túnica media que contiene solo unas pocas fibras de músculo liso aisladas (Kumar, 2010). Las vénulas más grandes que convergen para formar venas contienen la túnica externa característica de las venas (Kumar, 2010; Triggle y col., 2012). La capa interna de las venas es más delgada que la de las arterias; la túnica media de las venas es mucho más delgada que en las arterias, con relativamente poco músculo liso y fibras elásticas (Tortora y Derrickson, 2006; Kumar, 2010). La túnica externa de las venas es la capa más gruesa y está formada por fibras elásticas de colágeno (Kumar, 2010). Las venas no tienen lámina elástica interna o externa que se encuentran en las arterias. Son lo suficientemente capaces de adaptarse a las variaciones de volumen y presión de la sangre que pasa a través de ellas, pero no están diseñadas para resistir alta presión, ya que al comparar la luz de una vena se observa que es mayor que la de una arteria de tamaño comparable (Tortora y Derrickson, 2006; Kumar, 2010; Arrebola-Moreno y col., 2012).

Fisiología del Endotelio Vascular

El EV es un tejido epitelial plano que recubre la túnica íntima de toda la vasculatura (Tortora y Derrickson, 2006), resulta determinante para conservar la homeostasis de la pared vascular y el óptimo funcionamiento de la circulación. La vasomoción juega un papel directo en el equilibrio entre la oferta y demanda de oxígeno del tejido metabólico, regulación de tono de los vasos y el diámetro de los mismos, además de estar involucrado en la remodelación de la estructura

vascular (Contreras y col., 2012; Triggle y col., 2012; Susienka y Medici, 2013;). Se ha encontrado que la vejez endotelial está vinculada a factores de riesgo, como aterosclerosis, hipertensión, tabaquismo y tensión mecánica de un alto ritmo cardíaco, lo cual contribuye a elevar el estrés oxidativo, y a su vez el estrés inducido a la vejez endotelial, deteniendo el crecimiento, perdiendo la capacidad de reparación y promoviendo un fenotipo proaterogénico (Abebe y Mozaffari, 2010; Onat y col., 2011; Van-Ierssel y col., 2013).

Células endoteliales. Las CE tienen la capacidad de dividirse además de permitir el surgimiento de nuevos capilares a partir del endotelio existente, contienen cuerpos de Weibel-Palade, orgánulos intracelulares rodeados de membrana para el almacenamiento del Factor de von Willebrand (FvW) (García-Cardena y Gimbrone, 2006; Kumar, 2010). El EV es un tejido multifuncional con multitud de propiedades sintéticas y metabólicas; en condiciones basales desempeña varias actividades constitutivas que resultan esenciales para la homeostasis de los vasos (Tabla 1) (Stevens, 2001; Rajendran y col., 2013). Al mismo tiempo, las CE mantienen una superficie de contacto sangre-tejido no trombógena, modulando la resistencia vascular, metabolizando hormonas, regulando la inflamación y repercutiendo sobre el crecimiento de otras células, en especial las células musculares lisas (Kumar, 2010).

En la mayoría de las regiones, las uniones interendoteliales son básicamente impermeables (Berk, 2001; Rajendran y col., 2013), sin embargo, las uniones íntimas de las CE pueden relajarse bajo la influencia de factores hemodinámicos, lo que determina una inundación de los tejidos adyacentes por electrolitos y proteínas; en los estados inflamatorios, incluso los leucocitos pueden infiltrarse entre las CE adyacentes (Shimizu y Mitchell, 2003; Sata, 2006). Aunque las CE comparten numerosos atributos generales, las poblaciones que revisten las diversas porciones del árbol vascular, los grandes vasos frente a los capilares, las arterias frente a las venas, poseen un repertorio transcripcional y un comportamiento definidos (Sata, 2006; Kumar, 2010). Así, las CE de los sinusoides hepáticos o de los glomérulos renales están perforadas, se supone que para facilitar la filtración; mientras que en el sistema nervioso central crean una barrera hematoencefálica impermeable (Tortora y Derrickson, 2006).

Células vasculares del músculo liso. Son las responsables de la vasoconstricción o dilatación que sucede como respuesta a las acciones fisiológicas o farmacológicas. Las funciones migratoria y proliferativa de las células musculares lisas están reguladas por los

Tabla 1. Propiedades de las células endoteliales y su funcionamiento.

Conservación de la barrera de permeabilidad
Elaboración de reguladores anticoagulantes
Antitromboticos y fibrinolíticos
<ul style="list-style-type: none"> - Prostaciclina - Trombomodulina - Heparina - Activador del tisular plasminógeno
Elaboración de moléculas protrombóticas
<ul style="list-style-type: none"> - Factor de von Willebrand - Factor tisular - Inhibidor del activador tisular del plasminógeno
Producción de matriz extracelular (colágeno y proteoglicanos)
Modulación del flujo sanguíneo y la reactividad vascular
<ul style="list-style-type: none"> - Vasoconstrictores: endotelina, ECA - Vasodilatadores: ON, prostaciclina
Regulación de la inmunidad y la inflamación
<ul style="list-style-type: none"> - IL-1, IL-6, quimiocinas - Moléculas de adhesión: VCAM-1, ICAM-1, E-selectina, P-selectina - Antígenos de histocompatibilidad
Regulación del crecimiento celular
<ul style="list-style-type: none"> - Estimuladores del crecimiento: PDGF, CSF, FGF - Inhibidores del crecimiento: heparina, TGF-β
<p>CSF: factor estimulador de colonias; ECA: enzima convertidora de angiotensina; FGF: factor de crecimiento de los fibroblastos; IL: interleucina; LDL: lipoproteína de baja densidad; ON: óxido nítrico; PDGF: factor de crecimiento derivado de las plaquetas; TGF- β: factor de crecimiento transformante β.</p> <p>Fuente: Kumar, 2010.</p>

activadores e inhibidores del crecimiento celular (Shimizu y Mitchell, 2003), entre los que figuran el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por sus siglas en inglés), así como la endotelina 1 (ET-1), trombina, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, por sus siglas en inglés), interferón gamma (IFN- γ) e interleucina 1 (IL-1), entre otros (Garcia-Cardena y Gimbrone, 2006; Pober y col., 2009; Kumar, 2010).

Fisiopatología del Endotelio Vascular

Las CE son capaces de responder a diversos estímulos fisiopatológicos mediante la adaptación de sus funciones habituales o constitutivas y la expresión de las propiedades recién adquiridas o inducibles, en un proceso denominado activación endotelial (Figura 2); entre los inductores de este fenómeno figuran las citocinas y los productos bacterianos, que provocan inflamación y shock séptico (Kumar, 2010; Thorburn y Baines, 2013; Johansson y col., 2014), sobre cargas hemodinámicas y derivados lipídicos, elementos cardinales en la patogenia de la arterosclerosis; los productos finales de la glicación avanzada, la cual es de suma importancia en la patogenia de la DM, además de otros componentes que pueden comprometer la homeostasis del EV (Shimizu y Mitchell, 2003; Abebe y Mozaffari, 2010; Jain y col., 2014).

A su vez, las CE activadas expresan moléculas de adhesión en su superficie, generan citocinas y quimiocinas, factores de crecimiento, moléculas vasoactivas que propician la vasoconstricción o vasodilatación, moléculas del complejo principal de histocompatibilidad, sustancias procoagulantes y anticoagulantes, además de toda una diversidad de productos activos desde el punto de vista biológico (Onat y col., 2011; Rajendran y col., 2013; Guan y col., 2014). Las CE influyen sobre la reactividad vascular de las células musculares lisas subyacentes por medio de la producción de factores relajantes como el ON e inductores de la contractibilidad en el caso de la ET-1. El funcionamiento normal del endotelio se caracteriza por un equilibrio entre estas respuestas (Rajendran y col., 2013).

El daño y/o la disfunción endotelial (DE) se define como una alteración del fenotipo de las células endoteliales, lo cual deteriora la reactividad inmunitaria e induce la aparición de una superficie trombógena o anormalmente adhesiva para las células inflamatorias (Kumar, 2010). Este proceso es responsable, al menos en parte de iniciar la formación del coágulo, en padecimientos como la arterosclerosis y las lesiones vasculares en otros trastornos (Garcia-Cardena y Gimbrone, 2006; Skibsted y col., 2013).

Determinadas formas de disfunción en las CE son de inicio rápido en cuestión de minutos, reversibles y evolucionan con independencia de la síntesis de nuevas proteínas, en el caso de la contracción de las CE provocada por la histamina y otros mediadores vasoactivos que dilatan el endotelio de las vénulas (Kumar, 2010). El cambio fundamental que participa en este proceso es el cambio en la señalización del ON endotelial, el cual se procesa a través de la activación por señalización redox (Deanfield y col., 2007). Las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), en presencia de superóxido dismutasa (SOD), conducen a la generación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual al igual que el ON, es difundido rápidamente por toda la célula y reacciona con grupos de cisteína en las proteínas alterando su función (Deanfield y col., 2007).

Una lesión vascular estimula el crecimiento de las células musculares lisas y síntesis de la MEC asociándose con el engrosamiento la íntima (Pober y col., 2009). La recuperación de los vasos dañados es análoga al proceso de cicatrización que acontece en otros tejidos lesionados; en los vasos, dando lugar a la formación de una neoíntima (Pober y col., 2009; Zhi-Ling y col., 2014). Durante su evolución, las CE recubren zonas desnudas desplazándose desde regiones contiguas o proceden de sus precursores circundantes (Caplice y Doyle, 2005; Pober y col., 2009). Las células musculares lisas de la media o células procedentes del musculo liso también migran hacia la íntima, proliferan y sintetizan MEC de forma muy similar a los fibroblastos que infiltran una herida; es típico de la neoíntima resultante estar cubierta del todo por CE (Stevens, 2001; Kumar, 2010).

Por tanto, el engrosamiento de la íntima es la respuesta de la pared vascular ante cualquier agresión, diversos estudios apuntan a que el fenotipo de las células musculares lisas de la neoíntima difiere del correspondiente a la media; estas células nuevas no se contraen, pero tienen la capacidad de dividirse (Rajendran y col., 2013; Susienka y Medici, 2013). A pesar de que durante mucho tiempo se ha creído que estos elementos de la neoíntima procedían de la de las células musculares lisas que emigraron desde la media subyacente, cada vez hay más evidencias de que al menos una parte proceden de CE precursoras circulantes (Figura 3) (Hillebrands, 2003; Onat y col., 2011). Las actividades de migración, proliferación y síntesis de las células musculares lisas de la íntima se encuentran sometidas a la regulación fisiológica por productos derivados de plaquetas, CE y macrófagos, así como de factores activados de la coagulación y el complemento (Garcia-Cardena y Gimbrone, 2006; Heimrath y col., 2014). Se puede mencionar que moléculas como el PDGF, ET-1, trombina, FGF, IFN- γ e IL-1 estimulan a las células musculares lisas de la neoíntima, mientras que los sulfatos de heparano, el ON y

el TGF- β son antagonistas de su crecimiento (Garcia-Cardena y Gimbrone, 2006; Pober y col., 2009; Kumar, 2010).

Es importante remarcar que el engrosamiento de la íntima también se produce en arterias normales durante los procesos de maduración o envejecimiento (Tortora y Derrickson, 2006; Pober y col., 2009). Este cambio de la íntima vinculado a la edad carece específicamente de consecuencias, en parte debido a que una remodelación compensatoria del vaso hacia el exterior determina pocos cambios en el diámetro luminal; también confirma que no todo engrosamiento de la íntima es el anuncio de una enfermedad vascular (Caplice y Doyle, 2005; Esteller, 2006; Arauz y Ruíz-Franco, 2012; Thorburn y Baines, 2013).

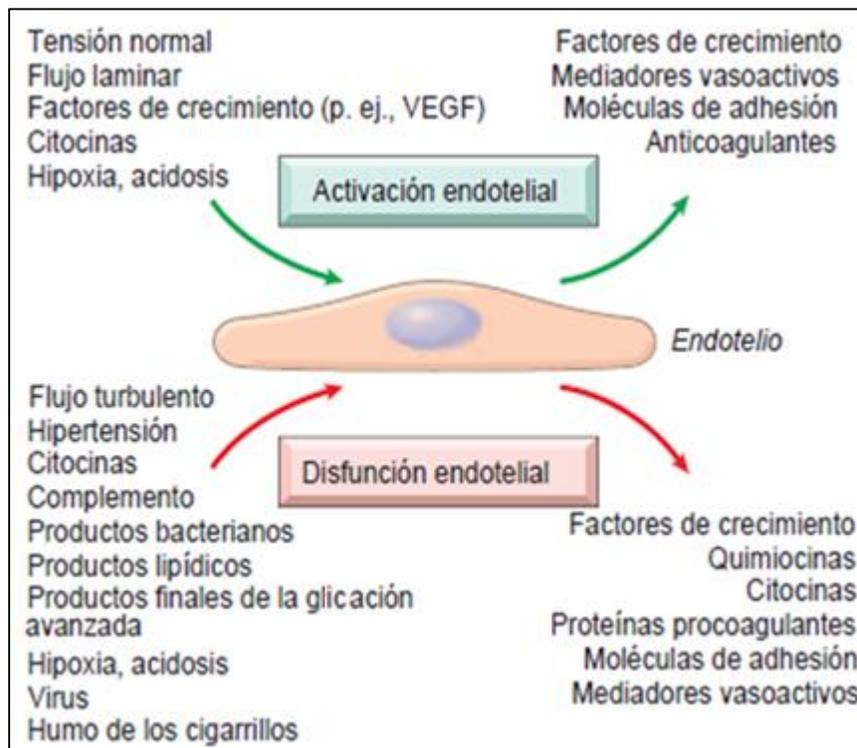


Figura 2. Respuestas de las células endoteliales a los estímulos ambientales. Ciertas señales como el flujo hemodinámico y las concentraciones constantes de los factores de crecimiento conducen a la activación estable de las células endoteliales que mantiene una superficie de contacto no-trombótica con el tono conveniente de las células musculares lisas. (VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular, por sus siglas en inglés). Fuente: Kumar, 2010.

Marcadores de Daño Endotelial

Bajo las condiciones de DE, las CE disminuyen su capacidad de liberar diversas moléculas que incluyen al ON, las prostaciclina, el factor hiperpolarizante derivado del endotelio, la trombomodulina y el activador de plasminógeno de tipo tisular (t-PA, por sus siglas en inglés), por otra parte aumenta la producción de citocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α , por sus siglas en inglés) e interleucina-6 (IL-6) (Constans y Conri, 2006; Arrebola-Moreno y col., 2012), además de la expresión moléculas de adhesión endotelial como ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina (Sultana y col., 2004; Burger y Touyz, 2012; Rajendran y col., 2013).

Algunas moléculas liberadas por el endotelio han surgido como una alternativa para realizar mediciones funcionales de la vasculatura (Arrebola-Moreno y col., 2012; Van-Ierssel y col., 2013; Wiseman y col., 2014), por lo que se han propuesto una gran variedad de marcadores plasmáticos, fundamentalmente moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1, E-selectina), ET-1, ON, proteína C reactiva (PCR), el inhibidor del activador del plasminógeno tisular 1 (PAI-1, por sus siglas en inglés), el FvW y, más recientemente se han propuesto a las micropartículas plasmáticas (MPs) y células progenitoras del endotelio (Contreras y col., 2006; Constans y Conri, 2006; Duprez y col., 2013; Page y Liles, 2013; Susienka y Medici, 2013; Wiseman y col., 2014).

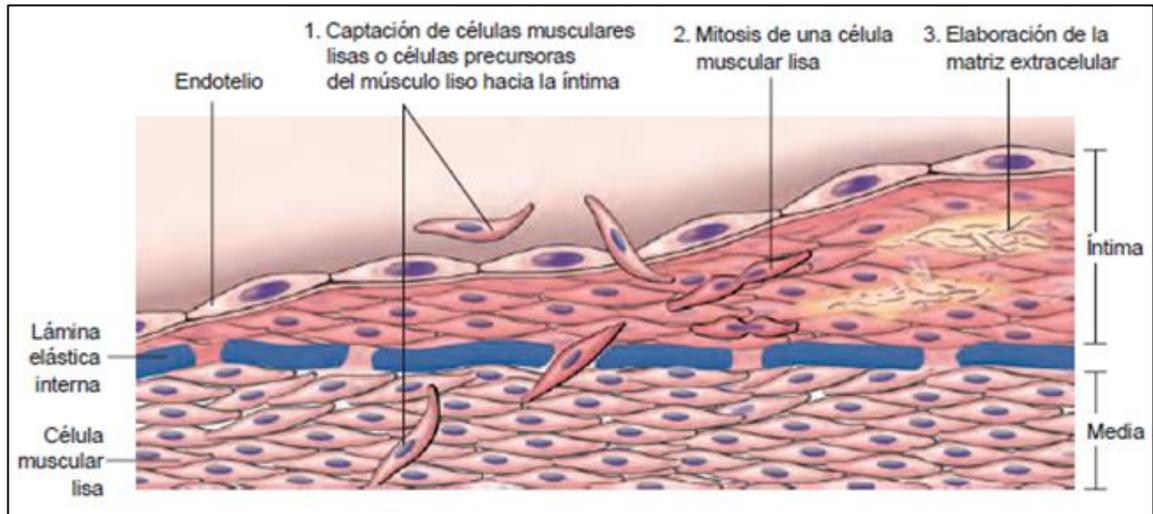


Figura 3. Engrosamiento de la íntima. Cambio del relieve en la migración de las células musculares lisas y su proliferación en la íntima, con una síntesis asociada a la matriz extracelular. Fuente: Schoen, 2010.

VCAM-1 como Marcador de Daño Vascular

La molécula de adhesión a células vasculares 1 (VCAM-1, por sus siglas en inglés) es una glicoproteína transmembranal de cadena única, que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas con un peso molecular (PM) de aproximadamente 95 a 110 kDa, compuesta por 715 aminoácidos y se expresa en CE, células dendríticas, macrófagos y fibroblastos (Pepinsk y col., 1992; Lares y col., 2005). Existe poca información sobre los niveles plasmáticos basales de VCAM-1 en la sangre, siendo los niveles medios reportados en los individuos sanos de 431 hasta 504 ng/mL (Videm y Albrigtsen, 2008). VCAM-1 es intensamente expresado por el endotelio vascular inflamado, lo cual es necesario para el anclaje endotelial de monocitos circulantes (Lares y col., 2005; Kameno y col., 2013). Esta interacción se inicia cuando las CE activadas por citocinas en respuesta a un estímulo inflamatorio expresan moléculas de adhesión como P-selectina, E-selectina, ICAM-1, VCAM-1 y factores quimiotácticos (Macias y col., 2003; Videm y Albrigtsen, 2008).

Una vez iniciada la respuesta inflamatoria, se promueve la liberación de VCAM-1 en su forma soluble (sVCAM-1) desde la superficie celular a la circulación por medio de la actividad proteolítica de desintegrinas y metaloproteasas localizadas en plaquetas y leucocitos.

(Glowinska y col., 2005; Videm y Albrigtsen, 2008; Cook-Mills y col., 2011). sVCAM-1 parece reflejar procesos de activación y /o lesión endotelial en varias enfermedades. Diversas investigaciones han observado niveles de sVCAM-1 plasmática elevada en enfermedades inflamatorias y procesos infecciosos, como aterosclerosis coronaria y periférica, DM, lupus eritematoso sistémico, autismo, preclamsia, enfermedad de Crohn, sepsis, entre otros padecimientos (Goke y col., 1997; Glowinska y col., 2005; Cook-Mills y col., 2011; Kameno y col., 2013; Page y Liles, 2013; Zhu y col., 2013).

Las concentraciones plasmáticas de otras sustancias relacionadas al endotelio también pueden ser de carácter informativo, pero reflejan otros aspectos de la función endotelial, tales como la regulación del tono vascular (ON y ET-1) o el equilibrio entre coagulación y la fibrinólisis (FvW) (Videm y Albrigtsen, 2008; Kaczmarek y col., 2013). Aunque las moléculas de adhesión circulantes pueden tener funciones propias de unión a receptores en leucocitos, se consideran como reflejo de los cambios de expresión en la superficie endotelial cuando se utilizan como marcadores de activación y/o lesión endotelial (Zhi-Ling y col., 2014).

Estudios demuestran que los niveles elevados de ICAM-1 en plasma se correlacionan con la expresión de la superficie, aunque su expresión es constante en el endotelio (Videm y Albrigtsen, 2008; Chen y Scholl, 2014). El momento de la expresión en la superficie endotelial es diferente en comparación con VCAM-1, se tiene entendido que en padecimientos como la aterosclerosis, VCAM-1 es la primera molécula de adhesión expresada antes del desarrollo de la placa aterosclerótica (Cook-Mills y col., 2011). Sin embargo, se sigue debatiendo cuál de las dos moléculas de adhesión circulantes puede ser un marcador de mayor validez (Videm y Albrigtsen, 2008). Varias investigaciones sugieren que en procedimientos como la cirugía a corazón abierto, hay una activación de parte del endotelio, se liberan niveles más altos de sVCAM-1 en comparación con sICAM-1 (porción soluble de ICAM-1) y por lo tanto más fácil en detectar (Macías y col., 2003; Videm y Albrigtsen, 2008). Sin embargo, de acuerdo con varios grupos de investigación que han evaluado su uso como marcadores, sICAM-1 y sVCAM-1 permiten predecir condiciones o eventos en ciertos padecimientos, sICAM-1 parece predecir el riesgo de infarto agudo al miocardio o DM en pacientes sanos (Guan y col., 2014), mientras que sVCAM-1 se correlaciona con riesgo recurrente de síndrome coronario agudo en pacientes con problemas cardiovasculares (Constans y Conri, 2006).

Micropartículas Plasmáticas de Origen Endotelial como Marcadores de Daño

Las micropartículas plasmáticas (MPs) son vesículas que poseen un tamaño de 0,1 a 1,0 μm , originadas de células que transitan y recubren el endotelio vascular tales como las leucocitos (neutrófilos, linfocitos y monocitos), eritrocitos, plaquetas, CE, células vasculares de músculo liso, entre otras líneas celulares; pueden ser detectadas en sangre periférica, orina, ascitis y líquido sinovial (Diamant y col., 2004; Budaj y col., 2012; Angelillo-Scherrer, 2012; Batool y col., 2013; Hargett y Bauer, 2013). En los últimos años, la identificación de micropartículas plasmáticas de origen endotelial (EMPs, por sus siglas en inglés), ha suscitado un gran interés, ya que estos podrían ser marcadores no invasivos de DE (Awad y col., 2013).

Debido a la gran heterogeneidad de la población de MPs circulantes, su detección se realiza mediante la identificación de antígenos específicos correspondientes al tipo de célula del cual son provenientes, por medio de la técnica de citometría de flujo (Lacroix y col., 2010), permitiendo la clasificación e identificación de MPs (Burger y col., 2013).

En la detección de MPs por citometría de flujo se presentan algunas limitaciones, debido a la carencia de antígenos específicos (Lacroix y col., 2010). Se han propuesto diversas estrategias para contrarrestar estas dificultades, varios grupos de investigación sugieren el uso de varios marcadores endoteliales que se han utilizado en la detección de MPs, las cuales incluyen CD31, CD34, CD51, CD54, CD62E, CD105, CD106, CD144 y CD146 (Lacroix y col., 2010; Dignat-George y Boulanger, 2011; Awad y col., 2013). El desarrollo de la combinación de anticuerpos (CD31+/CD41-, CD31+/CD42b-, CD105+/CD45-, CD144+) permite una mejor especificidad y en conjunto con otros aumenta la sensibilidad (CD105+, CD146+ CD106+) (Lacroix y col., 2010; Awad y col., 2013). Se tiene entendido que la molécula CD144 o VE-Caderina es uno de los antígenos específicos para la detección de EMPs (Dignat-George y Boulanger, 2011; Awad y col., 2013). Se ha utilizado a EMPs CD144+ como un marcador de daño en CE en pacientes con DM, enfermedad arterial coronaria, enfermedad hemolítica del recién nacido, accidente cerebrovascular isquémico e insuficiencia renal terminal (Koga y col., 2005; Awad y col., 2013).

La proteína calcio dependiente, CD144, es el principal componente de las CE involucrado en la adhesión celular, además de controlar la permeabilidad del vaso sanguíneo (Vestweber, 2009). Las MPs CD144+ son derivadas de CE, pueden encontrarse en el plasma humano y sus niveles parecen ser un marcador clínico específico y cuantitativo del daño y/o disfunción en las CE (Koga y col., 2005; Bernard y col., 2009). Existen evidencias que permiten

afirmar que los niveles de MPs CD144+ en plasma se podrían utilizar para predecir futuros eventos cardiovasculares en pacientes con insuficiencia cardíaca (Nozaki y col., 2010) y de que la determinación de MPs CD144+, proporciona una evaluación cuantitativa de la disfunción endotelial, además de ser útil para la identificación de pacientes con DM en riesgo de una enfermedad coronaria arterial (Koga y col., 2005; Dignat-George y Boulanger, 2011; Awad y col., 2013).

Micropartículas Plasmáticas

Actualmente el interés en el estudio de las MPs ha ido en aumento, debido a su importante papel en procesos inflamatorios y a su capacidad de afectar directamente las funciones del endotelio provocando; la liberación de citocinas, expresión de moléculas de adhesión por el endotelio y activación de leucocitos, atracción de monocitos en el proceso inflamatorio, proliferación de células en el músculo liso y angiogénesis, además de inducir actividad procoagulante en lesiones avanzadas (Diamant y col., 2004; Morel y col., 2009; Dignat-George y Boulanger, 2011). Desde el descubrimiento de las MPs, diversos grupos de investigación han reportado evidencias de una fuerte correlación positiva entre los niveles circulantes de MPs en plasma y diversos padecimientos inflamatorios como infecciosos, tanto en humanos y animales (Balducci y col., 2012; Awad y col., 2013; Curtis y col., 2013; Herring y col., 2013). Las MPs juegan un papel notable en la coagulación, inflamación, función endotelial y angiogénesis (Figura 4); contribuyen a la progresión de enfermedades vasculares, por lo que no son simplemente una consecuencia de la enfermedad, si no que pueden contribuir a procesos patológicos y servir de ambas formas como marcador de DE (Dignat-George y Boulanger, 2011; Jeanneteau y col., 2012).

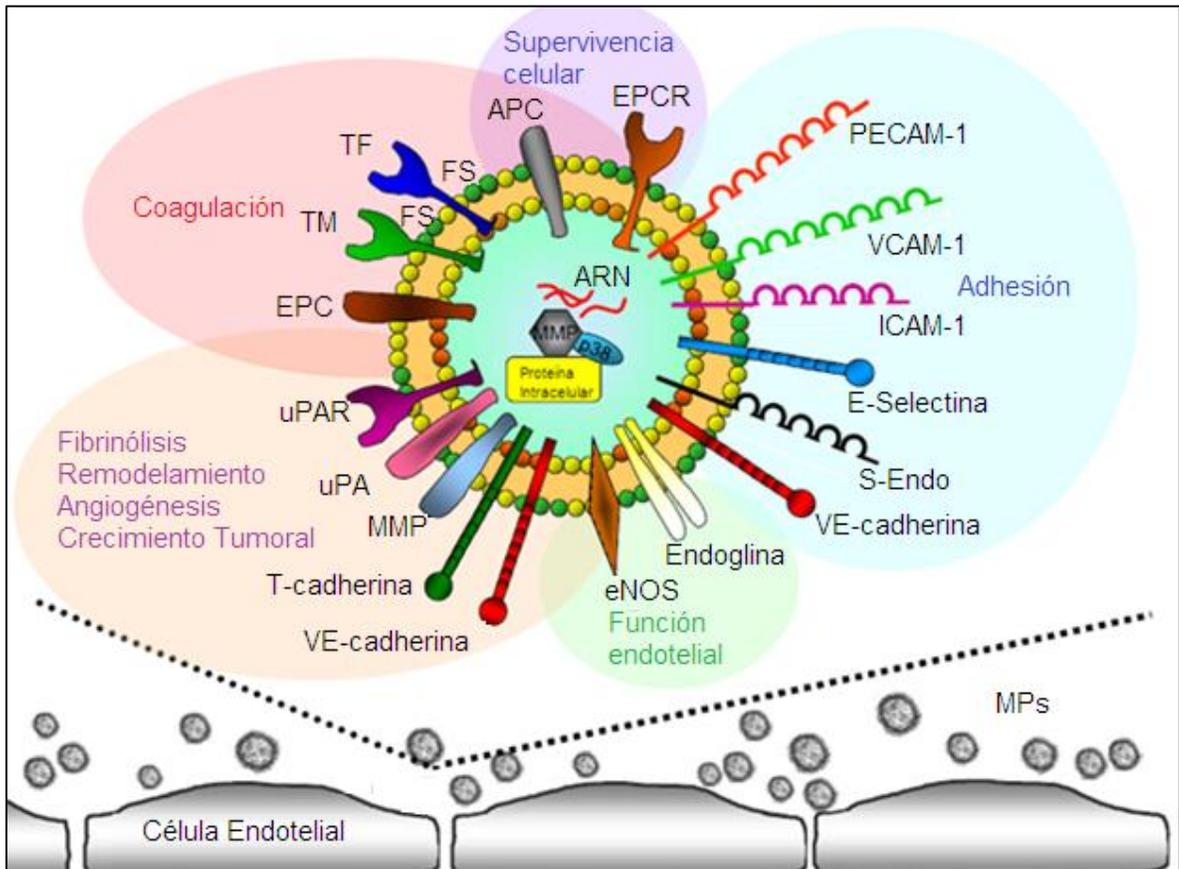


Figura 4. Representación esquemática moléculas transportadas por micropartículas plasmáticas y su actividad biológica. APC, (del inglés proteína de poliposis adenomatosa del colón); EPCR, (del inglés receptor endotelial de proteína C); PECAM-1, (del inglés molécula de adhesión entre células endoteliales y plaquetas 1); ICAM-1, (del inglés molécula de adhesión intercelular 1); VCAM-1, (del inglés molécula de adhesión a células vasculares 1); S-Endo, (del inglés molécula de adhesión a célula de melanoma/CD146); E-selectina, (del inglés selectina endotelial); VE-cadherina, (del inglés cadherina endotelial vascular); eNOS, (del inglés óxido nítrico sintasa endotelial); MMP, (del inglés metaloproteasas de matriz); uPA, (del inglés activador de plasminógeno tipo uroquinasa); uPAR, (del inglés receptor de activador de plasminógeno tipo uroquinasa); EPC, (del inglés proteína C endotelial); TM, (del inglés trombomodulina); FS, (fostafidilserina); Micropartículas Plasmáticas (MPs). Fuente: Balducci y col., 2012.

Mecanismo de Formación y Liberación de Micropartículas Plasmáticas a la Vasculatura

El conocimiento actual de los mecanismos de formación de MPs se deriva principalmente de experimentos aislados o cultivos de CE, documentando la capacidad de generar MPs después de la activación y/o apoptosis celular por una variedad de estímulos (Dignat-George y Boulanger, 2011). En general, es aceptado que las MPs se forman cuando hay una pérdida en la distribución asimétrica de los lípidos entre el interior y exterior de la membrana plasmática (Morel y col., 2011).

En condiciones normales las células intactas, tienen una bicapa lipídica con una composición asimétrica de fosfolípidos, donde la fosfatidiletanolamina (FE) y fosfatidilserina (FS) están presentes en la cara interna de la membrana; mientras que en el exterior de ésta se exponen moléculas como fosfatidilcolina (FC), fosfatidilinositol, esfingomiélin (EM) entre otros glicolípidos (Mause y Weber, 2010; Herring y col., 2013). Diversas moléculas inducen la formación de MPs como el TNF- α , trombina, PAI-1, angiotensina II, los lipopolisacáridos, bacterianos, toxinas urémicas, ROS, y lípidos oxidados, entre otros (Dignat-George y Boulanger, 2011; Batool y col., 2013). Una vez que dichas moléculas inducen la estimulación de su receptor, se desencadena una liberación de calcio al espacio intracelular por parte del retículo endoplásmico liso, promoviendo una redistribución de lípidos en la membrana plasmática tanto en su cara interna como externa, por lo que la liberación de MPs es un proceso activo mediado por cambios enzimáticos que conducen e implican la reorganización del citoesqueleto y la membrana plasmática (Morel y col., 2011; Owens III y Mackman, 2011, Curtis y col., 2013).

Este proceso inicia con la inhibición de la enzima translocasa, la cual es un transportador de fosfolípidos dependiente de calcio intracelular que permite la translocación internas (flip) y/o externas (flop) de lípidos en la membrana (Figura 5) (Curtis y col., 2013). Estudios recientes muestran que la translocación de FS a la cara externa de la membrana celular, implica despolarización mitocondrial (Bever y Williamson, 2010; Nguyen y col., 2011; Batool y col., 2013). La exposición de FS es consecuencia de la translocación ejercida por la flopasa e inhibición de la flipasa (Bever y Williamson, 2010). Tras la activación enzimática, el flujo de calcio inhibe la actividad de la flipasa y activa las enzimas sensibles al calcio, como calpainas y gelsoinas, proteasas que rompen el enlace entre miosina y α -actina (Owens III y Mackman, 2011; Batool y col., 2013). La asimetría de la membrana celular ocasiona la exposición de FS en la superficie celular y por último estimula una pérdida en la adhesión del

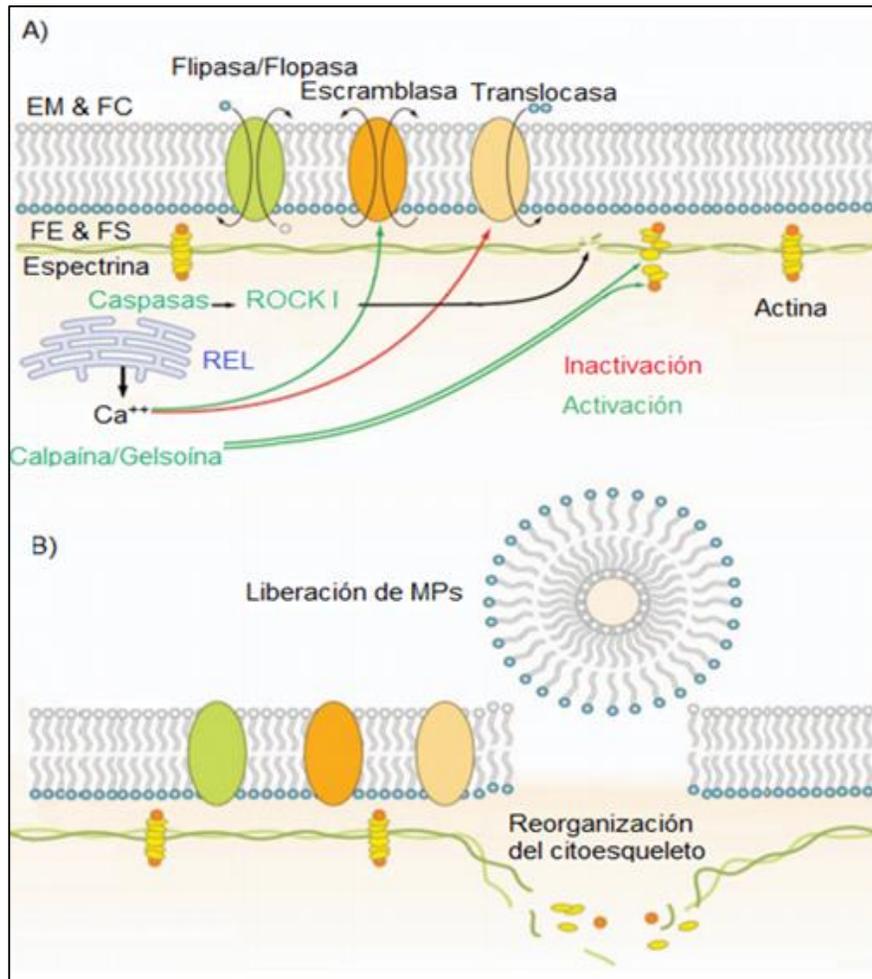


Figura 5. Representación esquemática de la membrana celular y formación de micropartículas plasmáticas. (A) Activación escramblasa e inactivación de translocasa y distribución de fosfatidilserina (FS), esfingomielina (EM), fosfatidilcolina (FC), fosfatidiletanolamina (FE), inicia una liberación de calcio (Ca^{++}), intracelular a través del retículo endoplasmático liso (REL), iniciando la activación de gelsoína y calpains, además de la activación de proteína quinasa asociada a rho I (ROCK I, por sus siglas en inglés) causando la interrupción del enlace entre miosina y actina, (B) liberación de MPs, reorganización del citoesqueleto, externalizando FS en la membrana. Fuente: Curtis y col., 2013.

citoesqueleto a la membrana y contribuyendo finalmente a la formación de MPs (Rautou y col., 2011; Burger y col., 2013).

Muy pocos estudios han analizado los mecanismos que controlan la liberación de MPs por CE (EMPs CD144+) (Dignat-George y Boulanger, 2011). Aunque se sabe que la activación de la proteína quinasa asociada a rho I (ROCK I, por sus siglas en inglés), desempeña un papel crucial en la formación MPs apoptóticas (Curtis y col., 2013). Las MPs liberadas pueden diferir en cuanto a su tamaño, fosfolípidos, composición de proteínas de superficie, así como su función fisiológica dependiendo del tipo de célula del que se hayan liberado (Batool y col., 2013; Wu y col., 2013).

Técnicas de Estudio de las Micropartículas Plasmáticas

Para la determinación de MPs están disponibles actualmente múltiples metodologías que permiten su detección, aislamiento, caracterización y/o cuantificación, clasificándose por aspectos como el tamaño, morfología, concentración, composición bioquímica y origen celular (Herring y col., 2013). Diversas técnicas como la dispersión de luz dinámica, el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés), la ultracentrifugación, la citometría de flujo y la microscopía electrónica se han utilizado con esos fines (Yong y col., 2012; Batool y col., 2013). Sin embargo, la mayoría de estas técnicas requieren una amplia preparación de muestra y no nos dan una idea cuantitativa del número real de MPs (Dragovic y col., 2011).

Caracterización de Micropartículas por Citometría de Flujo

La citometría de flujo nos permite realizar mediciones rápidas en células u otras partículas individuales en suspensión, conforme estas pasan -una por una- a través de un punto específico de análisis (Nielsen y col., 2014; Shantsila y col., 2014). La capacidad de poder analizar cuantitativamente múltiples parámetros de las células o partículas mediante un haz de luz láser, constituye una de las mayores fortalezas de esta herramienta (Nielsen y col., 2014); además ofrece la ventaja de ser comúnmente disponible en la mayoría de las instalaciones de investigación y puede analizar rápidamente gran cantidad de muestras (Burger y col., 2013; Shantsila y col., 2014). Las MPs pueden ser detectadas por citometría de flujo en muestras de

sangre o fracciones del mismo, así como en otros fluidos corporales como orina, ascitis y líquido sinovial (Diamant y col., 2004).

El estándar de oro actual para el análisis de MPs es la citometría de flujo, en donde son implementados fluorocromos conjugados a antígenos de superficie como marcadores en la detección específica de las partículas de interés (Ibrahim y van den Engh, 2007); permite una buena reproducibilidad en la determinación de MPs de acuerdo a diversos estudios realizados en MPs, con una variabilidad interensayo e intraensayo de aproximadamente de un 7-12% y 2-6%, respectivamente (Simak y col., 2006; Herring y col., 2013). Sin embargo, posee una serie de limitaciones, en primer lugar, el tamaño de las MPs se encuentra en los límites de detección de la citometría de flujo (Chandler y col., 2011). Esto provoca una pérdida de un número significativo de potenciales MPs o que múltiples partículas se identifiquen como un único evento (Lacroix y col., 2010; Batool y col., 2013).

La detección de MPs se da gracias a su unión con Anexina V, molécula que se une específicamente a la carga negativa de fosfolípidos como PS en presencia de iones de calcio, actuando como sonda en la detección y cuantificación de MPs (Batool y col., 2013; Burger y col., 2013). De cada evento detectado por citometría de flujo, se determinan electrónicamente el tamaño y granularidad por medio de la dispersión frontal (FSC, por sus siglas en inglés) y dispersión lateral (SSC, por sus siglas en inglés), así como la fluorescencia en diversos canales (Diamant y col., 2004; Shantsila y col., 2014).

La fluorescencia refleja la cantidad de anticuerpo unido al antígeno expresado por las MPs y, por tanto, es una estimación de la cantidad del antígeno expuesto en la superficie de la membrana (Diamant y col., 2004; Shantsila y col., 2014). En los últimos años, varias investigaciones han sugerido que CD105+/CD144+ parece ser la mejor combinación de anticuerpos para el seguimiento de la población de EMPs, ya que son antígenos que se encuentran de manera constitutiva en las CE (Gelderman y Simak, 2008). Sin embargo, hay diversos grupos de investigación que proponen a CD105+/CD146+ como una combinación más eficaz en la detección, debido a que su similar especificidad (Duval y col., 2010; Yong y col., 2012). Aunque hay algunos marcadores constitutivos como PECAM-1 (CD31), endogлина (CD105) y VE-cadherina (CD144); los cuales aumentan notablemente en la formación de MPs apoptóticas (Jiménez y col., 2003; Tramontano y col., 2010), así mismo otros marcadores inducibles como ICAM-1 (CD54), E-selectina, (CD62E) y VCAM-1(CD106) aumentan su expresión en la formación de MPs ante la activación del endotelio (Jiménez y col., 2003; Tramontano y col., 2010). Como resultado, el análisis de los perfiles fenotípicos de MPs pueden

proporcionar información clínicamente útil en la naturaleza del DE (Yong y col., 2012; Nielsen y col., 2014).

Micropartículas de Origen Endotelial en Procesos Patológicos

Las EMPs, representan una población muy dispersa de MPs (Mostefai y col., 2008; Wu y col., 2013), las fluctuaciones en los niveles plasmáticos pueden llevar a información clínica importante tanto en sujetos sanos como en pacientes con una variedad de condiciones patológicas o eventos tales como el accidente cerebrovascular isquémico agudo, hipertensión pulmonar arterial, y el DE en enfermedades como la insuficiencia renal en fase terminal, enfermedad arterial coronaria, DM, síndrome metabólico, vasculitis, infarto agudo al miocardio, malaria, preeclampsia; entre otras (Tabla 2) (González-Quintero y col., 2003; Mostefai y col., 2008; Nomura y col., 2009; Feng y col., 2010; Nozaki y col., 2010; Tramontano y col., 2010; Amabile y col., 2012; Herring y col., 2013; La Vignera y col., 2012; Heimrath y col., 2014).

Es conocido que los niveles circulantes de EMPs están asociados con un aumento del riesgo aterotrombótico en individuos asintomáticos y por lo tanto puede proporcionar un potencial valor predictivo (Yong y col., 2012), debido a que las EMPs aumentan la actividad procoagulante y proinflamatoria en la red vascular, promoviendo complicaciones tromboembólicas (Dignant-George y Boulanger, 2011). Al aumentar el número de EMPs en circulación, han surgido estos como un marcador del DE y remodelación vascular sistémica (Budaj y col., 2012). Sin embargo, no está claro si las EMPs son consecuencia de estos padecimientos, ya que a menudo se correlaciona la severidad de la enfermedad con la concentración relativa en circulación (Yong y col., 2012; Curtis y col., 2013).

Recientemente el interés por una evaluación más completa del EV se ha enfocado en combinar marcadores como los niveles de progenitores de CE y el estudio de las EMPs (Nozaki y col., 2010; Markiewicz y col., 2013; Wu y col., 2013). La diferencia en la relación de los niveles de EMPs y progenitores de CE parece reflejar un desequilibrio entre el DE y la reparación vascular, lo cual podría ser útil para identificar a pacientes en riesgo de presentar algún grado de DE (Markiewicz y col., 2013). Aunque otros estudios, apuntan a que los niveles plasmáticos de EMPs parecen predecir futuros eventos cardiovasculares incorporando en su estudio marcadores como el péptido natriurético tipo B y la PCR (Nozaki y col., 2009). Hasta ahora, sólo unos pocos estudios han investigado la capacidad de pronóstico potencial en la medición de los

niveles plasmáticos de EMPs (Dignant-George y Boulanger, 2011). Investigaciones en pacientes con accidente cerebrovascular isquémico agudo, se han encontrado niveles de EMPs lo cual se ha asociado con el grado de lesión y su resultado clínico, pero no se tienen datos sobre eventos clínicos durante el seguimiento de estos pacientes (Nozaki y col., 2010; Duprez y col., 2013).

Tabla 2. Fenotipos de micropartículas plasmáticas de origen endotelial y su asociación con diversas enfermedades.

Condición	Enfermedad Especifica	Fenotipos de EMPs
Enfermedad Arterial Coronaria	Aterosclerosis	CD31+, CD 144+, Anexina V+, T-cadherina+
	Enfermedad coronaria aguda	CD31+, CD105+, CD146+
	Enfermedad coronaria estable	CD31+, CD41+, CD62E+, CD105+, MCP1+
	Insuficiencia cardiaca crónica	CD31+, CD62E+, CD144+
Diabetes mellitus	Diabetes mellitus tipo 1	CD51+
	Diabetes mellitus tipo 2	CD31+, CD51+, CD144+, Anexina V+
	Síndrome metabólico	CD144+, CD146+
Ataque cerebro vascular	Accidente cerebrovascular isquémico agudo	CD62E, CD105+, CD144+
Hipertensión	Hipertensión pulmonar	CD31+, CD62E, CD144+
Insuficiencia renal	Etapa final de la insuficiencia renal	CD31+, CD144+
Durante la activación o apoptosis, las EMPs puede presentar distintivamente diferentes fenotipos antigénicos, que permiten identificación de la naturaleza de la lesión endotelial. (MCP1, del inglés proteína quimiotáctica de macrófago-1) (Fuente: Yong y col., 2013).		

Por otro lado, investigaciones realizadas en pacientes que presentan un daño endotelial caracterizado, los niveles de EMPs circulantes se correlacionan inversamente con la amplitud de la dilatación mediada por el flujo vascular, independientemente de factores como la edad y presión (Markiewicz y col., 2013). Hallazgos similares se observan en insuficiencia renal que crónica, donde los valores altos de EMPs CD31+, CD41- fueron predictores independientes de muerte cardiovascular (Dignant-George y Boulanger, 2011; Amabile y col., 2012).

Experimentos *in vitro* sugieren que las EMPs modulan el tono vascular influyendo en la producción de ON y prostaciclina (Curtis y col., 2013; Markiewicz y col., 2013). Debido a la inhibición de la vasodilatación mediada por el EV y la generación de ON a partir de la enzima óxido nítrico sintasa (eNOS, por sus siglas en inglés); también se ha observado que en cultivos de células endoteliales incubadas con EMPs muestran una disminución en la actividad de eNOS (Curtis y col., 2013, Markiewicz y col., 2013).

Además de su papel en el EV, las EMPs parecen modular la coagulación, una consecuencia directa de la exposición de FS en EMPs resulta en la capacidad de FS para unirse y activar los factores de la coagulación, lo cual les confiere un potencial procoagulante, su actividad trombogénica fue confirmada en experimentos *in vitro* e *in vivo* donde EMPs participaron en la generación de trombina dependiente del factor tisular (Owens III y Mackman, 2011; Markiewicz y col., 2013). Estos datos en su conjunto, sugieren que los niveles de EMPs se podrían utilizar en el futuro como un marcador en la evaluación de pacientes e identificación de sujetos con un alto riesgo de desarrollar complicaciones cardiovasculares y eventos tromboticos, ya sea por enfermedad o envejecimiento (Dignant-George y Boulanger, 2011; Markiewicz y col., 2013).

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del Estudio

Descripción

Se llevó a cabo un estudio piloto del tipo observacional descriptivo en el cual se utilizaron muestras de plasma de un paciente con DM2 y como control a un sujeto aparentemente sano (ADA, 2014).

Selección de Sujetos

Se incluyó un sujeto con DM2 diagnosticado previamente al ingreso del estudio y se utilizó como control un sujeto no diabético, aparentemente sano. El estado de salud de ambos sujetos de estudio fue valorado por un médico colaborador utilizando los criterios establecidos por el comité internacional de expertos en el diagnóstico y clasificación de la diabetes mellitus (ADA, 2014). Fueron excluidos de este procedimiento los sujetos que presentaron algún proceso infeccioso previo a la toma de muestra, así como la ingesta reciente de fármacos antiinflamatorios que alteren la concentración de sVCAM-1 plasmático, y además como criterio de eliminación la decisión de no participar en el proyecto.

Consideraciones Bioéticas

Se emplearon muestras de plasma sanguíneo colectadas a partir de los dos sujetos invitados a participar los cuales aceptaron de manera voluntaria, y se les explicó detalladamente la confidencialidad con la que se manejarían los datos que ellos aportaron, los posibles riesgos

derivados de la extracción de sangre por punción venosa, además de los alcances y/o beneficios de este proyecto a la comunidad y a su persona. Una vez que los sujetos aceptaron a participar en el estudio firmaron una hoja de consentimiento informado, mismo donde se les informa que en el momento en que decidan no participar, sus datos serán descartados de manera inmediata (Ver anexo 1).

Obtención de Muestras Biológicas

Las muestras sanguíneas fueron obtenidas después de un periodo de ayuno de 8 a 12 h. La sangre se obtuvo por punción venosa en tubos Vacutainer® de polipropileno adicionados con EDTA y se centrifugaron durante 2,000 g por 5 min para separar el plasma del paquete globular. Una vez obtenido el plasma, fue separado en alícuotas, una alícuota se utilizó para la determinación de glucosa, colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol, triglicéridos, ácido úrico, bilirrubinas, además de citometría hemática y examen general de orina; para la valoración del estado de salud del paciente; cabe aclarar que las mediciones de estos analitos y estudios se encuentran fuera de los objetivos de este trabajo; el resto fue inmediatamente almacenado a -80°C para su posterior procesamiento.

Separación de las Fracciones Plasmáticas

Las alícuotas almacenadas a -80°C fueron sometidas a una de centrifugación a 3,000 g durante 30 min para la eliminación de residuos celulares. Posteriormente, para la obtención de un plasma pobre en plaquetas (PPP), se centrifugó nuevamente, esta vez a 1,500 g a 20°C y por 20 min, se prosiguió a centrifugar las muestras por última vez a 15,000 g, a 20°C por un periodo de 30 min, con el fin de eliminar las MPs plaquetarias, las cuales constituyen más del 80% de las micropartículas totales (Owens III y Mackman, 2011).

Una vez obtenido el PPP y disminuido en MPs plaquetarias, fue filtrado empleando un filtro de Merck Millipore® (clave de catálogo: UV30VV00) con un límite de exclusión de tamaño de 0.1 μm , donde se utilizaron 100 μL de PPP y se centrifugo a 6,000 g por 4 min a una temperatura de 20°C, se agregó un volumen de 50 μL de amortiguador de fosfatos salino (PBS) 10 mM y con un pH de 7.2, posteriormente se centrifugó a 6,000 g por 2 min a 20°C, se volvió

agregar 50 μL de PBS y finalmente se centrifugó a 6,000 g por 2 min a 20°C, obteniéndose dos fracciones plasmáticas, una mayor e igual de 0.1 μm , la cual contiene a las MPs de interés y la otra fracción menor de 0.1 μm , en la que se encuentra el marcador de manera soluble, tales fracciones fueron alicuotadas e inmediatamente almacenadas a - 80°C para la posterior cuantificación de sVCAM-1 (Yoshida T y col., 2002).

Cuantificación de sVCAM-1 Plasmático

Se cuantificó la concentración de sVCAM-1 circulante en las muestras de plasma total en los dos sujetos de estudio, así como en las fracciones plasmáticas con un tamaño mayor e igual a 0.1 μm y menor 0.1 μm , utilizando un equipo comercial de ELISA para la detección de sVCAM-1 humano de LEGEND MAX® (número de catálogo: 440308). Para ello se añadieron 100 μL del conjugado enzimático a cada pozo y se pipetearon 50 μL de la dilución de estándar de sVCAM-1, plasmas problema en los pozos correspondientes, se dejó incubar a temperatura ambiente por 1 h mezclando a 20 rpm. Posteriormente, se decantó el líquido de los pozos y se lavó en 5 ocasiones con 300 μL de solución de lavado, se agregó 100 μL de solución de sustrato TMB (3-5-3'-5'-tetrametilbenzidina) y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente en oscuridad con agitación suave y constante. Se detuvo la reacción añadiendo 100 μL de solución de paro de reacción a cada pozo y se agitó suavemente. Finalmente se tomó lectura de las absorbancias a 450 nm de longitud de onda en un lector de microplacas Model680 de BIO-RAD® y se calcularon los resultados mediante la aplicación de la recta obtenida de la curva de calibración de acuerdo al fabricante, obteniéndose una $R^2 = 0.9952$, así como la ecuación de la recta para la determinación de nuestras muestras problema (Alabanza y Bynoe, 2012).

Análisis Citométrico de Micropartículas Plasmáticas

El análisis se realizó en el citómetro FACSCalibur® de BD®, los datos obtenidos fueron analizados en el programa Summit Software Informer® versión 4.3 de Dako®. Los ensayos de tinción se realizaron utilizando 25 μL del PPP correspondiente, se utilizaron 2 μL del anticuerpo primario monoclonal anti-VCAM-1 (anti-CD106) generado en ratón; acoplado con PE/Cy5 de la marca BioLegend®, al igual que un anticuerpo primario monoclonal anti-VE-Cadherina (anti-

CD144) generado en ratón; acoplado con PE de la marca BioLegend®, se adicionó 2 µL de Anexina V acoplado a FITC de la marca BioLegend®, y se incubó por 15 min, se agregó 100 µL del amortiguador de unión (número de catálogo: 42220) de la misma marca y se añadió solución salina hasta un volumen final de 300 µL, el cual fue inyectado al equipo ya descrito hasta lograr capturar 100,000 eventos, mismos que fueron analizados en el programa antes descrito (Monnier, y col., 2012; Hellmann y col., 2013; Werling y col., 2013).

Análisis de VCAM-1 en la Superficie de Micropartículas Plasmáticas

El número relativo de MPs, así como la expresión del marcador VCAM-1 en su superficie se definió sobre un gráfico de puntos (Dot Plot), graficándose tamaño (FSC) contra granularidad (SSC) determinado por un área de análisis y captura, el cual fue determinado mediante el uso de perlas calibradoras de látex fluorescentes de 0.1 y 1.0 µm de la marca SIGMA-ALDRICH®, seleccionando una región 'R' sobre el Dot Plot. Empleando un control de autofluorescencia (CAF) se determinaron las partículas de un tamaño de 0.1 a 1 µm que fueran positivas para el marcador de Anexina V-FITC y finalmente de esa población de eventos Anexina-V positivas, se trasladó esa ventana de selección y se evaluaron los marcadores de identificación CD106 (VCAM-1) y CD144 (VE-Cadherina) para conocer el porcentaje de MPs provenientes de origen endotelial y que evidencian el marcador de DE VCAM-1 (Awad y col., 2013; Nielsen y col., 2014).

Análisis de Datos

Los datos fueron expresados como el promedio de las concentraciones de sVCAM-1 en plasma de las determinaciones realizados por triplicado en los dos sujetos de estudio. La comparación de los datos entre la cuantificación de la sVCAM-1 plasmático y el unido a micropartículas plasmáticas se hizo de manera observacional tanto en los datos obtenidos por el análisis citométrico de MPs, así como la evidencia de la expresión de VCAM-1 en éstas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

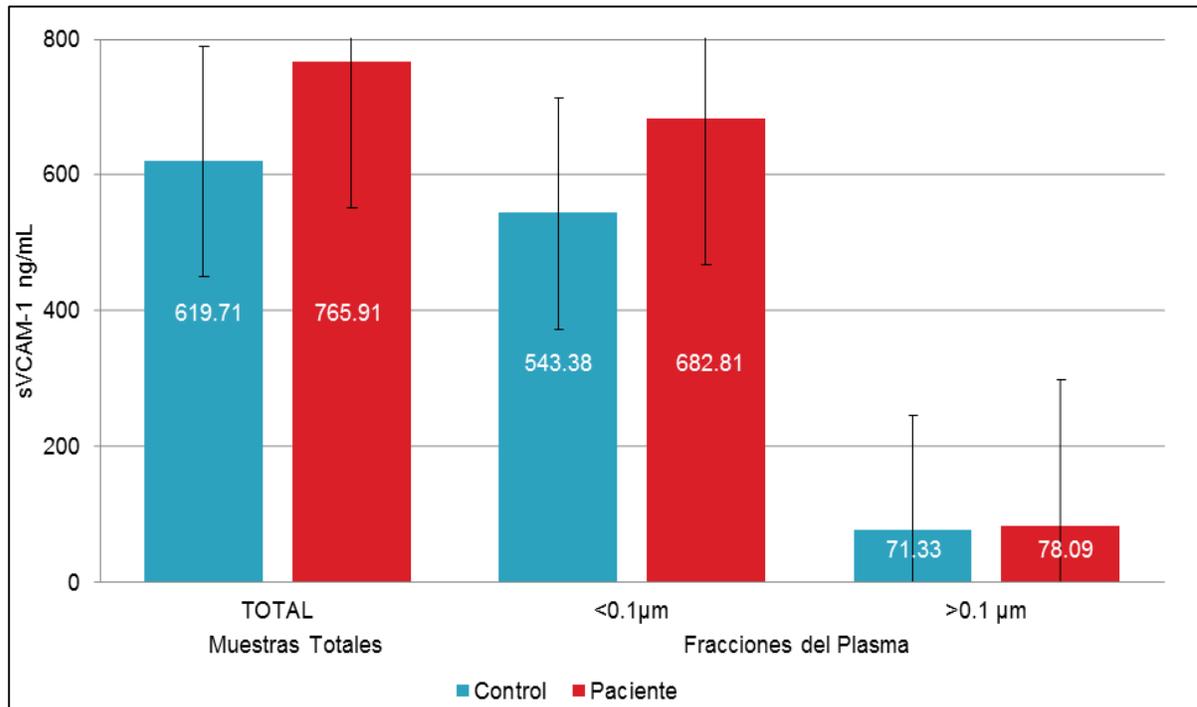
Selección de Sujetos de Estudio

Se seleccionaron dos sujetos los cuales respondieron a la invitación abierta hecha a la comunidad Hermosillense, fueron sometidos a una evaluación clínica llevada a cabo por un médico colaborador especialista. De los sujetos muestreados, uno de ellos presentó DM2, refiriendo el haber sido diagnosticado hace más de diez años con este padecimiento y el otro sujeto fue evaluado como no diabético aparentemente sano, de acuerdo a los criterios recomendados por el comité internacional de expertos en el diagnóstico y clasificación de la diabetes mellitus (ADA, 2014).

Análisis de los Niveles de sVCAM-1 en Plasma

La concentración promedio de sVCAM-1 en la muestra de plasma total del sujeto control fue de 619.71 ng/mL, 543.38 ng/mL en la fracción menor de 0.1 μm y 71.33 ng/mL en la fracción mayor e igual de 0.1 μm (Figura 6). En el paciente con DM2 se obtuvo una concentración promedio de 765.91 ng/mL de sVCAM-1 en la muestra de plasma total, 682.81 ng/mL en la fracción menor de 0.1 μm y 78.09 ng/mL en la fracción superior e igual a 0.1 μm (Figura 6). Estos resultados reflejan que las concentraciones de sVCAM-1 tanto de las muestras de plasma total como de sus fracciones fueron mayores en el sujeto diagnosticado con DM2 respecto al sujeto control, coincidiendo con lo reportado por diversos grupos de investigación donde se demuestran que los niveles totales en plasma del marcador de daño endotelial sVCAM-1 se encuentran aumentados en sujetos que presentan aterosclerosis coronaria y periférica, DM, lupus eritematoso sistémico, preclamsia, enfermedad de Crohn, entre otros padecimientos (Goke y col., 1997; Glowinska y col., 2005; Cook-Mills y col., 2011; Kameno y col., 2013; Page y Liles, 2013; Zhu y col., 2013).

Figura 6. Comparación de los niveles de sVCAM-1 en plasma total y sus fracciones de los



sujetos de estudio en ng/mL.

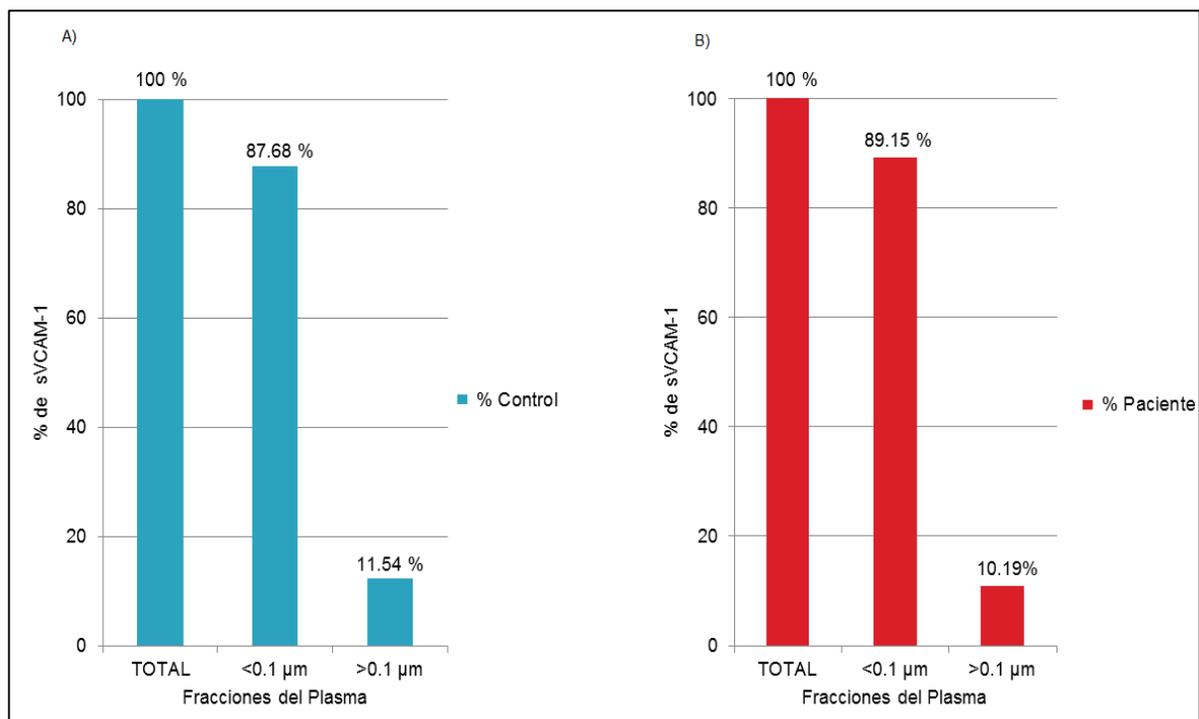
Diversos grupos de investigación indican una correlación satisfactoria entre uno o más marcadores solubles de DE como VCAM-1, el factor tisular, E-selectina y el FvW con el estado clínico de pacientes (Mannuci, 1998; Horstman y col., 2004b).

Sin embargo, estudios donde se realizaron la medición de marcadores como sVCAM-1 e sICAM-1 en pacientes con infarto agudo al miocardio, tanto en el momento de la admisión como 10 días después (Macías y col., 2003); no se encontraron en ese estudio una correlación entre los valores de las moléculas de adhesión solubles por la técnica de ELISA y la severidad del daño miocárdico, estimado por enzimas cardíacas y cambios electrocardiográficos (Macías y col., 2003); esto puede estar relacionado al hecho de que resultados por la técnica de ELISA utilizando el mismo marcador soluble a menudo varían de un laboratorio a otro (Chironi y col., 2009; Yong y col., 2012). Por lo cual, no se puede descartar la idea de que cierta proporción de algunos marcadores solubles se encuentra realmente unido a alguna población de MPs y afectar la concentración de los marcadores solubles (Horstman y col., 2004b).

Análisis de la Proporción de VCAM-1 de Cada una de las Fracciones Plasmáticas

La concentración promedio del plasma total fue obtenida de un triplicado, el cual se utilizó como referencia para el 100% del VCAM-1 en las muestras de plasma, y permitió determinar el porcentaje de las fracciones plasmáticas mayores y menores de 0.1 μm . Evidenciando que en las fracciones menores de 0.1 μm hubo una mayor proporción del marcador plasmático de 87.68% y 89.15%, respectivamente para el sujeto control y el paciente diabético (Figura 7); mientras que en la fracciones mayores e iguales de 0.1 μm se obtuvieron porcentajes de 11.54% en el sujeto control y 10.19% en el paciente con DM2, asumiendo que esta última corresponde a la fracción de VCAM-1 cuantificada que se encuentra unida a MPs y no en su forma libre, la cual corresponde a la cuantificada en la fracción menor a 0.1 μm (Figura 7).

Figura 7. Comparación de porcentajes de sVCAM-1 en las fracciones plasmáticas analizadas.



A) Control, B) Paciente.

Probablemente el problema más grave en la determinación de marcadores solubles radica en la posibilidad de que la mayoría de estos llamados “marcadores solubles” se

encuentren realmente unidos a MPs, al menos en cierta proporción (Horstman y col., 2004; Chironi y col., 2009). En la mayoría de los estudios realizados en la determinación de marcadores solubles, no se tiene especial cuidado en distinguir entre la proporción del marcador soluble contra el unido a MPs (Horstman y col., 2004b). Una excepción a lo anterior es un estudio donde evidenció una concentración significativa de P-selectina en plasma de pacientes con púrpura trombocitopénica trombótica, incluso después de una centrifugación a 100,000 g y posteriormente filtrando con una membrana con un límite de exclusión de tamaño de 0,22 μm (Katayama y col., 1993; Horstman y col., 2004a).

Por lo que es factible que en la mayoría de los estudios, la determinación de marcadores solubles sea en realidad debido a la medición de estas moléculas unidas a EMPs, otra subclase de MPs, o mezclas de formas solubles y unidas MPs (Horstman y col., 2004b; Chironi y col., 2009; Yong y col., 2012).

Expresión de VCAM-1 en la Superficie de Micropartículas Plasmáticas por Citometría de Flujo

En el programa Summit Software Informer® versión 4.3 de Dako®, se seleccionó la región correspondiente (denominada R14) al tamaño de las MPs (0.1 - 1.0 μm); empleando perlas de látex acopladas a fluorocromos de 0.1 y 1.0 μm (Figura 8).

De las MPs que se encontraron en el área R14, se seleccionaron las positivas para Anexina V-FITC, las cuales se muestran en el panel central dentro de la región R16 de las Figuras 9A y 9B, mismas en las que se determinó la presencia de los marcadores de célula endotelial (CD144) y del marcador de daño endotelial VCAM-1 (CD106), empleando anticuerpos monoclonales específicos fluoromarcados (Panel inferior, ver figura 9A y 9B). Permitiendo evidenciar la presencia de VCAM-1 en MPs provenientes de células de endotelio vascular mediante el uso de la técnica de citometría de flujo en los dos sujetos estudiados.

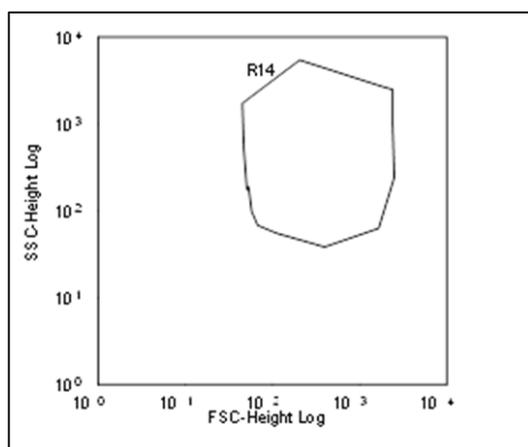


Figura 8. Región de análisis y captura correspondiente al tamaño de 0.1 y 1.0 μm .

En la Figura 9 se muestran dos series de gráficos de puntos representativos de los 2 sujetos de estudio; donde se registraron de 2,488 y 3,367 eventos a partir del área R14, del sujeto control y el paciente, respectivamente. Se obtuvieron 808 y 960 eventos Anexina V+, los cuales equivalen al 32.77% y 29.06% respectivamente del total de partículas dentro del intervalo de tamaño para MPs. Al evaluar el contenido de los marcadores CD106 (VCAM-1) y CD144 (VE-Cadherina) en las MPs capturadas en esta área se puede ver una proporción del 42.86% de CD106+, 7.88% de CD144+ y finalmente una doble positividad del 27.76% de estos marcadores en las MPs del sujeto control. Al mismo tiempo el paciente con DM2 presenta una proporción del 37.81% de CD106+, 10.76% de CD144+ y una doble positividad del 29.06% (Tabla 3).

Estos resultados representativos son congruentes con hallazgos encontrados por otros grupos de investigación en pacientes diabéticos, donde se ha encontrado incrementado el número de MPs CD144+, tal como observamos en nuestro paciente respecto al sujeto control; al mismo tiempo, estos niveles de EMPs incrementados en plasma se han asociado con DE (Koga y col., 2005; Bernard y col., 2009; Chironi y col., 2009; Markiewicz y col., 2013). Asimismo, al extrapolar estos resultados en estudios más amplios, en donde se evalúan los niveles de EMPs en un número significativo de pacientes, mostraron un aumento en la expresión de CD144+ en EMPs, lo cual se ha asociado de manera independiente futuros eventos cardiovasculares en pacientes diabéticos (Koga y col., 2005; Curtis y col., 2013). Se han reportado altos niveles de antígenos de superficie como E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1 en EMPs, liberadas a través de la activación de células endoteliales *in vitro* (Markiewicz y

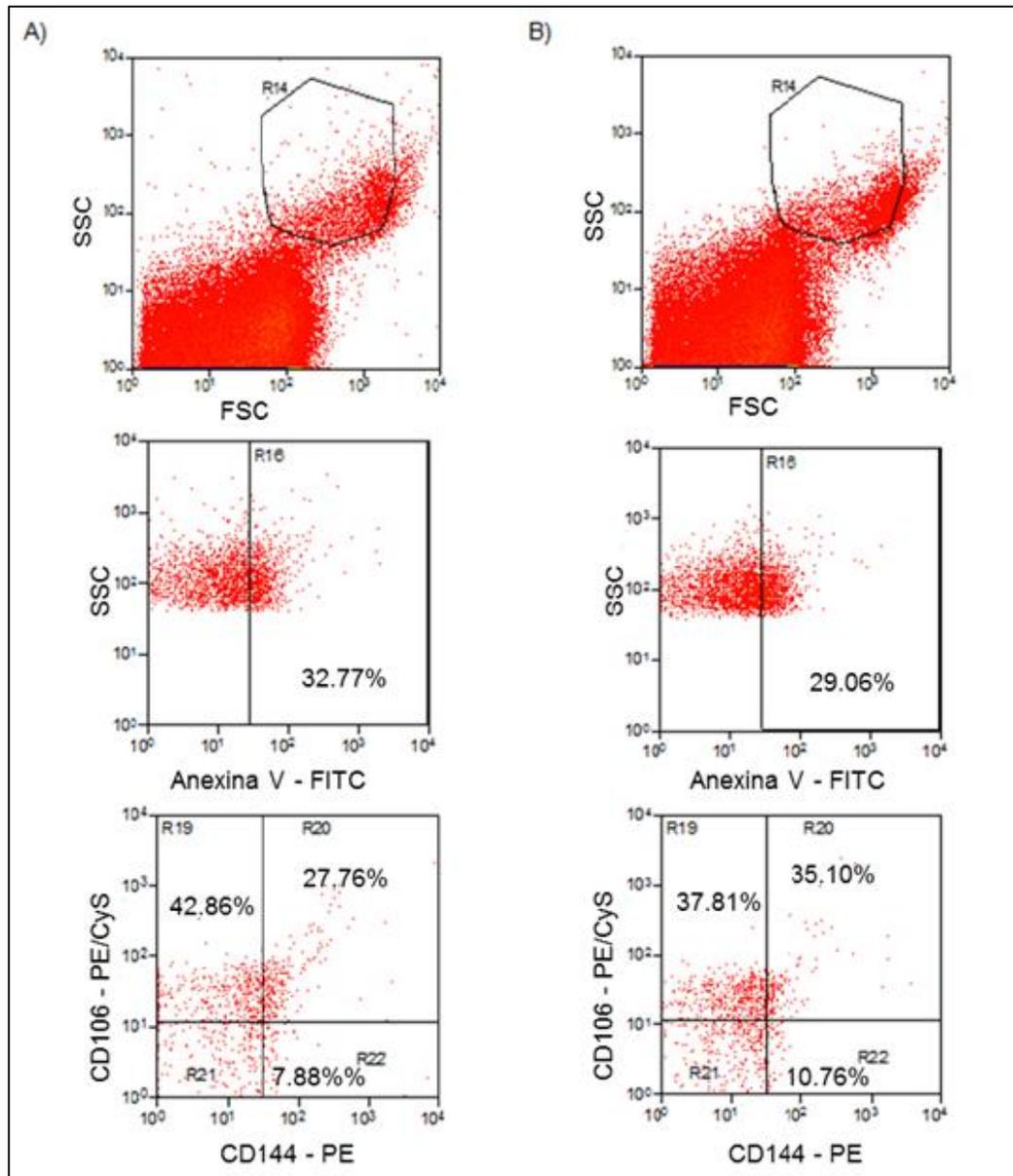


Figura 9. Detección de VCAM-1 en la superficie de micropartículas plasmáticas de origen endotelial por citometría de flujo. A) Sujeto control, B) Paciente con DM2.

col., 2013; Van-Ierssel y col., 2013). En contraste, se ha observado una disminución de estos en el proceso apoptótico de las CE (Tramontano y col., 2010; Yong y col., 2012; Markiewicz y

col., 2013). De manera adicional, las EMPs generadas a partir de la apoptosis de CE tienen una mayor cantidad de FS en su composición en comparación con las EMPs generados por la activación de CE (Tramontano y col., 2010), lo cual sugeriría que hay distintos mecanismos de formación de EMPs en células activadas y apoptóticas (Dignant-George y Boulanger, 2011; Yong y col., 2012; Markiewicz y col., 2013; Van-Ierssel y col., 2013). Adicionalmente, en otros reportes donde se determinó el fenotipo antigénico de EMPs en pacientes diabéticos; ciertos marcadores constitutivos (predominantemente CD31 y CD105) son expresados en oposición a marcadores inducibles o de activación (Tramontano y col., 2010; Dignant-George y Boulanger, 2011).

Tabla 3. Eventos obtenidos al evaluar marcadores de identificación en microparticulas plasmáticas de origen endotelial.

Micropartículas Plasmáticas				
		% sobre el total de MPs Anexina V+		
Sujeto	Total de MPs Anexina V +	CD144+ (%)	CD106+ (%)	CD144+/CD106+ (%)
Control	808	7.88	42.86	27.76
Paciente	960	10.76	37.81	35.10

Además se ha observado, que la relación de poblaciones CD62E+ / CD31+, se puede utilizar como un criterio para distinguir activación frente a la apoptosis en las CE, debido a que CD62E es considerado un marcador de activación del endotelio; mientras que CD31 se encuentra de manera constitutiva en las CE (Tramontano y col., 2010; Dignant-George y Boulanger, 2011; Markiewicz y col., 2013). Lo cual puede ser interpretado como una indicación de un aumento en la activación celular de CE de en los pacientes con DM2 (Tramontano y col., 2010).

Con los resultados obtenidos en el presente estudio piloto, se establecen las condiciones y métodos que podrán tomarse como base para posteriores estudios donde se evalúen otros marcadores solubles, además de como las MPs podrían afectar las concentraciones de éstos; comparando una muestra que maneje un mayor número de sujetos sanos contra sujetos con

DM2 o prediabéticos, lo cual permitirá obtener mejores correlaciones entre los marcadores solubles y el estado clínico de los pacientes.

CONCLUSIONES

1. Se encontró una proporción mayoritaria de sVCAM-1 en las fracciones menores de 0.1 μm en ambos sujetos de estudio.
2. Se evidenció la presencia de VCAM-1 en la superficie de micropartículas plasmáticas de origen endotelial en los 2 sujetos de estudio.

RECOMENDACIONES

Al ser este un estudio piloto, nos permitió valorar que es factible realizar este tipo de estrategia metodológica para cuantificar la proporción del marcador sVCAM-1 que se encuentra libre en circulación y la proporción que se encuentra acoplada a MPs. Ya que observamos ligeras diferencias en estas proporciones en los dos sujetos analizados, es recomendable que se lleve a cabo en este estudio utilizando un grupo de pacientes con DM2 o prediabéticos y controles, así como la utilización alterna bajo el mismo procedimiento metodológico del marcador sICAM-1, lo cual permitiría obtener resultados más claros sobre las proporciones de estos marcadores solubles y el estado clínico de los pacientes.

REFERENCIAS

Abebe W, Mozaffari M. 2010. Endothelial dysfunction in diabetes: potential application of circulating markers as advanced diagnostic and prognostic tools. *EPMA Journal* 30(1):32-45.

ADA. 2014. Standards of Medical Care in Diabetes-2014. *Diabetes Care* 35(1):11-61.

Alabanza L, Bynoe M. 2012. Thrombin induces an inflammatory phenotype in a human brain endothelial cell line. *J Neuroimmunol* (245):48-55.

Angelillo-Scherrer A. 2012. Leukocyte-derived microparticles in vascular homeostasis. *Circ Res* 20;110(2):356-369.

Amabile N, Guérin AP, Tedgui A, Boulanger CM, London GM. 2012. Predictive value of circulating endothelial microparticles for cardiovascular mortality in end-stage renal failure: a pilot study. *Nephrol Dial Transplant* 27(5):1873-80.

Arauz A, Ruíz-Franco A. 2012. Enfermedad cerebro vascular. *Rev Facul Med UNAM* 3(55):11-21.

Arrebola-Moreno AL, Laclaustra M, Kaski JC. 2012. Evaluación no invasiva de la función endotelial en la práctica clínica. *Rev Esp Cardiol* 1(65):80-90.

Awad HA, Tantawy A, El-Farrash RA, Ismail EA, Youssif NM. 2013. CD144+ endothelial microparticles as a marker of endothelial injury in neonatal ABO blood group incompatibility. *Blood Transfus* 1(1):1-13.

Badimón L, Martínez-González J. 2006. Disfunción endotelial. *Rev Esp Cardiol Supl* 6(1):21-30.

Balducci E, Cointe S, Lacroix R, Sabatier F, Dignat-George F. 2012. Circulating microparticles, emerging actors and markers in human diseases. *RFL* 433(1):29-39.

Batool S, Abbasian N, Burton JO, Stover C. 2013. Microparticles and their roles in inflammation. *J Immunol Res* 1(6):1-14.

Bernard S, Loffroy R, Sérusclat A, Bousset L, Bonnefoy E, Thévenon C, Rabilloud M, Revel D, Moulin P, Douek P. 2009. Increased levels of endothelial microparticles CD144 (VE-Cadherin) positives in type 2 diabetic patients with coronary noncalcified plaques evaluated by multidetector computed tomography (MDCT). *Athero Res* 1(2):429-35.

Bevers EM, Williamson PL. 2010. Phospholipid scramblase: An update. *FEBS* 1(584):2724–2730.

Biasucci LM, Cardillo MT. 2012. Biomarkers of inflammation and endothelial function: the holy grail of experimental and clinical medicine?. *VascPharma* 56(1):26-28.

Budaj M, Poljak Z, Ďuriš I, Kaško M, Imrich R, Kopáni M, Maruščáková L, Hulín I. 2012. Microparticles: a component of various diseases. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej* 1(122):24-30.

Burger D, Touyz RM. 2012. Cellular biomarkers of endothelial health: microparticles, endothelial progenitor cells, and circulating endothelial cells. *J Am Soc Hypertens* 6(2):85-99.

Burger D, Schock S, Thompson CS, Montezano AC, Hakim AM, Touyz RM. 2013. Microparticles: biomarkers and beyond. *Clin Sci* 1(124): 423-441.

Caplice N, Doyle B. 2005. Vascular progenitor cells: origin and mechanisms of mobilization, differentiation, integration, and vasculogenesis. *Stem Cells Dev* 14(1):122-126.

Chandler WL, Yeung W, Tait JF. 2011. A new microparticle size calibration standard for use in measuring smaller microparticles using a new flow cytometer. *J Thromb Haemost* 9(6):1216-1224.

Chen X, Scholl TO. 2014. Maternal biomarkers of endothelial dysfunction and preterm delivery. *PLoS ONE* 1(9):1-8.

Chironi GN, Boulanger CM, Simon A, Dignat-George F, Freyssinet JM, Tedgui A. 2009. Endothelial microparticles in diseases. *Cell Tissue Res* 335(1):143-151.

Constans J, Conri C. 2006. Circulating markers of endothelial function in cardiovascular disease. *Clin Chim Acta* 368 (2):33-47.

Contreras F, Lares M, De Mayorca ES, Fragoza S. 2012. Disfunción endotelial en pacientes diabéticos e hipertensos. *Rev Dig de Postg* 1(1):28-40.

Cook-Mills JM, Marchese ME, Abdala-Valencia H. 2011. Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants. *Antioxid Redox Sign* 15(6):1607-38.

Curtis AM, Edelberg J, Jonas R, Rogers WT, Moore JS, Syed W, Mohler III ER. 2013. Endothelial microparticles: sophisticated vesicles modulating vascular function. *Vasc Med* 18(4):204–214.

Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. 2007. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circ Res* 11(5):1285-1295.

Diamant M, Tushuizen ME, Sturk A, Nieuwland R. 2004. Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease?. *European Journal of Clinical Investigation* 1(34):392–401.

Dignat-George F, Boulanger CM. 2011. The many faces of endothelial microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1(31):27-33.

Dragovic RA, Gardiner C, Brooks AS. 2011. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using nanoparticle tracking analysis. *Nanomed* 7(6): 780-788.

Duprez DA, Hearst MO, Lutsey PL, Herrington DM, Ouyang P, Barr RG, Bluemke DA, McAllister D, Carr JJ, Jacobs Jr DR. 2013. Associations among lung function, arterial elasticity, and circulating endothelial and inflammation markers: the multiethnic study of atherosclerosis. *Hyperten Res* 61(2):542-548.

Duval A, Helley D, Capron L, Youinou P, Renaudineau Y, Dubucquoi S, Fischer AM, Hachulla E. 2010. Endothelial dysfunction in systemic lupus patients with low disease activity: evaluation by quantification and characterization of circulating endothelial microparticles, role of anti-endothelial cell antibodies. *Rheuma (Oxford)* 49(6):1049-1055.

Esteller A. 2005. Biología de la pared vascular y síndrome metabólico. *Nutr Hosp XX* 1(1):5-17.

Feng B, Chen Y, Luo Y, Chen M, Lia X, Nia Y. 2010. Circulating level of microparticles and their correlation with arterial elasticity and endothelium-dependent dilation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Athero Res* 208(1):264–269.

Garcia-Cardena G, Gimbrone M. 2006. Biomechanical modulation of endothelial phenotype: implications for health and disease. *Handb Exp Pharmacol* 176(2):75-95.

Gelderman MP and Simak J. 2008. Flow cytometric analysis of cell membrane microparticles. *Methods Mol Biol* 4(84):79-93.

Glowinska B, Urban M, Peczynska J, Florys B. 2005. Soluble adhesion molecules (sICAM-1, sVCAM-1) and selectins (sE-selectin, sP-selectin, sL-selectin) levels in children and adolescents with obesity, hypertension, and diabetes. *Metabol* 1(54):1020–1026.

Goke M, Hoffmann JC, Evers J, Krüger H, Manns MP. 1997. Elevated serum concentrations of soluble selectin and immunoglobulin type adhesion molecules in patients with inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 1(32):480–486.

González-Quintero VH, Jiménez JJ, Jy W, Mauro LM, Hortman L, O'Sullivan MJ, Ahn Y. 2003. Elevated plasma endothelial microparticles in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 189(2):589-593.

Guan G, Han H, Yang Y, Jin Y, Wang X, Liu X. 2014. Neferine prevented hyperglycemia-induced endothelial cell apoptosis through suppressing ROS/Akt/NF-κB signal. *Endo* 1(1):11-18.

Hargett LA, Bauer NN. 2013. On the origin of microparticles: from “platelet dust” to mediators of intercellular communication. *Pulm Circ* 3(2):329-340.

Heimrath J, Paprocka M, Czekanski A, Ledwozyw A, Kantor A, Dus D. 2014. Pregnancy-induced hypertension is accompanied by decreased number of circulating endothelial cells and circulating endothelial progenitor cells. *Arch Immunol Ther Exp* 1(1): 20-29.

Hellmann J, Zhang MJ, Tang Y, Rane M, Bhatnagar A, Spite M. 2013. Increased saturated fatty acids in obesity alter resolution of inflammation in part by stimulating prostaglandin production. *J Immunol* 1;191(3):1383-1392.

Herring JM, McMichael MA, Smith SA. 2013. Microparticles in health and disease. *J Vet Intern Med* 1(27):1020–1033.

Hillebrands J. 2003. Origin of vascular smooth muscle cells and the role of circulating stem cells in transplant arteriosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(1):8-20.

Horstman LL, Jy W, Jimenez JJ, Ahn YS. 2004a. Endothelial microparticles as markers of endothelial dysfunction. *Front Biosci* 1(9):1118-1135.

Horstman LL, Jy W, Jimenez JJ, Bidot C, Ahn YS. 2004b. New horizons in the analysis of circulating cell-derived microparticles. *Keio J Med* 53(4):210-230.

Ibrahim SF, van den Engh G. 2007. Flow cytometry and cell sorting. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 10(6):19-39.

INEGI. 2013. Estadísticas de mortalidad, Datos nacionales en México. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp>. Fecha de acceso: 27 de Agosto de 2014.

Jain K, Suryakumar G, Ganju L, Singh SB. 2014. Differential hypoxic tolerance is mediated by activation of heat shock response and nitric oxide pathway. *Cell Stress Chap* 1(1):612-615.

Jeanneteau J, Hibert P, Martinez MC, Tual-Chalot S, Tamareille S, Furber A, Andriantsitohaina R, Prunier F. 2012. Microparticle release in remote ischemic conditioning mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 303(7):871-877.

Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Soderland C, Horstman LL, Ahn YS. 2003. Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Thromb Res* 109(4):175-180.

Johansson PI, Haase N, Perner A, Ostrowski SR. 2014. Association between sympathoadrenal activation, fibrinolysis, and endothelial damage in septic patients: A prospective study. *J Crit Care* 1(14):12-14.

Kaczmarek E, Bakker JP, Clarke DN, Csizmadia E, Kocher O, Veves A, Tecilazich F, O'Donnell CP, Ferran C, Malhotra A. 2013. Molecular biomarkers of vascular dysfunction in obstructive sleep apnea. *PLoS ONE* 8(7):1-9.

Kameno Y, Iwata K, Matsuzaki H, Miyachi T, Tsuchiya KJ, Matsumoto K, Iwata Y, Suzuki K, Nakamura K, Maekawa M, Tsujii M, Sugiyama T, Mori N. 2013. Serum levels of soluble platelet endothelial cell adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 are decreased in subjects with autism spectrum disorder. *Mol Autism* 4(1):19-26.

Katayama M, Handa M, Araki Y, Ambo H, Kawai Y, Watanabe K, Ikeda Y. 1993. Soluble P-selectin is present in normal circulation and its plasma level is elevated in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura and haemolytic uraemic syndrome. *Br J Haematol* 84(4):702-710.

Koga H, Sugiyama S, Kugiyama K, Watanabe K, Fukushima H, Tanaka T, Sakamoto T, Yoshimura M, Jinnouchi H, Ogawa H. 2005. Elevated levels of VE-cadherin-positive endothelial microparticles in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *JACC* 10(45):1622-1630.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. 2010. *Patología estructural y funcional*. 8va ed. ELSEVIER. España, S.L. 490-495 p.

Lacroix R, Robert S, Poncelet P, Dignat-George F. 2010. Overcoming limitations of microparticle measurement by flow cytometry. *Semin Thromb Hemost* 36(8):807-18.

Lares MC, Castro J, Brito S, Obregón O. 2005. Evaluación de un marcador de inflamación vascular VCAM-1 y su asociación con factores protromboticos en una población normal y otra con diabetes tipo 2. *AVFT* 2(25):6-14.

La Vignera S, Condorelli RA, Tumino S, Di Mauro M, Vicari E, Calogero AE. 2012. Original evaluation of endothelial dysfunction in men with erectile dysfunction and metabolic syndrome. *Int J Impot Res* 24(4):150-4.

Macías C, Villaescusa R, Valle L, Boffil V, Cordero G, Hernández A, Hernández P, Ballester JM. 2003. Moléculas de adhesión endoteliales ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina en pacientes con síndrome coronario agudo. *Rev Esp Cardiol* 1(56):137-144.

Mannucci PM. 1998. von Willebrand factor: a marker of endothelial damage? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*18(9):1359-1362.

Markiewicz M, Richard E, Marks N, Ludwicka-Bradley A. 2013. Impact of endothelial microparticles on coagulation, inflammation and angiogenesis in age-related vascular diseases. *J Aging Res* 3(1):1-11.

Martinez MC, Andriantsitohaina R. 2011. Microparticles in angiogenesis as therapeutic potential. *Circ Res* 1(109)110-119.

Mause SF, Weber C. 2010. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ Res* 107(9):1047-1057.

Monnier J, Lewén S, O'Hara E, Huang K, Tu H, Butcher EC, and Zabel BA. 2012. Expression, Regulation and Function of Atypical Chemerin Receptor CCRL2 on Endothelial Cells. *J Immunol* 189(2): 956–967.

Morel O, Toti F, Morel N, Freyssinet JM. 2009. Microparticles in endothelial cell and vascular homeostasis: are they really noxious?. *Haema* 94(3):313-318.

Morel O, Jesel L, Freyssinet JM, Toti F. 2011. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1(31):15-26.

Mostefai HA, Andriantsitohaina R, Martínez MC. 2008. Plasma membrane microparticles in angiogenesis: role in ischemic diseases and in cancer. *Physiol Res* 57(3):311-20.

Nguyen DB, Wagner-Britz L, Maia S, Steffen P, Wagner C, Kaestner L, Bernhardt I. 2011. Regulation of phosphatidylserine exposure in red blood cells. *Cell Physiol Biochem* 1(28):847-856.

Nielsen MH, Beck-Nielsen H, Andersen MN, Handberg A. 2014. A flow cytometric method for characterization of circulating cell-derived microparticles in plasma. *J Extracell Vesicles* 4(3):1-12.

Nomura S, Inami N, Shouzu A, Urase F, Maeda Y. 2009. Correlation and association between plasma platelet-, monocyte- and endothelial cell-derived microparticles in hypertensive patients with type 2 diabetes mellitus. *Plalets* 20(6):406-414.

Nozaki T, Sugiyama S, Koga H. 2009. Significance of a multiple biomarkers strategy including endothelial dysfunction to improve risk stratification for cardiovascular events in patients at high risk for coronary heart disease. *J Am Coll Cardiol* 54(7):601–608.

Nozaki T, Sugiyama S, Sugamura K, Ohba K, Matsuzawa Y, Konishi M, Matsubara J, Akiyama E, Sumida H, Matsui K, Jinnouchi H, Ogawa H. 2010. Prognostic value of endothelial microparticles in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail* 12(11):1223-1228.

OMS. 2013. Observatorio de salud mundial, Ginebra, Organización Mundial de la Salud. http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/ES_WHS2012_Full.pdf. Fecha de acceso: 28 de Agosto de 2014.

Onat D, Brillon D, Colombo PC, Schmidt AM. 2011. Human vascular endothelial cells: a model system for studying vascular inflammation in diabetes and atherosclerosis. *Curr Diab Rep* 11(3)193-202.

Owens III AP, Mackman N. 2011. Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ Res* 11(108):1284-1297.

Page AV, Liles WC. 2013. Biomarkers of endothelial activation/dysfunction in infectious diseases. *Virulen* 4(6):507-16.

Pepinsky B, Hession C, Chen LL, Moy P, Burkly L, Jakubowski A, Chow EP, Benjamin C, Rosso GC, Luhowskyj S, Lobb R. 1992. Structure/function studies on vascular cell adhesion molecule-1. *J Bio Chem* 25(267):17820-17826.

Perez AE. 2005. Biología de la pared vascular y síndrome metabólico. *Nutr. Hosp.* n.1. 17(20):212-261.

Pober JS, Min W, Bradley JR. 2009. Mechanisms of endothelial dysfunction, injury, and death. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 4(1):71-95.

Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G, Nishigaki I. 2013. The vascular endothelium and human diseases. *Int. J Biol Sci* 9(10):1057-1069.

Rautou PE, Vion AC, Amabile N, Chironi G, Simon A, Tedgui A, Boulanger CM. 2011. Microparticles, vascular function, and atherothrombosis. *Circ Res* 1(109):593-606.

Rubio-Guerra AF, Vargas-Robles H, Serrano AM, Lozano-Nuevo JJ, Escalante-Acosta BA. 2009. Correlation between the levels of circulating adhesion molecules and atherosclerosis in type-2 diabetic normotensive patients: circulating adhesion molecules and atherosclerosis. *Cell Adh Migr* 3(4):369-372.

Sata M. 2006. Role of circulating vascular progenitors in angiogenesis, vascular healing, and pulmonary hypertension: lessons from animal models. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(5):1008-1014.

Saidi H, Vakilian M, Noori GH, Ghafouri HB, Abazarian N. 2013. Alterations in circulating adhesion molecules in acute myocardial infarction before and after thrombolysis with streptokinase. *J Cardiovasc Thorac Res* 5(4):139-141.

Schoen FJ. 2010. *Interventional and Surgical Cardiovascular Pathology: Clinical Correlations and Basic Principles*. Philadelphia, WB Saunders. 254 p.

Shantsila E, Montoro-García S, Gallego P, Lip GY. 2014. Circulating microparticles: challenges and perspectives of flow cytometric assessment. *Thromb Haemost* 111(6):1-6.

Shimizu K, Mitchell RN. 2003. Stem cell origins of intimal cells in graft arterial disease. *Curr Athero Rep* 5(3):230-237.

Simak J, Gelderman MP, Yu H. 2006. Circulating endothelial microparticles in acute ischemic stroke: A link to severity, lesion volume and outcome. *J Thromb Haemost* 4(6):1296-1302.

Skibsted S, Jones AE, Puskarich MA, Arnold R, Sherwin R, Trzeciak S, Schuetz P, Aird WC, Shapiro NI. 2013. Biomarkers of endothelial cell activation in early sepsis. *Shock* 39(5):427-432.

Stevens T. 2001. NHLBI workshop report: endothelial cell phenotypes in heart, lung, and blood diseases. *Am J Physiol Cell Physiol* 281(5):1422-1433.

Sultana S, Goslinga M, Nagaseb H, Powella JT. 2004. Shear stress-induced shedding of soluble intercellular adhesion molecule-1 from saphenous vein endothelium. *FEBS Letters* 564(1):161-165.

Susienka MJ, Medici D. 2013. Vascular endothelium as a novel source of stem cells for bioengineering. *Landes Bioscience Special focus review. Biomatter* 3(3):224-234.

Thorburn K, Baines PB. 2013. Broken barriers, biomarkers, and blocking antibodies-endothelial activation in sepsis. *Pediatr Crit Care Med* 14(7):720-721.

Tortora GJ, Derrickson B. 2006. *Principios de anatomía y fisiología*. 11va Edición. Editorial Médica Panamericana. 741-747 p.

Tramontano AF, Lyubarova R, Tsiakos J, Palaia T, Deleon JR, Ragolia L. 2010. Circulating endothelial microparticles in diabetes mellitus. *Mediators Inflamm* 10(2):47-60.

Triggle CR, Samuel SM, Ravishankar S, Gnanapragasam-Arunachalam IM, Ding H. 2012. The endothelium: influencing vascular smooth muscle in many ways. *Can J Physiol Pharmacol* 90(6):713-738.

Van-Ierssel SH, Van-Craenenbroeck EM, Hoymans VY, Vrints CJ, Conraads VM, Jorens PG. 2013. Endothelium dependent vasomotion and in vitro markers of endothelial repair in patients with severe sepsis: an observational study. *PLoS One* 8(8):1-8.

Vega A, Pérez García R, Abad S, Verde E, López-Gómez JM, Jofré R, Puerta M, Rodríguez P. 2008. Enfermedad vascular periférica: prevalencia, mortalidad y asociación con inflamación en hemodiálisis. *Rev de Nefro* 28(3):311-316.

Vestweber D1, Winderlich M, Cagna G, Nottebaum AF. 2009. Cell adhesion dynamics at endothelial junctions: VE-cadherin as a major player. *Trends Cell Biol* 19(1):8-15.

Videm V, Albrigtsen M. 2008. Soluble ICAM-1 and VCAM-1 as markers of endothelial activation. *Scandi Jour Immn* 67(5);523–531.

Wang JM, Su C, Wang Y. 2009. Elevated circulating endothelial microparticles and brachial-ankle pulse wave velocity in well-controlled hypertensive patients. *J Hum Hypertens* 23(5):307–315.

Werling NJ, Thorpe R, Zhao Y. 2013. A Systematic Approach to the Establishment and Characterization of Endothelial Progenitor Cells for Gene Therapy. *Hum Gene Ther Methods* 24(3): 171–184.

Wiseman S, Marlborough F, Doubal F, Webb DJ, Wardlaw J. 2014. Blood markers of coagulation, fibrinolysis, endothelial dysfunction and inflammation in lacunar stroke versus non-lacunar stroke and non-stroke: systematic review and meta-analysis. *Cerebrovasc Dis* 1(37):64–75.

Wu ZH, Ji CL, Li H, Qiu GX, Gao CJ, Weng XS. 2013. Membrane microparticles and diseases. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 17(18):2420-2427.

Yong PJ, Koh CH, Shim WS. 2012. Endothelial microparticles: missing link in endothelial dysfunction?. *Eur J Prev Cardiol* 20(3):496-512.

Yoshida T, Cai Sj, Inouye M. 2002. Interaction of EnvZ, a sensory histidine kinase, with phosphorylated OmpR, the cognate response regulator *Mol Microbiol* 46(5):1283-1294.

Zhi-Ling Q, Jun-Ping Z, Xiao-Chen G. 2014. Endoplasmic reticulum stress and vascular endothelial cell apoptosis. *Med Acade Act Sinic* 36(1):102-107.

Zhu L, Shi S, Liu L, Lv J, Zhang H. 2013. Increased plasma sVCAM-1 is associated with severity in IgA. *BMC Nephrol* 22:(14):21-25.

ANEXO 1

Carta de Consentimiento Informado

Yo _____, manifiesto haber sido invitado (a) por la Universidad de Sonora, para participar en el proyecto “Estudio piloto para estimar la proporción de la molécula de adhesión a células vasculares 1 unida a micropartículas plasmáticas y de su forma soluble”; cuyo objetivo es el de “Estimar la proporción del marcador de daño endotelial VCAM-1 unida a micropartículas plasmáticas y en su forma soluble”.

Me han informado que los resultados de este proyecto podrían ayudar a la identificación y tratamiento oportuno de las complicaciones vasculares que presentan los pacientes con Diabetes Mellitus. También me han informado que si acepto participar en el estudio donaré una muestra de sangre venosa tomada en ayuno de 8-12 h de 10mL y que el procedimiento tiene riesgos mínimos.

Se me ha explicado con claridad en qué consiste este estudio, además se me ha dado la oportunidad de hacer preguntas y todas mis preguntas han sido contestadas a mi satisfacción. Se me ha dado una copia de este formato.

Al firmar este formato estoy de acuerdo en participar en la investigación que aquí se describe.

No autorizo

Sí autorizo mi participación en el estudio y que se me tome la muestra de sangre venosa que se empleará en el laboratorio para los estudios pertinentes.

Nombre del Participante

Firma del Participante

Fecha

Firma del encargado de obtener el consentimiento informado

Le he explicado el estudio de investigación al participante y he contestado todas sus preguntas. Creo que él/ella entiende la información descrita en este documento y libremente da su consentimiento a participar en este estudio de investigación.

Dra. Jesús Adriana Soto Guzmán (investigador responsable)

Firma del Investigador Responsable del Proyecto Fecha

Firma de los testigos

Mi firma como testigo certifica que el/la participante firmó este formato de consentimiento informado en mi presencia y de manera voluntaria.

Nombre del Testigo 1.

Firma del Testigo Fecha (debe ser igual que la del participante)

Nombre del Testigo 2.

Firma del Testigo Fecha (debe ser igual que la del participante)

Firma de aceptación para participar en el proyecto: _____

Lugar y Fecha: _____