

https://doi.org/10.24245/rev_hematol.v26i1.2

Relación del TLR2 y TLR4 con alteraciones plaquetarias en pacientes yucatecos con diabetes tipo 2

TLR2 and TLR4 relation with platelet abnormalities in Yucatecan patients with type 2 diabetes.

Yumi Elena Nakazawa Ueji, Juan Daniel Villarreal Kú, Irma Guadalupe Quintal Ortiz, Ligia Gabriela Alonzo Salomón, Lucía Guadalupe González Espinosa, Isaac Alberto López Briceño, Shilia Stephanie Chab Escalante, Nina Valadez González, Guillermo Valencia Pacheco

Resumen

OBJETIVO: Evaluar la expresión de los receptores tipo Toll 2 y 4 (TLR2 y TLR4) y su relación con las alteraciones plaquetarias en pacientes yucatecos con diabetes tipo 2.

MATERIALES Y MÉTODOS: Estudio transversal, comparativo, efectuado del 1 de enero de 2020 al 4 de octubre de 2021 en pacientes con diabetes tipo 2 y sujetos control de Yucatán, a los que se les practicó citometría hemática, cuantificación de glucosa y perfil de lípidos, agregación y activación plaquetaria, y expresión de TLR2 y TLR4 en plaquetas.

RESULTADOS: Se incluyeron 34 pacientes con diabetes tipo 2 y 33 sujetos control. La glucemia fue mayor en pacientes que en controles, pero no se observaron diferencias en la agregación ni en la activación plaquetaria. La intensidad media de fluorescencia (IMF) de TLR2 mostró correlación con la agregación plaquetaria en pacientes ($p = 0.204$) y en controles ($p = 0.0328$). El tiempo de agregación plaquetaria mostró correlación con los porcentajes de expresión de TLR2 y TLR4 ($p = 0.0309$ y $p = 0.0070$, respectivamente), únicamente en el grupo control.

CONCLUSIONES: TLR2 y TLR4 podrían estar vinculados con alteraciones plaquetarias en la población yucateca.

PALABRAS CLAVE: Receptores tipo Toll; agregación plaquetaria; diabetes tipo 2.

Abstract

OBJECTIVE: To evaluate the expression of Toll-like receptors 2 and 4 (TLR2 and TLR4) and their relationship with platelet alterations in Yucatecan patients with type 2 diabetes.

MATERIALS AND METHODS: Comparative cross-sectional study was done from January 1st 2020 to October 4th 2021, which included type 2 diabetes patients and controls from Yucatan, who underwent blood cytometry, glucose quantification and lipid profile, platelet aggregation and activation, and the expression of TLR2 and TLR4 in platelets.

RESULTS: There were included 34 patients with type 2 diabetes and 33 control subjects. Blood glucose was higher in patients than controls, but no differences were seen in platelet aggregation or activation. TLR2 mean fluorescence intensity (MFI) showed a correlation with platelet aggregation in diabetic ($p = 0.204$) and control group ($p = 0.0328$). Platelet aggregation time was only correlated with expression percentage of TLR2 and TLR4 ($p = 0.0309$ and $p = 0.0070$, respectively) in the control group.

CONCLUSIONS: TLR2 and TLR4 could be related with platelet alterations in the Yucatecan population.

KEYWORDS: Toll-like receptors; Platelet aggregation; Type 2 diabetes.

Laboratorio de Hematología, Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México.

Recibido: 16 de abril 2024

Aceptado: 17 de diciembre 2024

Correspondencia

Guillermo Valencia Pacheco
vpacheco@correo.uady.mx

Este artículo debe citarse como: Nakazawa-Ueji YE, Villarreal-Kú JD, Quintal-Ortiz IG, Alonzo-Salomón LG, González-Espinosa LG, López-Briceño IA, Chab-Escalante SS, Valadez-González N, Valencia-Pacheco G. Relación del TLR2 y TLR4 con alteraciones plaquetarias en pacientes yucatecos con diabetes tipo 2. Hematol Méx 2025; 1: 1-14.

ANTECEDENTES

La diabetes tipo 2 es una enfermedad crónica metabólica multifactorial, caracterizada por hiperglucemia, poliuria, polifagia, polidipsia, pérdida de peso e infecciones recurrentes, entre otras manifestaciones.^{1,2} Los principales factores de riesgo incluyen el sedentarismo, el sobrepeso, la obesidad, la hipertensión, la hipercolesterolemia, el síndrome metabólico, la hipertrigliceridemia, la inflamación, la edad, los antecedentes familiares y el sexo.^{3,4} La hiperglucemia provoca hiperactividad pancreática, lo que induce el incremento de la secreción y resistencia a la insulina, producción de glucosa hepática, disminución del tejido adiposo y muscular que, finalmente, podría favorecer la aparición de enfermedades cardiovasculares, como consecuencia de alteraciones plaquetarias.^{3,5}

Las plaquetas son células metabólicamente activas que carecen de núcleo, generalmente unidas a vasos dañados que forman trombos para evitar el sangrado; sin embargo, también se agregan en las placas ateroscleróticas o en sitios de erosión endotelial, lo que contribuye a la aparición de aterosclerosis.⁶ Los pacientes con diabetes tipo 2 tienen hiperactividad e hiperagregación plaquetaria, además de aumento en los índices plaquetarios, volumen plaquetario medio, ancho de la distribución plaquetaria y la proporción de macroplaquetas (P-LCR), lo que sugiere que la morfología y la activación de vías de señalización plaquetarias podrían estar asociadas con mayor riesgo de enfermedad cardiovascular en estos pacientes.^{6,7}

Las plaquetas expresan receptores para integritas, glicoproteínas (GPIb/IX/V), receptores tipo Toll, cinasas de tirosina e inmunoglobulinas (glucoproteína VI [GPVI] y FcγRIIA).⁶ Los receptores tipo Toll son una familia de receptores, cuyas proteínas de señalización se han asociado con el estado proinflamatorio causado por la

hiperglucemia en diabetes tipo 2, y han mostrado correlación con la enfermedad coronaria y la función plaquetaria, porque participan en la secreción de sus gránulos, formación de trombos, agregación, activación y la producción de especies reactivas de oxígeno.^{8,9,10}

El receptor tipo Toll 2 (TLR2) induce la secreción de gránulos y del tromboxano al participar en la agregación de plaquetas-neutrófilos y la liberación de interleucina 1 beta (IL-1β), como respuesta al reconocimiento de ligandos bacterianos, como el lipopéptido tripalmitoilado Pam3CysSerLys4 (Pam3CSK4) y derivados de fosfatidiletanolamina carboxilpirrol (CAP-Pes), y de las histonas H3 y H4.^{11,12} El receptor tipo Toll 4 (TLR4) es activado por el lipopolisacárido y se ha evidenciado que induce la activación plaquetaria, lo que conduce a su degranulación, la secreción de adenosín difosfato (ADP), la liberación y síntesis de tromboxano que, a su vez, resulta en un aumento en la activación y reclutamiento de plaquetas en el trombo; sin embargo, su papel en la hiperagregación plaquetaria en diabetes 2 se desconoce.^{8,13} El objetivo de este estudio fue evaluar la expresión de TLR2 y TLR4 y su relación con las alteraciones plaquetarias en pacientes yucatecos con diabetes 2.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio transversal, comparativo, efectuado del 1 de enero de 2020 al 4 de octubre de 2021, en el que se incluyeron pacientes diagnosticados con diabetes 2 y sujetos control, originarios de Yucatán, México. Se excluyeron los pacientes y controles con alguna otra enfermedad crónico-degenerativa, infecciosa o que recibieran tratamiento con fármacos anticoagulantes o antiinflamatorios. Cada participante aceptó, de manera voluntaria, colaborar con el estudio mediante la firma del consentimiento informado, de acuerdo con la Declaración de Helsinki. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética del Centro de Investigaciones Regionales Dr.

Hideyo Noguchi de la Universidad Autónoma de Yucatán (CEI-11-2019).

Diseño experimental

A partir de la muestra de sangre periférica de cada participante, se llevó a cabo la citometría hemática, química sanguínea, glucosa y perfil de lípidos, y se obtuvo el plasma rico en plaquetas a partir del cual se determinó la agregación plaquetaria y la expresión de P-selectina (CD62P), TLR2 y TLR4. **Figura 1**

Determinación de parámetros hematológicos y bioquímicos

Los parámetros hematológicos y bioquímicos se evaluaron a partir de una muestra de 6 mL de sangre venosa colectada en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 5 mL de sangre colectada en un tubo con gel separador y 10 mL de sangre con citrato de sodio, respectivamente. La citometría hemática se practicó con el equipo automatizado XP-300 de Sysmex® y se verificó

mediante tinción de Wright. La cuantificación de glucosa y perfil de lípidos (colesterol total, lipoproteínas de alta densidad [HDL], lipoproteínas de baja densidad [LDL] y triglicéridos) se hizo a partir del suero obtenido mediante centrifugación a 3500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, utilizando el Point Scientific® kit, siguiendo las recomendaciones del fabricante, y se analizaron en el equipo automatizado InCCa Bit de Diconex®.

Agregación plaquetaria

La agregación plaquetaria se efectuó a partir de la sangre con citrato de sodio. El plasma rico en plaquetas se obtuvo mediante centrifugación de la muestra de sangre a 900 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se transfirió a un tubo nuevo, se cuantificó con un analizador hematológico KX21N Sysmex® y se ajustó a una concentración de 250×10^3 plaquetas/ μL . La sangre restante se centrifugó de nuevo para obtener el plasma pobre en plaquetas. La agregación plaquetaria se determinó utilizando adenosín difosfato a una concentración de 1 mM, como agonista, y el kit Chrono-par and chrono-lume reagents®, usando el agregómetro PAP8E BIO/DATA, que se calibró a partir de $45 \mu\text{L}$ de plasma rico en plaquetas y $450 \mu\text{L}$ de plasma pobre en plaquetas, utilizando el programa Aggrolink. Se ajustó la densidad óptica para iniciar en 0, se agregó el agonista, se incubó durante 5 minutos a 37°C y se determinó el tiempo y porcentaje de agregación.^{14,15}

Expresión de TLR2 y TLR4 en plaquetas. A partir del plasma rico en plaquetas se transfirieron 1×10^8 plaquetas/ μL a tres tubos, se fijaron durante 30 minutos a 4°C en oscuridad, utilizando el Staining Flow Assay kit (IMGENEX IC-Flow). Se hicieron dos lavados adicionando 1 mL de amortiguador de fosfatos 1X pH 7.3, suplementado con suero fetal bovino al 1%, y centrifugando a 2000 rpm, durante 10 minutos. Para la detección de los receptores tipo toll en

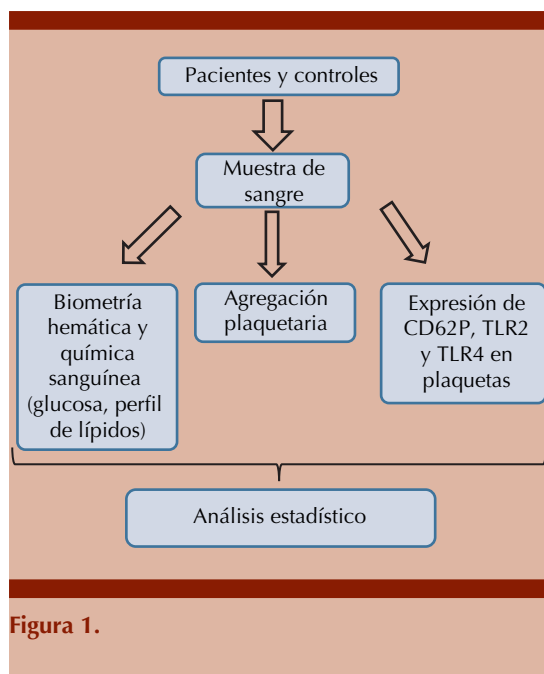


Figura 1.

plaquetas activadas se agregaron 3 μ L de los siguientes anticuerpos: 1) CD41/CD61-PE (Cat. 359806)/CD62P-FITC (Cat. 304904), 2) CD41/CD61-PE/TLR2-FITC (Cat. 309705), 3) CD62P-FITC/TLR4-PE (Cat. 312805), de BioLegend®, a cada tubo. Se incubaron durante 30 minutos, a temperatura ambiente y en oscuridad, se lavaron y centrifugaron durante 10 minutos a 2000 rpm. Las plaquetas fueron resuspendidas en 350 μ L de amortiguador de fosfatos 1x pH 7.3.¹⁵⁻¹⁸ Las muestras se analizaron en el citómetro de flujo FACScallibur (BD Biosciences®). El porcentaje de plaquetas activadas (CD41/CD61/CD62P), así como la expresión y la intensidad media de fluorescencia (IMF) de TLR2, TLR4 y CD62P en las plaquetas, se determinaron con el programa CellQuest Pro v5.1. (BD Biosciences®). La población de plaquetas se delimitó a partir de la distribución del *forward scatter* (FSC) versus *side scatter* (SSC) y el marcador CD41/CD61.

Análisis estadístico

Se compararon los parámetros hematológicos, bioquímicos y los de expresión de CD62P, TLR2 y TLR4, entre pacientes y controles, mediante la prueba U de Mann-Whitney. El análisis de correlación, entre los parámetros hematológicos y bioquímicos con los de expresión, se hizo mediante la prueba de Spearman. La agregación plaquetaria (tiempo y porcentaje), la activación plaquetaria y la expresión de TLR2 y TLR4 se analizaron con una *n* de 34 pacientes con diabetes tipo 2 (23 mujeres y 11 hombres) y 33 controles (22 mujeres y 11 hombres). Todos los análisis se graficaron utilizando el programa Graph Pad Prism 9.0; los valores de $p < 0.05$ se consideraron significativos.

RESULTADOS

Se incluyeron 34 pacientes diagnosticados con diabetes tipo 2 (23 mujeres y 11 hombres) y 33 controles (22 mujeres y 11 hombres), con edad

promedio de 52.55 ± 8.61 y 45.42 ± 9.33 años, respectivamente. El parámetro bioquímico con mayor variación fue la glucosa en ayuno, con un promedio de 202.76 ± 83.72 mg/dL en pacientes y 90.99 ± 9.76 mg/dL en controles ($p < 0.0001$). En la citometría hemática se observaron valores significativamente disminuidos de eosinófilos en pacientes ($p = 0.0365$) con respecto a los controles. Los demás parámetros hematológicos no mostraron diferencias significativas. Se observó una disminución no significativa ($p = 0.5147$) de los tiempos de agregación plaquetaria en pacientes (118.35 ± 89.80 segundos), en comparación con los controles (130.64 ± 87.42 segundos). **Figura 2A**

El porcentaje de agregación no mostró diferencias significativas entre los grupos ($p = 0.8134$) (**Figura 2B**), ni entre las mujeres ($p = 0.8705$) y los hombres ($p = 0.4106$). **Figura 2C y D**

De los 34 pacientes con diabetes tipo 2, 30 recibían tratamiento con metformina y 11 con sulfonilureas.

El análisis de correlación de los índices plaquetarios con la edad, glucosa en ayuno, colesterol total, triglicéridos e índice de aterogenicidad en mujeres y hombres mostró una correlación entre el índice de aterogenicidad con el volumen plaquetario medio ($p = 0.0189$), P-LCR ($p = 0.0490$) y el ancho de distribución ($p = 0.0042$) solo en hombres con diabetes tipo 2. En controles femeninos, únicamente se encontró correlación del índice de aterogenicidad con la agregación plaquetaria ($p = 0.0317$).

La activación plaquetaria, dada por la expresión e intensidad media de fluorescencia de CD62P, fue mayor en los controles, sin ser estadísticamente significativa (**Figura 3A**) y la estratificación por sexo mostró resultados similares. **Figura 3C-F**

La expresión de receptores tipo Toll mostró un aumento en el porcentaje de TLR2 y TLR4 en los

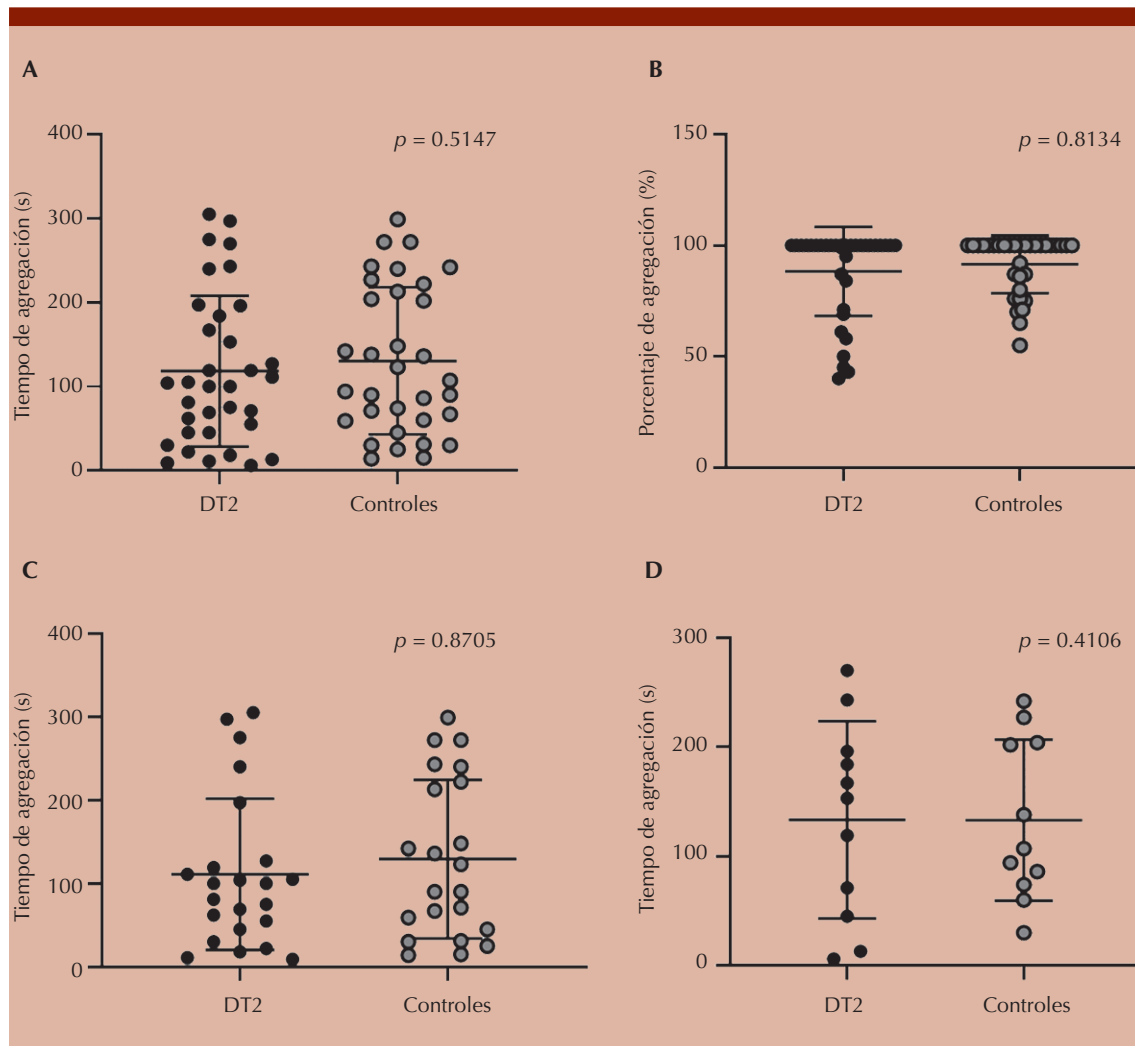


Figura 2. Análisis comparativo del porcentaje y tiempo de agregación plaquetaria entre pacientes con diabetes tipo 2 y controles. Comparación del tiempo (A) y porcentaje (B) de agregación plaquetaria entre pacientes y controles totales, así como tiempo de agregación en mujeres (C) y en hombres (D).

controles ($18.3 \pm 19.3\%$ y $12.2 \pm 13.2\%$, respectivamente) en comparación con los pacientes ($14.9 \pm 15.8\%$ y $17.1 \pm 15.3\%$, respectivamente), sin ser significativos ($p = 0.6140$ y $p = 0.1076$).

Figura 4A y C

La intensidad media fluorescencia (IMF) de estos receptores mostró resultados similares ($p = 0.5445$ y $p = 0.9460$). **Figura 4B y D**

Al determinar la correlación de TLR2 y TLR4 con el tiempo de agregación plaquetaria y los índices plaquetarios, se encontró correlación inversa de la IMF de TLR2 con el tiempo de agregación plaquetaria en el grupo de diabetes tipo 2 ($p = 0.0204$). En el grupo control, el tiempo de agregación plaquetaria también mostró correlación negativa con el porcentaje de expresión ($p = 0.0309$) y la IMF ($p = 0.0328$) de TLR2, así

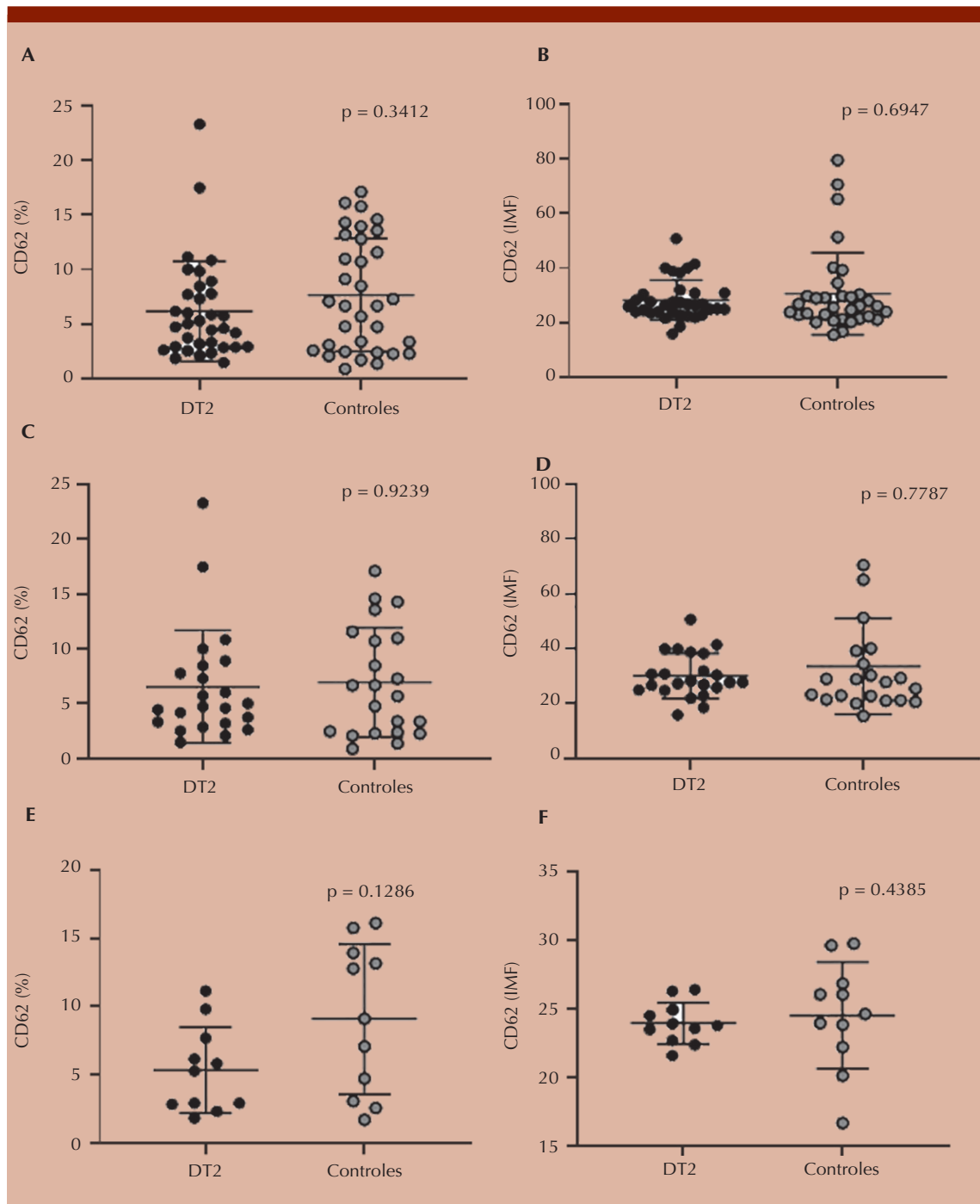


Figura 3. Análisis comparativo de la activación plaquetaria en pacientes con diabetes tipo 2 y controles. La activación plaquetaria se determinó mediante el porcentaje de expresión (%) de CD62P (A) y la intensidad media de fluorescencia (B) al comparar pacientes y controles y al estratificar en mujeres (C y D) y hombres (E y F). IMF: intensidad media de fluorescencia.

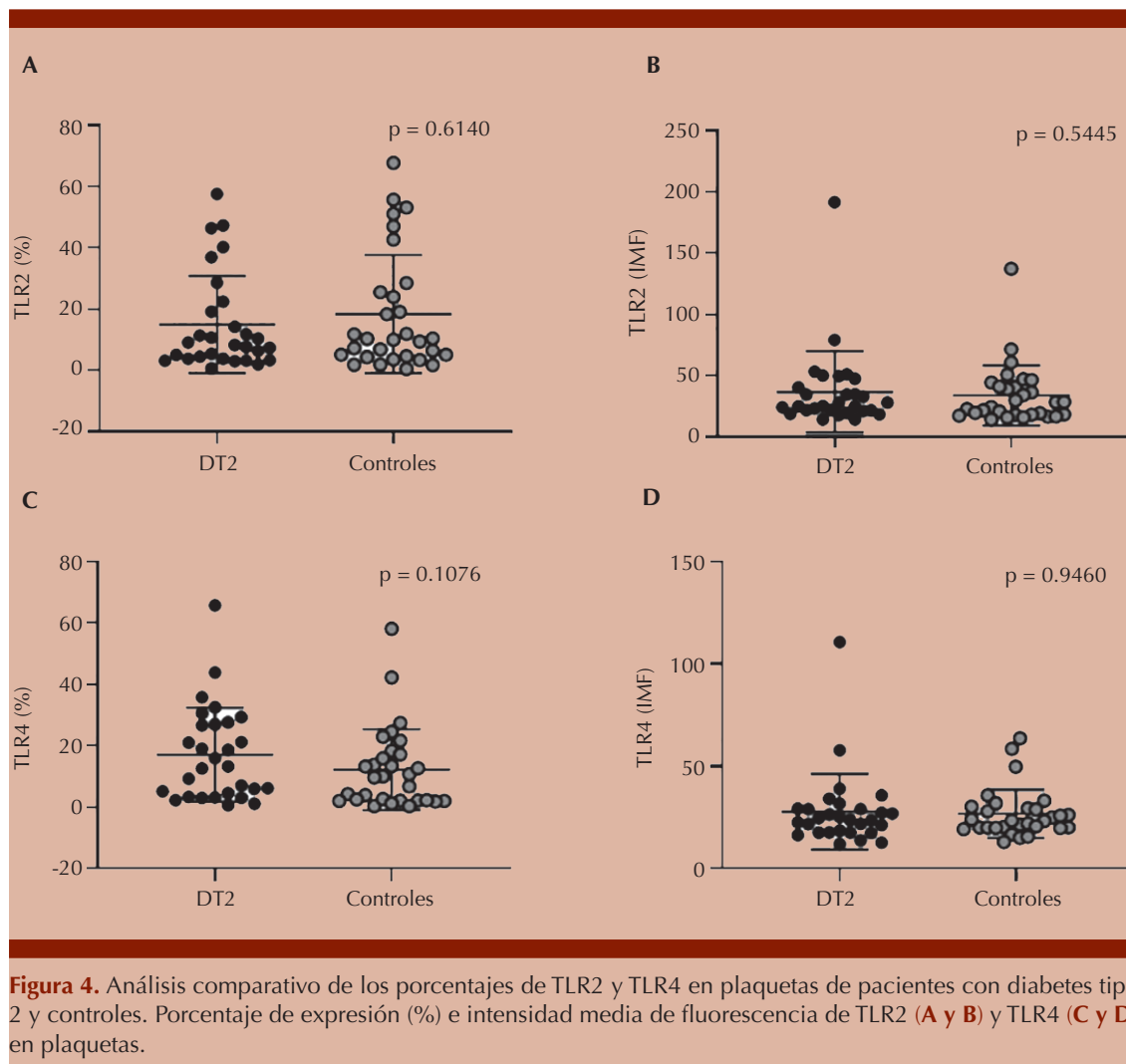


Figura 4. Análisis comparativo de los porcentajes de TLR2 y TLR4 en plaquetas de pacientes con diabetes tipo 2 y controles. Porcentaje de expresión (%) e intensidad media de fluorescencia de TLR2 (A y B) y TLR4 (C y D) en plaquetas.

como con la expresión de TLR4 ($p = 0.007$). Los índices plaquetarios no mostraron correlación significativa con TLR2 ni TLR4.

Para determinar el papel de TLR2 y TLR4 en la activación plaquetaria, se analizó su correlación con la expresión e IMF de CD62P y se encontró correlación de TLR2 con la IMF de CD62P en el grupo de diabetes tipo 2 ($p = 0.0200$) y el grupo control ($p = 0.0009$). Además, se observó correlación de la IMF de TLR2

y de CD62P en controles ($p < 0.001$), así como de la IMF de TLR4 con la expresión de CD62P ($p = 0.0210$) en diabetes tipo 2; y la expresión de TLR4 con la expresión y la IMF de CD62P ($p = 0.0015$ y $p = 0.0068$, respectivamente) en controles. **Cuadro 1**

DISCUSIÓN

Los eosinófilos participan en infecciones helmínticas, reacciones alérgicas y contienen

Cuadro 1. Análisis de correlación del porcentaje de expresión e intensidad media de fluorescencia de TLR2 y TLR4 con la activación plaquetaria (CD62P) en pacientes con diabetes tipo 2 (n = 34) y sujetos control (n = 33)

| Parámetro 1 | Parámetro 2 | R | p |
|--------------------------------------|-------------|---------|-------------------|
| Pacientes con diabetes tipo 2 | | | |
| TLR2 % | CD62P % | 0.1616 | 0.4023 |
| | CD62P IMF | 0.4296 | 0.0200 |
| TLR2 IMF | CD62P % | -0.1027 | 0.5959 |
| | CD62P IMF | 0.4783 | 0.0087 |
| Sujetos control | | | |
| TLR2 % | CD62P % | 0.0803 | 0.6731 |
| | CD62P IMF | 0.5724 | 0.0009 |
| TLR2 IMF | CD62P % | 0.1021 | 0.5913 |
| | CD62P IMF | 0.6756 | < 0.001 |
| Pacientes con diabetes tipo 2 | | | |
| TLR4 % | CD62P % | -0.0160 | 0.9343 |
| | CD62P IMF | 0.2557 | 0.1807 |
| TLR4 IMF | CD62P % | -0.4267 | 0.0210 |
| | CD62P IMF | -0.0123 | 0.9494 |
| Sujetos control | | | |
| TLR4 % | CD62P % | 0.5541 | 0.0015 |
| | CD62P IMF | 0.4833 | 0.0068 |
| TLR4 IMF | CD62P % | -0.1371 | 0.4702 |
| | CD62P IMF | -0.0020 | 0.9916 |

CD62P: P-selectina; IMF: intensidad media de fluorescencia; %: porcentaje de expresión.

todos los mediadores necesarios para regular la respuesta inmunitaria innata y adaptativa.¹⁹ Zhu y su grupo llevaron a cabo un estudio con 9111 participantes, con edad promedio de 58.5 ± 9.7 años, y encontraron asociación entre el aumento del porcentaje de eosinófilos y menor riesgo de diabetes tipo 2 (OR 0.91 [IC95% 0.85-0.97], p = 0.008).²⁰ Por el contrario, Jacobsen y colaboradores sugieren que tienen un papel protector en la aparición de diabetes tipo 2, al observar valores disminuidos de eosinófilos en estos pacientes.¹⁹

Los resultados de este estudio concuerdan con lo reportado con Jacobsen y colaboradores ya

que observamos valores bajos en los pacientes con diabetes tipo 2. Los eosinófilos, mediante su interacción célula-célula, pueden regular la homeostasia de la glucosa porque, al secretar interleucina 4 (IL-4), participan en la diferenciación de los adipocitos precursores, en blancos o pardos, disminuyendo la síntesis de citocinas proinflamatorias y masa grasa, lo que aumenta la termogénesis y el metabolismo e induce la respuesta antiinflamatoria a través de la activación de macrófagos en el tejido adiposo.²¹ Por ello, en la población de este estudio, la disminución de los eosinófilos en los diabéticos podría asociarse con el aumento en el estado inflamatorio, la disminución en la tolerancia a la glucosa, la

disminución en la activación de macrófagos y el aumento del tejido adiposo blanco. Sin embargo, es necesario efectuar estudios adicionales para determinar las concentraciones de IL-4, así como de citocinas proinflamatorias, incrementar el tamaño de muestra y estratificar a la población de acuerdo con parámetros como el índice de masa corporal (IMC), porcentaje de grasa corporal, tolerancia a la glucosa, sensibilidad o resistencia a la insulina, que no se incluyeron en este estudio.

Los índices plaquetarios se han vinculado con la resistencia a la insulina y la diabetes 2 y se han considerado biomarcadores de complicaciones vasculares.^{22,23} Taderegew y su grupo compararon los índices plaquetarios de 352 pacientes con diabetes tipo 2 de Etiopía y encontraron asociación del volumen plaquetario medio (OR = 1.68, IC95%: 1.37-2.05), adenosín difosfato (OR = 1.37, IC95%: 1.15-1.63) y la P-LCR (OR = 1.07, IC95%: 1.01-1.14), con las complicaciones microvasculares.²²

Waghale y su grupo analizaron 105 pacientes de India, con un tiempo de evolución de 30 años aproximadamente y encontraron aumento de volumen plaquetario medio, ancho de distribución plaquetaria y P-LCR en los pacientes con diabetes tipo 2.²³ En contraste, en este artículo no hubo correlación de los índices plaquetarios con la expresión de TLR2 ni TLR4, por lo que el análisis en pacientes con enfermedad cardiovascular proporcionaría más información para confirmar su papel como biomarcador de riesgo de esas complicaciones.

En un estudio longitudinal de 9 años, realizado en población originaria de Taiwán, en el grupo de edad de 40 a 65 años, se observó asociación del índice de aterogenicidad con hipertensión arterial, síndrome metabólico y diabetes tipo 2, independientemente del sexo.²⁴ Li y su grupo estudiaron su correlación con complicaciones microvasculares en pacientes de Wuhan, lo que sugiere su papel como indicador de alto riesgo de

padecer complicaciones vasculares en pacientes con diabetes tipo 2.²⁵

Risal y su grupo reportaron que, a menor control glucémico, mayor volumen plaquetario medio.²⁶ Los resultados de este estudio indican que, en el grupo de diabéticos masculinos, existe una correlación negativa de los índices plaquetarios con el índice de aterogenicidad, que se han asociado con el riesgo cardiovascular, y sugieren que el sexo podría ser un factor de riesgo de enfermedad cardiovascular en esta población; sin embargo, es probable que otros factores puedan influir, como el tratamiento, el IMC, la hipertensión arterial, las concentraciones de glucosa en sangre, colesterol total, triglicéridos, LDL, HDL, etc.

En la diabetes tipo 2 se ha reportado aumento en la agregación, activación basal e hiperreactividad plaquetaria, asociadas con alta morbilidad y mortalidad.¹² Rodríguez y Johnson observaron disminución del tiempo de agregación plaquetaria inducida por adenosín difosfato (5 μ M) y epinefrina (1 μ M) en hombres diabéticos del Reino Unido, pero no en mujeres.²⁷ Soma y colaboradores analizaron la expresión de CD62P en 30 sujetos sanos y 30 diabéticos con o sin enfermedad cardiovascular y encontraron aumento en la activación en los diabéticos con complicaciones cardiovasculares.²⁸

Pretorius y su grupo reportaron concentraciones séricas elevadas de interleucina (IL) 1 β , IL-6 e IL-8 y de CD62P soluble en sujetos con diabetes tipo 2, cambios en la estructura de las plaquetas y aumento en la expresión de receptores en su membrana.²⁹

Sallam y colaboradores no observaron diferencias en la agregación ni activación plaquetaria inducida por adenosín difosfato en diabéticos de Arabia Saudita.³⁰ En este estudio, al comparar el tiempo y porcentaje de agregación, estratificados por sexo, tampoco se encontraron diferencias significativas

en el tiempo de agregación (**Figura 3C y D**), ni en la activación (**Cuadro 1**), similar a lo reportado por Sallam y su grupo, pero diferente de lo encontrado por Pretorius y colaboradores. La mayoría de los pacientes de nuestro estudio recibían tratamiento con metformina, cuya administración podría inhibir la activación plaquetaria e influir en los valores obtenidos.³⁰

Las alteraciones plaquetarias podrían estar reguladas por vías de señalización, lo que contribuye a la formación de trombos, embolización capilar y constricción, y acelera lesiones vasculares como consecuencia de la hiperglucemia, hiperlipidemia, resistencia a la insulina e inflamación.²⁷

Koupenova y su grupo reportaron mayor expresión de receptores tipo Toll en mujeres que en hombres, con asociación de TLR2 y TLR4 con CD62P soluble (1.83 [1.11-3.01] $p = 1.7 \times 10^{-2}$ y 2.29 [1.43-3.66] $p = 5.2 \times 10^{-4}$, respectivamente) únicamente en mujeres.³¹ Al comparar los porcentajes de TLR2 y TLR4 en pacientes y controles, no hubo diferencias en este estudio (**Figura 4**); sin embargo, aunque su expresión no se ve afectada, es probable que sus vías de señalización estén alteradas, lo que requiere evaluarse.

Asimismo, se correlacionó la expresión de estos receptores con el tiempo de agregación y los índices plaquetarios en pacientes y controles y se encontró correlación negativa de la intensidad media de fluorescencia de TLR2 con el tiempo de agregación plaquetaria, lo que sugiere que podría participar en este proceso; a menor expresión, mayor tiempo para alcanzar el 100% de agregación en pacientes y en controles. En el grupo control se observó correlación negativa del porcentaje de expresión de TLR2 y TLR4 con el tiempo de agregación, lo que sugiere que ambos receptores podrían participar en la agregación plaquetaria. El uso de agonistas para estos receptores confirmaría su participación.

CD62P, regulador de la adhesión plaquetaria en el endotelio vascular, se considera un factor predictivo de enfermedades cardiovasculares relacionadas con el intercambio y activación de las plaquetas. El aumento de CD62P se ha asociado con la enfermedad arterial en tejido periférico, eventos cerebrovasculares y miocardio agudo.³² En los pacientes con diabetes tipo 2 se encontró correlación entre el porcentaje de TLR2 y el de CD62P y, por otro lado, la intensidad media fluorescencia (IMF) del TLR4 mostró correlación negativa con el porcentaje de CD62P; estos resultados sugieren que TLR2 podría inducir la activación plaquetaria, a diferencia de TLR4. En los controles, se observó correlación positiva del porcentaje e IMF de TLR2 con la IMF de CD62P, así como del porcentaje de TLR4 con el porcentaje e IMF de CD62P, lo que sugiere la participación de TLR4 en regular la activación plaquetaria. Al respecto, Niklaus y su grupo evaluaron el papel de TLR2 y TLR4 plaquetarios en respuesta a los ligandos Pam3CSK4 (TLR2) y lipopolisacárido (TLR4), respectivamente y observaron que la estimulación con estos ligandos disminuye la expresión de ambos receptores en la superficie de las plaquetas.³³ Debido a que los pacientes con diabetes tipo 2 muestran mayores concentraciones de lipopolisacárido, a causa de la disbiosis,³⁴ es probable que la agregación plaquetaria sea mediada por el TLR2 u otras vías de señalización, y no por el TLR4, lo que difiere de lo reportado.

Los receptores tipo Toll participan en la respuesta a patrones moleculares asociados con patógenos y con daño en diversas enfermedades, entre las que se incluye la disfunción endotelial. Jin y su grupo mencionan que el aumento de la activación de las proteínas ERK1/2 (cinasa regulada por señales extracelulares) podría llevar al aumento de la interacción de las plaquetas con los leucocitos y las células endoteliales, lo que contribuye al estado protrombótico.³⁵ En

la población estudiada, la correlación negativa observada entre el tiempo de agregación y la expresión de los receptores tipo Toll sugiere su posible participación en el estado protrombótico; sin embargo, es necesario analizar la activación de componentes de sus respectivas vías de señalización, como ERK1/2, en pacientes con y sin complicaciones cardiovasculares, para confirmar su participación en la enfermedad cardiovascular.

Limitaciones del estudio

Es el primer estudio que evalúa el papel de TLR2 y TLR4 en la diabetes tipo 2 en población yucateca; sin embargo, debido al tamaño de muestra, no pudo estratificarse en sujetos diabéticos con hipertensión, enfermedad cardiovascular o insuficiencia renal. Estudios posteriores que incluyan pacientes con tiempos de evolución y concentraciones de glucosa diferentes, con enfermedad cardiovascular, tratamientos distintos a la metformina, así como ensayos *in vitro* con ligandos como Pam3CSK4 y lipopolisacárido, contribuirían a comprender el papel de estos receptores en la función plaquetaria de pacientes con diabetes tipo 2. Es necesario determinar la activación de componentes de la vía de señalización de TLR2 y TLR4 en poblaciones con y sin

complicaciones cardiovasculares, estratificando la población de acuerdo con el sexo, edad, IMC, así como considerar parámetros como la glucosa, perfil de lípidos, presión arterial, tratamiento farmacológico, etc.

Consideraciones éticas

El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética del Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi de la Universidad Autónoma de Yucatán (CEI-11-2019).

Agradecimientos

Al personal de CEMANUD por su apoyo en la difusión del proyecto de investigación y facilitar el contacto de los pacientes con diabetes tipo 2.

CONCLUSIONES

Los resultados sugieren la participación de TLR2 en la activación plaquetaria. Respecto del TLR4, los resultados contrastantes sugieren que, en población control, participa en la activación plaquetaria, pero no en diabéticos; sin embargo, es necesario determinar la activación de los componentes de sus vías de señalización, así como otras vías y receptores. **Figura 5**

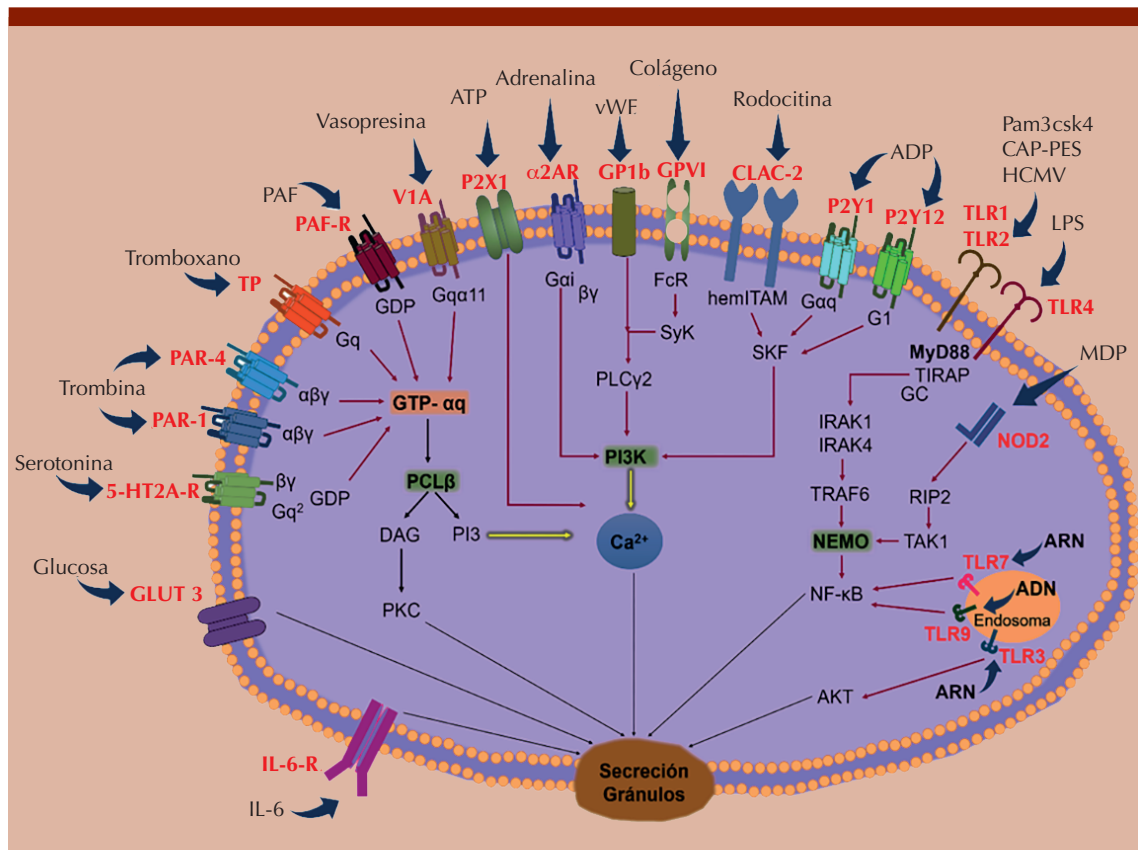


Figura 5. Modelo de activación plaquetaria. Se muestran los diferentes agonistas (glucosa, ATP, trombina, vasopresina, colágeno, entre otros), liberados como consecuencia del estrés oxidativo en la diabetes mellitus tipo 2, que son reconocidos por una variedad de receptores, incluidos TLR2 y TLR4, que inducen señales intracelulares que llevan a la activación de las plaquetas. Elaborada con el programa Biorender con información reportada en la bibliografía.^{11,18,36-46}

REFERENCIAS

1. Zheng Y, Ley SH, Hu FB. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nat Rev Endocrinol* 2018; 14 (2): 88-98. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.151>
2. Petrie JR, Guzik TJ, Touyz RM. Diabetes, hypertension, and cardiovascular disease: clinical insights and vascular mechanisms. *Can J Cardiol* 2018; 34 (5): 575-84. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2017.12.005>
3. Dendup T, Feng X, Clingan S, Astell-Burt T. Environmental risk factors for developing type 2 diabetes mellitus: a systematic review. *Int J Environ Res Public Health* 2018; 15 (1): 78. <https://doi.org/10.3390/ijerph15010078>
4. Ruiz D, Becerra M, Jagai JS, Ard K, Sargis RM. Disparities in environmental exposures to endocrine-disrupting chemicals and diabetes risk in vulnerable populations. *Diabetes Care* 2018; 41 (1): 193-205. <https://doi.org/10.2337/dc16-2765>
5. Oktay AA, Akturk HK, Esenboğa K, Javed F, et al. Pathophysiology and prevention of heart disease in diabetes mellitus. *Curr Probl Cardiol* 2018; 43 (3): 68-110. doi: 10.1016/j.cpcardiol.2017.05.001
6. Yun SH, Sim EH, Goh RY, Park JI, Han JY. Platelet activation: The mechanisms and potential biomarkers. *Biomed Res Int*. 2016; 2016: 1-5. <https://doi.org/10.1155/2016/9060143>
7. Alhadas KR, Santos SN, Freitas MMS, Viana SMSA, et al. Are platelet indices useful in the evaluation of type 2 diabetic patients? *J Bras Patol Med Lab*. 2016.

8. De Nardo D. Toll-like receptors: Activation, signalling and transcriptional modulation. *Cytokine* 2015; 74 (2): 181-9. <https://doi.org/10.5935/1676-2444.20160017>
9. Dasu MR, Ramirez S, Isseroff RR. Toll-like receptors and diabetes: a therapeutic perspective. *Clin Sci* 2012; 122 (5): 203-14. <https://doi.org/10.1042/CS20110357>
10. Dasu MR, Devaraj S, Park S, Jialal I. Increased Toll-like receptor (TLR) activation and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care* 2010; 33 (4): 861-8. <https://doi.org/10.2337/dc09-1799>
11. D'Atri LP, Schattner M. Platelet toll-like receptors in thromboinflammation. *Frontiers Bioscience* 2017; 22 (11): 4576. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00705>
12. Mahmoodian R, Salimian M, Hamidpour M, Khadem-Maboudi AA, Gharehbaghian A. The effect of mild agonist stimulation on the platelet reactivity in patients with type 2 diabetes mellitus. *BMC Endocr Disord* 2019; 19 (1): 62. <https://doi.org/10.1186/s12902-019-0391-2>
13. Carestia A, Rivadeneyra L, Romaniuk MA, Fondevila C, et al. Functional responses and molecular mechanisms involved in histone-mediated platelet activation. *Thromb Haemost* 2013; 110 (11): 1035-45. <https://doi.org/10.1160/TH13-02-0174>
14. Koltai K, Kesmarky G, Feher G, Tibold A, Toth K. Platelet aggregometry testing: molecular mechanisms, techniques and clinical implications. *Int J Mol Sci* 2017; 18 (8): 1803. <https://doi.org/10.3390/ijms18081803>
15. Valencia-Pacheco GV, Novelo-Noh IB, Velasco-Cárdenas RMH, Angulo-Ramírez AV, et al. Expression of TLR-7, MyD88, NF- κ B, and INF- α in B lymphocytes of mayan women with systemic lupus erythematosus in Mexico. *Front Immunol* 2016; 7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00022>
16. Ramachandran A. Know the signs and symptoms of diabetes. *Indian J Med Res* 2014; 140 (5): 579-81.
17. Perez-Campos-Mayoral L, Pérez-Campos E, Zenteno E, Majluf-Cruz A, et al. Better detection of platelet aggregation in patients with metabolic syndrome using epinephrine and ADP. *Diabetol Metab Syndr* 2014; 6 (1): 93. <https://doi.org/10.1186/1758-5996-6-93>
18. Gómez-Gómez B, Rodríguez-Weber FL, Díaz-Greene EJ. Fisiología plaquetaria, agregometría plaquetaria y su utilidad clínica. *Med Int Méx* 2018; 34 (2): 244-63. <https://doi.org/10.24245/mim.v34i2.1908>
19. Jacobsen EA, Helmers RA, Lee JJ, Lee NA. The expanding role(s) of eosinophils in health and disease. *Blood* 2012; 120 (19): 3882-90. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-330845>
20. Zhu L, Su T, Xu M, Xu Y, et al. Eosinophil inversely associates with type 2 diabetes and insulin resistance in chinese adults. *PLoS One* 2013; 8 (7): e67613. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067613>
21. Calco GN, Fryer AD, Nie Z. Unraveling the connection between eosinophils and obesity. *J Leukoc Biol* 2020; 108 (1): 123-8. <https://doi.org/10.1002/JLB.5MR0120-377R>
22. Taderegew MM, Woldeamanuel GG, Emeria MS, Tilahun M, et al. Platelet indices and its association with microvascular complications among type 2 diabetes mellitus patients in northeast ethiopia: A cross-sectional study. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2021; 14: 865-74. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S300460>
23. Waghale RM, Khot RS, Joshi PP. Platelet volume indices: markers of carotid atherosclerosis in type 2 diabetes mellitus? *Clin Diabetol* 2020; 9 (2): 103-11. <https://doi.org/10.5603/DK.2020.0008>
24. Li YW, Kao TW, Chang PK, Chen WL, Wu LW. Atherogenic index of plasma as predictors for metabolic syndrome, hypertension and diabetes mellitus in Taiwan citizens: a 9-year longitudinal study. *Sci Rep* 2021; 11 (1): 9900. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89307-z>
25. Li Z, Huang Q, Sun L, Bao T, Dai Z. Atherogenic index in type 2 diabetes and its relationship with chronic microvascular complications. *Int J Endocrinol* 2018; 2018: 1-9. <https://doi.org/10.1155/2018/1765835>
26. Risal P, Bhatt RD, Sakhakarmi N, Thapa S, Koju S. Insights into cardiovascular disease risk based on platelet indices and lipid ratios in reference to glycemic control and duration of diabetes. *J Nobel Med Coll* 2020; 9 (2): 55-60. <https://doi.org/10.3126/jonmc.v9i2.33488>
27. Rodriguez BAT, Johnson AD. Platelet measurements and type 2 diabetes: investigations in two population-based cohorts. *Front Cardiovasc Med* 2020; 7. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.00118>
28. Soma P, Swanepoel AC, du Plooy JN, Mqoco T, Pretorius E. Flow cytometric analysis of platelets type 2 diabetes mellitus reveals 'angry' platelets. *Cardiovasc Diabetol* 2016; 15 (1): 52. <https://doi.org/10.1186/s12933-016-0373-x>
29. Pretorius L, Thomson GJA, Adams RCM, Nell TA, et al. Platelet activity and hypercoagulation in type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 2018; 17 (1): 141. <https://doi.org/10.1186/s12933-018-0783-z>
30. Sallam Reem M, Alayoubi Samha MZ, Al-Daghri Nasser M, Alhammad Alwaleed A, Alfadda Assim A. Gender-specific profiles of cardiovascular disease in type 2 diabetes mellitus: A cross-sectional study. *J Nat Sci Med* 2018; 1 (2): 74-81. https://doi.org/10.4103/JNSM.JNSM_34_18
31. Koupenova M, Mick E, Mikhalev E, Benjamin EJ, et al. Sex differences in platelet toll-like receptors and their association with cardiovascular risk factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015; 35 (4): 1030-7. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304954>
32. Shen L, Yang T, Xia K, Yan Z, et al. P-selectin (CD62P) and soluble TREM-like transcript-1 (sTLT-1) are associated with coronary artery disease: a case control study. *BMC Cardiovasc Disord* 2020; 20 (1): 387. <https://doi.org/10.1186/s12872-020-01663-2>
33. Niklaus M, Klingler P, Weber K, Koessler A, et al. Platelet Toll-like-receptor-2 and -4 mediate different immune-related responses to bacterial ligands. *TH Open* 2022; 06 (03): e156-67.

34. Salguero M, Al-Obaide M, Singh R, Siepmann T, Vasylyeva T. Dysbiosis of Gram-negative gut microbiota and the associated serum lipopolysaccharide exacerbates inflammation in type 2 diabetic patients with chronic kidney disease. *Exp Ther Med* 2019. <https://doi.org.10.3892/etm.2019.7943>
35. Jin M, Fang J, Wang J, Jiao, Shao X, et al. Regulation of toll-like receptor (TLR) signaling pathways in atherosclerosis: from mechanisms to targeted therapeutics. *Acta Pharmacol Sin* 2023; 44 (12): 2358-75. <https://doi.org/10.1038/s41401-023-01123-5>
36. Senchenkova EY, Komoto S, Russell J, Almeida-Paula LD, et al. Interleukin-6 mediates the platelet abnormalities and thrombogenesis associated with experimental colitis. *Am J Pathol* 2013; 183 (1): 173-81. <https://doi.org.10.1016/j.ajpath.2013.03.014>
37. Cognasse F. The inflammatory role of platelets via their TLRs and Siglec receptors. *Front Immunol* 2015; 6. <https://doi.org.10.3389/fimmu.2015.00083>
38. Yeung J, Li W, Holinstat M. Platelet signaling and disease: targeted therapy for thrombosis and other related diseases. *Pharmacol Rev* 2018; 70 (3): 526-48. <https://doi.org.10.1124/pr.117.014530>
39. Yun SH, Sim EH, Goh RY, Park JI, Han JY. Platelet activation: The mechanisms and potential biomarkers. *Biomed Res Int* 2016; 2016: 1-5. <https://doi.org.10.1155/2016/9060143>
40. Negroni A, Pierdomenico M, Cucchiara S, Stronati L. NOD2 and inflammation: current insights. *J Inflamm Res* 2018; 11: 49-60. <https://doi.org.10.2147/JIR.S137606>
41. Vallance TM, Zeuner MT, Williams HF, Widera D, Vaiyapuri S. Toll-like receptor 4 signalling and its impact on platelet function, thrombosis, and haemostasis. *Mediators Inflamm* 2017; 2017: 1-13.
42. D'Atri LP, Schattner M. Platelet toll-like receptors in thromboinflammation. *Front Biosci* 2017; 22 (11): 4576. <https://doi.org.10.2741/457>.
43. Hally KE, La Flamme AC, Larsen PD, Harding SA. Platelet Toll-like receptor (TLR) expression and TLR-mediated platelet activation in acute myocardial infarction. *Thromb Res* 2017; 158: 8-15. <https://doi.org.10.1016/j.thromres.2017.07.031>
44. Dütting S, Bender M, Nieswandt B. Platelet GPVI: a target for antithrombotic therapy?! *Trends Pharmacol Sci* 2012; 33 (11): 583-90. <https://doi.org.10.1016/j.tips.2012.07.004>
45. Tomaiuolo M, Brass LF, Stalker TJ. Regulation of platelet activation and coagulation and its role in vascular injury and arterial thrombosis. *Interv Cardiol Clin* 2017; 6 (1): 1-12. <https://doi.org.10.1016/j.iccl.2016.08.001>
46. Shah BH, Rasheed H, Rahman IH, Shariff AH, et al. Molecular mechanisms involved in human platelet aggregation by synergistic interaction of platelet-activating factor and 5-hydroxytryptamine. *Exp Mol Med* 2001; 33 (4): 226-33. <https://doi.org/10.1038/emmm.2001.37>