

112056
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

División de Estudios de Postgrado

HOSPITAL DE CARDIOLOGIA "LUIS MENDEZ"

CENTRO MEDICO NACIONAL, SIGLO XXI, I. M. S. S.

IDENTIFICACION DE LINFOCITOS T ACTIVADOS (HLA-DR+ E IL-2R+),
PRODUCTORES DE INTERFERON-GAMMA (IFN gamma), Y DE MACRO-
FAGOS Y CELULAS MUSCULARES LISAS ACTIVADAS (HLA-DR+) EN
ARTERIAS CORONARIAS HUMANAS CON ATROSCLEROSIS.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
C A R D I O L O G O
P R E S E N T A
DR. EFRAIN ARIZMENDI URIBE

Director y Asesor de Tesis:

DR. ESTANISLAO C. STANISLAWSKI MILEANT



2024 JUN 11
FACULTAD DE MEDICINA

México, D. F.

1992



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

INTRODUCCION.....	1
MATERIAL Y METODO.....	3
ANALISIS ESTADISTICO.....	7
RESULTADOS.....	7
DISCUSION.....	12
CUADROS 1 al 8	17
FIGURAS 1 a la 6	25
BIBLIOGRAFIA.....	31

MEXICO, D.F. 1992

INTRODUCCION

Hasta el momento actual ha existido poco interés por estudiar la posible participación de la respuesta inmune en el origen y progresión de la enfermedad aterosclerosa humana (1,2). O'Connel y col. (3) han demostrado que la exposición crónica de conejos a suero humano promueve el desarrollo de placas arteriales con engrosamiento de la íntima y depósito de lípidos; Alonso y col. (4) informan que el rechazo de alotransplantes de corazón de conejos se acompaña de aterosclerosis rápidamente progresiva y Beaumont y col. (5) han hecho lo mismo con el rechazo de alotransplantes en el humano. Recientemente diversos investigadores han reportado que el estudio histológico de los órganos sometidos a rechazo de trasplante hiperagudo, agudo o crónico con frecuencia revela daño endotelial que sugiere haber sido mediado por procesos inmunes (6,7).

La placa aterosclerosa se encuentra constituida por células musculares lisas (CML), infiltrado mononuclear y depósito de lípidos y tejido conectivo (8). De acuerdo a diversos investigadores las CML participan en forma importante en la patogenia de la aterosclerosis debido a que su proliferación y actividad secretora de componentes

de la matriz extracelular constituye la manifestación más temprana de la enfermedad (9,10). Las células mononucleares aparecen desde las primeras fases de la aterogénesis experimental y espontánea (11); diversos autores (11,12) han demostrado su presencia en las coronarias de niños y adultos que fallecieron en forma accidental, encontrándose las tanto en las estrias amarillentas como en el engrosamiento difuso de la íntima y en las placas complicadas (14-16). Diversos estudios han demostrado que el infiltrado mononuclear de las placas de ateroma está constituido por macrófagos y linfocitos T (14,17-19). Se desconoce aún el significado de este infiltrado, el cual puede deberse a células sanguíneas de paso por las placas sin significado funcional, a células que forman parte de un proceso inflamatorio, o a células inmunocompetentes activas. Cuando las células T se encuentran activas expresan en su superficie antígenos HLA-DR (HLA-DR+) así como receptores para interleucina 2 (IL-2R+) (20-23) y secretan diversas citotoquinas tales como interleucina 2 (IL-2) e interferón gamma (IFn gamma) (24). Estudios recientes revelan que aún cuando el músculo liso no posee antígenos HLA-DR, cuando se le cultiva en presencia de IFn gamma los desarrolla en forma importante (25, 26) al igual que los macrófagos. La expresión de HLA-DR constituye un pre-requisito para la función presentadora de antígenos (27).

El propósito del presente trabajo es analizar los tres principales componentes celulares de las placas de ateroma de las coronarias en el humano por medio de anticuerpos monoclonales para determinar la posible participación del sistema inmunológico en su formación y progresión. Con este propósito se empleó un panel de anticuerpos destinados a identificar en la pared de las coronarias con lesión aterosclerosa la presencia de linfocitos T (CD3), linfocitos T colaboradores -inductores (CD4), linfocitos T citotóxicos-supresores (CD8), macrófagos (CD11c) y células musculares lisas, así como los marcadores de actividad inmunológica: HLA-DR e IL-2R y de actividad paracrina: IFn gamma.

MATERIAL Y METODO

Se obtuvieron muestras de tejido de las arterias coronarias de 30 pacientes que murieron y fueron sometidos a estudio postmortem dentro de las primeras cuatro horas de haber fallecido.

Veinte pacientes cursaron con infarto agudo del miocardio (Grupol) documentado por historia clínica, electrocardiograma y niveles séricos de enzimas; 10 de ellos correspondieron al sexo masculino y 10 al femenino y sus edades fluctuaron entre 45 y 70

años. Diez pacientes fallecieron sin evidencia clínica de aterosclerosis coronaria, cerebral o periférica (Grupo II); 5 de ellos correspondieron al sexo masculino y 5 al femenino y sus edades fluctuaron entre 35 y 55 años.

Para confirmar la reactividad de los anticuerpos monoclonales estudiados, en cada caso se obtuvo, además tejido ganglionar y esplénico.

Anticuerpos monoclonales

En todos los casos los tejidos problema (coronarias, ganglios y bazo) fueron estudiados mediante un panel de siete anticuerpos monoclonales murinos y un anticuerpo policlonal de caballo (Cuadro I).

Inmunohistoquímica

El tejido fue dividido en dos secciones: una sección, destinada a estudiar células dentro de la placa de ateroma, fue fijada en formol buffer al 10%, procesada en un procesador automático de tejidos (Autotechnicon), embebida en parafina y cortada a cinco micras de espesor.

Cada corte se hizo reaccionar con el panel de anticuerpos siguiéndose las técnicas de peroxidasa antiperoxidasa (PAP) y fosfatasa alcalina antifosfatasa alcalina (APAAP) (28,29). Se leyeron, interpretaron y fotografiaron en un fotomicroscopio (Reichert, modelo Polyvar). La segunda sección, destinada a aislar células de la placa de ateroma, fue procesada por la técnica de Jonasson y col. (30) que consiste, en esencia, en: cortar las placas en pequeños fragmentos para ser digeridos por colagenasa y elastasa. El material digerido fue filtrado a través de nylon y centrifugado a baja velocidad. Del sedimento se obtuvieron células que fueron incubadas con eritrocitos de carnero para identificar a las células con roseta E. La suspensión celular se colocó en porta-objetos y se incubó con el panel de anticuerpos; ulteriormente se siguieron las técnicas de PAP y APAAP, se leyeron, se interpretaron y se fotografiaron.

Evaluación microscópica

A fin de confirmar la identidad de los especímenes muestreados, los tejidos fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina y estudiados histológicamente constatándose la preservación del detalle celular. De cada paciente se incluyeron cortes representativos de las placas con lesiones aterosclerosas con grados diversos de severidad (placas

que provocan menos de 25% de estenosis y estenosis superior a 75%); se realizaron 10 secciones de 5 micras de espesor de cada tejido estudiado. A cada tejido se le asignó un valor de 0 a 5 para el número de células presentes (macrófagos, linfocitos y CML). El 0 representó ausencia de células y el 5 representó presencia de células abundantes. En cada tejido se examinó la sección histológica en su totalidad y el valor asignado fue el promedio de todas las áreas estudiadas en esa misma sección histológica.

El análisis fue realizado en forma ciega respecto al grado de severidad de la placa de ateroma.

En cada tejido se determinó el porcentaje de linfocitos CD3 (linfocitos T) y se contaron 200 a 500 células, de acuerdo al grado de inflamación; donde se detectaron células CD3 - se realizaron cortes seriados para determinar el porcentaje de linfocitos T citotóxicos/supresores (CD8) y de linfocitos T colaboradores/inductores (CD4), así como el de linfocitos CD3 que expresó en su superficie HLA-DR e IL-2R, e IFN gamma en su citoplasma; donde se detectaron células CD11c (macrófagos) y células con desmina (células musculares lisas) se practicaron cortes seriados a fin de determinar la presencia del antígeno HLA-DR.

Análisis estadístico

Las diferencias entre los valores medios de los grupos se determinó empleando el análisis de la varianza (31). Los valores de P menores de 0.05 se consideraron como significativos.

RESULTADOS

Histología General y Análisis de las Coronarias

Grupo I

La mayoría de las coronarias estudiadas mostraron su capa media y adventicia intacta. La íntima y media se encontraron reemplazadas por aterosclerosis. En la pared coronaria normal no se identificaron células inflamatorias, macrófagos ni proliferación de CML. En contraste todas las paredes coronarias con placas de ateroma, sin importar su grado de severidad presentaron conteos significativos ($P < 0.05$) de células inflamatorias, macrófagos y CML; el conteo de los tres tipos de células fue directamente proporcional al grado de severidad de la enfermedad aterosclerosa. El conteo medio de las células inflamatorias fluctuó entre 1.35 (placa de ateroma con estenosis menor del 25%) y 3.55 (placas de ateroma con estenosis superior al 75%); el de los macrófagos fluctuó entre 1.5 y

3.6 y el de las CML entre 1.35 y 3.75 (cuadros 2,3,4 y 5).

Las coronarias estudiadas en los diez pacientes que fallecieron por causas no vasculares mostraron grados variables de aterosclerosis coronaria. Los casos 3,4,5,7, y 9 presentaron 15% de estenosis máxima de las coronarias y los casos restantes (1,2,6,8 y 10) 25% de estenosis máxima. En todos los casos se identificaron células inflamatorias (conteo con media de 1.4), macrófagos (conteo con media de 1.5) y proliferación de CML (conteo con media de 1.6) en las lesiones menos severas de los pacientes del Grupo I.

Imunohistoquímica de las Coronarias del Grupo I

En los veinte pacientes de Grupo I el porcentaje de linfocitos CD3+ presentes en las lesiones fluctuó entre 48% y 90%, con una media de 59.5% en las lesiones menos severas y de 88.9% en las más avanzadas (cuadros 2, 3, 4 y 5). Estas células se encontraron tanto en la placa (donde fueron más abundantes) como en la adventicia de las coronarias (figura 1); dentro de la placa se localizaron fundamentalmente en la capa fibrosa. Los linfocitos T presentes en el timo se encuentran fundamentalmente en etapa inmadura y expresan ambas moléculas CD4 y CD8 (CD4+, CD8+); en la periferia los linfocitos T están bien diferenciados y expresan únicamente la

molécula CD4 (CD4+) o la molécula CD8 (CD8+) o no expresan ninguna de las dos (CD4-, CD8-). La mayoría de los linfocitos T con función colaboradora-inductora poseen la molécula CD4 (CD4+) mientras que la mayoría de los linfocitos T con función citotóxica-supresora expresan la molécula CD8 (CD8+). En la sangre periférica, en condiciones normales, la relación entre las células CD4+ y CD8+ es de 2:1, a favor de los linfocitos CD4+. La relación de estas células en las placas de ateroma de las coronarias fluctuó entre 3.1:1 a 10.5:1, con una media de 3.82:1 en las lesiones menos severas y de 8.96:1 en las lesiones más avanzadas (cuadros 2,3,4, y 5). Los linfocitos CD4+ tendieron a localizarse fundamentalmente a nivel de la capa fibrosa de la placa (figura 2), mientras que los linfocitos CD8+ tendieron a hacerlo en la región del hombro de la placa. La frecuencia tan elevada de linfocitos CD3+ y de sus subpoblaciones CD4+ y CD8+ sugiere la existencia de una respuesta inmune celular a dicho nivel desde etapas tempranas.

En todas las placas de los pacientes del Grupo I se identificaron linfocitos CD3 con antígeno HLA-DR (HLA-DR+) en su superficie (cuadro 7) cuya frecuencia media fue de 37.5%; los linfocitos CD3 HLA-DR+ se localizaron más comúnmente en la capa fibrosa de la placa (figura 3) y prácticamente no se les identificó a nivel del centro. El 7.5% de los linfocitos (con fluctuaciones entre

6% y 10%) mostró receptor para interleucina 2(IL-2R+); estas células se localizaron tanto en la capa fibrosa de la placa como en las regiones basal y subendotelial de la misma. Los linfocitos CD3 activados secretan diversas linfoquinas capaces de influir en el fenotipo de las células vecinas por acción paracrina. Una de éstas es el interferón gamma, capaz de alterar la expresión génica y la capacidad proliferativa de las células musculares lisas vasculares. A fin de valorar la secreción de linfoquinas en la placa, empleamos un anticuerpo policlonal para interferón gamma. Se detectó interferón gamma en el citoplasma del 6.0% de los linfocitos T, (cuadro 7) corroborando esto por cortes seriados (figura 4).

Los macrófagos, segundo componente celular de las placas de ateroma, pueden actuar como células fagocíticas o como células presentadoras de antígenos; el prerequisite para esta última función es el expresar en su superficie el antígeno HLA-DR después de haber sido activadas por los linfocitos CD3. A fin de valorar la presencia de células macrofágicas con capacidad inmunológica, empleamos un anticuerpo monoclonal destinado a demostrar el antígeno HLA-DR. El 56.7% de los macrófagos presente en las placas de ateroma presentó este antígeno (cuadro 7), indicando con ello la posible participación de estas células en la respuesta inmune dentro de la placa (figura 5).

Las células musculares lisas constituyen el tercer tipo de células dentro de la placa. Estas células normalmente no expresan antígenos HLA-DR en su superficie; sin embargo, dado que en forma aberrante puedan hacerlo en presencia de interferón decidimos emplear un anticuerpo monoclonal para detectar su presencia en estas células. El 39.2% de las CML de las placas presentó antígeno HLA-DR (cuadro 7), lo que confirma la activación de estas células dentro de las lesiones aterosclerosas coronarias (figura 6).

Inmunohistoquímica de las Coronarias del Grupo II

En los diez pacientes del Grupo II el porcentaje de linfocitos CD3 fue muy similar al encontrado en las lesiones menos severas del Grupo I ($P < 0.05$ (cuadro6). Esto mismo ocurrió con el grado de activación de las células CD3, de los macrófagos y de las CML (cuadro8), lo que sugiere la posible participación de la respuesta inmune en la aterogénesis desde etapas tempranas, sin importar la existencia o no de manifestaciones clínicas.

DISCUSION

La población de linfocitos CD3 es responsable tanto de guardar la memoria, como de iniciar y regular la respuesta inmune. Tanto la respuesta inmune normal como la patológica se inician con el reconocimiento del antígeno por los linfocitos CD3 en presencia de células presentadoras y del antígeno HLA-DR correspondiente (32).

La respuesta de hipersensibilidad tipo IV normal (hipersensibilidad retardada) y las lesiones autoinmunes tipo artritis reumatoide se caracterizan por cursar con denso infiltrado de linfocitos CD3 y de células presentadoras de antígeno que expresan HLA-DR en su superficie (33).

El hallazgo en el presente trabajo de la existencia de denso infiltrado de linfocitos CD3 en las lesiones aterosclerosas, conjuntamente con macrófagos y células musculares lisas activadas (HLA-DR+), sugiere la posible participación de la respuesta inmune en la patogenia de la aterosclerosis coronaria. La mayoría de los linfocitos CD3 presentes en las placas coronarias correspondió a la subpoblación colaboradora-inductora (CD4+), la cual es capaz de reaccionar con los antígenos en presencia de células presentadoras de antígenos activadas (HLA-DR+) (17).

El número relativamente bajo de linfocitos CD8+ encontrado no descarta necesariamente la participación del brazo celular de la respuesta inmune en la aterogénesis ya que se les encontró fundamentalmente en el hombro de la placa, además de que algunas células CD4+ poseen actividad citotóxica.

La sola presencia de linfocitos CD3+ en los tejidos no necesariamente significa que se está llevando a cabo en ellos una respuesta inmune. Estas células pueden encontrarse en tránsito en dichos tejidos o estar en estado de reposo. Por ello era importante aclarar el grado de actividad de estas células en las lesiones coronarias. Primero empleamos un anticuerpo policlonal para el receptor de interleucina 2 como marcador de las etapas iniciales de activación de los linfocitos CD3+. La expresión del IL-2R juega un papel clave en la estimulación del crecimiento celular autocrino una vez que los linfocitos T han sido activados (34). Dado que los IL-2R pueden también ser expresados por los linfocitos B y ciertos macrófagos (35, 36), el análisis de los cortes seriados de las placas y el aislamiento de las células de las mismas, reveló que las células que expresaron el IL-2R fueron linfocitos T y no macrófagos o linfocitos B. La frecuencia de células que expresó IL-2R+ fue de la misma magnitud que la encontrada en las lesiones autoinmunes tales como esclerosis múltiple y artritis reumatoide (37,38).

Se ha observado que los linfocitos CD3 pierden su receptor de interleucina-2 después de varios días, pero conservan algunas otras evidencias de su estado de activación (34,39). La citometría de flujo del líquido sinovial ha detectado cifras superiores de linfocitos CD3 con marcadores de activación tardía que las encontradas con el marcador IL-2R. Dado que no contamos con este recurso, decidimos estudiar por técnica de inmunohistoquímica al HLA-DR como marcador de actividad de los linfocitos T. El HLA-DR aparece en forma relativamente temprana en el proceso de activación, sin embargo permanece en la superficie celular más tiempo que el IL-2R (37,39). En el presente trabajo, la frecuencia de células CD3 HLA-DR+ fue muy elevada, 40%, lo que sugiere que una gran proporción de linfocitos CD3 se encuentra en estado activo en las lesiones aterosclerosas de las coronarias.

La elevada frecuencia de células HLA-DR+ y la baja frecuencia de células IL-2R+ puede significar que el estado de activación de los linfocitos CD3 en las lesiones aterosclerosas de las coronarias es muy similar al observado en las enfermedades del tejido conectivo, pero diferentes del patrón de activación temprano de los linfocitos CD3 encontrados in vitro

El análisis de las células aisladas de las lesiones aterosclerosas provee las siguientes ventajas: 1) Facilidad para discriminar entre células positivas y negativas, una vez que se ha

eliminado la matriz extracelular, y 2) factibilidad de realizar técnicas como las de roseta que permiten llevar a cabo tinciones inmunohistoquímicas dobles. Por otra parte, su desventaja consiste en el hecho de que la población de células que se obtiene probablemente no es representativa de la existente en la placa dada la digestión del tejido por colagenasa.

La activación local de linfocitos CD3 puede jugar un papel importante en el proceso de reparación de las arterias coronarias ya que el empleo experimental de ciclosporina A, droga inhibidora de la activación de los linfocitos CD3, reduce en forma significativa la proliferación de la íntima de las arterias después de sufrir daño mecánico experimental (40).

La activación local de linfocitos CD3 puede jugar un papel importante en la patogenia de la aterosclerosis coronaria no solo por el hecho de inducir destrucción del tejido vascular, sino también por su capacidad para secretar diversas citoquinas y con ello modular el fenotipo y la función de diversos tipos de células. La presencia de linfocitos CD3 con interferón gamma en su citoplasma sugiere que dentro de la placa existe secreción importante de linfocinas. Recientemente se ha demostrado que las células musculares lisas de las arterias son sensibles al interferón gamma, y que responden a su estímulo expresando antígeno HLA-DR en su superficie. Por lo tanto,

la secreción de interferón puede ser un mecanismo paracrino mediante el cual los linfocitos CD3 modulan el fenotipo de las células musculares lisas de la placa. Además el interferón gamma es un potente activador de macrófagos, el tercer componente celular de la placa de ateroma.

El interferón gamma no es la única linfoquina que puede tener importancia en la aterogénesis si se produce en forma aberrante en la pared coronaria. Los linfocitos CD3 secretan también factor de crecimiento y factor-beta necrozante de tumores (linfotoxina). Ambas sustancias pueden alterar el fenotipo y la diferenciación tanto de las células musculares lisas como la de los macrófagos y la de las plaquetas. Es necesario realizar más estudios para aclarar el papel que desempeñan las diversas linfoquinas en las arteriopatías y estudiar la especificidad y consecuencias de la respuesta inmune local en la aterosclerosis.

Cuadro I. Panel de anticuerpos empleados en el presente estudio.

Anticuerpo	Tipo de anticuerpo	Antígeno	Técnica	Células	Fabricante
T3	Ac MM	CD3	APAAP	Pan-T	Dakopatts.
T4	Ac MM	CD4	APAAP	Colaboradora/inductora	Dakopatts.
T8	Ac MM	CD8	APAAP	Citotóxica/supresora	Dakopatts.
Leu-m-5	Ac MM	CD11c	PAP	Macrófago	Becton-Dickinson.
IL-2R	Ac MM	CD25	PAP	T-activada (y otras)	Becton-Dickinson.
BMA-022	Ac MM	HLA-DR	PAP	T-activada (y otras)	Behring.
Anti-IFn	Acpc	IFn	PAP	T-activada	Boehringer.
Desmina	Ac MM	Desmina	PAP	Muscular	Dakopatts.

Ac MM = anticuerpo monoclonal de ratón, AcPc = anticuerpo policlonal de caballo.

PAP = peroxidasa-antiperoxidasa, APAAP = fosfatasa alcalina-antifosfatasa alcalina

Cuadro 2. Análisis inmunohistoquímico de las coronarias de 20 pacientes con enfermedad aterosclerosa (Grupo I). Placas con estenosis del 25% o menos del calibre de la luz del vaso.

Caso No.	Grado de inflamación	Linfocitos CD3 (%)	Relación CD4/CD8	Macrófagos CD11c	Células musculares
1	1	55	3.5	2.0	1.0
2	1	52	3.1	1.0	1.0
3	2	75	5.0	2.0	2.0
4	1	48	3.5	1.0	1.0
5	2	68	5.5	1.0	2.0
6	1	55	3.0	2.0	1.0
7	1	51	3.5	1.0	1.0
8	1	56	3.2	2.0	1.0
9	2	75	5.1	1.0	2.0
10	2	70	5.0	2.0	2.0
11	1	50	3.0	1.0	1.0
12	1	56	3.3	2.0	1.0
13	2	68	5.5	1.0	2.0
14	1	53	3.5	1.0	1.0
15	2	65	5.3	2.0	2.0
16	1	58	3.3	2.0	1.0
17	2	66	5.2	2.0	2.0
18	1	55	3.0	1.0	1.0
19	1	56	3.5	2.0	1.0
20	1	58	3.5	1.0	1.0
Promedio	1.35	59.5	3.82	1.5	1.35

Cuadro 3. Análisis inmunohistoquímico de las coronarias de 20 pacientes con enfermedad aterosclerosa (Grupo I). Placas con estenosis del 25 al 50% o menos del calibre de la luz del vaso.

Caso No.	Grado de inflamación	Linfocitos CD3 (%)	Relación CD4/CD8	Macrófagos CD11c	Células musculares
1	1	55	3.5	2.0	1.0
2	1	52	3.1	1.0	1.0
3	2	75	5.0	2.0	2.0
4	1	75	5.0	2.0	2.0
5	2	68	5.5	1.0	1.0
6	1	55	3.0	2.0	1.0
7	1	51	3.5	1.0	1.0
8	1	56	3.2	2.0	1.0
9	2	75	5.1	1.0	2.0
10	2	70	5.0	2.0	2.0
11	1	50	3.0	1.0	1.0
12	1	56	3.3	2.0	1.0
13	2	68	5.5	1.0	2.0
14	1	53	3.5	1.0	1.0
15	2	65	5.3	2.0	2.0
16	1	58	3.3	2.0	1.0
17	2	66	5.2	2.0	2.0
18	1	55	3.0	1.0	1.0
19	1	56	3.5	2.0	1.0
20	1	58	3.5	1.0	1.0
Promedio	1.4	68.5	5.4	2.4	2.2

Cuadro 4. Análisis inmunohistoquímico de las coronarias de 20 pacientes con enfermedad aterosclerosa (Grupo I). Placas con estenosis del 50 al 75% o menos del calibre de la luz del vaso.

Caso No.	Grado de inflamación	Linfocitos CD3 (%)	Relación CD4/CD8	Macrófagos CD11c	Células musculares
1	3	89	38.5	3.0	3.0
2	3	85	8.0	3.0	3.0
3	4	90	10.3	4.0	3.0
4	2	55	7.5	3.0	3.0
5	4	95	12.0	3.0	3.0
6	2	68	6.5	4.0	3.0
7	3	90	8.8	3.0	4.0
8	2	65	7.6	3.0	3.0
9	2	60	8.0	4.0	3.0
10	3	85	10.2	4.0	3.0
11	2	55	6.5	3.0	3.0
12	2	48	6.0	4.0	3.0
13	4	89	7.6	3.0	3.0
14	2	68	8.2	3.0	3.0
15	2	72	8.6	3.0	3.0
16	3	91	10.2	4.0	4.0
17	2	53	6.6	4.0	3.0
18	4	90	8.6	3.0	3.0
19	2	50	7.0	4.0	3.0
20	3	90	8.6	3.0	4.0
Promedio	2.7	74.4	8.3	3.4	3.1

Cuadro 5. Análisis inmunohistoquímico de las coronarias de 20 pacientes con enfermedad aterosclerosa (Grupo I). Placas con estenosis del 75% o más del calibre de la luz del vaso.

Caso No.	Grado de inflamación	Linfocitos CD3 (%)	Relación CD4/CD8	Macrófagos CD11c	Células musculares
1	3	90	10.2	3.0	4.0
2	4	95	8.5	3.0	4.0
3	3	83	8.0	4.0	4.0
4	3	88	8.2	4.0	4.0
5	4	92	9.5	4.0	4.0
6	3	85	8.0	3.0	4.0
7	4	90	8.0	4.0	4.0
8	4	86	8.2	3.0	3.0
9	3	92	10.2	3.0	3.0
10	4	85	9.0	4.0	3.0
11	3	92	9.2	4.0	4.0
12	4	88	8.6	3.0	4.0
13	4	93	9.0	4.0	4.0
14	3	86	8.8	4.0	4.0
15	4	88	9.2	4.0	4.0
16	3	90	8.6	3.0	3.0
17	4	88	10.5	4.0	4.0
18	3	92	9.6	3.0	4.0
19	4	86	8.8	4.0	3.0
20	4	90	9.2	4.0	4.0
Promedio	3.55	88.9	8.9	3.6	3.7

Cuadro 6. Análisis inmunohistoquímico de las coronarias de 10 pacientes sin evidencia clínica de enfermedad aterosclerosa coronaria (Cuadro II)

Caso No.	Grado de inflamación	Linfocitos CD3 (%)	Relación CD4/CD8	Macrófagos CD11c	Células musculares
1	2	68	5.5	2.0	2.0
2	1	55	3.5	1.0	1.0
3	2	65	5.0	2.0	2.0
4	1	55	3.0	1.0	1.0
5	1	51	3.4	2.0	2.0
6	1	58	3.2	1.0	1.0
7	1	55	3.5	1.0	2.0
8	2	63	5.5	2.0	2.0
9	1	52	3.5	1.0	1.0
10	2	62	3.0	2.0	2.0
Promedio	1.4	58.4	3.91	1.5	1.6

Cuadro 7. Frecuencia de linfocitos CD3 que expresan HLA-DR, IL-2R e IFn gamma, así como de células CD11c y células musculares lisas que expresan HLA-DR, en arterias coronarias de pacientes con enfermedad aterosclerosa (Grupo I)

Caso No.	Linfocitos CD3			Células CD11c HLA-DR+ (%)	Células musculares lisas HLA-DR+ (%)
	HLA-DR+ (%)	IL-2R+ (%)	IFn gamma +		
1	35	6	8	59	38
2	43	8	4	55	41
3	36	7	8	60	35
4	38	8	5	58	39
5	41	9	8	73	40
6	36	10	6	58	38
7	35	6	4	53	42
8	41	7	7	61	40
9	33	6	6	59	38
10	38	10	4	62	41
11	40	9	7	66	36
12	36	7	6	53	40
13	32	8	5	59	42
14	37	9	9	62	37
15	39	7	5	65	42
16	40	7	8	55	39
17	38	6	5	62	38
18	36	9	4	60	41
19	37	6	6	58	40
20	40	6	5	56	38
Promedio	37.5	7.5	6.0	59.7	39.2

Cuadro 8. Frecuencia de linfocitos CD3 que expresan HLA-DR, IL-2R e IFn gamma, así como células CD11c y células musculares lisas que expresan HLA-DR, en las arterias de pacientes sin enfermedad aterosclerosa (Grupo II).

Caso No.	Linfocitos CD3			Células CD11c HLA-DR+ (%)	Células musculares lisas HLA-DR+ (%)
	HLA-DR+ (%)	IL-2R+ (%)	IFn gamma +		
1	20	4	2	50	33
2	15	6	2	55	39
3	18	5	4	61	35
4	22	5	3	53	30
5	25	6	3	60	29
6	19	7	2	48	31
7	21	3	3	54	28
8	20	5	3	57	32
9	22	4	4	51	33
10	16	6	2	49	30
Promedio	19.8	5.1	2.8	53.8	32

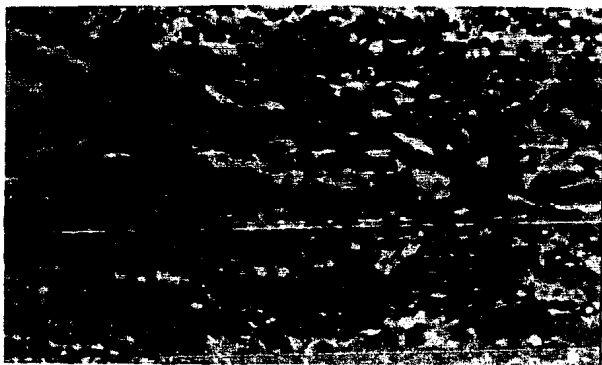


Figura 1: Placa de ateroma donde se identifican, a nivel de la capa fibrosa, linfocitos T con marcadores CD4. Inmunoperoxidasa 125 X.

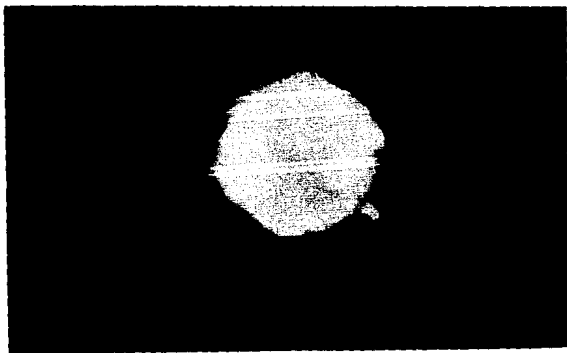


Figura 2: Linfocito CD3 que expresa marcador IL-2R+ a nivel de la capa fibrosa de la placa. Inmunofluorescencia Anti-CD3 y Anti-IL-2R , 1,200 X.



Figura 3: Linfocitos CD3 aislados de la placa los cuales expresan Ag-HLA-DR en su superficie (HLA-DR+) Inmunoperoxidasa,400X.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

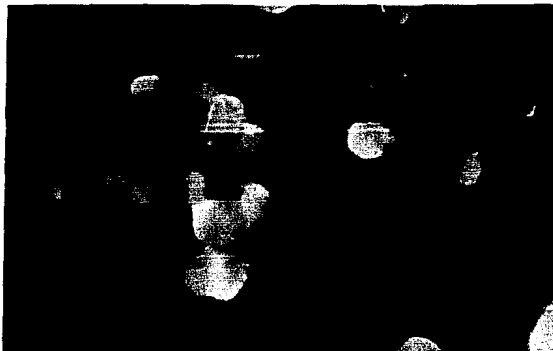


Figura 4: Linfocitos CD3 aislados de la placa los cuales expresan interferon gamma. Inmunofluorescencia 1000 X.



Figura 5: Placa de ateroma con macrófagos los cuales expresan Ag HLA-DR en su superficie (HLA-DR+) -- Inmunoperoxidasa, 400 X.



Figura 6: Placa de ateroma con células musculares lisas las cuales expresan Ag HLA-DR en su superficie (HLA-DR+). Inmunoperoxidasa, 400 X.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Ross R.: The pathogenesis of atherosclerosis-an update. N. Engl.J. Med. 1986; 314:448.
2. Villalpando J.; Patogenia de la aterosclerosis. Rev. Med. IMSS (Mex). 1989; 27:432.
3. O'Connel TX y MOWbray JF: Arterial intimal thickening produced by alloantibody and xenoantibody. Transplantation. 1973; 15:262.
4. Alonso Dr, Starek PX y Minick CR: Studies on the pathogenesis of atherosclerosis induced in rabbit cardiac allograft rejection and hipercholesterolemia. Am J. Pathol. 1 977;87:415.
5. Beaumcnt JL y Beaumont V: atherosclerosis during cardiac allogenic graft rejection. En: Atherosclerosis review. Paoletti R. y Gotto-AM, eds. Raven Press, New Yok. 1978, vol. 3 pag. 133.
6. Williams GM, ter Haar, A Parcks LC y Karajewski CA: Endothelial changes with hyperacute, acute and chronic allograft rejection in man. Transp. Proc. 1973; 5:819.

7. Forbes RD, Gutman RD, Gomersall M y col: A controlled serial ultrastructural tracer study of first-set allograft rejection in the rat. Evidence that the microvasculature endothelium is the primary target of graft destruction. *Am. J. Pathol.* 1983; 111:184.
8. Hansson GK, Jonasson S, Seifert PS, Stemme S: Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 1989, 9:567-578.
9. Ross R, Wight TN, Strandness E, Thiele B: Human atherosclerosis. I. cell constitution and characteristics of advanced lesions of the superficial femoral artery.
10. Schwartz SM, Campell GR, Cambell JH: Replication of smooth muscle cells in vascular disease. *Circ. Res.* 1986, 58:427-444.
11. Emeson EE, Robertson AL Jr.: T Lymphocytes in aortic and coronary intimas. Their potential role in atherogenesis. *Am. J. Pathol.* 1988. 130:369-376.
12. Joris I, Billingham ME, Majino G: Human coronary arteries: An ultrastructural search for the early changes of atherosclerosis. *Fed. Proc.* 1984, 43:710.

13. Gown AM, Tsukaada T y Ross R: Human atherosclerosis. II Immunocytochemical analysis of the cellular composition of human atherosclerotic lesions. *Am J. Pathol.* 1986; 125:191.
14. Swart CJ, Mitchell RA: Cellular infiltration of human arterial adventitia associated with atheromatous plaques. *Circulation* 1962, 26: 73-78.
15. Munro JM, Can der Walt JD, Munro CS, Chalmers JAC, Cox EI: An immunohistochemical analysis of human aortic fatty streaks. *Hum Pathol.* 1987, 18:375-380.
16. Van der Wal AC, Das PK, Bentz van de Berg D, Van der Loos CM, Becker AE: Atherosclerotic lesions in humans. In situ immunophenotypic analysis suggesting an immune mediated response. *Lab. invest.* 1989, 61:166-170.
17. Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bodjers G, Hansson GK: Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis* 1986, 6:131-138.
18. Emeson EE, Robertson AL: T lymphocytes in aortic and coronary intimas. Their potential role in atherogenesis. *Am. J. Pathol.* 1988, 130:369-376.

19. Swartz Cj, Valente AJ, Sprague EA, Kelley JL, y cols.:
Monocyte/macrophage participation in atherogenesis:
Inflammatory components of pathogenesis. Seminars in
Thrombosis and Hemostasis 1986. 12:79-86.
20. Davis M My Bjorkman PJ: T-cell antigen receptor genes and T-
cell recognition. Nature. 1988, 344:395.
21. Hansson Gk, Jonasson L, Holm J, Clowes MM, Clowes AW:
Gamma interferon regulates smooth muscle proliferation and
la expression in vivo and in vitro. Circ. Res. 1988, 63: 712-
719.
22. Jonasson L, Holm J, Hansson GK: Smooth muscle cells
express Ia antigens during arterial response to injury. Lab.
Invest. 1988, 58:310-315.
23. Smith KA: Interleukin-2 Ann. Rev. Immunol. 1986. 2:319-333.
24. Balkwill FR y Burke F: Cytokines involved in the regulation
of immune responses. Immunol. Today. 1989 10:299.

25. Hansson GK, Jonasson I, Holm J, Clowes MM y col: Gamma interferon regulates smooth muscle proliferation and la expression in vivo and in vitro. *Circ. Res.* 1988; 63: 712.
26. Campbell GR, Campbell JH: Smooth muscle phenotype changes in arterial wall homeostasis: Implications for the pathogenesis of atherosclerosis. *Exp. M01. Path.* 1985, 42:139-147.
27. Stanislavski EC: Funciones del Sistema Inmunológico en: El médico frente al SIDA. Conasida, ED. 1989; pag. 59.
28. Hrapchak RJ: Immunohistochemical labeling of monoclonal antibodies by the APAAP immunoalkaline phosphatase technique. *Techniques in Immunocytochemistry.* 1985; 3:25.
29. Masson DY: Immunocytochemical labeling of monoclonal antibodies by the APAAP immunoalkaline phosphatase technique. *Techniques in immunocytochemistry.*
30. Jonasson L, Holm J, Skalli O, Gabbiani G, Hansson GK: Expression of calss II transplantation antigen on vascular muscle cells in human atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* 1985, 76:125-131.
31. Winer B: *Statistical Principals in Experimental Design.* New York, McGraw Hill, 1971.

32. Marrack P, Kappler J: The T cell receptor. *Science* 1987. 238:1073-1079.
33. Unanue ER, Allen PM: Comments on the finding of Ia expression in nonlymphoid cells. *Lab. Invest.* 1986, 55:123-125.
34. Waldman TA: The structure, function, and expression of interleukin 2 receptors on normal and malignant lymphocytes. *Science* 1986,232:727-732.
35. Hancock WW, Kobzik L, Colby AJ, O'Hara CJ, Cooper AG, Godieski JJ: Detection of lymphokines and lymphokine receptors in pulmonary sarcoidosis: Immunohistologic evidence that inflammatory macrophages express IL-2 receptors. *Am. J. Pathol.* 1986, 123:1-8.
36. Hancock WW, Muller WA, Cotran RS: Interleukin 2 receptors are expressed by alveolar macrophages during pulmonary sarcoidosis and are inducible by lymphokine treatment of normal lung macrophages, blood monocytes, and monocyte cell lines. *J. Immunol.* 1987, 128:185-191.
37. Bellamy A, Davison AN, Feldmann M: Derivation of ganglioside-specific T cell lines of suppressor or phenotype from cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *J. Neuroimmunol.* 1986, 12: 107-120.

38. Stamenkovic I, Stegagno M, Wright KA, Krane SM, Amento EP, Colvin RB, Duquesnoy RJ, Kurnick JT: Clonal dominance among T-lymphocyte infiltrates in arthritis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988, 85:1179-1183.
39. Burmester Gr, Jahn B, Gramatzki M, Zacher Kalten JR. Activated T cells in vivo and in vitro. Divergence in expression of T ac and Ia antigens in the nonblastoid small T cells of inflammation and normal T cells activated in vitro. J. Immunol. 1984, 133:1230-1234.
40. Jonnasson L, Holm J, Hansson GK: Cyclosporin A inhibits smooth muscle proliferation in the vascular response to injury. Proc. Natl. Acad. Sci USA 1988, 85:2303-2306.