



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DE MOLÉCULAS DE SUPERFICIE EN
SUBPOBLACIONES DE MONOCITOS DERIVADOS DE
PACIENTES CON INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO**

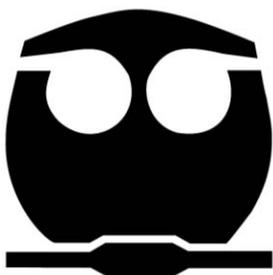
TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

RICARDO MICHELLE VAQUERO GARCÍA

MÉXICO, D.F. 2015





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: PROFESOR: LAURA ELIZABETH PENICHE VILLALPANDO

VOCAL: PROFESOR: JULIO CÉSAR MARTÍNEZ ÁLVAREZ

SECRETARIO: PROFESOR: LUIS CHÁVEZ SÁNCHEZ

1ER. SUPLENTE: PROFESOR: HÉCTOR JAVIER PÉREZ CANO

2° SUPLENTE: PROFESOR: OCTAVIO CASTRO ESCAMILLA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: EL PRESENTE TRABAJO FUE DESARROLLADO EN LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOLOGÍA, UNIDAD DE ALTA ESPECIALIDAD DEL HOSPITAL DE PEDIATRÍA “DR. SILVESTRE FRENK FREUND”, CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.

ASESOR DEL TEMA:

DR. LUIS CHÁVEZ SÁNCHEZ

SUSTENTANTE:

RICARDO MICHELLE VAQUERO GARCÍA

Este trabajo fue financiado con el apoyo del proyecto de Investigación Científica Básica con número 177669 de la convocatoria 2012 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

TABLA DE CONTENIDO

Abreviaturas	<i>i</i>
Índice de figuras	<i>iii</i>
Introducción	1
Marco Teórico	2
Enfermedades cardiovasculares	2
Desarrollo de la placa aterosclerosa	3
Infarto agudo de miocardio	5
Inflamación en el infarto agudo de miocardio.....	5
Los monocitos.....	8
Subpoblaciones de monocitos	9
Subpoblaciones de monocitos en IAM	12
Planteamiento del problema.....	13
Objetivos	14
Objetivo general	14
Objetivos particulares.....	14
Hipótesis.....	15
Diseño experimental	16
Diseño del estudio:.....	16
Población de estudio.....	16
Criterios de inclusión.....	16
Criterios de exclusión.....	17
Criterios de eliminación.....	17
Definición de variables	17
Materiales y Métodos	20

Obtención de muestras sanguíneas.....	20
Separación de células mononucleares	20
Marcaje de moléculas de superficie	20
Citometría de flujo	21
Análisis estadístico.....	21
Diagrama de flujo	22
Consideraciones éticas	22
Resultados:	23
Análisis de las subpoblaciones de monocitos	23
Comparación de la frecuencia de subpoblaciones de monocitos en pacientes con IAM y sujetos sanos	24
Expresión de HLA-DR en los monocitos clásicos, intermedios y no clásicos de pacientes con IAM y sujetos sanos	24
Expresión de CD80 en los monocitos clásicos, intermedios y no clásicos de pacientes con IAM y sujetos sanos	25
Expresión de CD86 en los monocitos clásicos, intermedios y no clásicos de pacientes con IAM y sujetos sanos	26
Expresión de TLR4 en los monocitos clásicos, intermedios y no clásicos de pacientes con IAM y sujetos sanos	27
Expresión de CD11b en los monocitos clásicos, intermedios y no clásicos de pacientes con IAM y sujetos sanos	28
Discusión.....	29
Conclusiones.....	32
Perspectivas.....	33
Referencias	34

ABREVIATURAS

ADCC	Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpos
APC	Alofococianina
BRIHH	Bloqueo de la Rama Izquierda del Haz de His
CCR	Receptor de Quimiocinas
CD	Grupo de Diferenciación
CK	Creatina Cinasa
DAMP	Patrones Moleculares Asociados a Daño
ECV	Enfermedad Cardiovascular
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
HLA	Antígenos Leucocitarios Humanos
IAM	Infarto Agudo de Miocardio
ICAM	Moléculas de Adhesión Intercelular
Ig	Inmunoglobulina
IgG	Inmunoglobulina G
IL	Interleucina
IMF	Intensidad Media de Fluorescencia
LDL	Lipoproteína de Baja Densidad
LDL_{ox}	Lipoproteína de Baja Densidad oxidada
LPS	Lipopolisacárido
MCP	Proteína Quimiotáctica de Monocitos
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad
NK	Células Asesinas Naturales

NLR	Receptor tipo NOD
PAMP	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
PE	Ficoeritrina
PECAM	Moléculas de adhesión de plaquetas a células endoteliales
PECy	Ficoeritrocianina
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
RPM	Revoluciones Por Minuto
ScR	Receptor Scavenger
TLR	Receptor Tipo Toll
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
VCAM	Moléculas de Adhesión de Células Vasculares

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Desarrollo de la placa aterosclerosa.....	4
Figura 2. Inicio de la respuesta inflamatoria en el infarto de miocardio.....	7
Figura 3. Distribución de las subpoblaciones de monocitos en citometría de flujo.....	11
Figura 4. Estrategia para el análisis de las subpoblaciones de monocitos.....	23
Figura 5. Frecuencia de las subpoblaciones de monocitos en pacientes con infarto agudo de miocardio y sujetos sanos.....	24
Figura 6. Expresión de HLA-DR en las subpoblaciones de monocitos.....	25
Figura 7. Expresión de CD80 en las subpoblaciones de monocitos.....	26
Figura 8. Expresión de CD86 en las subpoblaciones de monocitos.....	26
Figura 9. Expresión de TLR4 en las subpoblaciones de monocitos.....	27
Figura 10. Expresión de CD11b en las subpoblaciones de monocitos.....	28

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en el mundo, clínicamente se definen como un grupo de desórdenes del corazón y de los vasos sanguíneos. En México, las enfermedades cardiovasculares, y en particular los síndromes isquémicos coronarios, ocuparon el primer lugar de mortalidad en la población general. La presentación clínica más común de las cardiopatías isquémicas coronarias es el infarto agudo de miocardio (IAM). La causa más frecuente para el desarrollo del infarto es la aterosclerosis, definida como una enfermedad crónica y progresiva, caracterizada por la formación de placas de ateroma en las arterias grandes y medianas. La aterosclerosis es un proceso patológico complejo que involucra, además de la dislipidemia, la retención subendotelial de las lipoproteínas, la activación endotelial y la migración de las células inmunes, acompañado por un proceso inflamatorio que modula la iniciación y progresión de las lesiones. El IAM se produce cuando hay ruptura de la placa aterosclerosa, generalmente está acompañado de un trombo que obstruye la luz de las arterias coronarias causando que el flujo sanguíneo que irriga el corazón disminuya progresivamente, teniendo como consecuencia hipoxia, necrosis del miocardio y una respuesta inflamatoria exacerbada, en la cual participan células de la respuesta inmune. En este sentido, los monocitos son cruciales en condiciones inflamatorias agudas y crónicas, por ejemplo en la defensa del huésped y en enfermedades crónicas como la artritis reumatoide, fibrosis pulmonar y la glomerulonefritis. Los monocitos son una población celular heterogénea y pueden clasificarse en tres subpoblaciones, los monocitos clásicos, intermedios y no clásicos. Se ha demostrado la participación de los monocitos en la formación, progresión, desestabilización y ruptura de la placa aterosclerosa, así como en fases posteriores a un evento coronario agudo, donde intervienen en la remodelación y cicatrización del tejido dañado. Esta aparente dualidad de los monocitos como células benéficas o perjudiciales en las cardiopatías isquémicas permite plantear la siguiente pregunta: ¿Cuál es la relación del fenotipo las subpoblaciones de monocitos con el infarto agudo de miocardio?

MARCO TEÓRICO

Enfermedades cardiovasculares

Actualmente, las enfermedades cardiovasculares (ECV) son un grave problema de salud en el mundo debido a que se han consolidado como la primera causa de muerte en la población adulta. Se estima que durante el año 2012 murieron cerca de 17.5 millones de personas, lo que representa un 31% del total de las muertes registradas en ese año [1]. En México, las ECV ocuparon el primer lugar de mortalidad en la población durante el 2013, llegando a causar cerca de 113 mil decesos, de las cuales el 68 por ciento corresponden a síndromes isquémicos coronarios. Las enfermedades isquémicas coronarias afectaron mayoritariamente a hombres que a mujeres, en una relación aproximada de 3:1 y tuvieron mayor incidencia en la población adulta donde cerca del 80% de las defunciones corresponden a adultos mayores de 45 años [2]. Estudios epidemiológicos han demostrado que los principales factores de riesgo asociados a enfermedades cardiovasculares son la hipertensión arterial, la diabetes mellitus tipo II, el síndrome metabólico, la dislipidemia, el consumo de alcohol y tabaco, la obesidad, la inactividad física y la mala alimentación [3,4]. La causa más frecuente para desarrollo de enfermedades cardiovasculares es el aumento de la concentración de colesterol total, así como niveles altos de lipoproteína de baja densidad en la sangre, lo que propicia la formación de depósitos de grasa en las paredes de los vasos sanguíneos que irrigan el corazón o el cerebro [3,5,6]. Los síndromes coronarios isquémicos son un grupo de trastornos asociados con la disminución del flujo sanguíneo a través de la arteria coronaria, lo que origina un desequilibrio entre el aporte y el consumo de oxígeno y nutrientes en las células del miocardio. En la mayoría de los casos, la cardiopatía isquémica se debe a la presencia de placas de ateroma que, al romperse, producen la oclusión parcial o total de la arteria coronaria, lo que produce distintos grados de daño al miocardio [7-8].

Desarrollo de la placa aterosclerosa

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica que puede afectar todas las arterias, particularmente cardíacas, cerebrales y renales [9]. El proceso aterogénico inicia con la disfunción endotelial y como consecuencia se observa la expresión de moléculas de adhesión tales como las selectinas (E y P), moléculas de adhesión de plaquetas a células endoteliales (PECAM)-1, moléculas de adhesión intercelular (ICAM)-1 y moléculas de adhesión de células vasculares (VCAM) mediante las cuales se produce la interacción con los monocitos circulantes con las células endoteliales [10,11]; además, las células del endotelio liberan quimioatrayentes como la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP)-1, estimulando la migración de monocitos [12]. Estos cambios tempranos incluyen la oxidación de lipoproteína de baja densidad (LDL) en el espacio subendotelial por compuestos reactivos del oxígeno, generándose la LDL oxidada (LDLox) [13]. Los monocitos infiltrados en la lesión se diferencian a macrófagos, lo cuales expresan en su superficie celular receptores “scavenger” como CD36 mediante el cual identifican y endocitan partículas de LDLox y se diferencian en células espumosas [14]. En la última etapa de la aterosclerosis ocurre ruptura o ulceración de la placa fibrosa; la vulnerabilidad de la placa se origina por un adelgazamiento de la lesión, donde los monocitos/macrófagos degradan la matriz de la capa fibrosa por medio de colagenasa intersticial, gelatinasa y estromilisina. La degradación de la capa fibrosa puede conducir a una hemorragia, donde las plaquetas activadas se adhieren a la arteria lesionada ocasionando la formación de un trombo y la oclusión de la arteria, provocando un infarto agudo al miocardio (*figura 1*) [10,13].

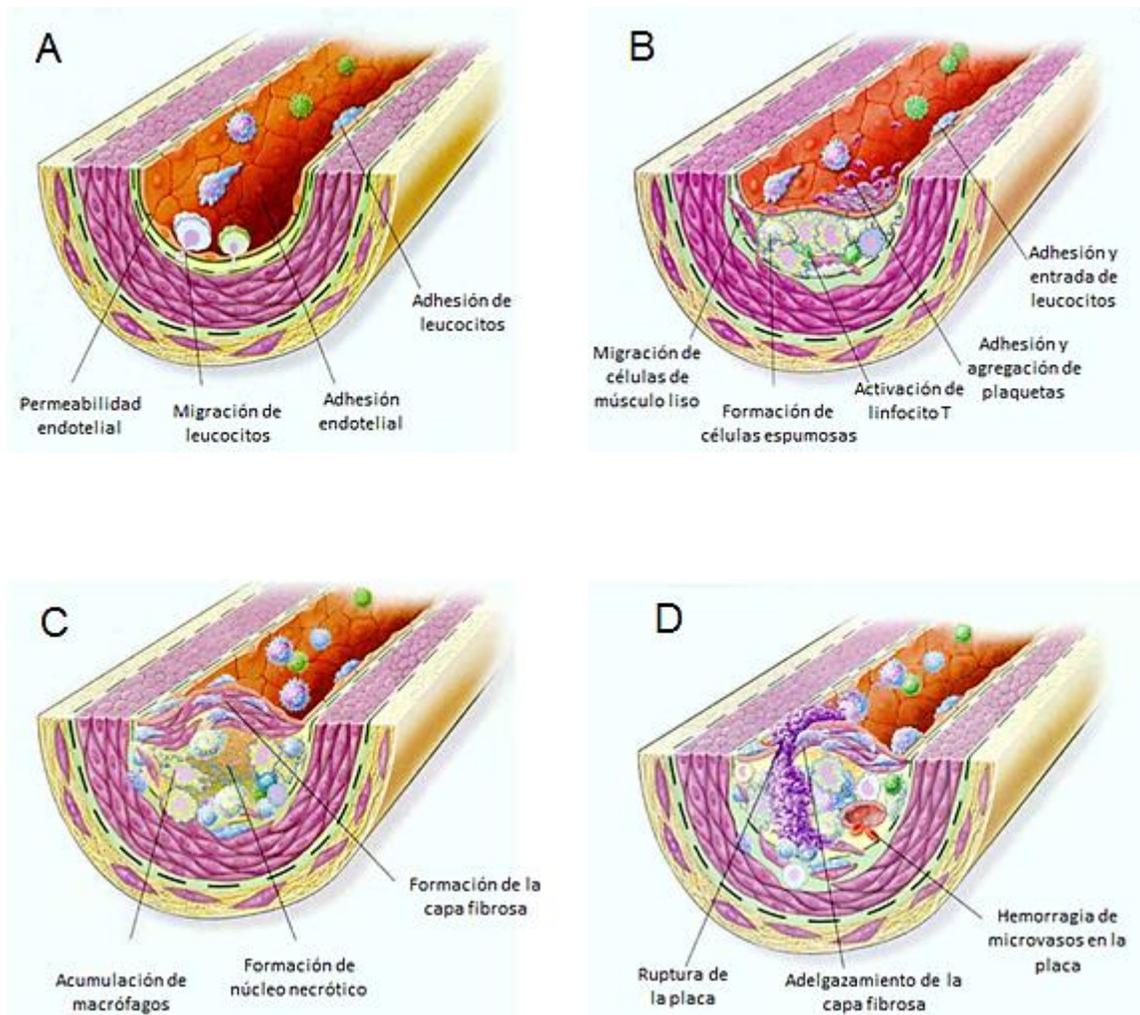


Figura 1. Desarrollo de la placa aterosclerótica. (1A) La lesión se origina por un daño al endotelio, lo que permite un incremento en la permeabilidad endotelial, ocasionando la migración y adhesión de leucocitos. (1B) En la siguiente etapa de la lesión, las células de músculo liso migran a la lesión, los macrófagos se transforman a células espumosas, los linfocitos T presentes se activan, las plaquetas se adhieren y agregan a la lesión y continúa el arribo de leucocitos. (1C) En la lesión ocurre una acumulación de macrófagos los cuales mueren por apoptosis o necrosis, generándose el núcleo necrótico y formación de la capa fibrosa. (1D) En las etapas finales la lesión sufre un adelgazamiento de la capa fibrosa, ruptura de la placa y hemorragias de microvasos [modificado de 10].

Infarto agudo de miocardio

El infarto agudo de miocardio (IAM) es el término dado al proceso de muerte celular miocárdica en combinación con la presentación clínica de isquemia. La obstrucción de las arterias que irrigan el músculo cardiaco, conocidas como arterias coronarias, trae como consecuencia una anoxia celular prolongada que induce la necrosis de los cardiomiocitos. El espectro clínico del IAM es muy variado y está determinado por la intensidad del mismo [15,16]. La manifestación clínica más frecuente es la aparición de un dolor precordial opresivo con duración mayor a 30 minutos que se extiende hasta la mandíbula, los hombros y el brazo izquierdo. El malestar asociado al IAM incluye otros síntomas como taquicardia, disnea, diaforesis y vómito [17]. Además de las manifestaciones clínicas, el diagnóstico de IAM se establece por la presencia de biomarcadores de daño miocárdico y por cambios en las derivaciones del electrocardiograma (ECG) como las desviaciones positivas o negativas de la onda ST, el bloqueo del rama izquierda del Haz de His (BRIHH) o el desarrollo de ondas Q patológicas [15]. Los marcadores cardiacos son un grupo de proteínas que reflejan daño celular miocárdico, las troponinas (I y T) y la isoenzima MB de la creatina cinasa (CK-MB) son los biomarcadores más utilizados en el diagnóstico de IAM por su alta especificidad del músculo cardiaco [7].

Inflamación en el infarto agudo de miocardio

El proceso fisiopatológico del IAM involucra una secuencia de eventos en el que la respuesta inmune interviene de forma fundamental. La respuesta inflamatoria en el corazón infartado se divide en dos fases bien caracterizadas: la fase inflamatoria aguda y la fase de reparación. La fase inflamatoria aguda inicia con la necrosis masiva de los miocardiocitos que liberan su contenido intracelular al exterior. Diversos ligandos endógenos como proteínas de choque térmico, hialuronano, proteoglicanos y algunos lípidos membranales son reconocidos como patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) [18,19]. Algunos receptores tipo Toll,

además de reconocer moléculas de patógenos, pueden reconocer moléculas endógenas de daño a los tejidos. La activación de estas señales inducen la expresión de citocinas y quimiocinas tales como IL-1, TNF- α , CXCL1, CCL3 y CCL5; importantes para el reclutamiento de células inmunes. La migración de los leucocitos al miocardio inicia a las pocas horas del infarto y su infiltración es esencial para la eliminación de restos celulares (*figura 2*) [19]. Una vez reclutados, los neutrófilos fagocitan células muertas y liberan proteasas que inician la disolución de la matriz extracelular. Por otro lado, los monocitos aumentan su actividad fagocítica y secretan altas cantidades de especies reactivas de oxígeno (ROS) [20-21]. Los macrófagos residentes de tejido facilitan la degradación de la matriz extracelular a través de la producción de metaloproteinasas, lo que conduce a una mayor limpieza del tejido dañado. A medida que los restos celulares y fragmentos de matriz se eliminan, la respuesta inflamatoria es suprimida e inicia la fase de reparación del tejido [22].

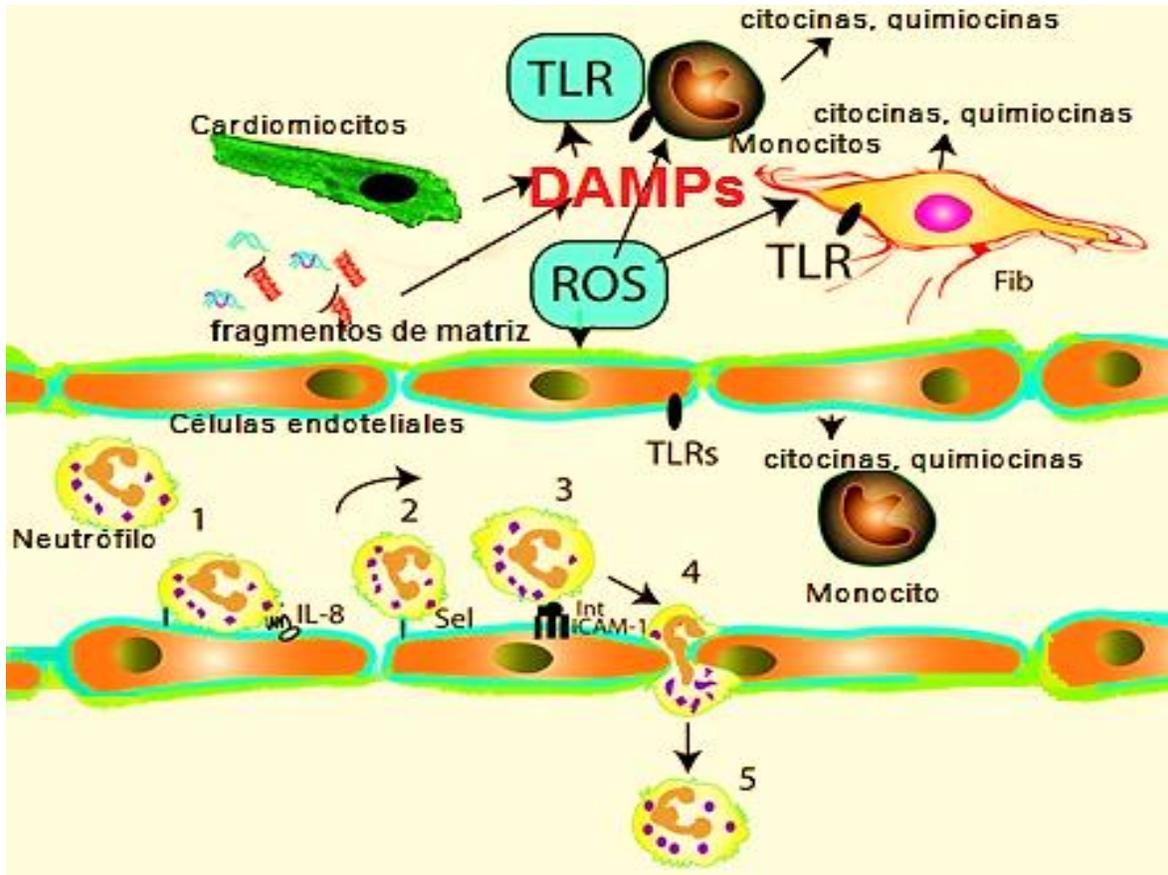


Figura 2. Inicio de la respuesta inflamatoria en el infarto de miocardio. Los cardiomiocitos necróticos y la fragmentación de la matriz liberan señales de daño (DAMPs), desencadenando una cascada de señalizaciones vía TLRs y del complemento. Los mediadores pro-inflamatorios incrementan, mientras las células endoteliales y fibroblastos inducen la secreción de ROS, quimiocinas y citocinas. Los leucocitos son reclutados en el corazón infartado a través de la activación de una serie de mecanismos de adhesión. Los neutrófilos son capturados por el endotelio activado (1) e inician el rodamiento sobre la superficie endotelial a través de interacciones que implican a las selectinas (2). Los neutrófilos se inmobilizan en la superficie endotelial y se adhieren firmemente ante la interacción de las integrinas e ICAM-1 (3). La transmigración de los neutrófilos a través de la capa endotelial (4) es un proceso que involucra interacciones entre ICAM-1 y cadherinas. Después de la extravasación en el infarto, los neutrófilos desempeñan un papel importante en el aclaramiento de los tejidos a partir de células muertas y los desechos matriz (5). [Modificado de 20]

Los monocitos

Los monocitos son células del sistema inmune que tienen una participación integral en la formación de inmunidad innata y adaptativa. Estas células mononucleares de origen mieloide constituyen del 3 al 8% de los leucocitos en sangre periférica. Los monocitos tienen la capacidad de extravasarse a tejidos donde se diferencian a macrófagos o células dendríticas, las cuales cumplen con diversas funciones especializadas como fagocitosis, captación y presentación de antígenos, secreción de citocinas y activación de células [23,24]. Como principal componente del sistema inmune innato, los monocitos son fundamentales para contrarrestar las infecciones bacterianas, virales y fúngicas, siendo la fagocitosis el principal mecanismo de eliminación de agentes exógenos [24]. Los monocitos, además de la defensa contra los patógenos, están involucrados en la angiogénesis, la homeostasis y la remodelación tisular posterior a una lesión; también tienen un papel clave en la depuración de compuestos tóxicos y la eliminación de células apoptóticas [25]. Estas células secretan citocinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-6, también son capaces de inducir efectos anti-inflamatorios mediante la secreción de IL-10. La superficie de los monocitos está cubierta por múltiples receptores de membrana que son importantes en la locomoción, captación de partículas y señalización. Entre las principales moléculas membranales destacan los receptores de integrinas, receptores de quimiocinas (CCRs), moléculas co-estimuladoras y los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) como receptores tipo Toll (TLRs), tipo NOD (NLRs) o receptores del complemento [23,26-28]. CD14 es un receptor de alta afinidad que reconoce el lipopolisacárido bacteriano, es la molécula más representativa de los monocitos. Esta glicoproteína también está presente en los macrófagos y granulocitos, aunque en niveles más bajos [29]. TLR4 es un receptor transmembranal miembro de la familia de los TLRs, junto con CD14 participa en el reconocimiento del LPS, siendo un componente crítico en la activación de la reacción inflamatoria de los monocitos. [30-34]. CD11b es otra molécula expresada en los monocitos que, junto con la integrina β 2, forma el receptor de complemento 3. Durante la respuesta inflamatoria, CD11b regula la adhesión y migración de los leucocitos

hacia los tejidos [35]. CD16 es un receptor de baja afinidad para IgG que puede unir agregados de IgG o complejos IgG-antígeno [36-39]. CD16 está relacionado con la fagocitosis, la activación de las células NK y la toxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) [40]. Los monocitos expresan HLA-DR, una molécula fundamental para mediar la interacción celular con las células T durante la presentación de antígeno [41]. CD80 y CD86 son moléculas homólogas de la familia B7 presentes en las APCs, y son las encargadas de proporcionar la unión de co-estimulación a través del receptor CD28 presente en los linfocitos T [42-44].

Subpoblaciones de monocitos

Los monocitos son considerados una población funcional y fenotípicamente heterogénea, esta diversidad es atribuida a la existencia de tres subpoblaciones clasificadas con base en la expresión de CD14 y CD16 (*figura 3*) [45-47]. Las diferencias de fenotipo y expresión de marcadores entre las subpoblaciones de monocitos humanos contribuyen a tener distintas propiedades funcionales lo que sugiere la especialización de estas células [48-50]. Actualmente, los monocitos se clasifican en monocitos clásicos, intermedios y no clásicos [25,51].

Los monocitos clásicos (CD14⁺⁺, CD16⁻) son la subpoblación más abundante en sangre periférica representando entre del 80 al 85% de los monocitos totales. Funcionalmente, son considerados los más importantes en la primer línea de defensa del huésped por su alta capacidad fagocítica y producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Se ha demostrado que los monocitos clásicos secretan niveles altos de IL-10 y muy bajos de TNF- α en respuesta a LPS o Pam3CSK4, por lo que son reconocidos como monocitos antiinflamatorios. Además de expresar muy altos niveles de CCR2, los monocitos clásicos tienen alta expresión de CD11b, L-selectina y del receptor scavenger clase A (ScR)-A [25,52].

Los monocitos intermedios (CD14⁺⁺, CD16⁺) integran la subpoblación menos común, representando únicamente del 4 al 6% del total de monocitos. Esta

subpoblación es considerada la más pro-inflamatoria debido a su gran potencial para producir ROS y por su alta capacidad de secreción de citocinas como TNF- α e IL-1 β en respuesta a la estimulación con LPS vía TLR4 o Pam3CSK4 vía TLR2. Sin embargo, también poseen propiedades proangiogénicas y pueden secretar IL-10, aunque en muy bajas cantidades [46,53]. Los monocitos intermedios son considerados la mejor subpoblación en cuanto a presentación de antígeno se refiere, esto porque son muy eficientes para estimular y activar a los linfocitos T [51]. Como células especializadas en la presentación de antígeno, la subpoblación intermedia tiene alta expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase dos (MHCII) y moléculas accesorias de las cuales destacan CD80 y CD86 [54,55]. También expresan cantidades significativas de los receptores CCR2, CCR5 y Tie2; cuyo ligando es la angiopoyetina-1, una molécula importante en la neovascularización y remodelación tisular [56-58].

Los monocitos no clásicos (CD14+, CD16+) se encuentran entre el 7 al 11% del total, se caracterizan por su alta expresión del receptor de fractalquina (CX3CR1), importante en la migración a través del endotelio; así como de CD86, CD11c, CCR5 y, a diferencia de los monocitos clásicos e intermedios, esta subpoblación no presenta niveles elevados de CCR2. En contraste con los monocitos clásicos, se ha reportado que la subpoblación no clásica actúa de manera importante en respuesta a virus y ácidos nucleicos produciendo citocinas pro-inflamatorias como TNF- α e IL-1 β vía TLR-7 y TLR-8. No obstante, también tienen efectos antiinflamatorios y expresan una amplia gama de moléculas de adhesión como VLA-4, lo que se relaciona fuertemente con su capacidad de patrullaje del endotelio, su participación en la reparación de tejido y en la deposición de colágeno. [54-56].

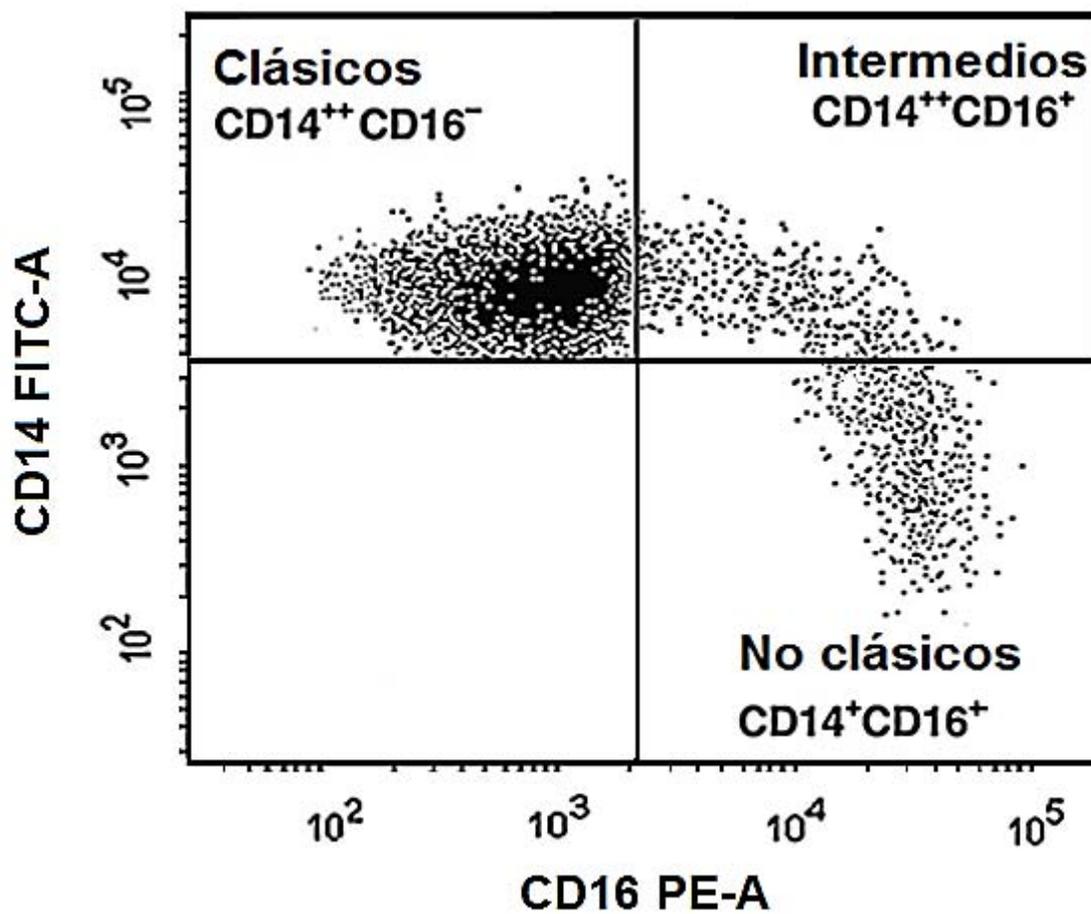


Figura 3. Distribución de las subpoblaciones de monocitos en citometría de flujo. CD14 y CD16 fueron marcados con FITC y Ficoeritrina (PE), respectivamente [Modificado de 51]

Subpoblaciones de monocitos en IAM

En el IAM en humanos se ocasiona un incremento en el número de monocitos clásicos en los primeros días del evento y alrededor del día siete se encuentran niveles elevados de los monocitos intermedios, la magnitud de la movilización de los monocitos clásicos es asociada con la recuperación cardíaca, estas evidencias sugieren una dinámica bifásica de los monocitos en el IAM con posibles consecuencias funcionales [59]. Otra evidencia demuestra que el incremento en el número de los monocitos intermedios se asocia con un mal pronóstico para el IAM [60]. Más aún, los monocitos clásicos e intermedios muestran un incremento de los niveles de TLR4 que se asocia como un marcador de activación de los monocitos en el IAM [61].

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la enfermedad cardiovascular se ha demostrado un incremento en la proporción de los monocitos intermedios de sangre periférica asociándose con un incremento de la respuesta inflamatoria en los pacientes, sugiriendo que las subpoblaciones de monocitos pueden tener una participación relevante en la aterosclerosis. Más aún, se ha demostrado un incremento en la expresión de TLR4 en los monocitos intermedios de pacientes con infarto agudo de miocardio, sugiriendo a TLR4 como una molécula asociada a la respuesta inflamatoria del paciente. Sin embargo, se desconoce el patrón de expresión de otras moléculas de superficie presentes en las subpoblaciones de monocitos en los pacientes con infarto agudo de miocardio.

Por lo que el proyecto se dirige a contestar la siguiente pregunta: ¿Cuál será el fenotipo de las distintas subpoblaciones de monocitos de pacientes con infarto agudo de miocardio?

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la expresión de moléculas de superficie en las subpoblaciones de monocitos provenientes de pacientes con infarto agudo de miocardio y compararla con sujetos sanos.

Objetivos particulares

1. Determinar el patrón de expresión de las moléculas HLA-DR, CD80, CD86, TLR4 y CD11b en los monocitos clásicos, intermedios y no clásicos en pacientes con IAM.
2. Determinar el patrón de expresión de las moléculas HLA-DR, CD80, CD486, TLR4 y CD11b en los monocitos clásicos, intermedios y no clásicos en sujetos sanos.

HIPÓTESIS

1. Las subpoblaciones de monocitos clásicos e intermedios estarán incrementados en los pacientes con IAM respecto a los sujetos sanos.
2. Los monocitos clásicos, intermedios y no clásicos de los pacientes con IAM tendrán mayor expresión de TLR4, HLA-DR, CD80, CD86, CD11b.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Diseño del estudio:

Se realizó un estudio comparativo y transversal.

Población de estudio

Serán incluidos pacientes con diagnóstico de infarto agudo de miocardio que sean ingresados de forma consecutiva a la UMAE, Hospital de Cardiología de Centro Médico Nacional Siglo XXI, que cumplan los criterios de selección. Las muestras de los pacientes se tomarán dentro de las primeras horas de iniciados los síntomas. El grupo de sujetos sanos será de 40 a 74 años de edad, y serán reclutados de banco de sangre. Ambos grupos serán sometidos a una valoración médica integral por un médico cardiólogo.

Criterios de inclusión

1. Pacientes de cualquier género con edad entre 45 a 75 años.
2. Pacientes con diagnóstico de infarto agudo de miocardio, dentro de las primeras 72 horas de iniciados los síntomas.
3. El diagnóstico de infarto se considerará con la presencia de elevación de marcadores de necrosis miocárdica como la elevación de CK total a 150% de su valor de referencia o la elevación en los niveles de troponinas a 10% de su valor basal; además de uno de los siguientes criterios:
 - A. Dolor precordial de tipo isquémico de 30 minutos o mayor tiempo de duración, acompañado de disnea, diaforesis, náuseas y/o vómito.
 - B. Detección de cambios electrocardiográficos, cuyas anomalías se detectan como desniveles positivos o negativos del segmento ST en las derivaciones y/o presencia del boqueo de la rama izquierda del Haz de His (BRIHH) de reciente aparición.

Criterios de exclusión

1. Pacientes que cursen con síndrome anémico o hayan recibido hemotransfusión en el último mes previo al infarto.
2. Pacientes con antecedentes de enfermedad inflamatoria crónica, neoplásica o proceso infeccioso activo.
3. Trombocitopenia o discrasia sanguínea conocida.
4. Antecedentes de tratamiento previo con antiinflamatorios o inmunosupresores.
5. Pacientes a los que no se logre obtener el número de cantidad de sangre necesaria para los ensayos.

Criterios de eliminación

1. Pacientes a los que no se logre obtener el número de monocitos necesarios para los experimentos.
2. Datos de sangrado mayor activo.

Definición de variables

Variables independientes:

Grupos de estudio:

- I. Pacientes con síndrome coronario agudo
- II. Sujetos sanos

Definición conceptual: Los pacientes con síndrome coronario agudo son aquellos que presentan manifestación clínica de isquemia aguda y necrosis miocárdica aguda debida a reducción del flujo coronario, aporte de oxígeno miocárdico insuficiente, asociada a la enfermedad arterial coronaria con erosión o ruptura de la placa aterosclerosa y la subsecuente oclusión parcial o total de la luz del vaso. Se considera un sujeto sano por la ausencia de enfermedad o estado patológico alguno.

Definición operacional: Se considera paciente con síndrome coronario agudo a aquellos que ingresen con diagnóstico de infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST. Se considera a sujetos sanos a aquellos en quienes de descarte la presencia de signos o síntomas de isquemia miocárdica, enfermedad inflamatoria crónica, neoplásica o infecciosa.

Tipo de variable: Nominal

Escala de medición: Grupo I y grupo II

Variables dependientes:

I. Molécula HLA-DR.

Definición conceptual: HLA-DR es una molécula de superficie expresada en las células presentadoras de antígeno, participa en la activación de linfocitos

Definición operacional: Se realizara la medición de la molécula mediante citometría de flujo.

Tipo de variable: Cuantitativa continua.

Escala de medición: Escala de razón.

II. Moléculas CD80, CD86

Definición conceptual: CD80 y CD86 son moléculas de superficie presentes en células presentadoras de antígeno, proporcionan la señal coestimuladora para la activación de linfocitos T.

Definición operacional: Se realizaran las mediciones de las moléculas mediante citometría de flujo.

Tipo de variable: Cuantitativa continua.

Escala de medición: Escala de razón.

III. Molécula TLR4

Definición conceptual: Receptor tipo Toll que reconoce LPS

Definición operacional: Se realizaran las mediciones de la molécula mediante citometría de flujo.

Tipo de variable: Cuantitativa continua.

Escala de medición: Escala de razón.

IV. Molécula CD11b

Definición conceptual: Molécula implicada en la migración y adhesión en los tejidos.

Definición operacional: Se realizaran las mediciones de la molécula mediante citometría de flujo.

Tipo de variable: Cuantitativa continua.

Escala de medición: Escala de razón.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de muestras sanguíneas

En el estudio se incluyeron un total de 25 pacientes con IAM y 12 donadores sanos, los cuales fueron reclutados en un periodo comprendido de marzo a septiembre de 2015. Las muestras sanguíneas de los sujetos sanos fueron obtenidas por venopunción, previa asepsia y antisepsia; las muestras correspondientes a los pacientes se obtuvieron a partir de catéter periférico o por venopunción. Para ambos grupos se recolectó un volumen aproximado de 5 mL de muestra. La sangre fue colectada en tubos con EDTA K₂ del sistema Vacutainer (BD Biosciences®, San Jose, CA, USA).

Separación de células mononucleares

La separación de células mononucleares se realizó mediante un gradiente de densidad con una solución comercial Lymphoprep (Axis-Shield®, Cambridgeshire, UK) cuya densidad es de 1.0077 g/mL. Las muestras de sangre se diluyeron a proporción de 1:2 en solución salina isotónica (SSI), posteriormente la sangre se colocó en tubos con 12 mL de Lymphoprep y se centrifugó a 2000 rpm por 30 minutos. Se recuperó la interfase formada entre el Lymphoprep y el plasma, las células recuperadas se lavaron dos veces con SSI durante 15 minutos a 1200 rpm y 900 rpm, respectivamente.

Marcaje de moléculas de superficie

En placas de 96 se colocaron 200,000 células mononucleares por pozo. Para la identificación de las subpoblaciones de monocitos se utilizaron los anticuerpos anti-humanos anti-CD14-APC o anti-CD14-FITC y CD16-PECy7 (eBioscience), adicionalmente se realizó la tinción con los anticuerpos anti-HLA-DR-PE, anti-CD80-PECy5, anti-CD86-PECy7, anti-TLR4-PE y anti-CD11b (eBioscience), las células mononucleares se incubaron con 10µL de cada anticuerpo durante 20 minutos a 4°C en la oscuridad. Posteriormente se lavaron las células con FACS

buffer (PBS-BSA-Na₃N 0.2% y pH= 7.4.) a 1500 rpm por 5 minutos y se fijaron con 35µL de p-formaldehído al 2%.

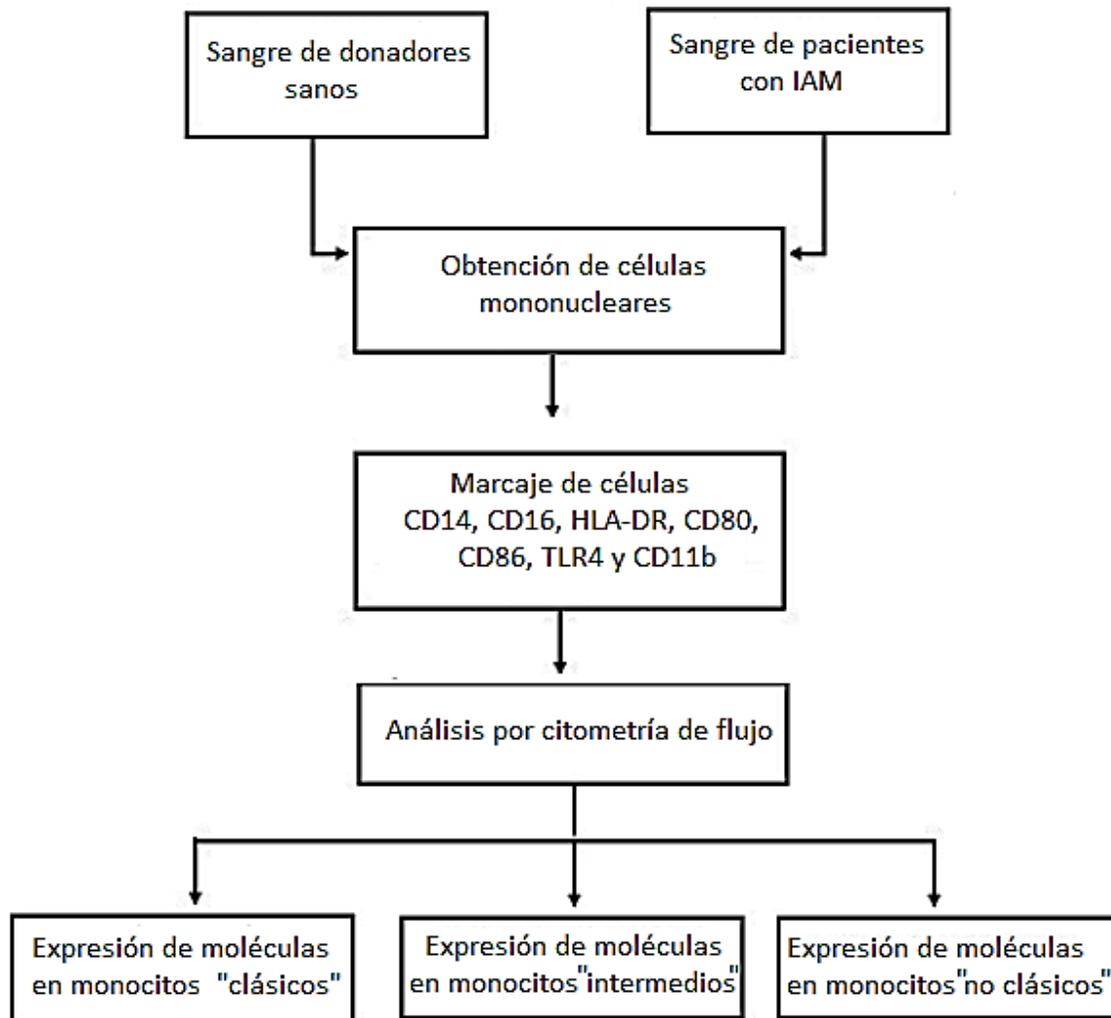
Citometría de flujo

Las muestras fueron adquiridas en el citómetro de flujo MACSQuant (Miltenyi Biotec®). El análisis de datos se realizó utilizando el software FlowJo versión 10.0.6 (Tree Star, Inc) para Windows.

Análisis estadístico

Se empleó la prueba ANOVA para la comparación de variables cuantitativas entre los grupos de acuerdo con la distribución de los datos y homogeneidad de varianzas. Se considerará un valor de $p < 0.05$.

DIAGRAMA DE FLUJO



CONSIDERACIONES ÉTICAS

Este protocolo corresponde a un estudio de riesgo mínimo de acuerdo al reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación, ya que únicamente se tomará una muestra de sangre en una ocasión a los pacientes con síndrome coronario agudo y sujetos sanos. Dado estas características aun así se solicitó consentimiento verbal.

RESULTADOS:

Análisis de las subpoblaciones de monocitos

Las células mononucleares de los dos grupos de estudio fueron teñidas con anticuerpos anti-CD14 y anti-CD16 para analizar a las tres subpoblaciones de monocitos. La estrategia de análisis se inició con una gráfica de singlete para analizar eventos celulares individuales (*figura 4A*). Posteriormente se generó un gráfico de tamaño contra granularidad, de la cual se seleccionó la región de monocitos (*figura 4B*) y se generó otra gráfica de tamaño contra la expresión de CD14, lo que permitió descartar células negativas a CD14 (*figura 4C*). Finalmente se abrió otra la gráfica de puntos de la expresión de CD14 y CD16 donde se identificaron las subpoblaciones de monocitos (*figura 4D*).

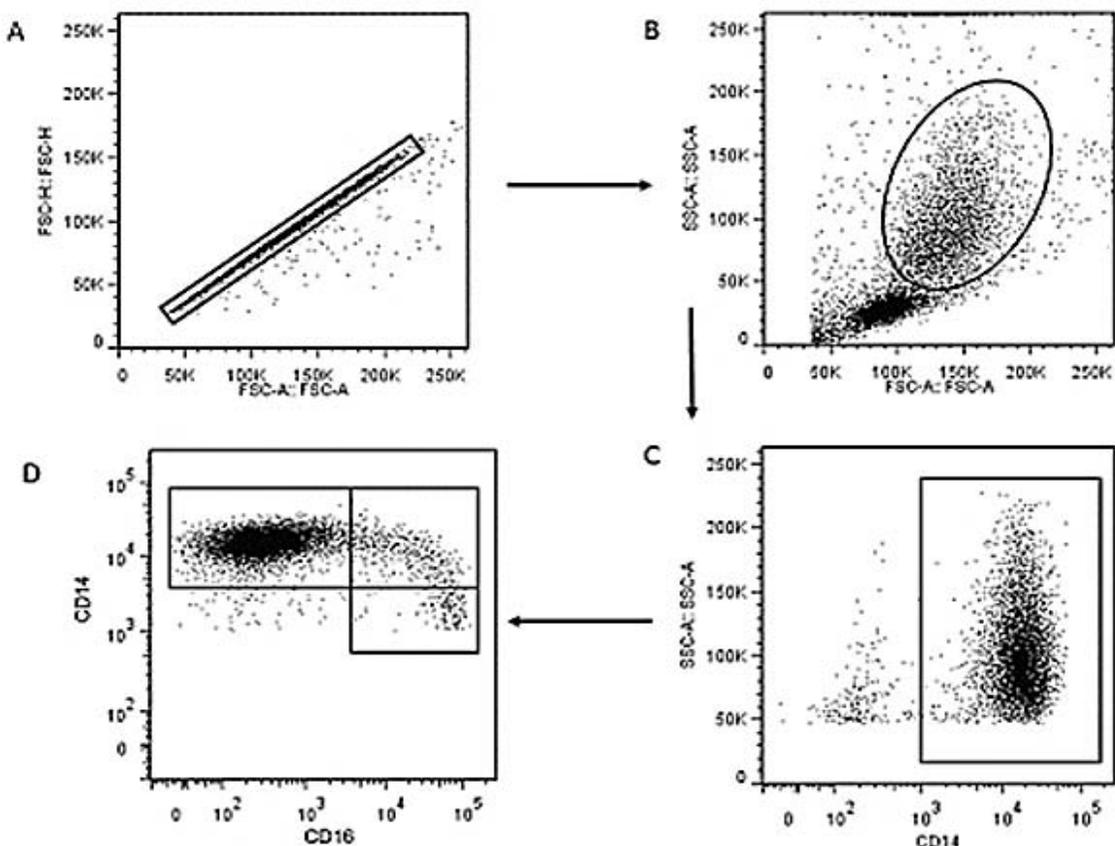


Figura 4. Estrategia para el análisis de las subpoblaciones de monocitos. Gráficos representativos de la secuencia de análisis realizado para identificar a las subpoblaciones de monocitos: A) Singlete, B) Tamaño contra granularidad, C) Tamaño contra expresión de CD14, D) Expresión de CD14 y de CD16.

Comparación de la frecuencia de subpoblaciones de monocitos en pacientes con IAM y sujetos sanos

Se determinó la proporción de las subpoblaciones de monocitos en los sujetos sanos y pacientes con IAM. Observamos que el recuento de células de los monocitos clásicos (CD14⁺⁺CD16⁻) fue significativamente mayor en los pacientes con IAM respecto a los sujetos sanos (*figura 5A*). Las proporciones de los monocitos intermedios (CD14⁺⁺CD16⁺) y no clásicos (CD14⁺CD16⁺) fueron similares para los dos grupos y en ambos casos, no hubo significancia estadística (*figura 5B y 4C*).

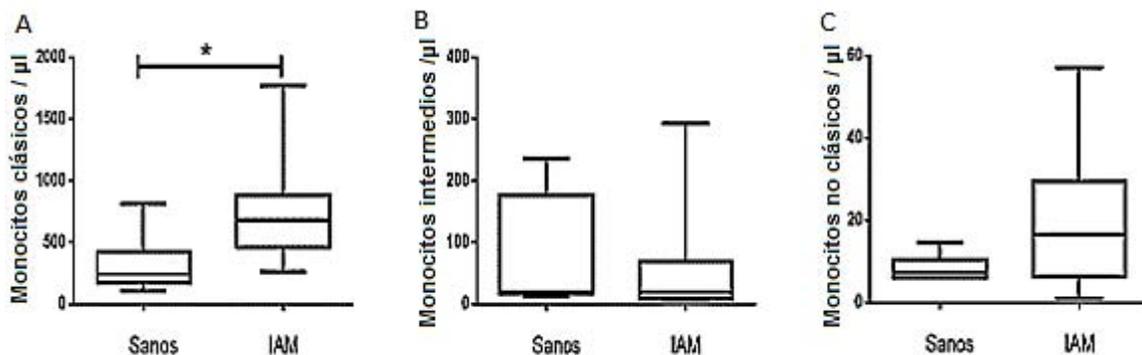


Figura 5. Frecuencia de las subpoblaciones de monocitos en pacientes con infarto agudo de miocardio y sujetos sanos. A) Monocitos clásicos, B) monocitos intermedios y C) monocitos no clásicos. Sanos: Sujetos sanos, IAM: Pacientes con infarto agudo de miocardio (*p<0.05).

Expresión de HLA-DR en los monocitos clásicos, intermedios y no clásicos de pacientes con IAM y sujetos sanos

Se evaluó la expresión de HLA-DR en los monocitos clásicos, intermedios y no clásicos de los pacientes con infarto y de los sujetos sanos. De acuerdo con los resultados, los monocitos clásicos de los pacientes con IAM presentaron alta expresión de HLA-DR en comparación con la subpoblación clásica de los sujetos sanos (*figura 6A*). Por otro lado, la expresión de HLA-DR en los monocitos

intermedios fue similar en ambos grupos de estudio (*figura 6B*). Los monocitos no clásicos mostraron mayor expresión de HLA-DR en los pacientes infartados respecto los sujetos sanos (*figura 6C*).

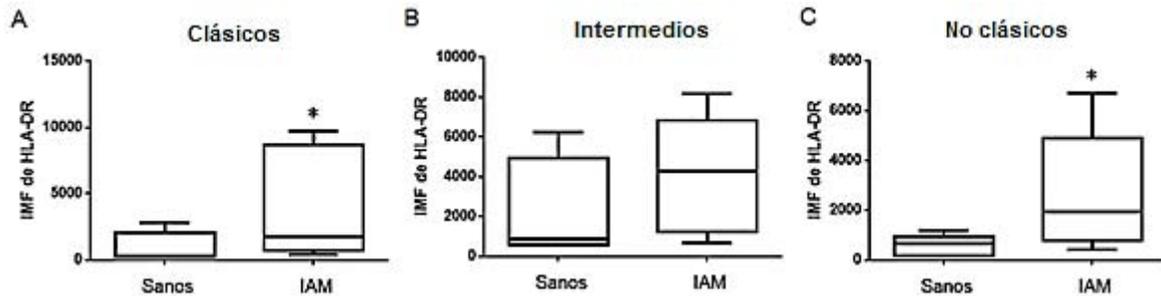


Figura 6. Expresión de HLA-DR en las subpoblaciones de monocitos. A, B y C expresión de HLA-DR en monocitos clásicos, intermedios y no clásicos, respectivamente. Se determinó la expresión de HLA-DR por citometría de flujo. IMF: Intensidad media de fluorescencia. Sanos: Sujetos sanos, IAM: Pacientes con infarto agudo de miocardio (* $p < 0.05$).

Expresión de CD80 en los monocitos clásicos, intermedios y no clásicos de pacientes con IAM y sujetos sanos

Se determinó la expresión de la molécula CD80 en los monocitos clásicos, intermedios y no clásicos de los pacientes con infarto y de los sujetos sanos. Los resultados indican que en las tres subpoblaciones de monocitos no hubo diferencia significativa en la expresión de CD80 tanto en pacientes con IAM como en los sanos. Sin embargo, los pacientes con IAM muestran una tendencia a incrementar los niveles de CD80 en los monocitos intermedios en comparación con los sujetos sanos (*figura 7*).

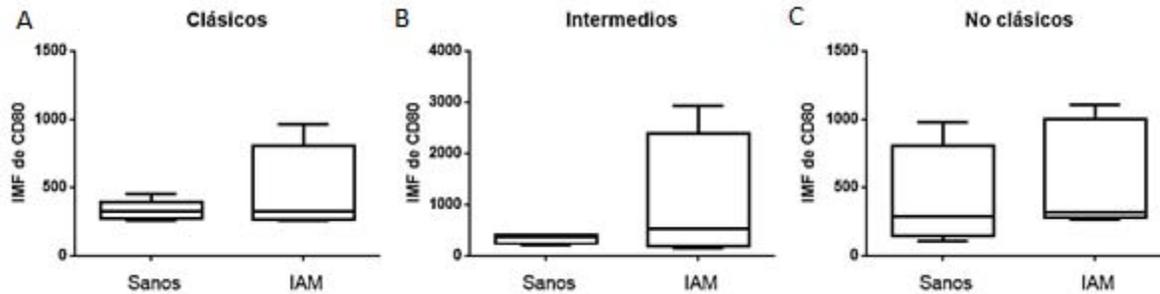


Figura 7. Expresión de CD80 en las subpoblaciones de monocitos. A, B y C expresión de CD80 en monocitos clásicos, intermedios y no clásicos, respectivamente. Se determinó la expresión de CD80 por citometría de flujo. IMF: Intensidad media de fluorescencia. Sanos: Sujetos sanos, IAM: Pacientes con infarto agudo de miocardio.

Expresión de CD86 en los monocitos clásicos, intermedios y no clásicos de pacientes con IAM y sujetos sanos

Se determinó la expresión de CD86 en los monocitos clásicos, intermedios y no clásicos de los pacientes con IAM y en sujetos sanos. Al explorar la expresión de CD86 observamos que los monocitos clásicos en pacientes con IAM presentan niveles superiores de CD86 respecto a los monocitos clásicos de los sujetos sanos (figura 8A). Mientras que los monocitos intermedios y no clásicos mostraron un patrón de expresión de CD86 similar entre ambos grupos (figura 8B y 8C).

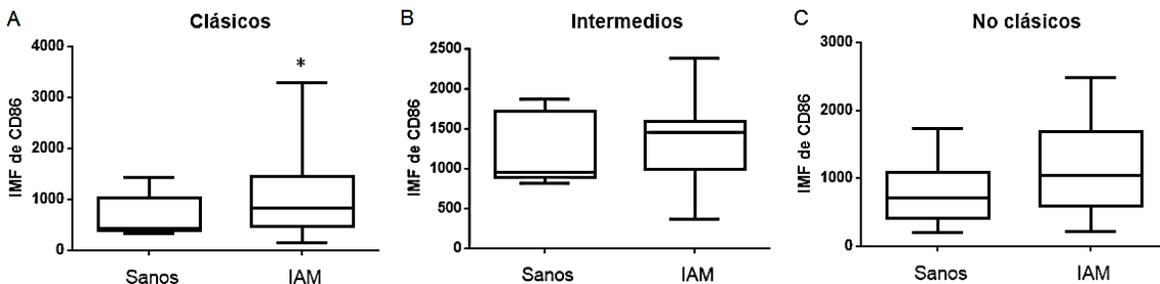


Figura 8. Expresión de CD86 en las subpoblaciones de monocitos. A, B y C expresión de CD86 en monocitos clásicos, intermedios y no clásicos, respectivamente. Se determinó la expresión de CD-86 por citometría de flujo. IMF:

Intensidad media de fluorescencia. Sanos: Sujetos sanos, IAM: Pacientes con infarto agudo de miocardio (* $p < 0.05$).

Expresión de TLR4 en los monocitos clásicos, intermedios y no clásicos de pacientes con IAM y sujetos sanos

Se evaluó la expresión de la molécula TLR4 en los monocitos clásicos, intermedios y no clásicos de pacientes con infarto y de sujetos sanos. La expresión de TLR4 en los monocitos clásicos mostró similitud en ambos grupos de estudio (*figura 9A*). Por otro lado, la subpoblación de monocitos intermedios presentó diferencias significativas en la expresión de TLR4. En este caso, TLR4 se vio mayoritariamente expresado en los pacientes infartados que en los sujetos sanos (*figura 9B*). Los monocitos no clásicos mantuvieron un patrón de expresión de TLR4 similar en los dos grupos (*figura 9C*).

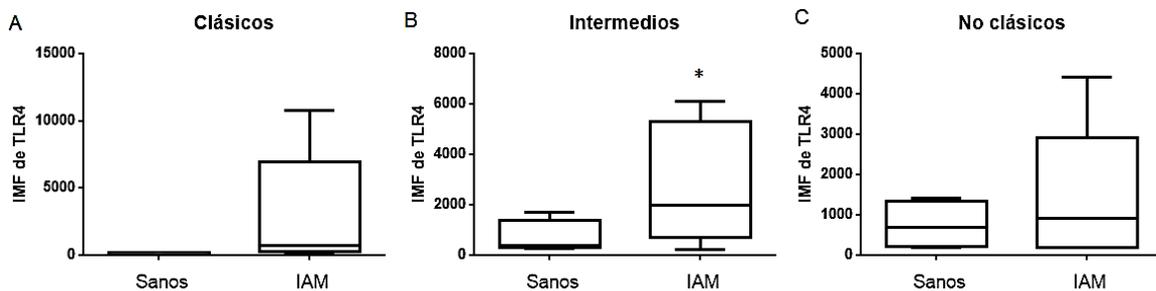


Figura 9. Expresión de TLR4 en las subpoblaciones de monocitos. A, B y C expresión de TLR4 en monocitos clásicos, intermedios y no clásicos, respectivamente. Se determinó la expresión de TLR4 por citometría de flujo. IMF: Intensidad media de fluorescencia. Sanos: Sujetos sanos, IAM: Pacientes con infarto agudo de miocardio (* $p < 0.05$).

Expresión de CD11b en los monocitos clásicos, intermedios y no clásicos de pacientes con IAM y sujetos sanos

Se evaluó la expresión de la molécula CD11b en los monocitos clásicos, intermedios y no clásicos provenientes de los pacientes con IAM y de sujetos sanos. Los resultados mostrados demuestran que CD11b está altamente expresado en las tres subpoblaciones de monocitos derivados de pacientes con IAM. En contraste, los monocitos del grupo de sujetos sanos presentan una baja expresión de esta molécula (*figura 10*).

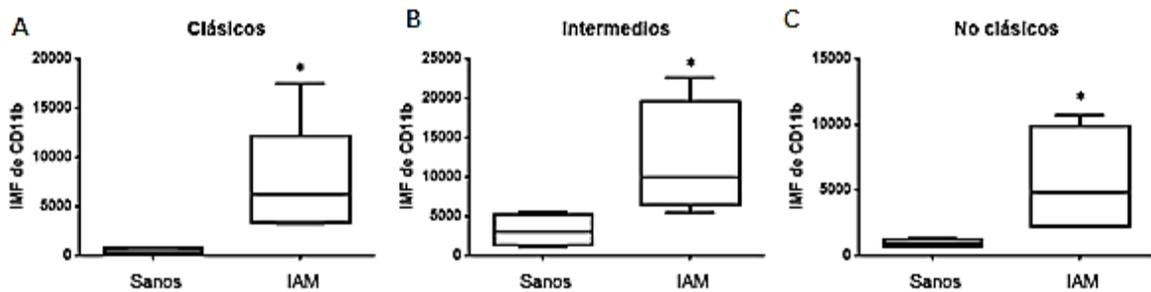


Figura 10. Expresión de CD11b en las subpoblaciones de monocitos. A, B y C expresión de CD11b en monocitos clásicos, intermedios y no clásicos, respectivamente. Se determinó la expresión de CD11b por citometría de flujo. IMF: Intensidad media de fluorescencia. Sanos: Sujetos sanos, IAM: Pacientes con infarto agudo de miocardio (*p<0.05).

DISCUSIÓN

En el IAM la necrosis de los cardiomiocitos induce una respuesta inflamatoria exacerbada, caracterizada por la liberación de sustancias endógenas que son reconocidas como señales de peligro. El reconocimiento de estas moléculas desencadena una serie de eventos que involucran la adhesión, extravasación y el reclutamiento de leucocitos al tejido cardiaco [12]. En este sentido, los monocitos tienen una participación clave en la promoción de la inflamación en las primeras horas del IAM [21]. Con base en los resultados obtenidos, se demostró que los monocitos clásicos están presentes en mayor proporción, respecto a las demás subpoblaciones, durante las primeras horas posteriores al IAM. De acuerdo con algunos estudios recientes, los monocitos clásicos son la primer subpoblación reclutada al tejido cardiaco durante la fase inflamatoria aguda del infarto. En pocas horas, la población clásica de monocitos participa activamente secretando citocinas pro-inflamatorias como TNF- α e IL-6; asimismo, producen altas cantidades de ROS, fagocitan restos celulares y promueven la proteólisis de la matriz extracelular (24).

De acuerdo con nuestros resultados, la frecuencia de los monocitos intermedios y no clásicos mostró similitud entre los pacientes que desarrollaron el IAM y los sujetos sanos. No encontramos un aumento significativo en el número de los monocitos intermedios y no clásicos en los pacientes debido a que el reclutamiento de estas células al tejido cardiaco inicia días después del infarto, durante la fase de reparación. [20].

Los monocitos son un grupo de células heterogéneas, lo que significa que presentan diferencias funcionales y fenotípicas, por lo que son clasificadas en tres subpoblaciones distintas [45]. Los cambios en las proporciones fenotípicas de los monocitos pueden tener implicaciones importantes en la progresión de enfermedades [25]. Bajo este concepto, existen evidencias experimentales que demuestran variación en el fenotipo de las subpoblaciones de monocitos en diversas condiciones patológicas. En el presente estudio, evaluamos la expresión de moléculas de superficie en las subpoblaciones de monocitos de pacientes

infartados, esto con el fin de encontrar posibles diferencias fenotípicas en comparación con monocitos expuestos a condiciones no patológicas. MHC II (HLA-DR) es una molécula implicada en la presentación de antígeno a los linfocitos T. Nuestros resultados mostraron un aumento significativo en la expresión de HLA-DR en los monocitos clásicos y no clásicos de los pacientes con IAM, respecto a los sujetos sanos. Estos datos podrían sugerir que, durante el proceso inflamatorio del infarto, ambas subpoblaciones de monocitos podrían activarse y aumentar su capacidad de presentación de antígenos, proporcionando la primera señal para la activación de células T.

Al evaluar a CD80 en los monocitos, encontramos que no presentan diferencia significativa en su expresión entre las subpoblaciones de los pacientes infartados y los sanos; sin embargo, CD80 está ligeramente aumentado en los pacientes con IAM. Por otro lado, CD86 mostró alta expresión en la subpoblación clásica de los pacientes con IAM y un ligero aumento en la expresión en los monocitos intermedios y no clásicos en comparación con los sanos. De acuerdo con datos reportados, el incremento de CD80 y CD86 en los monocitos durante un proceso inflamatorio está relacionado con una alta presentación de antígenos y la activación de estas células, siendo CD86 una molécula expresada rápidamente y de forma constitutiva durante el inicio de la respuesta inflamatoria, a diferencia de CD80 que aumenta sólo en las etapas tardías de la inflamación [43]. En este sentido, los resultados obtenidos sugieren que durante el IAM hay aumento en la presentación de diversos antígenos de daño por parte de los monocitos activados, lo cual se refleja en la sobreexpresión de CD86 en los monocitos clásicos, como un indicio de respuesta inflamatoria temprana. No se encontró aumento en los niveles de expresión de CD80 en las subpoblaciones de los pacientes infartados

TLR4 es un receptor crítico en la actividad proinflamatoria de los monocitos, participa en el reconocimiento del LPS bacteriano y promueve la adhesión de los monocitos en el endotelio. Esta molécula está involucrada en la patogénesis de ECV, particularmente en la aterosclerosis [34]. Al explorar la expresión de TLR4 en las subpoblaciones de monocitos, encontramos un incremento significativo en

los monocitos intermedios y un ligero aumento en las subpoblaciones clásicas y no clásicas en los pacientes con IAM en comparación con los donadores sanos. Estos hallazgos corroboran algunas evidencias experimentales que han demostrado el aumento en la expresión de TLR4 en los monocitos circulantes, especialmente la subpoblación de monocitos intermedios durante el IAM [61]. Los resultados sugieren que la sobreexpresión de TLR4 se da en respuesta a la liberación de ligandos específicos durante la fase aguda del IAM, tales como proteínas de choque térmico y ROS, las cuales participan en la activación de los monocitos por esta vía (TLR4). Asimismo, el aumento de TLR4 en los monocitos intermedios durante las primeras horas del inicio del IAM se ha relacionado con el proceso de la ruptura de la placa coronaria [62].

CD11b es una molécula involucrada en la adhesión de los monocitos y neutrófilos al endotelio, también regula la migración de leucocitos en diversos procesos inflamatorios. Se ha demostrado que durante la aterosclerosis, los monocitos incrementan la expresión de CD11b en respuesta a la activación endotelial. El aumento en moléculas de adhesión, particularmente ICAM-1 (considerado como ligando de CD11b), así como la liberación de la enzima 5-lipooxigenasa inducen la sobreexpresión de CD11b, y por consiguiente la activación, migración y adhesión [34]. Nosotros encontramos un aumento significativo en la expresión de CD11b en las tres subpoblaciones de monocitos de los pacientes con IAM, en contraste con los sujetos sanos, lo que concuerda con los estudios ya reportados. Estos resultados sugieren que el incremento de CD11b promueve la respuesta inflamatoria en el IAM mediante el reclutamiento y activación de los monocitos.

CONCLUSIONES

- ⊕ La subpoblación de monocitos clásicos se encontró incrementada en los pacientes con infarto agudo de miocardio, en comparación con los donadores sanos.
- ⊕ En los pacientes con IAM, los monocitos clásicos mostraron un aumento en la expresión de HLA-DR y CD86, mientras que los monocitos intermedios expresaron altas cantidades de TLR-4.
- ⊕ Las tres subpoblaciones de monocitos presentaron alta expresión de CD11b en los pacientes infartados.
- ⊕ En las tres subpoblaciones de monocitos no observamos diferencia en el patrón de expresión de CD80 de los pacientes con IAM, respecto a los sanos.
- ⊕ En su conjunto, estos resultados sugieren que las subpoblaciones de monocitos contribuyen en la respuesta inflamatoria del infarto agudo de miocardio.

PERSPECTIVAS

Análisis de citocinas:

Se evaluarán citocinas pro-inflamatorias en el suero de los pacientes y sujetos sanos que se asociarán con la expresión de las moléculas evaluadas.

REFERENCIAS

1. World Health Organization Salud (WHO). Enfermedades cardiovasculares [consultado el 3 de Septiembre de 2015]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/>.
2. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). Mortalidad, causas de defunción [consultado el 1 de Septiembre de 2015]. Disponible en: <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/temas/default.aspx?s=est&c=17484>.
3. World Health Organization. The top 10 causes of death, 2013 [consultado 3 de Septiembre de 2015]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacen...310/en/>.
4. Levi F, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C. Trends in mortality from cardiovascular and cerebrovascular diseases in Europe and other areas of the world. *Heart* 2002; 88(2):119-124.
5. Nikhil V, Joshi V., Toor I, Shah A, Carruthers K, Vesey A, et al. Systemic Atherosclerotic Inflammation Following Acute Myocardial Infarction: Myocardial Infarction Begets Myocardial Infarction. *J Am Heart Assoc* 2015; 4(9).
6. Schroder R. Prognostic impact of early ST-segment resolution in acute ST-elevation myocardial infarction. *Circulation* 2004; 110:e506–10.
7. Hamm C, Bassand J, Agewall S, Bax J, Boersma E, Bueno H, et al. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute coronary syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal* 2011; 32, 2999–3054.
8. Basra S, Virani S, Paniagua D, Kar B, Jneid H. Acute coronary syndromes: unstable angina and non-ST elevation myocardial infarction. *Cardiol Clin* 2014; 32(3):353-70.
9. Nicoletti A, Caligiuri G, Hansson K. Immunomodulation of Atherosclerosis: Myth and reality. *J Intern Med* 2000; 247:397-495.
10. Ross R. Mechanisms of disease. *New Engl J Med* 1999; 340:115-126.

11. Dai G, Kaazempur-Mofrad M, Natarajan S. Distinct endothelial phenotypes evoked by arterial waveforms derived from atherosclerosis-susceptible and resistant regions of human vasculature. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101(41):14871-6.
12. Braunersreuther V, Mach F, Steffens S. The specific role of chemokines in atherosclerosis. *Trimb Haemost* 2007; 97:714-721.
13. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 19-26; 420(6917):868-74.
14. Rahaman S, Lennon D, Febbrario M. A CD36- dependent signaling cascade is necessary for macrophage foam cell formation. *Cell Metab* 2006; 4:211-221.
15. Daubert M, Jeremias A. The utility of troponin measurement to detect myocardial infarction: review of the current findings. *Vasc Health Risk Manag* 2010; 6:691-9.
16. Thygesen K, Alpert J, Jaffe A. Third universal definition of myocardial infarction. *Glob Heart* 2012; 7(4):275-95.
17. Corwin E. Handbook of Pathophysiology. *Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins* 2008, p.541-545.
18. Christia P, Frangogiannis N. Targeting inflammatory pathways in myocardial infarction. *Eur J Clin Invest* 2013; 43(9):986-95.
19. Van den Akker F, Deddens J, Doevendans P. Cardiac stem cell therapy to modulate inflammation upon myocardial infarction. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1830(2):2449-58.
20. Liehn E, Postea O, Curaj A, Marx N. Repair after myocardial infarction, between fantasy and reality: the role of chemokines. *J Am Coll Cardiol* 2011; 58(23):2357-62.
21. White D, Su Y, Kanellakis P. Differential roles of cardiac and leukocyte derived macrophage migration inhibitory factor in inflammatory responses and cardiac remodelling post myocardial infarction. *Mol Cell Cardiol* 2014; 69:32-42.

22. Chen W, Frangogiannis N. Fibroblasts in post-infarction inflammation and cardiac repair. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1833(4):945-53.
23. Hristov M, Weber C. Differential role of monocyte subsets in atherosclerosis. *Thrombosis And Haemostasis* 2011; 106(5): 757-762.
24. Ghattas A, Lip G, Shantsila E, Griffiths H, Devitt A. Monocytes in coronary artery disease and atherosclerosis: Where are we now?. *Journal Of The American College Of Cardiology* 2013; 62(17): 1541-1551.
25. Abeles R, McPhail M, Sowter D, Antoniadou G, Vergis N, Vijay K, et al. CD14, CD16 and HLA-DR reliably identifies human monocytes and their subsets in the context of pathologically reduced HLA-DR expression by CD14(hi) /CD16(neg) monocytes: Expansion of CD14(hi) /CD16(pos) and contraction of CD14(lo) /CD16(pos) monocytes in acute liver failure. *Cytometry* 2012; 81(10):823-34.
26. O'Neill L, Golenbock D, Bowie A. The history of Toll-like receptors- redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2013; 13(6):453-60
27. Kawai, T, Akira, S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int. Immunol* 2009; 21:317–337.
28. Kurt-Jones E, Popova L, Kwinn L, Haynes L, Jones L, Tripp R, et al. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nature Immunol* 2000; 1(5):398-401.
29. Wright S, Ramos R. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990; 249(4975):1431-3.
30. Hoffmann J, Akira S. Innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2013; 25(1):1-3
31. Ishihara S, Rumi M, Kadowaki Y, Ortega-Cava C, Yuki T, Yoshino N, et al. Essential Role of MD-2 in TLR4-Dependent signaling during Helicobacter pylori-Associated Gastritis. *J immunology* 2004; 173(2):1406-16.
32. Gay N, Gangloff M, Weber A. Toll-like receptors as molecular switches. *Nat Rev Immunol* 2006; 6(9):693-8.
33. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors. *Curr Protoc Immunol* 2015; 109:14.12.1-14.12.

34. Lee S, Choi E, Seo K, Bae J, Park S, Kim C. TLR4-mediated expression of Mac-1 in monocytes plays a pivotal role in monocyte adhesion to vascular endothelium. *PLoS One* 2014; 12; 9(8).
35. Stewart M, Thiel M, Hogg N. Leukocyte integrins. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7(5): p.690-696.
36. Wirthmueller U, Kurosaki T, Murakami M, Ravetch J. Signal Transduction by FcγRIII (CD16) Is Mediated through the gamma chain. *J Exp Med* 1992; 175(5):1381-90.
37. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart N, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 2010; 116(16):e74-80.
38. Szaflarska, A., Baj-Krzyworzeka, M., Siedlar, M., Weglarczyk, K., Ruggiero, I., Hajto, B., et al. Antitumor response of CD14+/CD16+ monocyte subpopulation. *Exp. Hematol* 2004; 32(8):748-55. 32, 748–755.
39. Hibbs M, Selvaraj P, Carpén O, Springer T, Kuster H, Jouvin M, et al. Mechanisms for regulating expression of membrane isoforms of Fc gamma RIII (CD16). *Science* 1989; 246(4937):1608-11.
40. Fernandes M, Lachance G, Paré G, Rollet-Labelle E, Naccache P. Signaling through CD16b in human neutrophils involves the Tec family of tyrosine kinases. *J Leukoc Biol* 2005; 78(2):524-32.
41. Neumann J, Koch N. Assembly of major histocompatibility complex class II subunits with invariant chain. *FEBS Lett* 2005; 579(27):6055-9.
42. Mantegazza A, Magalhaes J, Amigorena S, Marks M. Presentation of phagocytosed antigens by MHC class I and II. *Traffic* 2013; 14(2): 135–152.
43. Girard T, Gaucher D, El-Far M, Breton G, Sékaly R. CD80 and CD86 IgC domains are important for quaternary structure, receptor binding and co-signaling function. *Immunol Lett* 2014; 161(1):65-75.
44. Racke M, Scott D, Quigley L, Gray G, Abe R, June C, et al. Distinct roles for B7-1 (CD-80) and B7-2 (CD-86) in the initiation of experimental allergic encephalomyelitis. *Clin Invest* 1995; 96(5):2195-203.

45. Tsujioka H, Imanishi T, Ikejima H, Kuroi A, Takarada S, Tanimoto T, et al. Impact of Heterogeneity of Human Peripheral Blood Monocyte Subsets on Myocardial Salvage in Patients With Primary Acute Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54(2):130-8.
46. Zeng S, Zhou X, Ge L, Ji WJ, Shi R, Lu R, et al. Monocyte subsets and monocyte-platelet aggregates in patients with unstable angina. *J Thromb Thrombolysis* 2014; 38(4):439-46.
47. Frankenberger M, Sternsdorf T, Pechumer H, Pforte A, Ziegler-Heitbrock H. Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. *Blood* 1996; 87(1):373-7.
48. Shantsila E, Tapp L, Wrigley B, Pamukcu B, Apostolakis S, Montoro-García S, et al. Monocyte subsets in coronary artery disease and their associations with markers of inflammation and fibrinolysis. *Atherosclerosis* 2014; 234(1):4-10.
49. Kashiwagi M, Imanishi T, Tsujioka H, Ikejima H, Kuroi A, Ozaki Y, et al. Association of monocyte subsets with vulnerability characteristics of coronary plaques as assessed by 64-slice multidetector computed tomography in patients with stable angina pectoris. *Atherosclerosis* 2010; 212(1):171-6.
50. Wang G, Xia Z. Monocyte subsets and their differentiation tendency after burn injury. *Front Med* 2013; 7(4):397-400.
51. Czepluch F, Kuschicke H, Dellas C, Riggert J, Hasenfuss G, Schäfer K. Increased proatherogenic monocyte-platelet cross-talk in monocyte subpopulations of patients with stable coronary artery disease. *J Intern Med* 2014; 275(2):144-54.
52. Van Craenenbroeck A, Van Ackeren K, Hoymans V, Roeykens J, Verpooten G, Vrints C, et al. Acute Exercise-Induced Response of Monocyte Subtypes in Chronic Heart and Renal Failure. *Mediators Inflamm* 2014; 2014:216534.
53. Skrzeczyńska-Moncznik J, Bzowska M, Loseke S, Grage-Griebenow E, Zembala M, Pryjma J. Peripheral blood CD14^{high} CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10. *Scand J Immunol* 2008; 67(2):152-9.

54. Jaipersad A, Lip G, Silverman S, Shantsila E. The Role of Monocytes in Angiogenesis and Atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2014; 63(1):1-11.
55. Chelombitko M, Shishkina V, Ilyinskaya O, Kaminnyi A, Pavlunina T, Samovilova N, et al. A cytofluorometric study of membrane rafts in human monocyte subsets in atherosclerosis. *Acta Naturae* 2014; 6(4):80-8.
56. Zawada A, Rogacev K, Schirmer S, Sester M, Böhm M, Fliser D, et al. Monocyte heterogeneity in human cardiovascular disease. *Immunobiology* 2012; 217(12):1273-84.
57. Davis S, Aldrich T, Jones P, Acheson A, Compton D, Jain V, Ryan T, et al. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 1996; 27:87(7):1161-9.
58. Master Z, Jones N, Tran J, Jones J, Kerbel R, Dumont D. Dok-R plays a pivotal role in angiopoietin-1-dependent cell migration through recruitment and activation of Pak. *EMBO J* 2001; 20(21):5919-28.
59. Patiño R, Ibarra J, Rodriguez A, Yagüe MR, Pintor E, Fernandez-Cruz A, et al. A. Circulating monocytes in patients with diabetes mellitus, arterial disease, and increased CD14 expression. *Am J Cardiol* 2000; 85:1288-1291.
60. Nahrendorf M, Swirski F, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo J, et al. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med* 2007; 204:3037-3047.
61. Kashiwagi M, Imanishi T, Ozaki Y, Satogami K, Masuno T, Wada T, et al. Differential expression of Toll-like receptor 4 and human monocyte subsets in acute myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2012; 221(1):249-53.
62. Tapp L, Shantsila E, Wrigley B, Montoro-Garcia S, Lip G. TLR4 expression on monocyte subsets in myocardial infarction. *J Intern Med* 2013; 273(3):294-305.