



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO  
SECRETARIA DE SALUD  
HOSPITAL JUAREZ DE MEXICO

**“Perfil de células inmunitarias en sangre periférica durante la evolución del infarto agudo de miocardio.”**

**TESIS DE POSTGRADO**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**ESPECIALISTA EN CARDIOLOGIA**

PRESENTA

**DR EDER NATANAEL FLORES LOPEZ**

ASESOR DE TESIS

DRA NAYELI GORETI NIETO VELAZQUEZ

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION EN INMUNOLOGIA E INFLAMACION

TITULAR DEL CURSO

DR ISMAEL HERNANDEZ SANTAMARIA

JEFE DEL CURSO DE CARDIOLOGIA DEL HOSPITAL JUAREZ DE MEXICO

CIUDAD DE MEXICO, JULIO 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

---

Dr. José Manuel Conde Mercado  
Jefe de Enseñanza del Hospital Juárez de México

---

Dr Ismael Hernandez Santamaría  
Titular del Curso de Cardiología

---

Dra Nayeli Goreti Nieto Velázquez  
Asesor de Tesis

## AGRADECIMIENTOS:

En agradecimiento al Dr. Ismael Hernandez Santamaria y su ardua labor por generar cardiólogos de gran calidad.

A la Dra Nayeli Goreti Nieto por su gran ayuda para implementación de protocolos de respuesta inmune en el IAM, sin duda su experiencia enriquecen los proyectos que poco a poco vamos generando .

## **DEDICATORIA**

A Mama, un beso hasta el cielo.

A Papa ( Leonardo ) El mayor ejemplo de nobleza , amor , dedicación y respeto en mi vida,

A mis Hermanos Edson y Gerson , siempre están ahí , en todo, somos unión y fortaleza.

A Berenice ,por mostrarme que existen personas en este mundo que valen la vida.

# INDICE

<b>1. Antecedentes.....</b>	<b>1</b>
1.1 Epidemiología.....	1
1.2 Respuesta inflamatoria .....	2
1.3 Células linfoides innatas .....	3
<b>2. Justificación .....</b>	<b>5</b>
<b>3. Pregunta de investigación .....</b>	<b>5</b>
<b>4. Hipótesis .....</b>	<b>5</b>
<b>5. Objetivos .....</b>	<b>5</b>
<b>6. Metodología .....</b>	<b>6</b>
6.1 Diseño de la investigación .....	6
6.2 Definición de variables:.....	6
6.3 Definición operativa para obtención de muestra y análisis de células innatas .....	8
6.4 Análisis multi-paramétrico de las poblaciones de células del sistema inmune.....	9
6.5 Definición de la población .....	9
6.6 Criterios de inclusión. ....	9
6.7 Criterios de exclusión.....	10
6.8 Variables clínicas.....	10
6.9.- Análisis estadístico e Interpretación de Resultados .....	10
<b>7.- Recursos .....</b>	<b>10</b>
<b>8.- Aspectos éticos Y de Bioseguridad.....</b>	<b>10</b>
<b>9. Cronograma .....</b>	<b>12</b>
<b>10. Resultados .....</b>	<b>13</b>
<b>11. Discusión .....</b>	<b>19</b>
<b>12. Conclusiones .....</b>	<b>20</b>
<b>13. Bibliografía.....</b>	<b>21</b>

## **1. ANTECEDENTES**

### **1.1 EPIDEMIOLOGIA**

En el mundo, cada 4 segundos ocurre un infarto agudo de miocardio. En México, en la población adulta (20-69 años) hay más de 17 millones de hipertensos, más de 14 millones de dislipidémicos, más de 6 millones de diabéticos, más de 35 millones de adultos con sobrepeso u obesidad y más de 15 millones con grados variables de tabaquismo. [1]

El 75% de la mortalidad total en adultos en Latinoamérica es secundaria a enfermedades crónicas no-comunicables. [2]

Nuestra pirámide poblacional determina que la mayoría de nuestros adultos (75%) tienen menos de 55 años y a pesar de que la prevalencia de los factores de riesgo cardiovascular es mayor después de los 40 años, en datos absolutos el número de millones portadores de estos factores de riesgo, se ubica en la población económicamente activa, con sus consecuencias devastadoras, tanto sociales, económicas y de calidad de vida. Así, las afecciones cardiovasculares caen dentro del rubro de gastos catastróficos. [3]

Las enfermedades cardiovasculares, en especial la cardiopatía isquémica, son la principal causa de muerte a nivel mundial. De acuerdo al INEGI, las enfermedades cardiovasculares ocasionan 121,427 defunciones anuales en la población mexicana, de las cuales 82,334 son por cardiopatía isquémica. [4]

El infarto agudo del miocardio con elevación persistente del segmento ST (IAMCEST) se debe a una obstrucción completa del flujo coronario. Los pacientes con IAMCEST deben recibir tratamiento de reperfusión urgente mediante intervención coronaria percutánea (ICP) dentro de las primeras 12 horas del inicio del dolor, reabriendo la oclusión de la vía y permitiendo que se reestablezca el flujo sanguíneo y el abastecimiento de oxígeno al miocardio isquémico. Aunque este procedimiento revolucionó el tratamiento de pacientes con IAMCEST en la última década, la reperfusión tiene un costo, el daño al tejido isquémico que se conoce como lesión por isquemia/reperfusión (I/R). [5,6]

Las complicaciones que se pueden presentar con la ICP son: muerte, infarto del miocardio en arteria no relacionada, accidente vascular cerebral, cirugía cardíaca urgente, perforación coronaria, perforación cardíaca, arritmias fatales, lesión vascular local, nefropatía por contraste y anafilaxia. [7] La I/R es un proceso complejo y multifactorial que involucra factores metabólicos [8], inflamación [9] y daño microvascular [10].

## 1.2 RESPUESTA INFLAMATORIA

La respuesta inflamatoria durante el IAMCEST se divide en tres fases, la primera, aguda, se caracteriza por el reclutamiento de neutrófilos y monocitos inflamatorios, que llegan del torrente sanguíneo e infiltran el miocardio lesionado para eliminar las células muertas. Inicialmente, los neutrófilos, que son los primeros en infiltrar, se adhieren al endotelio capilar, obstruyéndolo y evitando la reperfusión capilar posterior a la trombólisis o angioplastia primaria. Dos o tres días después del episodio agudo, los monocitos migran al espacio extravascular, donde se activan y reclutan más neutrófilos. El aumento en el número de monocitos circulantes en sangre periférica correlaciona con una reperfusión deteriorada o ausente. [11,12]

En la segunda fase, para resolver la reacción inflamatoria inicial y apoyar la formación de tejido de granulación vascularizado, la zona del infarto se infiltra con monocitos reparadores (macrófagos M2) y linfocitos T CD4+. Los macrófagos M2 producen IL-10, TGF $\beta$ , lipoxinas, protectinas y resolvinas, que inhiben la inflamación. [13] Estas moléculas inhiben la migración transendotelial de polimorfonucleares dependientes de las citocinas y quimiocinas producidas en el sitio dañado. [14] Entre los linfocitos T CD4+ del infiltrado, se encuentran células reguladoras (Treg) que modulan la respuesta inmune a través de la secreción de IL-10 y TGF- $\beta$ , promoviendo así la proliferación de fibroblastos y síntesis de colágena. [15]

La tercera fase se caracteriza por la formación de una cicatriz miocárdica estable. Las placas ateroscleróticas humanas contienen linfocitos T, macrófagos, mastocitos, linfocitos B, células dendríticas y monocitos, que se recirculan entre el flujo sanguíneo de la luz arterial, la pared de la arteria dañada, la vasa vasorum y los nódulos linfáticos regionales. [16]

En modelos experimentales se ha encontrado que la relación CD4+/ CD8+ en las placas ateroscleróticas es similar a la encontrada en sangre periférica y la mayoría de los linfocitos T son TCR $\alpha\beta$ . [17] La contribución de la respuesta adaptativa en el IAM durante mucho tiempo ha sido relegada a un segundo plano, detrás de la respuesta inmune innata. En primer lugar, debido a que la infiltración de linfocitos en el miocardio se considera un evento poco habitual, por lo que hay pocos estudios experimentales acerca de la participación de los linfocitos en el IAM.

En segundo lugar, la activación de linfocitos contradice la noción clásica de que la inmunidad adaptativa no se estimula por autoantígenos. Pese a ello, existen numerosas evidencias tanto clínicas como experimentales que implican la

activación de células del sistema inmune adaptativo durante un IAMCEST. [18,19] Así, existe una correlación entre el grado de leucocitosis y la extensión del área del infarto, estudios recientes han demostrado diferentes correlaciones entre los subtipos de linfocitos T (Th1, Th2 Th17 y Treg) y el pronóstico. [20]

### **1.3 Células linfoides innatas**

Los linfocitos se pueden dividir en linfocitos T, linfocitos B y células NK, cada una de estas poblaciones tiene diferentes funciones. La función principal de los linfocitos B es la producción de inmunoglobulinas (anticuerpos). Cada linfocito B es capaz de producir un anticuerpo específico para reconocer un solo antígeno, que puede ser una molécula de superficie celular de un agente patógeno. [21,22] Al ser activados, los linfocitos B proliferan y producen grandes cantidades de anticuerpos. [23,24] Las células NK forman parte de la respuesta inmune innata. No reconocen antígenos específicos pero juegan un papel importante en el reconocimiento y eliminación de células anormales, como células tumorales o células infectadas por patógenos intracelulares. [25]

Los linfocitos T, a su vez, tienen una gran variedad de funciones en la respuesta inmune adaptativa y pueden dividirse en dos poblaciones, tomando como referencia la expresión de las moléculas CD4 o CD8, que funcionan como co-receptores del receptor de células T (TCR) que reconoce péptidos específicos presentados por la molécula MHC de otras células. Los linfocitos T que expresan CD4 (CD4+) también son conocidos como linfocitos cooperadores. Llamados así porque post activación producen citocinas e interactúan con otros tipos celulares promoviendo su función. Los linfocitos T CD4+ también pueden ser caracterizados dependiendo del perfil de citocinas que producen y el tipo de respuesta que promueven. [24,26]

Los linfocitos T CD4+ con perfil TH1 produce citocinas pro inflamatorias como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  y su función principal es la protección contra patógenos intracelulares. [26,27] Ayudando a los macrófagos y a los linfocitos T CD8+ a eliminar las células infectadas y promoviendo que los linfocitos B produzcan anticuerpos contra los patógenos. [26] Sin embargo, este perfil de citocinas promueve la inflamación, que puede tener un efecto patológico cuando las células TH1 se mantienen activadas continuamente.

Los linfocitos T CD4+ con perfil TH2 tiene como función principal el promover que los linfocitos B produzcan anticuerpos eficaces contra patógenos extracelulares. [57] Las células TH2 producen citocinas como IL-4, IL-10 e IL-13, este es un perfil

primordialmente anti inflamatorio que contrarresta la función de las células TH1 y de los fagocitos inflamatorios. [26,27]

También se han identificado otras poblaciones de linfocitos T CD4+, como las células T reguladoras que expresan CD25 e el factor de transcripción FoxP3 y cuya función es inmunoreguladora, supresora de la inflamación y se han relacionado con enfermedades autoinmunes. [26] También se han descrito los linfocitos TCD4+ con perfil TH17, que producen la citocina pro inflamatoria IL-17 que ha sido estudiada en patologías autoinmunes. [26]

Por otro lado, los linfocitos T CD8+ reconocen péptidos antigénicos presentados por moléculas MHC-I de células infectadas con patógenos intracelulares. Su función principal es la de reconocer las células infectadas y destruirlas induciendo su apoptosis. [28] Los linfocitos T CD8+ al ser activados producen citocinas como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , un perfil similar al producido por los linfocitos T CD4+ TH1. [29,30]

Hasta el momento se han descrito algunas funciones de las diferentes poblaciones de linfocitos durante el IAM:

- Linfocitos B – Dirigen la inflamación sostenida del miocardio contribuyendo a la remodelación ventricular. La eliminación de linfocitos B en modelos murinos reduce la infiltración de monocitos al miocardio, mejora la función cardíaca y reduce la remodelación tisular. Finalmente, la producción de la quimiocina CCL7 por parte de los linfocitos B contribuye a la inflamación y a la infiltración de monocitos. [31]
- Linfocitos T CD4+ - Su función es la remodelación ventricular. Los ratones deficientes de linfocitos T CD4+ presentan un aumento en la dilatación del ventrículo izquierdo, depósitos de colágeno y formación de cicatriz, [32] así como daño exacerbado por la I/R. [33,34] Los ratones KO para Rag1 disminuyen la inflamación miocárdica y el tamaño del infarto después de la I/R, pero esta protección se pierde cuando se reconstituyen con linfocitos T CD4+, efecto no observado con linfocitos T CD8+. [34] En humanos se ha sugerido la infiltración de linfocitos T CD4+ dentro de los 45 minutos post reperfusión, su presencia se ha relacionado con obstrucción microvascular, un componente del daño por I/R. [35]
- Linfocitos T CD4+ perfil TH1 – En modelos murinos se han observado los efectos patológicos de la producción de IFN- $\gamma$ , aunque su ausencia total anula la protección contra la lesión por I/R. [34]
- Linfocitos T CD4+ reguladores – Tienen un efecto protector en modelos murinos durante la lesión por I/R, a través de la activación de la vía de RISK, disminuyen la apoptosis de los cardiomiocitos y la infiltración de neutrófilos.

[36] La eliminación de estas células en ratón deriva en una mayor inflamación del miocardio, aumento en el tamaño del infarto, la polarización de macrófagos al perfil M1 [37] y la dilatación del ventrículo izquierdo. [38] La transferencia adoptiva de los linfocitos T reguladores o la activación de estos en ratones y ratas resulta en una inflamación atenuada post infarto y la reducción de la remodelación inadecuada. [39,40]

## **2.-JUSTIFICACION**

En México las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte con 121,427 defunciones anuales, de las cuales 82,334 son por cardiopatía isquémica. Del total anual de muertes por enfermedades cardiovasculares, los hombres representan el 53% (64,038 casos) y las mujeres el 47% (57,388 casos) restante. (1)

No se conoce actualmente de manera completa la respuesta celular inmune innata en pacientes que presentan infarto agudo de miocardio, por tanto es de nuestro interés buscar describir dicha respuesta , para valorar nuevas oportunidades de dianas terapéuticas.

## **3.- PREGUNTA DE INVESTIGACION**

- ¿Cuál será la respuesta celular inmune innata en la evolución del infarto agudo al miocardio y su relación con la función ventricular?

## **4.- HIPOTESIS**

- Existirá una respuesta inmune aumentada en pacientes con infarto agudo al miocardio al inicio del cuadro que se mantendrá constante durante la evolución del mismo, y tendrá efectos en correlación con la función ventricular.

## **5.-OBJETIVOS**

-Analizar si existen cambios en el inmunofenotipo de las células linfoides innatas en hombres y en mujeres con IAMCEST

-Estudiar la dinámica del fenotipo de las células linfoides innatas periféricas en pacientes con primer infarto agudo del miocardio con elevación del segmento ST revascularizados con angioplastia primaria o trombólisis dentro de las primeras 24 horas del inicio del dolor.

- Analizar la asociación entre el fenotipo de las células linfoides innatas, así como linfocitos Th1, Th2, Th17 y Treg con la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEV) cuantificada por ecocardiograma transtorácico en los pacientes con IAM CEST

-Determinar si existen células MAIT en pacientes con IAM CEST y en caso de existir conocer la frecuencia de las mismas durante la evolución del IAM.

## **6 .METODOLOGIA**

### **6.1 DISEÑO DE LA INVESTIGACION**

Estudio prospectivo y longitudinal incluyendo 17 pacientes con IAMCEST dentro de las primeras 24 horas de evolución (de acuerdo con el inicio del dolor), para estudiar las CLI periféricas y su inmunofenotipo (CLI1, CLI2 y CLI3), además del inmunofenotipo de linfocitos T CD4+ postactivados para determinar la relación de lo anterior con la activación de la inmunidad adaptativa, así como valorar la existencia de células MAIT en pacientes con IAM CEST

Las determinaciones en sangre periférica se realizó al ingreso, a las 24 horas, y a los 7 y 30 días post infarto, además de una muestra de sangre de arteria coronaria brindada por el servicio de Hemodinamia durante el procedimiento de intervencionismo coronario, de la arteria afectada. Se analizó la relación de los distintos inmunofenotipos de linfocitos innatos y adaptativos con el desenlace clínico para la búsqueda de marcadores de pronóstico y remodelación miocárdica, lo que además permitirá un mejor entendimiento del papel de la respuesta inmune y su modulación en la evolución y pronóstico del IAM.

### **6.2 DEFINICION DE VARIABLES:**

#### **Para Diagnóstico y Tratamiento del IAMCEST**

Se analizaron los biomarcadores cardiacos: troponina I, CPK, CPK MB además de TGO y DHL. La troponina es el biomarcador de referencia ya que tiene una elevada especificidad del tejido miocárdico y una elevada sensibilidad clínica.

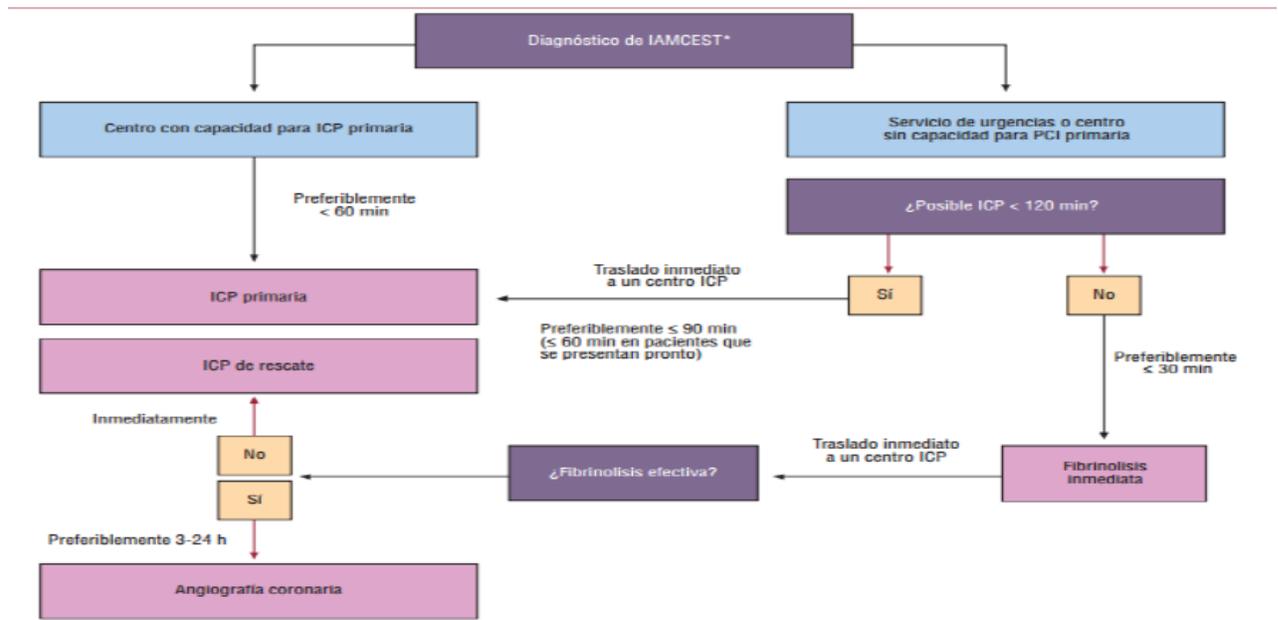
La detección de un aumento o una reducción de las determinaciones es esencial para diagnosticar infarto agudo de miocardio. Una concentración de Troponina aumentada se define como un valor que supera el percentil 99 de la población normal de referencia (límite superior de referencia).

Este percentil 99 discriminatorio se designa como el umbral de decisión para el diagnóstico de IM y se debe determinar para cada prueba específica con el control de calidad adecuado en cada laboratorio. [41] La determinación de troponinas se realiza mediante la maquina AQT 90 Flex, en este caso consideraremos positiva el biomarcador de troponinas realizado por el sistema mayor de 0.010 µg/l.

También se tomaron en cuenta los cambios electrocardiográficos, como nueva elevación del ST en el punto J en dos derivaciones contiguas con los puntos de corte:  $\geq 0,1$  mV en todas las derivaciones menos en V2-V3, en las que son de aplicación los puntos de corte siguientes:  $\geq 0,2$  mV en varones de edad  $\geq 40$  años,  $\geq 0,25$  mV en varones menores de 40 años o  $\geq 0,15$  mV en mujeres. Una vez establecido el diagnostico de IAMCEST, con los criterios electrocardiográficos, y biomarcadores positivos, se decidirá la terapia de reperfusión.

En pacientes con una presentación clínica de IAMCEST dentro de las primeras 12 h desde el inicio de los síntomas, y con elevación persistente del segmento ST o bloqueo de rama nuevo, o presuntamente nuevo, se debe realizar una reperfusión mecánica precoz o farmacológica lo antes posible. [41]

Para el tratamiento de reperfusión coronaria se muestra el siguiente esquema que representa las dos opciones de tratamiento que se utilizarán para el paciente con IAMCEST.



La intervención coronaria percutánea (ICP) se realizó en los pacientes que se encontraron durante los primeros 120 minutos de inicio del dolor, que ingresaron directamente a sala de hemodinamia. La fibrinólisis se aplicó siempre y cuando el paciente se encontraba en las primeras 12 horas de inicio de la sintomatología, la sala de hemodinámica no disponible y no se lograba realizar cateterismo cardiaco primario durante los primeros 120 minutos y que no existan contraindicaciones de la misma, como ictus en los 2 meses previos, neoplasia o aneurisma SNC, cirugía cerebral < 2 meses, cirugía o trauma mayor < 21 días, biopsia de órganos < 21 días, hemorragia digestiva activa < 1 mes, coagulopatía previa, disección de aorta o endocarditis.

Todo paciente sometido a fibrinólisis, sin importar si ésta fue fallida o exitosa, fue sometido a cateterismo cardiaco en forma secundaria. Si la trombolisis fue exitosa, únicamente se realizó angiografía coronaria. Si la trombolisis fue fallida, el

cateterismo cardiaco fue de rescate. El seguimiento de los pacientes fue llevado a cabo con el estudio ecocardiográfico, que se realizó dentro de los primeros 7 días del evento agudo, con determinación de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo mediante el sistema VIVID 7 de General Electric, realizado por un operador único con 15 años de experiencia en la realización de estudios de ecocardiografía transtorácicos. El cálculo de la fracción del ventrículo izquierdo se realizó mediante método de Simpson.

### **6.3 DEFINICION OPERATIVA PARA OBTENCION DE MUESTRA Y ANALISIS DE CELULAS INNATAS**

Se realizaron cinco tomas de 4ml de sangre venosa periférica en tubos con EDTA a todos los pacientes y una toma durante el cateterismo cardiaco

- La primer toma se realizó previo a la reperfusión, al ingreso del paciente.
- La segunda toma se realizó 24 horas después de la reperfusión
- La tercer toma se realizó a los 7 días después de la reperfusión, previo al alta del paciente.
- La cuarta toma se realizará a los 30 días después de la reperfusión, durante la consulta de seguimiento del paciente.
- La quinta toma se realizó al momento del cateterismo cardiaco y se obtuvo de la arteria coronaria afectada de manera directa .

Una vez tomada la muestra, se trasladó a la Unidad de Investigación en Inmunidad e Inflamación (UIININ) donde se determinaran los porcentajes y cuentas totales de linfocitos T CD4+, T CD8+, B CD19+ y NK CD56+ CD16+ en sangre completa. Se centrifugaron las muestra a 600g para obtener el plasma, que se almaceno a -70°C en alícuotas hasta su procesamiento.

El paquete celular se procesó para la obtención de las células mononucleares por gradiente de densidad (Ficoll-Paque PLUS, Amersham Biosciences, Uppsala, SE) según las indicaciones del fabricante.

Ensayo de activación: El ensayo se realizó en placas de 24 pozos con 2.5x10<sup>5</sup> células por pozo en 500 microlitros de medio RPMI 1640 suplementado. Las placas fueron cultivadas con PMA/Ionomicina por 24 horas a 37°C en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>. Una vez terminada la incubación se recuperaron las células y se centrifugaron para obtener el sobrenadante. Los sobrenadantes se almacenaron a -70°C hasta su procesamiento. Las células se lavaron y se prepararon para el marcaje de moléculas de superficie.

#### **6.4 Análisis multi-paramétrico de las poblaciones de células del sistema inmune innato y adaptativo.**

Se hizo el marcaje de moléculas de superficie de las células mononucleares con diferentes anticuerpos marcados con fluorocromos en diluciones previamente estandarizadas, siguiendo los procedimientos de operación normalizados de la UIININ, para la identificación de sub-poblaciones de Linfocitos T (Th1, Th2 Th17 y Treg), linfocitos B y linfocitos innatos. Se utilizó el citómetro FACSVerse con tres láser y los resultados serán analizados mediante el software FlowJo.

Los marcadores utilizados como CD45, CD3, CD4, CD8, CD25, FoxP3, CD69, CD56, CD16, CD14, CD19, CD34, CD11c, CD94, BDCA2, CD127, CD117, CRTH2, CD8b, CD161, TCR-V $\alpha$ 7.2, TCR-V $\alpha$ 24, TCR- $\alpha\beta$ , TCR- $\gamma\delta$ , Fc $\epsilon$ RI, TIM-3, LAG-3, CD62L, CTLA-4 y BTLA, además lo más representativo de esta investigación fue la determinación de V $\alpha$ 7.2+CD161+ para análisis de células MAIT. Cada tubo de tinción tenía 5x10<sup>6</sup> células mononucleares y se utilizaron un marcador de viabilidad para garantizar que el análisis se realice únicamente con las células vivas. La determinación de citocinas pro-inflamatorias, citocinas anti-inflamatorias y quimiocinas séricas se obtuvo por citometría de flujo.

#### **. 6.5 Definición de la población**

El tamaño de muestra se obtuvo con la siguiente fórmula de:

$$N = t^2 \times p(1-p) / m^2$$

N= Tamaño de la muestra requerido, t = Nivel de fiabilidad de 95% (valor estándar de 1.96), p= prevalencia esperada en nuestro hospital, m = margen de error del 5% (valor estándar de 0.05).

Calculando una muestra final de 17 pacientes.

#### **6.6 Criterios de inclusión.**

- Pacientes de ambos géneros entre 18 a 75 años con diagnóstico de novo de infarto agudo del miocardio con elevación del segmento ST, dentro de las primeras 12 horas de inicio de la sintomatología.
- Sin antecedentes de cardiopatía isquémica crónica definida como angina inestable, o Infarto agudo del miocardio con y sin elevación del segmento ST.
- Sin enfermedad neoplásica.
- Sin enfermedad autoinmune o de carácter inflamatorio no relacionado con el infarto.

### **6.7 Criterios de exclusión.**

- Muerte durante el ingreso.
- Re-infarto durante el ingreso.
- Inestabilidad clínica o hemodinámica.
- Cirugía de revascularización.

### **6.8 Variables clínicas.**

- Edad : La cual será cuantificada en años
- Sexo : Se dividirá en género Masculino y Femenino
- Diabetes mellitus : La variable será definida como si la presenta o No la presenta .
- Hipertensión arterial : La variable será definida como si la presenta o No la presenta .
- Tabaquismo: La variable será definida como si la presenta o No la presenta , y se establecera el indice tabáquico
- Frecuencia cardíaca : Cuantificada en número latidos por minuto
- Presión sistólica : Cuantificada en milímetros de mercurio

### **7.- Recursos**

**Recursos Humanos :** 2 médicos que tomen la muestra , 1 doctor en ciencias para procesamiento de células innatas.

**Recursos Financieros :** Kit de análisis de células por citometria de flujo , el hospital cuenta con dicho dispositivo .

### **8.- Aspectos éticos Y de Bioseguridad**

El presente trabajo requiere de la toma de tres muestras de 4 ml sangre periférica durante la permanencia de los pacientes con IAMCEST en la Unidad de Cuidados Coronarios del Hospital Juárez de México. La toma de dichas muestras de sangre la hará el personal médico responsable de los pacientes, por punción venosa o a través de catéter central.

Las muestras de sangre se emplearán únicamente para los propósitos de investigación descritos en este protocolo; toda la información sobre los pacientes será manejada de manera confidencial y los resultados obtenidos no afectarán de ninguna manera el tratamiento del paciente, que será responsabilidad del personal médico correspondiente.

Antes de realizar la toma de muestras, si el paciente decide participar en el estudio, firmará una carta de consentimiento informado (Anexo 1).

### **Aspectos de Bioseguridad**

El servicio de Cardiología del Hospital atiende alrededor de 200 pacientes con IAM con elevación del segmento ST anualmente, por lo que alcanzar el número de sujetos propuesto en el proyecto no representa ningún inconveniente. Con relación al diseño experimental, este estudio se encuentra clasificado como de riesgo mínimo debido a que las muestras de sangre venosa serán tomadas por el personal capacitado .

El diseño del estudio lo coloca en la fracción II del artículo 17 del Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación para la Salud.

## 9.- Cronograma

Actividad	Periodo trimestral			
	Mar – May 2017	Jun – Ago 2017	Sept – Nov 2017	Dic – Feb 2018
Recolección de muestras				
Elaboración de base de datos				
Procesamiento de muestras				
Análisis de resultados				
Interpretación de resultados				
Escritura de artículo y tesis				

## 10. RESULTADOS:

El resultado más importante de esta investigación es encontrar por primera vez la presencia de Células MAIT, en el contexto del infarto agudo al miocardio, se decidió por tanto establecer si existía correlación entre estas células y el riesgo moderado o severo de mortalidad por escala GRACE sin encontrar que exista correlación con el mismo. (Figura 1)

En segundo lugar se busco establecer la correlación entre las células MAIT y la Fracción de Eyección de Ventrículo Izquierdo, observando que no existen diferencias en la presencia de estas células durante el tiempo estudiado y la Función Ventricular Izquierda. (Figura 2)

Cabe aclarar que estas células MAIT están inactivadas, es decir que no se realizó la estimulación propia para poder establecer realmente su función, dicha función es la siguiente parte de nuestra línea de investigación.

Respecto a las líneas celulares restantes no se encontraron diferencias significativas de células T en sangre periférica ni en arteria coronaria, además de no encontrarse alteraciones respecto al tiempo de evolución del IAM (Figura 3)

Las células NK mostraron un comportamiento distinto, la toma que se realizó a las 24 horas del IAM muestra una disminución significativa de las mismas, a diferencia de las células B las cuales aumentaron en esa toma de 24 horas, sin embargo en la toma del día 30 existió una recuperación de las frecuencias sanguíneas circulantes de células NK y células B. (Figura 4)

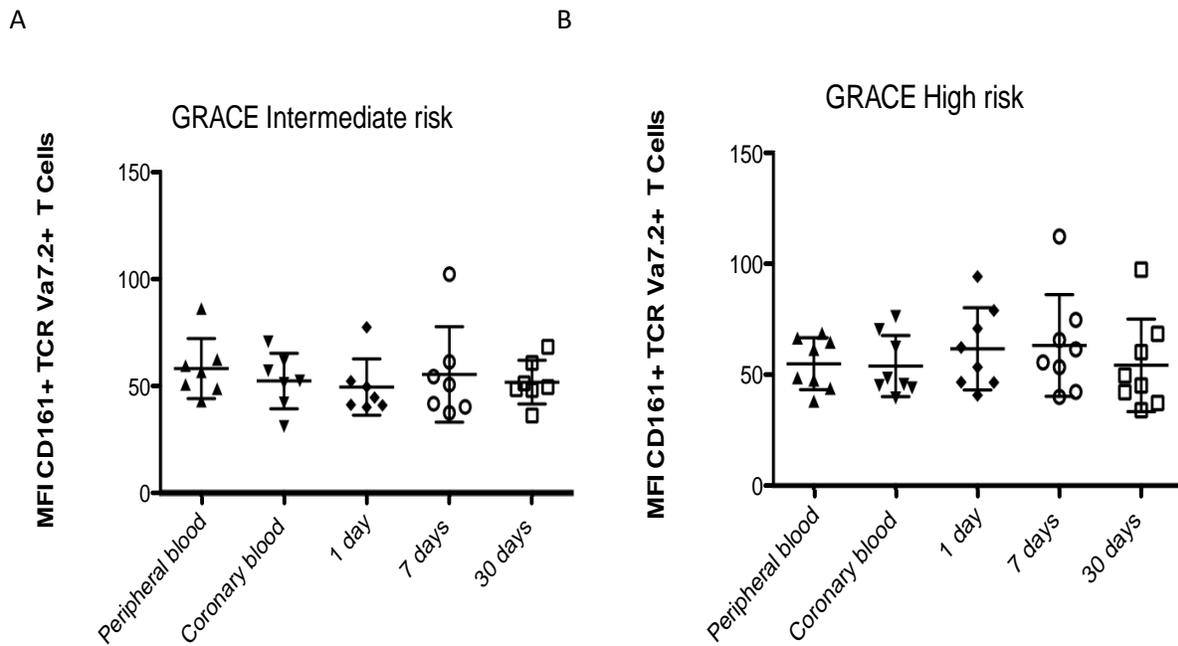
Los datos generales con la determinación de diámetros por ECOTT se pueden ver en la tabla 1

**TABLA 1**

Patients	
<b>N</b>	17
<b>Age</b> Mean $\pm$ SD	57.76 $\pm$ 8.96
<b>Gender</b>	
Male % (N)	64.7 (11)
Female % (N)	35.3 (6)
<b>FA</b> Mean $\pm$ SD	19.18 $\pm$ 6.02
<b>FEVI</b> Mean $\pm$ SD	41.94 $\pm$ 13.46
<b>DDVI</b> Mean $\pm$ SD	46.65 $\pm$ 8.59
<b>DSVI</b> Mean $\pm$ SD	37.41 $\pm$ 7
<b>TAPSE</b> Mean $\pm$ SD	18.18 $\pm$ 5.74
<b>ASR</b> Mean $\pm$ SD	-11.79 $\pm$ 2.7
<b>GRACE</b> Mean $\pm$ SD	140 $\pm$ 22.54

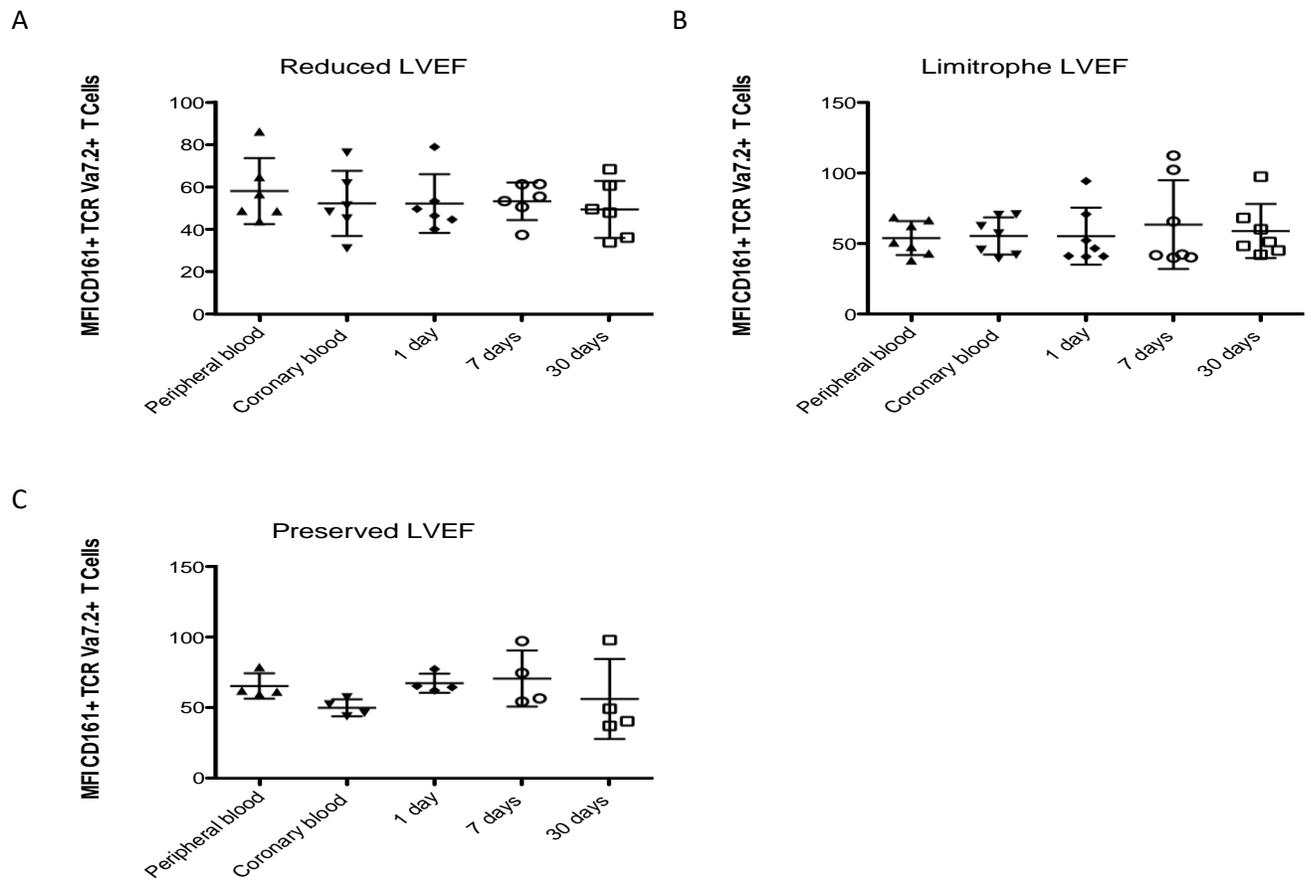
**Tabla1. Características clínicas.** FA: Fracción de Acortamiento , FEVI :Fracción de Eyección del Ventrículo Izquierdo , DDVI: Diámetro Diastólico del Ventrículo Izquierdo , DSVI: Diámetro Sistólico del Ventrículo Izquierdo , TAPSE: Excursión del Anillo Tricuspidео , ASR: Promedio de Strain , GRACE : Escala de estratificación de riesgo .

**FIGURA 1. FRECUENCIA DE CELULAS MAIT Y ESCALA GRACE**



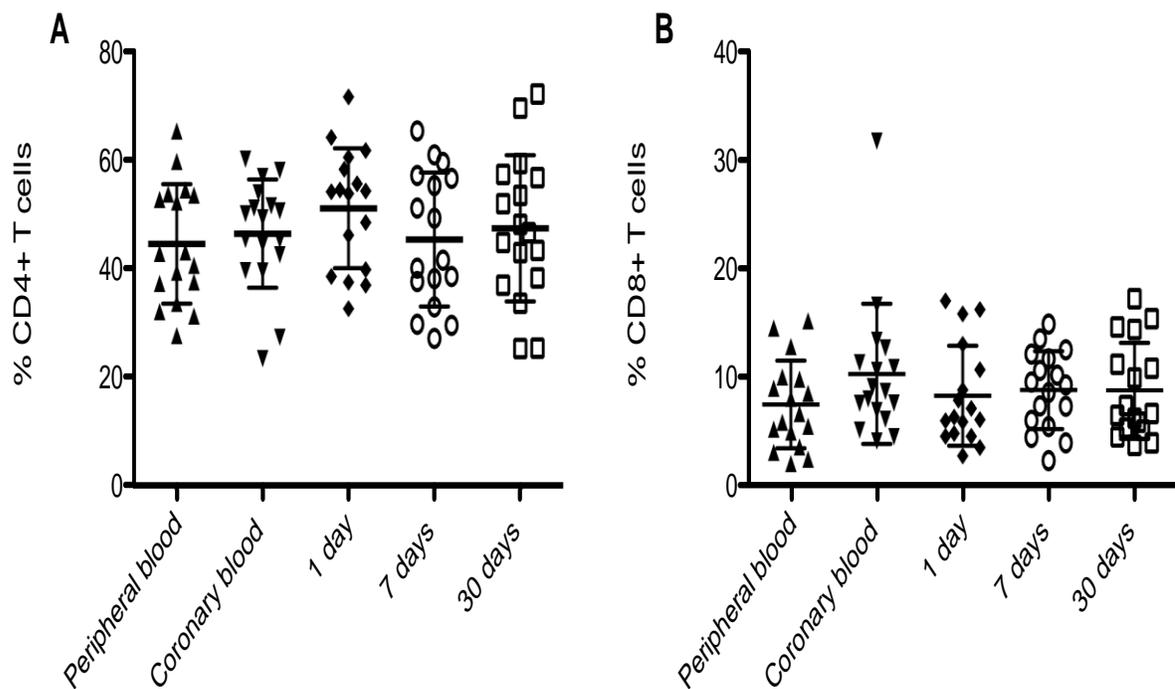
Las frecuencias de células MAIT no se modificaron en el mayor riesgo de estratificación STEMI por GRACE score de riesgo. No se analizó la puntuación GRACE de bajo riesgo, ya que sólo había 2 pacientes en esta categoría.

**FIGURA 2. FRECUENCIA DE CELULAS MAIT Y FEVI**



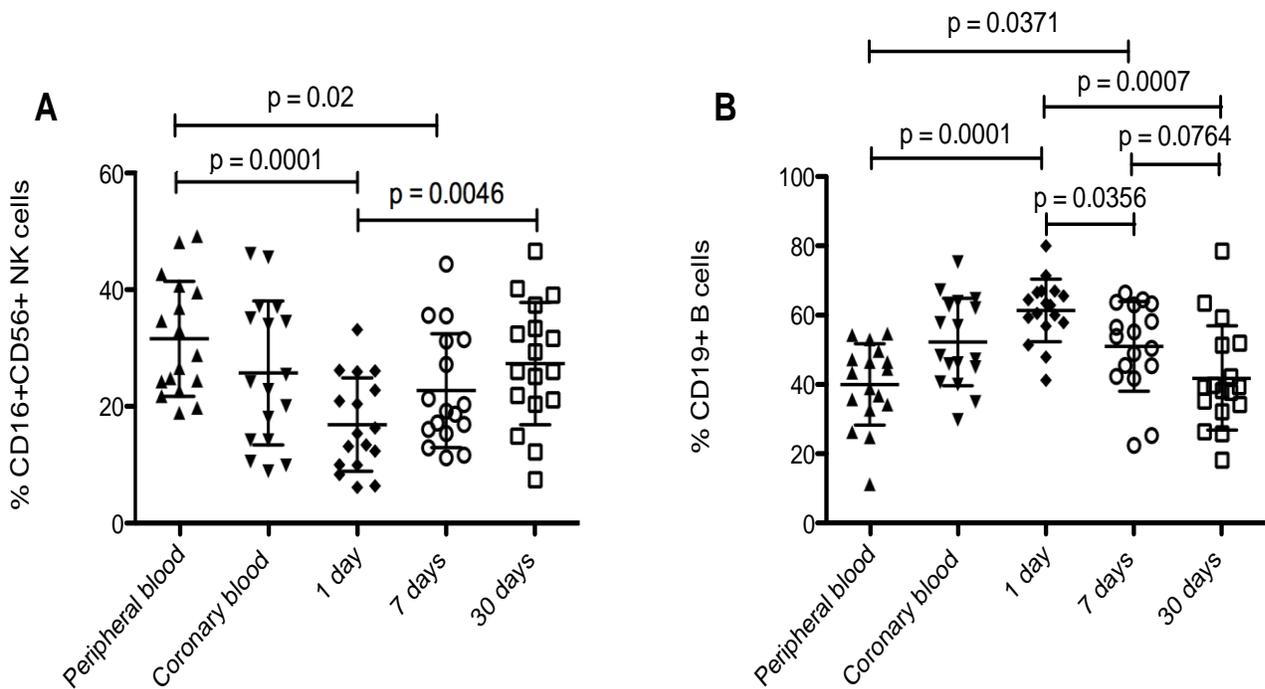
Las frecuencias de las células MAIT no se modificaron en correlación con la FEVI. No se encontraron diferencias entre la sangre periférica al ingreso y la sangre coronaria.

**FIGURA 3 LINFOCITOS T Y SU FRECUENCIA EN TIEMPO EN EL IAM CEST**



Las frecuencias de las células T no se modificaron antes y después de PCI. No se encontraron diferencias entre la sangre periférica y coronaria

**FIGURA 4. A) FRECUENCIA DE CELULAS NK EN IAM CEST . B) FRECUENCIA DE CELULAS B EN EL IAM CEST**



La frecuencia de las células NK 24 horas (1 día) después de PPCI disminuyen mientras que la frecuencia de las células B aumentan, sin embargo, 30 días después de PCI existe una recuperación completa de las frecuencias sanguíneas circulantes de células NK y células B.

## 11. DISCUSION

Es bien sabido que el infarto agudo de miocardio provoca necrosis y estrés mecánico en las paredes de los vasos que desencadenan una reacción inmunitaria, caracterizada por la liberación de citocinas, mediadores inflamatorios y factores de crecimiento, que se activa tanto en el tejido sistémico como en el miocárdico.

La inmunidad innata ha sido estudiada durante varias décadas en el contexto de lesión por isquemia-reperfusión, remodelación miocárdica y curación. Los leucocitos innatos son capaces de reconocer una amplia gama de patrones moleculares propios y extraños, mientras que la activación de la inmunidad adaptativa requiere la cooperación altamente específica de las células presentadoras de antígeno y de los distintos receptores específicos del antígeno en los linfocitos. La evidencia experimental indica que el reconocimiento del autoantígeno es necesario para la activación de las células T después del infarto de miocardio, mientras que los modos de activación no específicos del antígeno también podrían desempeñar un papel especialmente durante la isquemia aguda y la perfusión del miocardio.

En el Reino Unido ,un estudio similar, muestra una linfopenia después de la intervención coronaria percutánea primaria (PCI) que predice la mortalidad a largo plazo en pacientes con infarto agudo del miocardio con elevación del segmento ST . La pérdida de linfocitos de la sangre circulante se produce después de la perfusión en pacientes con IAMCEST. Dentro de la población de linfocitos, la depleción transitoria observada después de la perfusión en el grupo IAM CEST se debió principalmente a la pérdida de células T y células NK. [35]

Hasta ahora, la importancia de los recuentos de linfocitos en los pacientes con IAMCEST que se someten a PCI no ha sido totalmente elucidada. Además, numerosos estudios han evaluado el valor predictivo de la proporción de neutrófilos y linfocitos en IAMCEST tratados con PCI, encontrándose que es un predictor independiente del resultado, tanto en términos de mortalidad como de eventos cardiovasculares adversos mayores. [35]

En el contexto de Células MAIT estas solo se han encontrado en enfermedades infecciosas, en procesos de tipo viral, y en pacientes oncológicos, en esta ocasión al considerar que en IAM CEST existe un proceso inflamatorio severo tomamos la decisión de analizar si se encontraban dichas células en pacientes con IAM, siendo la primera vez en la literatura médica que se reporta, aún falta realizar activación de las mismas, para poder evidenciar si estas células tienen implicación en el contexto del IAM.

## **12. CONCLUSIONES:**

Nuestros resultados confirman que no hay diferencias de células T, 24 horas después del cateterismo cardiaco y que no existen modificaciones de las mismas durante los primeros 30 días del IAM.

Hemos identificado que las frecuencias de células NK y la recuperación de células B al día 30 del IAM, con una elevación transitoria de las células B a las 24 horas y caída de células NK

La frecuencia de las células MAIT muestran un comportamiento estático respecto al tiempo de evolución del IAM, además de no existir diferencias en la frecuencia de las mismas y pero este es el primer informe de sangre circulante y coronaria de los pacientes con STEMI, donde se encuentra este tipo de células ,para descartar la intervención en esta patología es necesario determinar el fenotipo y el perfil funcional y analizar su relación con la gravedad.

Las implicaciones clínicas de estos hallazgos son potencialmente de gran alcance, poder mediar la respuesta celular y establecer la función de las células MAIT al activarlas, podrían ser a futuro muy próximo dianas terapéuticas en el contexto del IAM.

## BIBLIOGRAFIA

1. Olaiz-Fernández G, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Rojas R, Villalpando-Hernández S, Hernández-Avila M, Sepúlveda-Amor J. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública. 2006; 6-130.
2. Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJ. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. Lancet. 2006 ; 27;367(9524):1747-57
3. Velazquez O., Rosas M, Lara EA, Pastelin HG, Sanchez CC, et al. Prevalencia en interrelación de las enfermedades crónicas no transmisibles y factores de riesgo cardiovascular en México. Arch Cardiol Mex. 2003; 73: 62-77.
1. Geografía, I.N.E.G.I. Principales causas de mortalidad por residencia habitual, grupos de edad y sexo del fallecido. 2014. <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulados/PC.asp?t=14&c=11817>.
2. Braunwald, E., and R. A. Kloner. Myocardial reperfusion: a double-edged sword?. J Clin Invest. 1985 ;76: 1713-1719.
3. Yellon, D. M., and D. J. Hausenloy. Myocardial reperfusion injury. N Engl J Med. 2007;357: 1121-1135.
4. CENETEC. Guía de Práctica Clínica. Diagnóstico y Tratamiento del Infarto Agudo al Miocardio con Elevación de Segmento ST en el Adulto Mayor. 2013; Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud. [http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/imss\\_357\\_13\\_iamcon\\_elevacionst/imss\\_357\\_13\\_iamconelevacionst\\_grr.pdf](http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/imss_357_13_iamcon_elevacionst/imss_357_13_iamconelevacionst_grr.pdf).
5. Hausenloy, D. J., S. B. Ong, and D. M. Yellon. The mitochondrial permeability transition pore as a target for preconditioning and postconditioning. Basic Res Cardiol.2009 ;104: 189-202.

6. Vinten-Johansen, J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2004; 61: 481-497.
7. Ito, H. No-reflow phenomenon in patients with acute myocardial infarction: its pathophysiology and clinical implications. *Acta Med Okayama.*2009 ;63: 161-168.
8. Chen, W. and N.G. Frangogiannis, Fibroblasts in post-infarction inflammation and cardiac repair. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1833(4): p. 945-53.
9. Palazzo, A.J., et al., Coronary endothelial P-selectin in pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol.*1998;275(5 Pt 2): p. H1865-72.
10. Nunez, J., et al., Prognostic value of leukocytosis in acute coronary syndromes: the cinderella of the inflammatory markers. *Curr Med Chem,* 2006;13(18): 2113-8.
11. Ma, Y., A. Yabluchanskiy, and M.L. Lindsey .Neutrophil roles in left ventricular remodeling following myocardial infarction. *Fibrogenesis Tissue Repair.* .2013;6(1): 11 unica pagina
12. Cheng, X., et al.The Th17/Treg imbalance in patients with acute coronary syndrome. *Clin Immunol.*2008 ;127(1): 89-97.
13. Hansson, G.K. and P. Libby.The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6(7):508-19.
14. Paulsson, G., et al.Oligoclonal T cell expansions in atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(1): 10-7.
15. Maisel, A., et al. Experimental autoimmune myocarditis produced by adoptive transfer of splenocytes after myocardial infarction. *Circ Res.*1998; 82(4):458-63.
16. Edfeldt, K., et al.Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation.*2002;105(10): 1158-61.
17. Libby, P., M. Nahrendorf, and F.K. Swirski. Leukocytes Link Local and Systemic Inflammation in Ischemic Cardiovascular Disease: An Expanded "Cardiovascular Continuum". *J Am Coll Cardiol.* 2016;67(9): 1091-103.
18. Boehm, T. Design principles of adaptive immune systems. *Nat Rev Immunol.* 2011;11: 307-317.
19. Pieper, K., B. Grimbacher, and H. Eibel. B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131: 959-971.
20. Nutt, S. L., P. D. Hodgkin, D. M. Tarlinton, and L. M. Corcoran. The generation

- of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol*. 2015; 15: 160-171.
21. Owen, J., Punt, J., and Stranford, S., Kuby Immunology: International Edition. New York: W. H. Freeman, 2013.
  22. Vivier, E., E. Tomasello, M. Baratin, T. Walzer, and S. Ugolini. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* . 2008; 9: 503-510 .
  23. Jiang, S., and C. Dong. A complex issue on CD4(+) T-cell subsets. *Immunol Rev*. 2013 ;252: 5-11.
  24. Abbas, A. K., K. M. Murphy, and A. Sher. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 1996; 383: 787-793.
  25. Wong, P., and E. G. Pamer. CD8 T cell responses to infectious pathogens. *Annu Rev Immunol* .2003; 21: 29-70 .
  26. Harty, J. T., A. R. Tvinnereim, and D. W. White. CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu Rev Immunol* .2000;18: 275-308.
  27. Mosmann, T. R., L. Li, and S. Sad. Functions of CD8 T-cell subsets secreting different cytokine patterns. *Semin Immunol* .1997; 9: 87-92.
  28. Zougari, Y., H. Ait-Oufella, P. Bonnin, T. Simon, A. P. Sage, C. Guerin, et al. B lymphocytes trigger monocyte mobilization and impair heart function after acute myocardial infarction. *Nat Med* . 2013 ;19: 1273-1280.
  29. Hofmann, U., N. Beyersdorf, J. Weirather, A. Podolskaya, J. Bauersachs, G. Ertl, et al. Activation of CD4+ T lymphocytes improves wound healing and survival after experimental myocardial infarction in mice. *Circulation* .2012; 125: 1652-1663.
  30. Yang, Z., Y. J. Day, M. C. Toufektsian, S. I. Ramos, M. Marshall, X. Q. Wang, et al . Infarct-sparing effect of A2A-adenosine receptor activation is due primarily to its action on lymphocytes. *Circulation* .2005;111: 2190- 2197.
  31. Yang, Z., Y. J. Day, M. C. Toufektsian, Y. Xu, S. I. Ramos, M. A. Marshall, B. et al . Myocardial infarct-sparing effect of adenosine A2A receptor activation is due to its action on CD4+ T lymphocytes. *Circulation*. 2006; 114: 2056-2064.
  32. Boag, S. E., R. Das, E. V. Shmeleva, A. Bagnall, M. Egred, N. Howard, et al. T lymphocytes and fractalkine contribute to myocardial ischemia/reperfusion injury in patients. *J Clin Invest* . 2015;128: 3063-3076.
  33. Xia, N., J. Jiao, T. T. Tang, B. J. Lv, Y. Z. Lu, K. J. Wang, et al. Activated regulatory T-cells attenuate myocardial ischaemia/reperfusion injury through a CD39-dependent mechanism. *Clin Sci* .2015; 128:679-693.

34. Weirather, J., U. D. Hofmann, N. Beyersdorf, G. C. Ramos, B. Vogel, A. Frey, et al. Foxp3+ CD4+ T cells improve healing after myocardial infarction by modulating monocyte/macrophage differentiation. *Circ Res* .2014;115: 55-67.
35. Saxena, A., M. Dobaczewski, V. Rai, Z. Haque, W. Chen, N. Li, et al. Regulatory T cells are recruited in the infarcted mouse myocardium and may modulate fibroblast phenotype and function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2014;307: H1233-42.
36. Matsumoto, K., M. Ogawa, J. Suzuki, Y. Hirata, R. Nagai, and M. Isobe. Regulatory T lymphocytes attenuate myocardial infarction-induced ventricular remodeling in mice. *Int Heart* .2011; 52: 382-387.
37. Tang, T. T., J. Yuan, Z. F. Zhu, W. C. Zhang, H. Xiao, N. Xia, et al . Regulatory T cells ameliorate cardiac remodeling after myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*.2012;107: 232-235.
38. Januzzi, J.L., Jr., et al., Troponin elevation in patients with heart failure: on behalf of the third Universal Definition of Myocardial Infarction Global Task Force: Heart Failure Section. *Eur Heart J*. 2012;33(18):2265-71.
39. Matsumoto, K., M. Ogawa, J. Suzuki, Y. Hirata, R. Nagai, and M. Isobe. Regulatory T lymphocytes attenuate myocardial infarction-induced ventricular remodeling in mice. *Int Heart J*.2011; 52: 382-387.
40. Tang, T. T., J. Yuan, Z. F. Zhu, W. C. Zhang, et al. Regulatory T cells ameliorate cardiac remodeling after myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*.2012; 107: 232-239
41. Januzzi, J.L., Jr., et al., Troponin elevation in patients with heart failure: on behalf of the third Universal Definition of Myocardial Infarction Global Task Force: Heart Failure Section. *Eur Heart J*. 2012; 33(18): 2265-71.