



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EVALUACIÓN DE LA MIGRACIÓN Y ACTIVACIÓN DE LAS CÉLULAS
DENDRÍICAS SLAN DE PACIENTES CON INFARTO AGUDO DEL MIOCARDIO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Q.F.B. SÁNCHEZ MARTÍNEZ MARÍA DE LA PAZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. FRANCISCO ANTONIO BLANCO FAVELA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MIRIAM RODRÍGUEZ SOSA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. RICARDO LASCURAIN LEDESMA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CD. MX., ENERO 2020



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.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/1322/2019

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **11 de noviembre de 2019** se aprobó la ratificación del siguiente jurado que le fue asignado en el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del día 28 de mayo de 2018, para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** de la estudiante **SÁNCHEZ MARTÍNEZ MARÍA DE LA PAZ** con número de cuenta **411086589** con la tesis titulada **"EVALUACIÓN DE LA MIGRACIÓN Y ACTIVACIÓN DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS SLAN DE PACIENTES CON INFARTO AGUDO DEL MIOCARDIO"**, realizada bajo la dirección del **DR. FRANCISCO ANTONIO BLANCO FAVELA**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO
Vocal: DR. JOSÉ SULLIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ
Secretario: DR. RICARDO LASCURAIN LEDESMA
Suplente: DRA. ADRIANA KARINA CHÁVEZ RUEDA
Suplente: DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 06 de diciembre de 2019

COORDINADOR DEL PROGRAMA


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, por la formación y apoyo brindado durante el desarrollo del programa de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante el tiempo de realización de los estudios de maestría. No de registro de becario 742939.

Al IMSS por el financiamiento del protocolo de investigación con clave número de registro R-2013-785-032.

Al Dr. Francisco A. Blanco Favela y a los miembros del Comité Tutor: Dra. Miriam Rodríguez Sosa y Dr. Ricardo Lascurain Ledesma, por su apoyo, consejos y disposición.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Al Dr. Francisco A. Blanco por confiar en mí y por su apoyo brindado durante el desarrollo del presente proyecto.

A mi compañero de laboratorio Esteban, por su apoyo y asesoría que ayudaron al desarrollo de mi proyecto.

A los miembros de mi comité tutor por el tiempo y consejos para enriquecer este proyecto.

A los miembros de jurado por los consejos, sugerencias para la mejora del presente trabajo y por el gran apoyo que me brindaron para concluir con los trámites.

A la Dra. Karina Chávez, Dr. Luis Chávez, por el apoyo durante mi estancia en el laboratorio.

A la Dra. Selene Salgado y Dr. Luis Moreno por su apoyo en la proporción de las muestras de los pacientes.

A mis compañeros y amigos de la UIMI; Chío, Dani, Esteffy, Karen, Montse, Wendy, Yolanda, Jonathan y Ricardo por sus consejos, ayuda y gran compañerismo, siempre haciendo más amena la estancia en el laboratorio.

A Rocío Chávez por el gran apoyo en los trámites de titulación.

DEDICATORIAS

A mis padres, gracias por el apoyo que me brindaron, por confiar en mí y siempre estar contribuyendo a que siga con mis propósitos de vida. Mamá te agradezco infinitamente el amor que me das sin importar la distancia. Papá gracias por las enseñanzas, sé que nos faltó recorrer más momentos juntos, pero tengo la esperanza de que nos volveremos a encontrar.

A mis hermanas Mago y Lupita, por ser esas personas que me dan alegrías, cariño y mucho amor cada vez que estamos juntas, las amo.

También quiero dedicarle este trabajo a Yoatzin (mishposó), muchas gracias por todo el apoyo, paciencia, confianza y amor que me has dado, llegaste a cambiar mi vida y quiero continuar caminando a tu lado.

A la familia Pérez Noriega por recibirme en su familia, por el gran apoyo y las presiones también, que en conjunto también contribuyeron a la conclusión de este trabajo.

A mis amigos, por seguir compartiendo vivencias conmigo, alegrándome la vida y apoyándome en las buenas y en las malas, los quiero infinitamente. Quiero enfatizar a mi amiga Chío por la gran ayuda y tiempo incondicional que me dio.

A mis compañeros de trabajo, especialmente a Lolita por el apoyo, confianza y consejos, que me ayudaron a poder concluir con este objetivo de vida.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

ABREVIATURAS

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
Enfermedades cardiovasculares	3
Aterosclerosis y el desarrollo de la placa aterosclerosa	4
El infarto agudo del miocardio	7
Inflamación en el infarto agudo al miocardio	7
Quimiocinas en el infarto agudo al miocardio.....	10
Células dendríticas.....	13
JUSTIFICACIÓN	15
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
HIPÓTESIS	17
OBJETIVO GENERAL	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
DISEÑO DE ESTUDIO	18
Grupos de estudio	18
Criterios de Inclusión para pacientes	18
Criterios de exclusión para pacientes.....	19
Criterios de eliminación para pacientes.....	19
Criterios de Inclusión para sujetos sanos.....	19
Criterios de exclusión para sujetos sanos	19
Criterios de eliminación para sujetos sanos	20
METODOLOGÍA	21
Toma de muestras de sangre.....	21
Obtención de células mononucleares	21
Frecuencia y números absolutos de las células dendríticas slan en sangre periférica.....	21
Ensayo de migración.....	22
Activación de las células dendríticas slan	23
Identificación de las células dendríticas slan.....	24

Fenotipificación de marcadores de superficie celular en las células dendríticas slan.....	24
Estrategia de identificación y fenotipificación de moléculas en las células dendríticas slan	26
Análisis estadístico.....	27
DIAGRAMA DE FLUJO	28
RESULTADOS	29
Características generales.....	29
Frecuencia y números absolutos de células dendríticas slan en sujetos sanos. 30	
Expresión de receptores de quimiocinas en células dendríticas slan de sujetos sanos.....	31
Frecuencia y números absolutos de células dendríticas slan en sujetos sanos y pacientes con infarto agudo del miocardio.	32
Migración de las células dendríticas slan.	33
Diferencia en la expresión de receptores de quimiocinas en células dendríticas slan de pacientes con infarto agudo del miocardio.....	35
Expresión de receptores de tipo Toll en	38
Expresión de receptores de quimiocinas después de la activación.....	38
DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES	46
LITERATURA CITADA	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Desarrollo de la placa aterosclerosa.	6
Figura 2. Respuesta inflamatoria en el infarto agudo del miocardio.	9
Figura 3. Estructura de las quimiocinas.	10
Figura 4. Estructura de los receptores de quimiocinas.	12
Figura 5. Identificación de las células dendríticas slan y evaluación de expresión de las diferentes moléculas de superficie.	27
Figura 6. Frecuencia de células dendríticas slan en sangre periférica de hombres y mujeres del grupo de sujetos sanos.	30
Figura 7. Expresión de receptores de quimiocinas en células dendríticas slan en el grupo de sujetos sanos.	31
Figura 8. Frecuencia y números absolutos de las células dendríticas slan en sangre periférica de sujetos sanos y de pacientes con infarto agudo del miocardio.	32
Figura 9. Migración de las células dendríticas slan de pacientes con infarto agudo del miocardio a través de un sistema transwell.	34
Figura 10. Expresión de receptores de quimiocinas en células dendríticas slan de sujetos sanos en comparación con las células dendríticas slan de pacientes con infarto agudo del miocardio.	36
Figura 11. Porcentaje de expresión de los receptores de quimiocinas en las células dendríticas slan de sujetos sanos y pacientes con infarto agudo del miocardio.	37
Figura 12. Expresión de receptores de tipo Toll en células dendríticas slan.	38
Figura 13. Expresión de receptores de quimiocinas en células dendríticas slan activadas con LPS.	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos monoclonales anti-humano utilizados en el presente estudio.	25
Tabla 2. Datos demográficos de sujetos participantes en el estudio.	29

ABREVIATURAS

APC	Aloficocianina
ATP	Adenosintrifosfato
BRIHH	Bloqueo de la rama izquierda del Haz de His
BSA	Albúmina Sérica Bovina
CCR2	Receptor 2 de quimiocinas CC
CCR6	Receptor 6 de quimiocinas CC
CD	Grupo de diferenciación
CK-MB	Isoenzima MB de la creatina cinasa
CXCL1	Ligando 1 de quimiocina CXC
CXCL8	Ligando 8 de quimiocina CXC
CX₃CL1	Ligando 1 de quimiocina CX ₃ C (Fractalquina)
CX₃CR1	Receptor 1 de quimiocina CX ₃ C
CXCR4	Receptor 1 de quimiocina CXC
DAMP	Patrones Moleculares Asociados a Daño
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FcR	Receptor de la fracción Fc
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
g	Gramo
GM-CSF	Factor Estimulante de Colonias de Macrófagos y Granulocitos
HLA	Antígeno de Leucocitos Humanos
HDL	Lipoproteína de alta densidad

ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1
IFN-γ	Interferón- γ
IL	Interleucina
IMF	Intensidad Media de Fluorescencia
KDa	Kilodalton
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LPS	Lipopolisacárido
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos 1 (CCL2)
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad
MIP-3α	Proteína Inflamatoria de Macrófagos 3 alfa (CCL20)
μg	Microgramo
μL	Microlitro
mL	Mililitro
MyD88	Gen de la respuesta primaria para diferenciación mieloide 88
NFκB	Factor Nuclear κ -B
NK	Células asesinas naturales
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAMP	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
PECAM-1	Molécula de Adhesión de Plaquetas a Células Endoteliales-1
PBS	Regulador de Fosfato Salino
PE	Ficoeritrina
PSGL-1	Ligando 1 de la glucoproteína P-Selectina
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno

rpm	Revoluciones por minuto
SICA	Síndromes Coronarios Agudos
SFB	Suero Fetal Bovino
SMC	Células del músculo liso
Th	Célula T cooperadora
TLR	Receptor Tipo Toll
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral- α
VCAM	Molécula de Adhesión de Células Vasculares
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad

RESUMEN

La respuesta inflamatoria aguda que se desarrolla después del infarto agudo del miocardio tiene como objetivo principal la reparación del tejido infartado. Uno de los primeros mecanismos que se presenta es el incremento de quimiocinas como: CX₃CL1, CCL2, CCL20 y C5a. Estas quimiocinas inducen la migración de diferentes grupos celulares, los cuales, pueden reconocer las señales de daño a través de TLR4, activándose diferentes vías de señalización celular que conllevan a la secreción de citocinas, quimiocinas, o cambios en la expresión de moléculas de membrana, contribuyendo aún más al proceso inflamatorio. Las células dendríticas slan contribuyen en la patología de enfermedades inflamatorias y expresan diferentes receptores de quimiocinas, sin embargo, se desconoce su participación en el infarto agudo del miocardio.

En este trabajo, se evaluó el proceso de migración y activación de las células dendríticas slan en 23 pacientes con infarto agudo del miocardio. Primero, se evaluó la capacidad de migración, observando una mayor migración en respuesta a MCP-1 ($p < 0.01$), y CCL20 ($p < 0.01$), congruentemente, se observó mayor expresión de CCR2 ($p < 0.001$) y CCR6 ($p < 0.001$), en comparación con el grupo control. También, encontramos que las células dendríticas slan expresan menos C5aR ($p < 0.001$), sin cambios en la capacidad de migración inducida por C5a. En cuanto a los números absolutos de las células dendríticas slan en circulación de los pacientes, no se observó disminución. Por último, las células dendríticas slan de los pacientes no presentaron cambios en la expresión de los receptores de quimiocinas CX₃CR1, C5aR, CCR2 y CCR6 después de la activación con un ligando de TLR4.

Todos estos resultados sugieren que las células dendríticas slan de pacientes con infarto agudo del miocardio podrían tener mejor capacidad de migración de sangre periférica al tejido isquémico en respuesta a las quimiocinas MCP-1 y CCL20; y una vez en el tejido infartado las células dendríticas slan que son activadas vía TLR4 no cambian su fenotipo en cuanto a los receptores de quimiocinas.

ABSTRACT

The acute inflammatory response that develops after acute myocardial infarction has as main objective the repair of infarcted tissue. One of the first mechanisms presented is the increase in chemokines such as: CX₃CL1, CCL2, CCL20 and C5a. These chemokines induce the migration of different cell groups, which can recognize the signs of damage through TLR4, activating different cell signaling pathways that lead to the secretion of cytokines, chemokines, or changes in the expression of membrane molecules, contributing even more to the inflammatory process. Slan dendritic cells contribute to the pathology of inflammatory diseases and express different chemokine receptors, however, their participation in acute myocardial infarction is unknown.

In this work, the process of migration and activation of slan dendritic cells was evaluated in 23 patients with acute myocardial infarction. First, the migration capacity was evaluated, observing a greater migration in response to MCP-1 ($p < 0.01$), and CCL20 ($p < 0.01$), congruently, a greater expression of CCR2 ($p < 0.001$) and CCR6 ($p < 0.001$), compared to the control group. Also, we found that slan dendritic cells express less C5aR ($p < 0.001$), without changes in the migration capacity induced by C5a. As for the absolute numbers of slan dendritic cells in circulation of the patients, no decrease was observed. Finally, the patients slan dendritic cells did not show changes in the expression of the CX₃CR1, C5aR, CCR2 and CCR6 chemokine receptors after activation with a TLR4 ligand.

All these results suggest that the slan dendritic cells of patients with acute myocardial infarction may have a better ability to migrate peripheral blood to ischemic tissue in response to chemokines MCP-1 and CCL20; and once in the infarcted tissue the slan dendritic cells that are activated via TLR4 do not change their phenotype in terms of chemokine receptors.

INTRODUCCIÓN

Enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares son un conjunto de padecimientos del corazón y de los vasos sanguíneos, donde la principal causa de la enfermedad es el desarrollo de la aterosclerosis [1]. Este grupo de enfermedades se pueden manifestar como cardiopatía isquémica que incluye la arteriopatía coronaria crónica (angina estable) y los síndromes coronarios agudos (SCA) en sus diferentes modalidades de presentación clínica que son, angina inestable, infarto agudo de miocardio y muerte súbita [2]. Otros padecimientos que comprenden las enfermedades cardiovasculares son enfermedades cerebrovasculares, arteriopatías periféricas, trombosis venosas profundas y embolias pulmonares, entre otras [3].

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades cardiovasculares son las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo. En 2015 fueron responsables de 17.7 millones de muertes, representando el 44.73 % de las muertes por enfermedades no transmisibles en todo el mundo. De estos decesos, se estima que 8.8 millones se debieron a cardiopatías isquémicas (comprende la angina estable y SCA) [4], y se estima que en 2030 el número de muertes por enfermedades cardiovasculares podría llegar a 23.6 millones [5]. Mientras tanto, en México en el mismo año alrededor de 160 mil personas murieron a causa de las enfermedades cardiovasculares, representando el 25 % de las muertes ocurridas y ocupando el primer lugar en las estadísticas, siendo las enfermedades isquémicas del corazón las más concurrentes. Con respecto a los grupos de edad, las enfermedades cardiovasculares ocupan el primer lugar de muerte en adultos mayores de 65 años; el tercer lugar en los adultos de 45-64 años y el cuarto en personas de 25-44 años [4-6].

Los factores de riesgo asociados con las enfermedades cardiovasculares son: dislipidemias, diabetes mellitus, hipertensión arterial, tabaquismo, síndrome

metabólico, obesidad e inactividad física, además de algunas infecciones por microorganismos tales como Citomegalovirus y *Chlamydia pneumoniae*, entre otros [1,7,8]; de éstos, las dislipidemias, en particular niveles elevados de colesterol total en suero, concentraciones elevadas de lipoproteína de baja densidad (LDL), así como bajas concentraciones de lipoproteína de alta densidad (HDL), han cobrado importancia como uno de los factores más importantes de riesgo de aterosclerosis.

Aterosclerosis y el desarrollo de la placa aterosclerosa

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica que puede afectar todas las arterias, particularmente grandes y medianas como son: cardíacas, cerebrales y renales [8-10]. El proceso aterogénico inicia con la disfunción endotelial, que representa uno de los primeros estadios en la patogénesis.

La primera fase consiste en una pérdida de las funciones homeostáticas del endotelio y como consecuencia se observa la expresión de moléculas de adhesión como las selectinas (E y P), moléculas de adhesión de plaquetas a células endoteliales (PECAM-1)-1, moléculas de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) y moléculas de adhesión de células vasculares (VCAM), mediante las cuales se produce la interacción entre los monocitos circulantes con las células endoteliales (figura 1A) [1, 8,11-12]. Estos cambios tempranos que preceden a la formación de la lesión aterosclerosa incluyen un aumento en la permeabilidad endotelial a la LDL, la cual es modificada por lipoperoxidación en el espacio subendotelial por especies reactivas de oxígeno (ROS), generándose una forma oxidada de LDL con propiedades quimioatrayentes de monocitos y linfocitos; el aumento de partículas de LDL en el espacio subendotelial inicia la formación de la placa aterosclerosa [1, 8, 11].

En la lesión existe un infiltrado de monocitos que posteriormente se diferencian a macrófagos los cuales identifican y endocitan partículas de LDL oxidada dando paso a la formación de células espumosas (figura 1B), que se acumulan para crear estrías grasas que posteriormente inducirán los ateromas [8, 13]. El proceso inflamatorio

estimula la migración de células del músculo liso desde la capa media hasta la íntima, en donde secretan agentes quimiotácticos que atraen más células inflamatorias. Además, las células del músculo liso sintetizan matriz extracelular, lo que provoca la progresión de la placa [14]. Otro evento que se inicia es la muerte celular de macrófagos por interferón (IFN)- γ que puede ser generada por la acumulación de lípidos promoviendo el avance del núcleo necrótico en la placa (figura 1C).

En la última etapa del aterosclerosis ocurre ruptura o ulceración de la placa fibrosa; la vulnerabilidad de la placa se origina por un adelgazamiento de la lesión. Los macrófagos degradan la matriz de la capa fibrosa por medio de colagenasa intersticial, gelatinasas y estromelisinina. Esta degradación 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 de manera parcial o total, lo que induce un estado inflamatorio y finalmente, provocar un infarto agudo del miocardio (figura 1D) [1, 2, 8, 10].

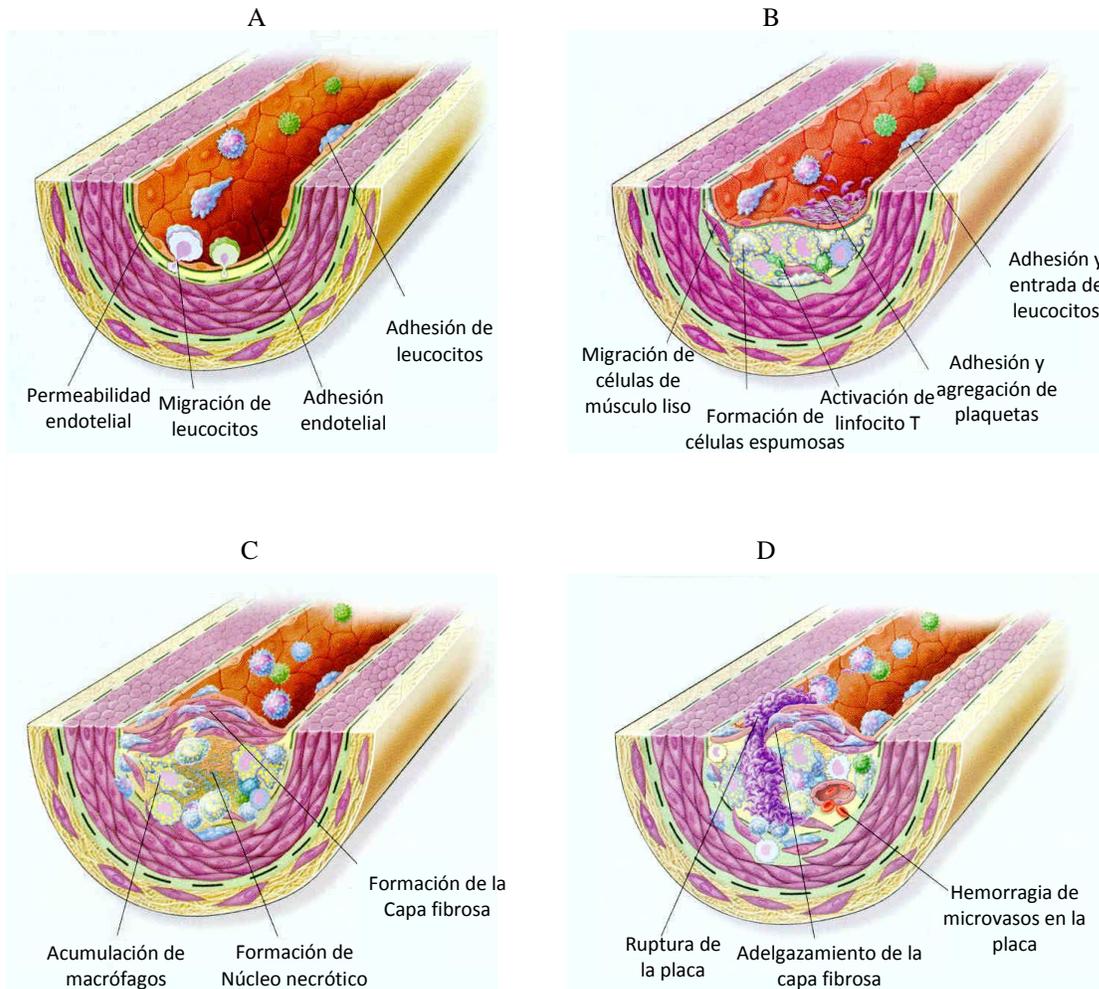


Figura 1. Desarrollo de la placa aterosclerosa.

La lesión se origina por una disfunción endotelial, lo que permite un incremento en la permeabilidad endotelial, ocasionando la migración y adhesión de leucocitos (A). 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 (B). 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 (C). En las etapas finales la lesión sufre un adelgazamiento de la capa fibrosa, ruptura de la placa y hemorragias de microvasos (D) [modificado de Ross R., 2000].

El infarto agudo del miocardio

El infarto agudo del miocardio es el término dado a la muerte celular que sufren los cardiomiocitos en conjunto con las manifestaciones clínicas de la isquemia, donde la obstrucción de las arterias coronarias induce anoxia celular prolongada provocando la muerte de las células cardíacas [10]. La manifestación clínica más frecuente es la aparición de un dolor precordial opresivo con una duración mayor a los treinta minutos, el cual se presenta en el brazo izquierdo y se puede extender hasta el hombro y la mandíbula, además de taquicardia, disnea, diaforesis y vómito [6].

El diagnóstico del infarto agudo del miocardio se basa en la aparición de las manifestaciones clínicas, así como, por la presencia de biomarcadores de daño miocárdico, entre estas se incluyen las troponinas (I y T) y la isoenzima MB de la creatina cinasa (CK-MB) y por cambios en las derivaciones del electrocardiograma, que pueden ser desviaciones positivas o negativas de la onda ST, el bloqueo de la rama izquierda del Haz de His (BRIHH) o el desarrollo de ondas Q patológicas [13].

Inflamación en el infarto agudo al miocardio

El infarto agudo del miocardio es asociado a una respuesta inflamatoria aguda e intensa, la cual, es un proceso esencial para la reparación y cicatrización del tejido, sin embargo, si la respuesta inflamatoria no es controlada esta puede provocar insuficiencia cardíaca y remodelación del ventrículo izquierdo contribuyendo a la patogénesis de esta enfermedad [14]. La lesión tisular genera señales endógenas que activan el sistema inmune innato; estas moléculas pertenecen a una gran familia de mediadores que advierten al cuerpo de la lesión y se conocen como patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). Entre los constituyentes intracelulares liberados por las células necróticas, se encuentran, fragmentos de hialuronana, proteínas de choque térmico, ATP y ADN mitocondrial [15-17].

Las células inmunes innatas identifican las señales de daño a través de receptores de tipo Toll (TLR), una familia de receptores transmembranales que activan vías pro-inflamatorias que inducen la liberación de citocinas y quimiocinas. De los diferentes miembros de la familia de TLR que se expresan en las células de humanos, TLR2 y TLR4 son los principales mediadores de la respuesta inflamatoria posterior al infarto [18-20].

La generación de especies reactivas de oxígeno y la activación del sistema del complemento a través de la escisión de C3, inducen la secreción de citocinas y quimiocinas promoviendo el reclutamiento de leucocitos. Además, la activación del complemento da como resultado la muerte de los cardiomiocitos dañados y la liberación de anafilotoxinas (C3a y C5a). Las anafilotoxinas y las moléculas de adhesión estimulan la extravasación de células mononucleares y neutrófilos [17]. Todos estos mecanismos que se activan inducen el reclutamiento de células inflamatorias en el sitio del infarto para después eliminar las células muertas y los desechos de la matriz extracelular por fagocitosis, preparando al tejido para la fase de reparación.

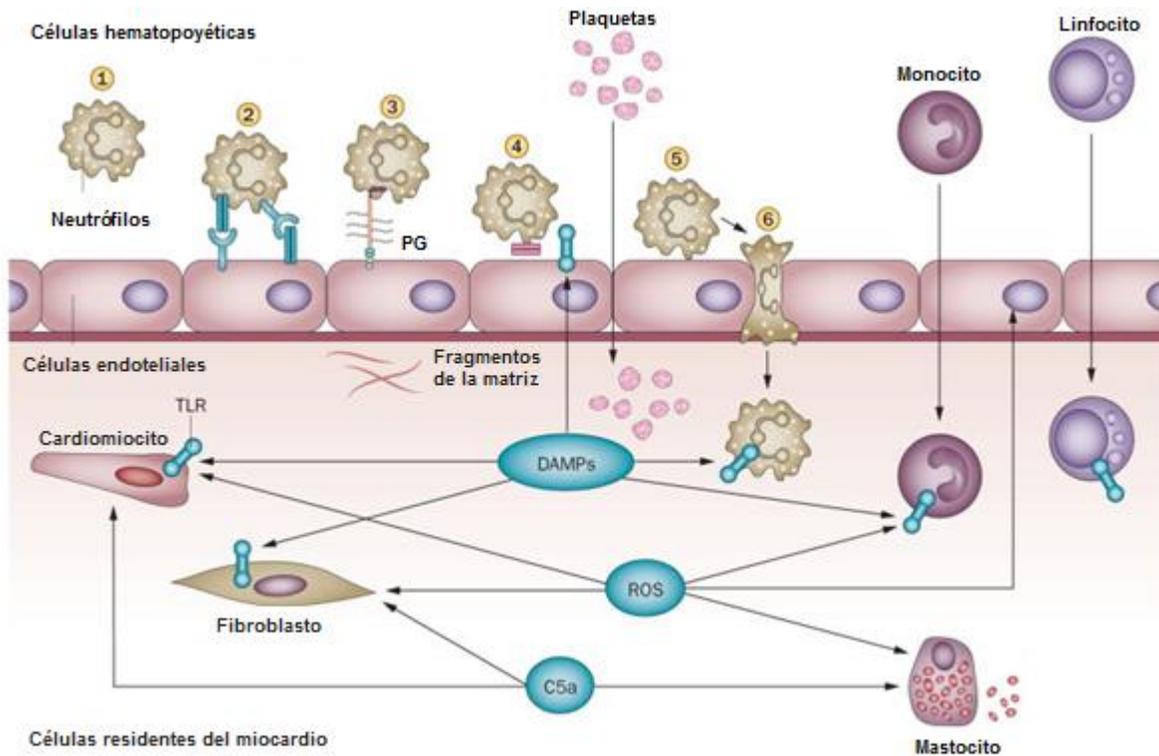


Figura 2. Respuesta inflamatoria en el infarto agudo del miocardio.

La muerte de los cardiomiocitos libera DAMPS y restos de la matriz extracelular, los cuales activan la señalización mediada por TLR en las células del miocardio, lo que provoca una reacción inflamatoria. La activación de la cascada del complemento y la generación de ROS promueven la reacción inflamatoria. El reclutamiento de neutrófilos, monocitos y plaquetas participan en la respuesta inflamatoria post-infarto. Los leucocitos son reclutados a través de la activación de una cascada de adhesión de varios pasos. Captura (1) de los leucocitos circulantes por células endoteliales activadas es seguida por rodamiento (2), mediada a través de interacciones que implican a las selectinas. Leucocitos rodantes se activan (3) por quimiocinas unidas a proteoglicanos (PG) en la superficie endotelial. Los leucocitos activados expresan integrinas y se adhieren a las células endoteliales (4). El fortalecimiento de la interacción adhesiva (5) entre los leucocitos y las células endoteliales es seguido por la trans migración de las células en la zona infartada (6) [modificado de *Frangogiannis NG, 2014*].

Quimiocinas en el infarto agudo al miocardio

Las quimiocinas son una familia de citocinas de bajo peso molecular de aproximadamente 8 a 17 KDa, siendo su función principal coordinar la migración de los leucocitos. Se pueden clasificar con base en su estructura en cuatro subfamilias (C, CC, CXC y CX₃C) en función del número y la disposición estructural de residuos conservados de cisteína dentro de su secuencia polipeptídica amino-terminal [21-24]. La familia C posee solo un residuo de cisteína precedido por un aminoácido, mientras que la familia CC tiene la primera y segunda cisteína adyacentes, el grupo CXC tienen un aminoácido que separa a las dos cisteínas, y por último la familia CX₃C tiene tres aminoácidos que separan a las dos cisteínas (figura 3) [22, 24].

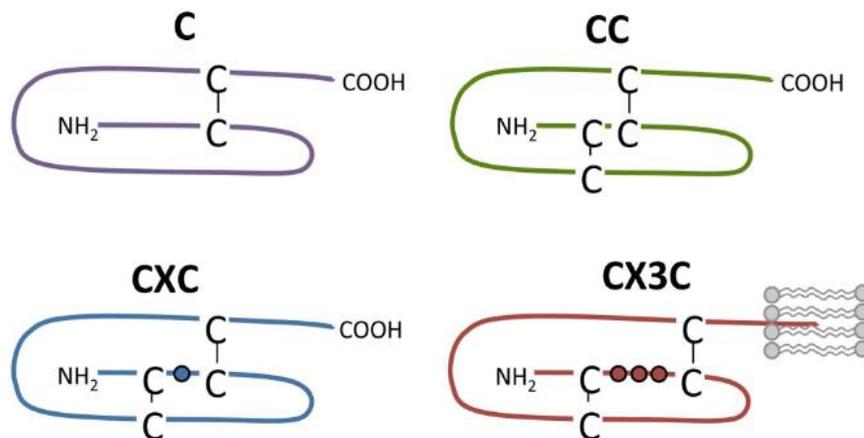


Figura 3. Estructura de las quimiocinas.

Las quimiocinas se dividen en cuatro familias de acuerdo con el número y la organización espacial de residuos de cisteína conservados en su extremo amino terminal. Los puentes disulfuro se muestran como líneas negras [Smit MJ et al, 2015].

Los receptores de quimiocinas son cadenas polipeptídicas que atraviesan la membrana celular siete veces. Estos receptores están acoplados a proteínas G para llevar a cabo la transducción de señal hacia el interior de las células y promover la migración dirigida a favor de un gradiente de concentración. Las principales características de los receptores de quimiocinas son las siguientes: tienen una longitud de aproximadamente 350 aminoácidos; un extremo amino (NH₂) terminal extracelular; un extremo carboxilo (COOH) intracelular; siete dominios

transmembrana α -helicoidales, con tres bucles de conexión intracelulares y tres extracelulares compuestos por aminoácidos hidrofílicos; y las proteínas G que se acoplan a través del segmento COOH-terminal (figura 4) [25-26]. La unión de una quimiocina con el receptor da lugar a un cambio conformacional en la proteína G induciendo un estado activo, también da paso a la activación de segundos mensajeros, que en conjunto van a activar diferentes vías de señalización, entre ellas, la vía de las Rap/MAP cinasa y la vía de señalización iniciada por la proteína G pequeña Rho, esta última, induce la polimerización de actina y con ello la migración celular [27].

Algunas quimiocinas participan en procesos inflamatorios, otras se expresan de manera constitutiva y comprenden importantes funciones fisiológicas. Las quimiocinas inflamatorias se inducen en respuesta a infecciones o daño tisular, un ejemplo es en la aterosclerosis y en el infarto agudo del miocardio [28].

En modelos animales con infarto agudo del miocardio se ha descrito que hay un aumento en la expresión de quimiocinas MCP-1, la proteína-1 α inflamatoria de macrófagos (MIP-1 α), MIP-1 β , CXCL8 y CXCL10 jugando un papel importante en el reclutamiento de leucocitos al sitio de la lesión [26]. En el humano, se conoce que pacientes que desarrollan un infarto agudo del miocardio presentan un aumento de: CXCL8, MCP-1, CX₃CL1, CXCL10, CCL22 y MIP-3 α o también llamada CCL20, donde pueden jugar una función importante en la regulación del tráfico de leucocitos, entre ellos, neutrófilos, monocitos, linfocitos y células dendríticas [29-32].

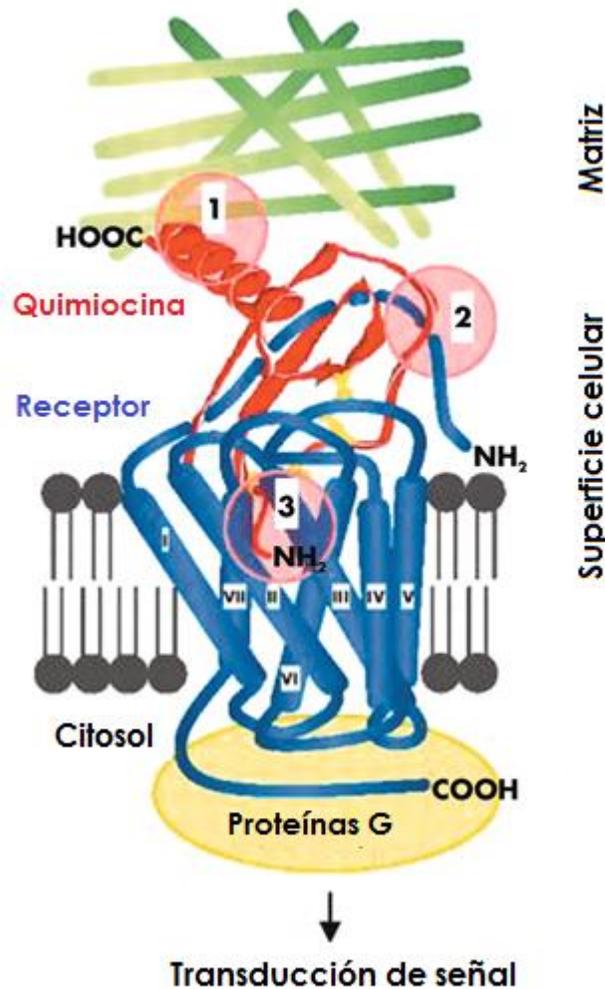


Figura 4. Estructura de los receptores de quimiocinas.

Los receptores de quimiocinas atraviesan la membrana plasmática por siete dominios transmembrana. El extremo NH₂ terminal y tres regiones de bucle extracelular están involucrados en la unión con las quimiocinas, mientras que, el extremo COOH y tres regiones de bucle intracelular participan en la transducción de señal mediada por proteínas G. Los tres sitios esenciales para que se lleve a cabo la unión con la quimiocina ligando son: (1) el sitio de fijación de la matriz en la estructura α -helicoidal o núcleo terminal de COOH, (2) la región del bucle N que permite el contacto inicial del receptor y (3) el extremo NH₂-terminal que interactúa con el bucle de unión a quimiocinas formado por las regiones transmembrana del receptor de quimiocinas [modificado de Moser B, Willmann, 2004].

Células dendríticas

Las células dendríticas representan una población heterogénea de células derivadas de médula ósea, que se distribuyen en diversos tejidos donde ejercen distintas funciones inmunológicas, entre ellas, procesamiento y presentación de antígenos, activación de células T, regulación de la respuesta inmunológica, inducción de tolerancia inmunológica [33]. En sangre periférica en humanos circulan tres poblaciones de células dendríticas denominadas: células dendríticas mieloides que representan el 0.2 %, las células dendríticas plasmacitoides que representan el 0.1 % [33] y la tercera población denominada células dendríticas slan que representa del 0.6 % al 2 % de las células mononucleares, siendo la de mayor proporción de células dendríticas presentes en sangre periférica [34].

Las células dendríticas slan expresan distintivamente una variante en la molécula ligando-1 de la glucoproteína P-selectina (PSGL-1) por el carbohidrato 6-sulfoLacNAc (slan) que las distingue de otras poblaciones de células dendríticas, son identificadas con el anticuerpo monoclonal MDC8 por lo que también son llamadas células MDC8+. Estas células expresan CD16, CD32, CD54, CD11c, CD45RA, también expresan receptores de componentes del complemento y de quimiocinas como son: C3aR, C5aR, CCR1, CCR2, CCR5, CCR6 y CX₃CR1 importantes para su migración a sitios inflamatorios, así como CCR7 y CXCR4 que participan en la migración hacia ganglios linfáticos. Adicionalmente, expresan CD80, CD86, así como, las moléculas del MHC clase I y clase II, sugiriendo que son capaces de inducir respuestas inmunes [35-37].

Las células dendríticas slan al igual que otras poblaciones de células dendríticas pueden ser activadas por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), así como por DAMPs a través de TLR [38-40]. Estudios *in vitro* han demostrado que el LPS induce la secreción de TNF- α en las células dendríticas slan inmaduras [40-41], mientras que en el estadio maduro induce la secreción de IL-12p70 [42]. Además, las células dendríticas slan son capaces de inducir la diferenciación de linfocitos T *naïve* hacia linfocitos Th1 y Th17; activa linfocitos T CD8+ reactivos a

tumores; en células NK promueven su proliferación, secreción de IFN- γ y su citotoxicidad [40,43-44].

Las células dendríticas slan son importantes en la progresión de enfermedades con un fondo inflamatorio como la enfermedad de Crohn [41], psoriasis vulgaris [45,40,42], en tejido inflamatorio de la artritis reumatoide [42], también contribuyen en la patología del lupus eritematoso sistémico (LES) [45-46] y esclerosis múltiple [47-48]. El infarto se considera una enfermedad con un fondo inflamatorio y a pesar de la creciente información, aún no se ha estudiado a las células dendríticas slan, las cuales por sus características inflamatorias podrían tener una función importante en la progresión de esta enfermedad.

Con respecto a otras poblaciones de células dendríticas en el infarto agudo del miocardio, en modelos animales se ha documentado la presencia de poblaciones de células dendríticas mieloides y plasmacitoides en el corazón infartado [49-51], donde pueden tener diferentes funciones, entre ellas, se ha encontrado que las células dendríticas mieloides pueden tener un efecto patológico al promover un proceso inflamatorio exagerado [51-52]. En humanos se ha abordado desde el punto de vista clínico, aunque existe controversia en la información. El análisis de células dendríticas en sangre periférica de pacientes con síndromes coronarios agudos demostró una disminución en la frecuencia de células dendríticas mieloides comparado con los individuos sanos, mientras que el número de células dendríticas plasmacitoides no se altera [53]. Otros autores han reportado una disminución tanto de células dendríticas mieloides como de las células dendríticas plasmacitoides después de presentarse un infarto [54-55], sugiriendo que esta disminución se podría deber a que las células dendríticas se están reclutando al tejido infartado.

JUSTIFICACIÓN

Los síndromes isquémicos son la segunda causa de muerte en México, por lo que el entendimiento de su fisiopatología es importante. En la actualidad aún no se tiene clara la participación de las diferentes poblaciones de células dendríticas en el proceso inflamatorio durante el infarto agudo del miocardio. En modelos animales de infarto hay un aumento de células dendríticas mieloides y plasmacitoides en el tejido infartado, mientras que, el estudio de las células dendríticas en humanos se ha enfocado en evaluar la frecuencia en circulación sanguínea donde se han encontrado disminuidas, sugiriendo que las células dendríticas pueden estar migrando al tejido inflamado.

En los últimos años, se ha descrito una nueva población de células dendríticas denominadas slan. Las células dendríticas slan se han descrito en enfermedades inflamatorias crónicas y se han caracterizado por ser las principales productoras de citocinas pro-inflamatorias en los sitios de inflamación, contribuyendo en el proceso patológico de dichas enfermedades, convirtiéndolas en una población celular interesante de evaluar en enfermedades con fondos inflamatorios.

A pesar de la creciente información que hay sobre la respuesta inmune en el tejido infartado y de las células dendríticas slan en enfermedades inflamatorias, se desconoce si las éstas células tienen una función en la respuesta inflamatoria desarrollada en el infarto agudo del miocardio. Por lo que consideramos importante conocer si las células dendríticas slan contribuyen en la respuesta infamatoria desarrollada en el tejido infartado.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las células dendríticas juegan un papel importante en la inducción y regulación de la respuesta inmune, tanto en condiciones homeostáticas como patológicas. Entre las diferentes poblaciones de células dendríticas existe la población de células dendríticas slan, un grupo celular con características inflamatorias. Estas células, expresan diferentes moléculas de membrana, entre ellas, receptores de quimiocinas como son: CX₃CR1, CCR2, CCR6 y C5aR. También, se ha observado que hay una mayor infiltración de células dendríticas slan en tejidos con un proceso inflamatorio en varias enfermedades, incluidas la psoriasis, el lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide y la enfermedad de Crohn, sin embargo, no existen estudios de la función que pudieran tener las células dendríticas slan en el infarto agudo de miocardio. En el proceso inflamatorio del infarto se han encontrado niveles elevados de quimiocinas entre las que destacan MCP-1, CX₃CL1 y CCL20, que favorecen el reclutamiento de diferentes tipos celulares. En este sentido se desconoce la función que tienen las células dendríticas slan en el proceso inflamatorio durante el infarto agudo del miocardio. Por lo que nos parece importante determinar la frecuencia de las células dendríticas slan en circulación, así como, conocer los estímulos que favorecen el reclutamiento de este grupo celular y que cambios sufren los receptores de quimiocinas cuando las células son activadas.

Por lo que el proyecto se dirige a contestar la siguiente pregunta:

¿Cuál es la frecuencia, capacidad de migración y activación de las células dendríticas slan en pacientes con infarto agudo del miocardio?

HIPÓTESIS

Las células dendríticas slan de pacientes con infarto agudo del miocardio tendrán una mayor capacidad de migración *in vitro* en respuesta a distintas quimiocinas en comparación con las células dendríticas slan de sujetos sanos, por lo tanto, habrá una disminución de células dendríticas slan en circulación sanguínea. Por último, la activación de las células dendríticas slan inducirá una disminución en la expresión de los receptores de quimiocinas.

OBJETIVO GENERAL

1. Evaluar la frecuencia y migración de las células dendríticas slan en respuesta a CX₃CL1, C5a, MCP-1 y CCL20 en pacientes con infarto agudo del miocardio, así como, evaluar el cambio fenotípico de los receptores de quimiocinas en las células dendríticas slan activadas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la frecuencia y números absolutos de las células dendríticas slan en sangre periférica de pacientes con infarto agudo del miocardio y comparar con la frecuencia y números absolutos en circulación sanguínea de sujetos sanos.
2. Evaluar la capacidad de migración *in vitro* de las células dendríticas slan después del estímulo con las siguientes quimiocinas: CX₃CL1, C5a, MCP-1 y CCL20 en pacientes con infarto agudo del miocardio y compararla con la mostrada en células de sujetos sanos.
3. Caracterizar la expresión de los receptores de quimiocinas CX₃CR1, C5aR, CCR2 y CCR6 en las células dendríticas slan provenientes de pacientes con infarto agudo del miocardio y de sujetos sanos.
4. Activar las células dendríticas slan con LPS y evaluar el cambio fenotípico en la expresión de los receptores de quimiocinas: CX₃CR1, C5aR, CCR2 y CCR6.

DISEÑO DE ESTUDIO

Se trata de un estudio transversal, comparativo, prospectivo y experimental, así como observacional.

Grupos de estudio

Se incluyeron 23 casos de pacientes, que ingresaron al Hospital de Cardiología de Centro Médico Nacional Siglo XXI, que cumplieron con los criterios de inclusión. A los pacientes con infarto agudo del miocardio se les tomó la muestra de sangre dentro de las primeras 24 horas iniciados los síntomas. A cada paciente se le realizó una evaluación del electrocardiograma de 12 derivaciones y de ser necesario el círculo completo, determinación de marcadores de necrosis miocárdica (como la isoenzima miocárdica de la creatina-fosfocinasa (CPK-MB) y/o troponinas), marcadores inflamatorios de riesgo (proteína C reactiva, fibrinógeno), química sanguínea, hemoglobina, plaquetas y perfil de lípidos. Para el grupo control se incluyeron 21 sujetos sanos que cumplían con los criterios de inclusión.

Criterios de Inclusión para pacientes

1. Pacientes de cualquier género, con una edad de 35 a 75 años.
2. Pacientes con diagnóstico de infarto agudo de miocardio, dentro de las 24 horas de iniciados los síntomas,
3. El diagnóstico de infarto se considerará con la presencia de biomarcadores de necrosis miocárdica, más uno de los siguientes criterios:
 - A. Dolor precordial de tipo isquémico \geq 30 min. de duración, acompañado o no de disnea, diaforesis, náusea y/o vómito,
 - B. Desnivel positivo o negativo del segmento ST igual o mayor de 1 mm en 2 o más derivaciones que vean la misma cara o presencia de bloqueo de rama izquierda del haz de His (BRIHH) de reciente aparición,

- C. Presencia de ondas Q patológicas de novo en por lo menos 2 derivaciones contiguas.
4. Consentimiento informado firmado por el paciente o familiar de su aceptación de ingreso al presente estudio.

Criterios de exclusión para pacientes

1. Pacientes que cursen con síndrome anémico,
2. Antecedentes de enfermedad neoplásica, inflamatoria crónica o proceso infeccioso activo,
3. Antecedentes de tratamiento previo con anti-inflamatorios o inmunosupresores,
4. Niveles de creatinina ≥ 1.6 mg/dl,
5. Trombocitopenia o discrasia sanguínea conocida.

Criterios de eliminación para pacientes

1. Pacientes a los que no se logre obtener la cantidad de sangre necesaria para los ensayos,
2. Pacientes en los que no se logre obtener el número de células mononucleares necesarias para los experimentos.

Criterios de Inclusión para sujetos sanos

1. Sujeto sano de cualquier género, con una edad de 25 a 55 años,
2. Sujetos sin datos electrocardiográficos o clínicos sugestivos de isquemia miocárdica, o alteraciones en el ritmo o la conducción,
3. Sujetos sin factores de riesgo cardiovascular mayor,
4. Consentimiento informado de su aceptación al presente estudio.

Criterios de exclusión para sujetos sanos

1. Sujetos sanos con síndrome anémico,

2. Antecedentes de enfermedad neoplásica, inflamatoria crónica o proceso infeccioso activo,
3. Antecedentes de tratamiento previo con anti-inflamatorios o inmunosupresores.

Criterios de eliminación para sujetos sanos

1. Sujetos a los que no se logre obtener la cantidad de sangre necesaria para los ensayos.
2. Sujetos en los que no se logre obtener el número de células mononucleares necesarias para los experimentos.

METODOLOGÍA

Toma de muestras de sangre

La muestra sanguínea en los pacientes con infarto agudo del miocardio se obtuvo por vía venosa a partir de catéter periférico o por punción de vena periférica, previa asepsia y antisepsia, se extrajo un volumen de 20 mL de sangre venosa en tubos que contenían EDTA. La muestra de los sujetos sanos se obtuvo a través de punción de vena periférica.

Obtención de células mononucleares

Los 20 mL de sangre se diluyeron en solución salina isotónica (SSI) en una relación 1:2. Posteriormente, los 40 mL de sangre diluida se colocaron sobre 10 mL de Lymphoprep® (*Axis-Shield*, Liverpool, UK) en un tubo de 50 mL y se centrifugaron a 2000 rpm durante 30 minutos. Se recuperó la interface (entre el Lymphoprep® y el plasma) correspondiente a las células mononucleares. Las células se lavaron 2 veces con SSI a 1200 rpm por 15 minutos y a 900 rpm por 10 minutos. El paquete celular recuperado se resuspendió en 1 mL de PBS 1×, realizando el conteo celular con cámara de Neubauer.

Frecuencia y números absolutos de las células dendríticas slan en sangre periférica

El valor de la frecuencia de las células dendríticas slan se sacó con el programa flowjo versión 7.6.5. (*Tree star, Inc.*). Haciendo una relación entre el número de las células dendríticas slan (células M-DC8+) con el número total de células mononucleares de cada muestra. Para los números absolutos, se tomaron estos mismos valores, además, el valor de leucocitos totales, dato obtenido en la citometría hemática. A continuación, se muestra la ecuación utilizada:

$$\# \text{ células dendríticas slan} = \frac{(\% \text{ células dendríticas slan}) \times (\# \text{ Leucocitos})}{100}$$

Purificación de monocitos

Las células dendríticas slan se enriquecieron a partir de las células mononucleares por selección negativa utilizando el kit "Pan Monocyte Isolation Kit, human" (*Miltenyi Biotec*, Bergisch Gladbach, Alemania), siguiendo las especificaciones del fabricante, esto debido a sus características fenotípicas por la expresión de CD16. Brevemente, de la suspensión celular por cada 10^7 células mononucleares, las células se resuspendieron en 30 μ L de MACS buffer (PBS 1 \times ph 7.4, BSA 0.5 %, EDTA 2 mM) y se adicionaron 10 μ L de anticuerpo bloqueador de FcR y 10 μ L de coctel de anticuerpos biotinilados dirigidos a linfocitos T, linfocitos B, linfocitos NK, granulocitos, eritrocitos y plaquetas; se incubó durante 15 minutos a 4 °C. Posteriormente, se adicionaron 60 μ L del MACS buffer y 20 μ L de microesferas magnéticas acopladas a anticuerpo antibiotina, incubando a 4 °C durante 10 minutos. Después, la suspensión celular se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos con MACS buffer, una vez terminado, las células se resuspendieron en 1 mL de MACS buffer para posteriormente pasarlas por la columna de separación LS MACS (*Miltenyi Biotec MACS*, Bergisch Gladbach, Alemania). Se recuperó la fracción negativa correspondiente a los monocitos totales y a las células dendríticas slan en 1mL de medio RPMI al 10 % de suero fetal bovino (*Hyclone*, Logan, UT, E.U.A.), realizando el conteo celular con cámara de Neubauer.

Ensayo de migración

Los ensayos de migración se realizaron en placas de 96 pozos "transwell" con un poro de 5 micras (*Corning Costar*, Cambridge, MA, R.U.). En la parte inferior de la cámara "transwells" se colocó por separado las siguientes quimiocinas (*R&D Systems*, Minneapolis, MN, E.U.A): CX₃CL1 (150 ng/mL), CCL20 (200 ng/mL), MCP-1 (100 ng/mL) y C5a (100 ng/mL) y como control negativo solo se colocó medio de cultivo RPMI (*Hyclone*, Logan, UT, E.U.A.). Posteriormente, en la parte superior se colocó en cada condición un volumen de 75 μ L de suspensión celular que contenía 3×10^5 células mononucleares de pacientes con infarto agudo del miocardio o de sujetos sanos. Para conocer el número de células dendríticas slan

colocadas inicialmente, se separó una alícuota del mismo volumen. Después de dos horas de incubación se recuperaron las células que migraron al pozo inferior. Las células recuperadas y la alícuota inicial se lavaron con PBS 1X a 1200 rpm durante 5 minutos, por último, se realizó la tinción de identificación de las células dendríticas slan como se describe más adelante [anti-CD3-PE, anti-CD14-PE, anti-CD19-PE, anti-CD56-PE, anti-HLA-DR-APC-Cy7 (*Biolegend*, San Diego, CA. E.U.A.), y anti-slan (M-DC8)-FITC (*Miltenyi Biotec MACS*, Bergisch Gladbach, Alemania)]. La adquisición de datos se realizó con el citómetro MACS Quant (*Miltenyi Biotec MACS*, Bergisch Gladbach, Alemania) y se determinó el número de células dendríticas slan usando el software flowjo versión 7.6.5. (*Tree star, Inc.*). El número obtenido se comparó con el número de células dendríticas slan que se encontraban en las 3×10^5 células mononucleares. Reportando los resultados en porcentaje, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de células MDC8+} = \frac{(\text{Número de células MDC8+ que migraron con los estímulos})}{(\text{Número de células MDC8+ iniciales})} * 100$$

Activación de las células dendríticas slan

Las células obtenidas con el kit de purificación de monocitos se colocaron en placas de 96 pozos (3×10^5 células/pozo) (*Corning Costar*, Cambridge, MA, R.U.), y se activaron con LPS (*Sigma Aldrich*, St. Louis, Mo, E.U.A.) (125 ng/mL), incubando los cultivos celulares durante 24 a 37 °C y 5 % de CO₂. Posterior al tiempo de incubación, las células se recuperaron y se lavaron con PBS 1× a 1200 rpm durante 10 minutos. Finalmente, se realizó la identificación y evaluación de las moléculas de membrana CX₃CR1, C5aR, CCR2 y CCR6 de las células dendríticas slan por citometría me flujo como se describe en los siguientes apartados.

Identificación de las células dendríticas slan

La identificación de las células dendríticas slan (HLA-DR+/-; M-DC8+; CD3-; CD14-; CD19- y CD56-) se hizo a partir de las células mononucleares y de las células activadas con LPS. Para ello, se determinó primero la viabilidad celular con el colorante “Zombie aqua™ Fixable Viability Kit” (*Biolegend*, San Diego, CA. E.U.A.), el cual tiñe a las células no viables, para ello, se siguieron las indicaciones del fabricante. Posteriormente, las células se lavaron a 1200 rpm durante 5 minutos y se resuspendieron en PBS 1×. Sucesivo a esto, las células se incubaron durante 20 minutos a 4 °C con los anticuerpos monoclonales anti-humano: anti-CD3, anti-CD14, anti-CD19 y anti-CD56 todos acoplados con el fluorocromo PE (*Biolegend*, San Diego, CA. E.U.A.), para excluir células de linaje de linfocitos T, monocitos, linfocitos B y células NK; y con los anticuerpos, anti-HLA-APC-Cy7 (*Biolegend*, San Diego, CA. E.U.A.) y anti-slan (M-DC8)-FITC (*Miltenyi Biotec*, Bergisch Gladbach, Alemania). Terminado el tiempo de incubación, las células se lavaron siguiendo el esquema antes mencionado, para posteriormente fijar las células con 35 µL de paraformaldehído al 2 % por 15 minutos a 4 °C, y lavadas con PBS 1×. Finalmente, las células se resuspendieron en FACS buffer. La adquisición de datos se hizo utilizando el citómetro de flujo MACS Quant (*Miltenyi Biotec*, Bergisch Gladbach, Alemania). Los niveles de expresión se cuantificaron midiendo la intensidad media de fluorescencia (IMF) de cada muestra utilizando el software FlowJo versión 7.6.5. (*Tree Star, Inc.*). Los anticuerpos utilizados para la identificación y para la medición de las diferentes moléculas de membrana se muestran en la tabla 1.

Fenotipificación de marcadores de superficie celular en las células dendríticas slan

La expresión de los receptores de quimiocinas, TLRs y moléculas de co-estimulación se realizó siguiendo el esquema anterior, agregando los siguientes anticuerpos monoclonales anti-humano: anti-TLR2-Biotina, anti-TLR4-Violeta Brillante 421, anti-CX₃CR1-PECy7, anti-C5aR-PECy7, anti-CCR2-PECy7, anti-CCR6-PECy7 (todos de la marca (*Biolegend*, San Diego, CA. E.U.A.). Para los

anticuerpos con biotina se incubaron con el anticuerpo anti-biotina-PECy7 (*Biolegend*, San Diego, CA. E.U.A.), siguiendo los mismos criterios de incubación. Por último, se fijaron con 35 μ L de paraformaldehído al 2 % por 15 minutos a 4 °C y fueron lavadas con PBS 1 \times . Finalmente, las células se resuspendieron en FACS buffer y leídas en un citómetro de flujo MACS Quant (*Miltenyi Biotec*, Bergisch Gladbach, Alemania). Los niveles de expresión se cuantificaron midiendo la intensidad media de fluorescencia (IMF) y el porcentaje de expresión de los receptores de cada muestra, utilizando el software FlowJo versión 7.6.5. (*Tree Star, Inc.*).

Tabla 1. Anticuerpos monoclonales anti-humano utilizados en el presente estudio.

Anticuerpo monoclonal	Fluorocromo	Dilución	Marca
Anti-CD3	PE	1:200	Biolegend
Anti-CD14	PE	1:200	Biolegend
Anti-CD19	PE	1:200	Biolegend
Anti-CD56	PE	1:200	Biolegend
Anti-HLA-DR	APC-Cy7	1:100	Biolegend
Anti-slan (M-DC8)	FITC	1:100	Miltenyi Biotec
Anti-CX₃CR1	PE-Cy7	1:40	Biolegend
Anti-C5aR	PE-Cy7	1:40	Biolegend
Anti-CCR2	PE-Cy7	1:100	Biolegend
Anti-CCR6	PE-Cy7	1:100	Biolegend
Anti-TLR2	Biotina	1:50	Biolegend
Anti-TLR4	Brilliant Violet 421	1:50	Biolegend
Anti-biotina	PE-Cy7	1:100	Biolegend

Estrategia de identificación y fenotipificación de moléculas en las células dendríticas slan

El análisis de citometría de flujo fue utilizado para evaluar la expresión de las moléculas CX₃CR1, C5aR, CCR2, CCR6, TLR2, TLR4, CD80 y CD40, expresadas en las células dendríticas slan. A partir de una gráfica de células con un solo núcleo (figura 5A) se realizó una gráfica de puntos de complejidad celular contra el marcador de viabilidad (Zombie aqua™), seleccionando a las células negativas para el marcador (figura 5B), posterior a ello se realizó una gráfica de puntos de tamaño contra granularidad, donde se permitió identificar a la población de células mononucleares (figura 5C), a partir de ésta región se realizó una cuarta gráfica de puntos de la expresión del marcador HLA-DR contra la expresión de los marcadores de células de linaje (LIN), excluyendo a las células de linaje positivas (figura 5D), de ésta, se realizó una quinta región que permitió identificar a las células positivas para el anticuerpo M-DC8 que corresponde a las células dendríticas slan (figura 5E). A partir de ésta última región se realizó el análisis de IMF y/o de la frecuencia de las diferentes moléculas de interés, así también se obtuvo el número de células dendríticas slan para los ensayos de migración.

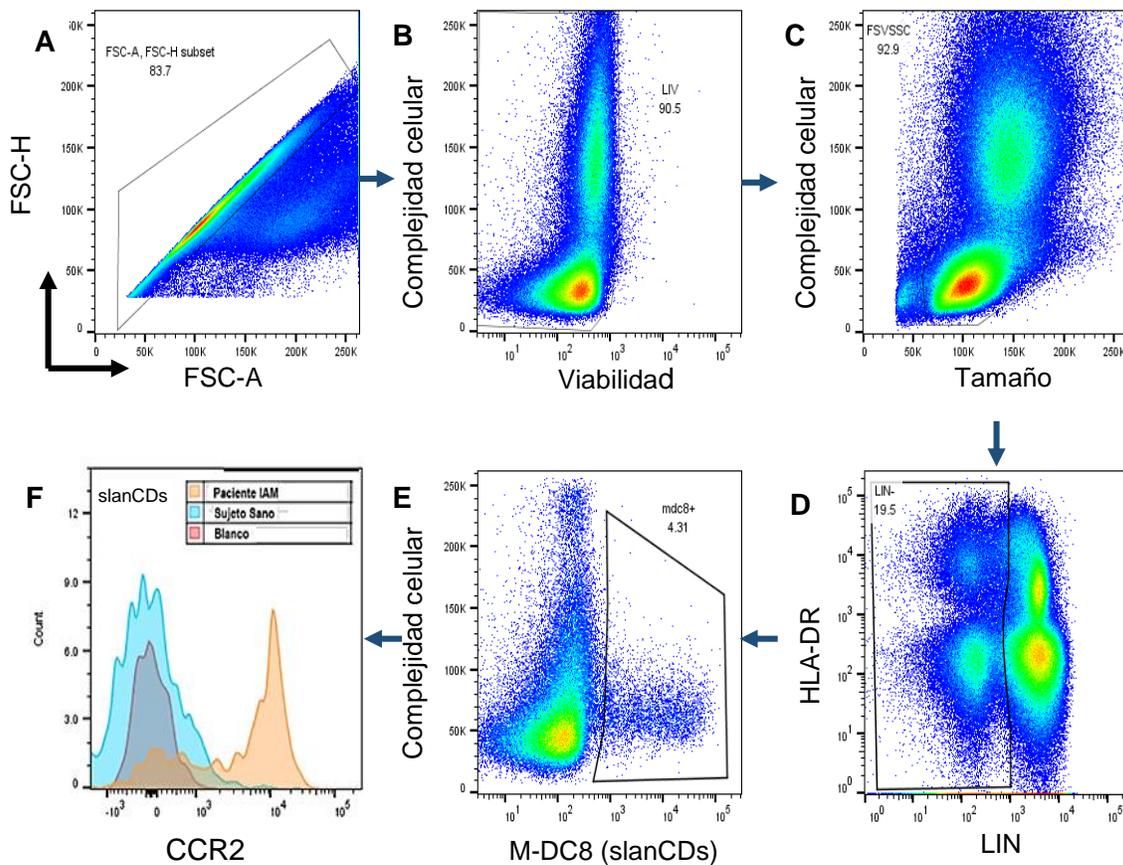


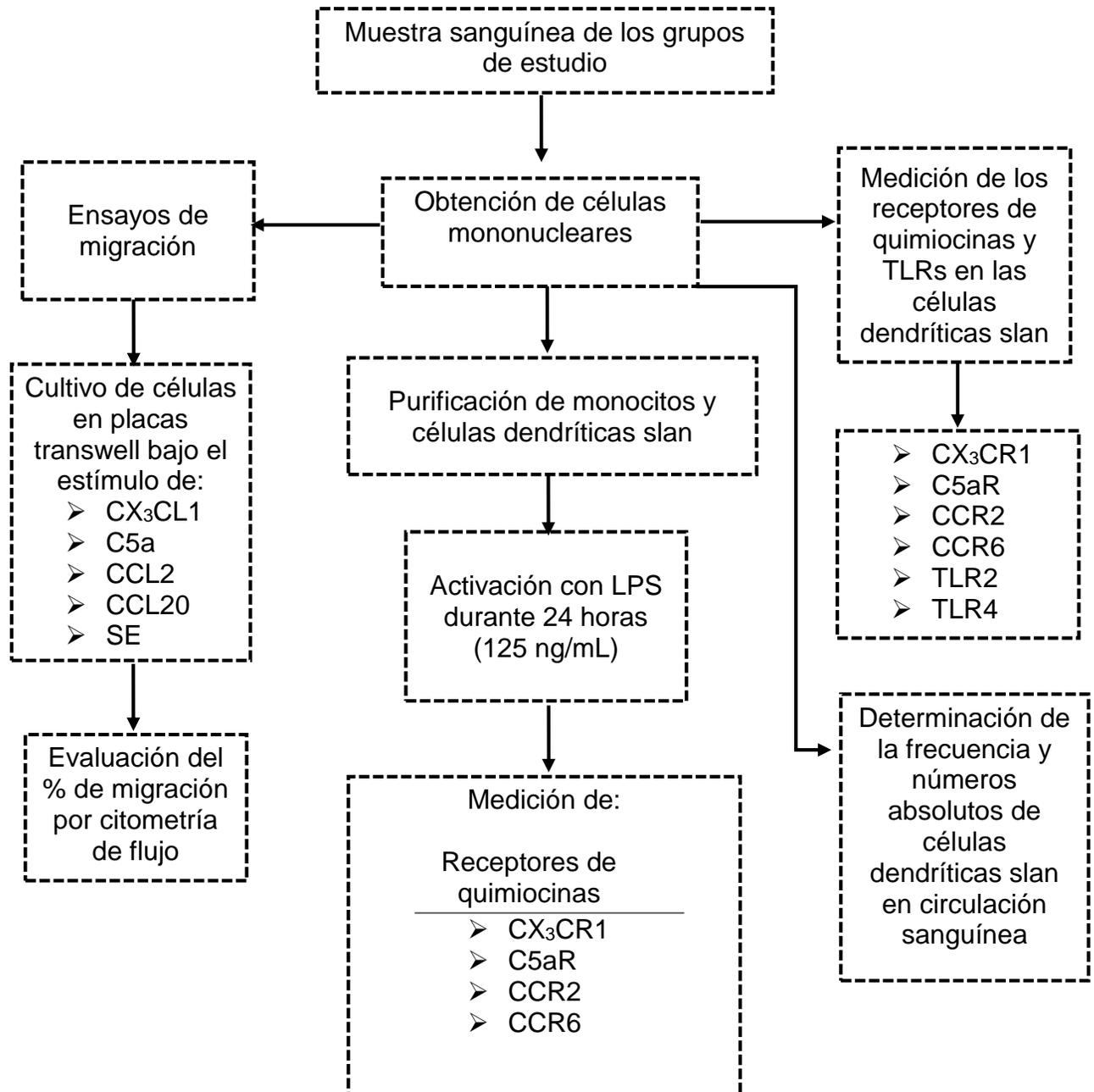
Figura 5. Identificación de las células dendríticas slan y evaluación de expresión de las diferentes moléculas de superficie.

A. Gráfica de células con un solo núcleo. **B.** Exclusión de células muertas. **C.** Selección de células mononucleares. **D.** Selección de células LIN-. **E.** Selección de células M-DC8+. **F.** Histogramas representativos de la expresión de CCR2 en células dendríticas slan: Histograma rojo: Autofluorescencia; Histograma azul: Sujeto sano; Histograma amarillo: Paciente con infarto agudo del miocardio.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa Graphpad Prism versión 6.0. Para conocer la normalidad de los datos se utilizó la prueba estadística Shapiro Wilk. Para la comparación de variables cuantitativas entre grupos se realizó un análisis no paramétrico, con la prueba U de Mann Whitney, considerando un valor de $p \leq 0.05$ como significativo.

DIAGRAMA DE FLUJO



RESULTADOS

Características generales

En este trabajo se reclutaron 25 sujetos sanos y 23 pacientes con infarto agudo del miocardio. Del grupo de sujetos sanos, 14 (56.00 %) eran del género masculino y 11 (44.00 %) del género femenino, con edad mínima de 24 años, edad máxima de 60 años y con una edad promedio de 33 años. En el caso de los pacientes, 20 (86.96 %) eran del género masculino y 3 (13.04 %) del género femenino, concordando con la prevalencia de la enfermedad. Con la mínima edad de 37 años, máxima de 88 años y un promedio de 62 años. En la tabla 2 se resumen los datos clínicos y demográficos de los pacientes.

Tabla 2. Datos clínico-demográficos de los pacientes de estudio.

Parámetro	Valor promedio ± DE
Género (M/F)	20/3
Edad (años)	62 ± 14
Peso (Kg)	75.04 ± 14.64
Talla (cm)	164.09 ± 9.14
IMC	27.35 ± 4.77
Glucosa (mg/dl)	185.04 ± 93.98
Colesterol total (mg/dl)	120.00 ± 30.40
Triglicéridos (mg/dl)	127.00 ± 48.80
Lipoproteína de alta densidad (mg/dl)	38.66 ± 6.20
Lipoproteína de baja densidad (mg/dl)	51.67 ± 22.84
Lipoproteína de muy baja densidad (mg/dl)	25.67 ± 10.19
Creatina cinasa (mg/dl)	1273.80 ± 1839.00
Isoforma MB de la Creatina cinasa (mg/dl)	125.16 ± 181.27
Troponina (mg/dl)	9.41 ± 10.19
Hemoglobina (g/dl)	14.79 ± 2.51
Leucocitos ($\times 10^9/L$)	12.11 ± 3.29
Monocitos ($\times 10^9/L$)	0.91 ± 0.36
Linfocitos ($\times 10^9/L$)	1.47 ± 0.55
Plaquetas ($\times 10^9/L$)	204.69 ± 57.90
Dislipidemia (%)	30.43
Diabetes mellitus (%)	47.83
Hipertensión arterial (%)	47.83
Obesidad (%)	26.09

M: masculino; F: femenino; Kg: kilogramo; cm: centímetro; IMC: Índice de masa corporal; mg/dl: miligramos por decilitro; g/dl: gramos por decilitro; %: porcentaje.

Como se puede observar, en el grupo de pacientes con infarto agudo del miocardio la mayoría de los sujetos que entraron en el estudio son hombres, y las proporciones entre hombres y mujeres en el grupo de sujetos sanos es casi la misma. Por lo que, se hizo un análisis de frecuencia, números absolutos y de la expresión de los receptores de quimiocinas de las células dendríticas slan de sangre periférica por género en el grupo de sujetos sanos para descartar diferencia entre hombres y mujeres.

Frecuencia y números absolutos de células dendríticas slan en sujetos sanos.

Se determinó que la frecuencia de las células dendríticas slan en sangre periférica fue de 0.6377 % en los hombres y de 0.8256 % en las mujeres (Figura 6A). Para el análisis de los números absolutos de las células dendríticas slan entre los dos géneros fue de $0.1241 \times 10^3/\mu\text{L}$ en hombres sanos y de $0.1060 \times 10^3/\mu\text{L}$ en mujeres sanas (Figura 6B). Estos resultados muestran que no hay diferencia en la frecuencia y números absolutos de las células dendríticas slan entre hombres y mujeres.

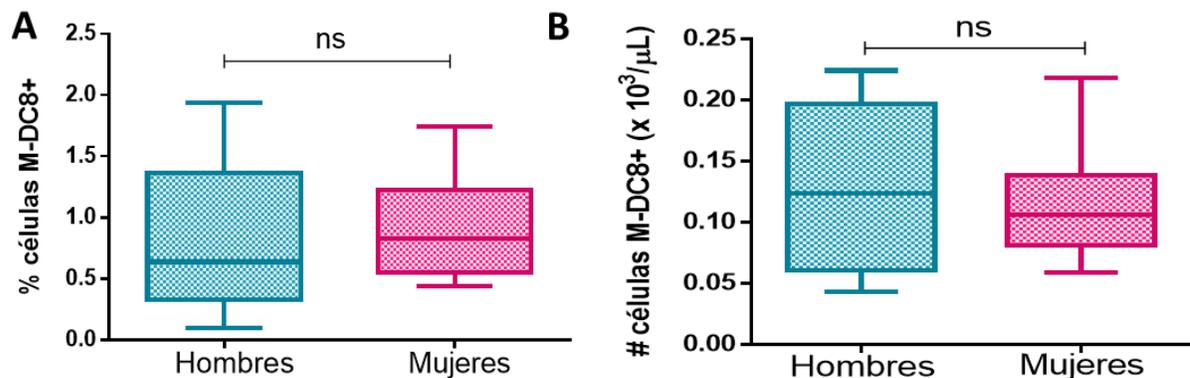


Figura 6. Frecuencia de células dendríticas slan en sangre periférica de hombres y mujeres del grupo de sujetos sanos.

Se determinó por citometría de flujo el porcentaje y los números absolutos de las células dendríticas slan (LIN-, HLA-DR+/-, MDC8+) en sangre periférica de sujetos sanos. **A.** Porcentaje de células dendríticas slan en sangre periférica. **B.** Números absolutos de células dendríticas slan. Datos obtenidos de 14 hombres y 11 mujeres. Prueba estadística U de Mann Whitney. Se indica la mediana y los valores intercuartiles. (ns=sin diferencia estadística significativa).

Expresión de receptores de quimiocinas en células dendríticas sanas de sujetos sanos.

La IMF de los cuatro receptores de quimiocinas evaluados entre hombres y mujeres fue la siguiente: CX₃CR1 fue de 1576.0 y 1573.0; C5aR fue de 5759.0 y 5879.0; CCR2 fue de 274.5 y 224.5; y por último para CCR6 346.0 y 332.0 en hombres y mujeres respectivamente. Estos resultados muestran que no hay diferencia en la expresión de los diferentes receptores de quimiocinas entre géneros, por lo tanto, la proporción de muestras entre hombres y mujeres en el grupo de sujetos sanos no repercute para la comparación con el grupo de pacientes con infarto agudo del miocardio.

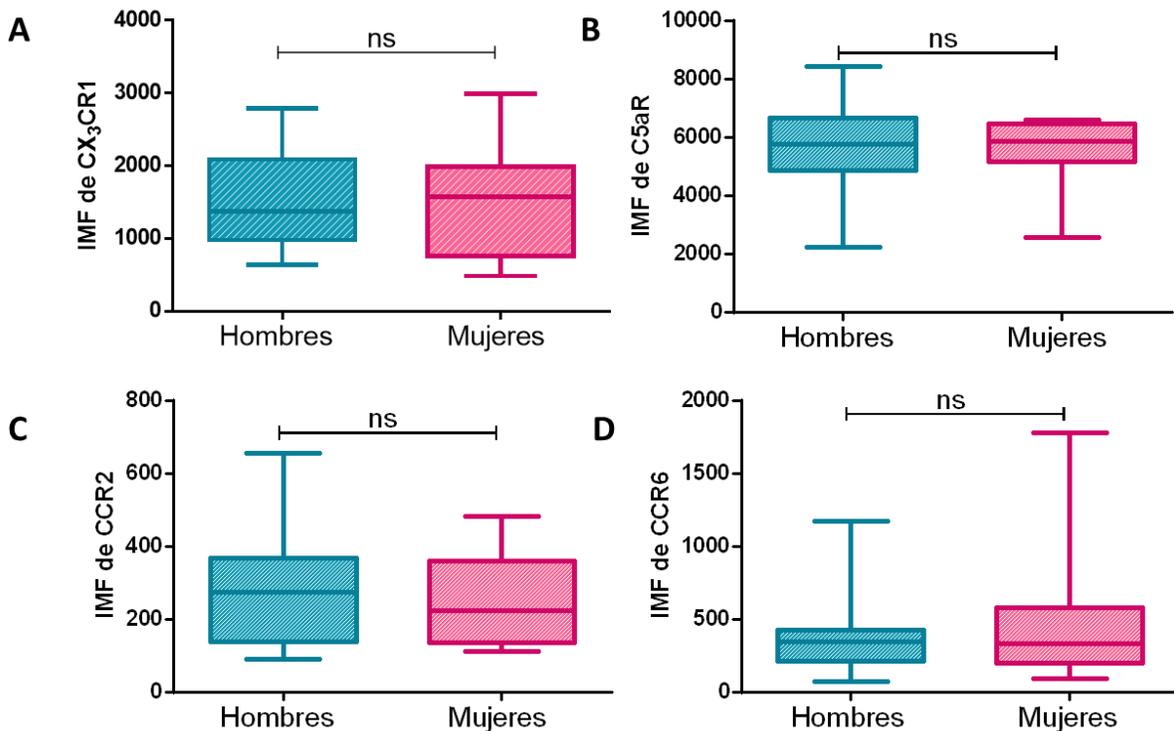


Figura 7. Expresión de receptores de quimiocinas en células dendríticas sanas en el grupo de sujetos sanos.

Se determinó por citometría de flujo la expresión de los receptores de quimiocinas en las células dendríticas sanas de sangre periférica de sujetos sanos. **A.** CX₃CR1. **B.** C5aR. **C.** CCR2. **D.** CCR6. Datos promedio de experimentos independientes de 14 hombres y 11 mujeres. Los niveles de expresión están expresados como intensidad media de fluorescencia (IMF). Prueba estadística U Mann Whitney. Se indica la mediana y los rangos intercuartiles. (ns=sin diferencia estadística significativa).

Frecuencia y números absolutos de células dendríticas slan en sujetos sanos y pacientes con infarto agudo del miocardio.

Se determinó la frecuencia de las células dendríticas slan en células mononucleares de muestras de sangre periférica tanto de sujetos sanos como de pacientes con infarto agudo del miocardio por citometría de flujo. Se encontró que la frecuencia de las células dendríticas slan en los pacientes con infarto agudo del miocardio (0.48%) disminuye significativamente en comparación con la frecuencia en los sujetos sanos (0.72%) (Figura 8A). Cuando se realizó el análisis de los números absolutos de las células dendríticas slan entre los dos grupos de estudio (# células MDC8+ en pacientes con infarto = $0.07382 \times 10^3/\mu\text{L}$; # células MDC8+ en sujetos sanos = $0.1048 \times 10^3/\mu\text{L}$) no se encontraron diferencias (Figura 8B).

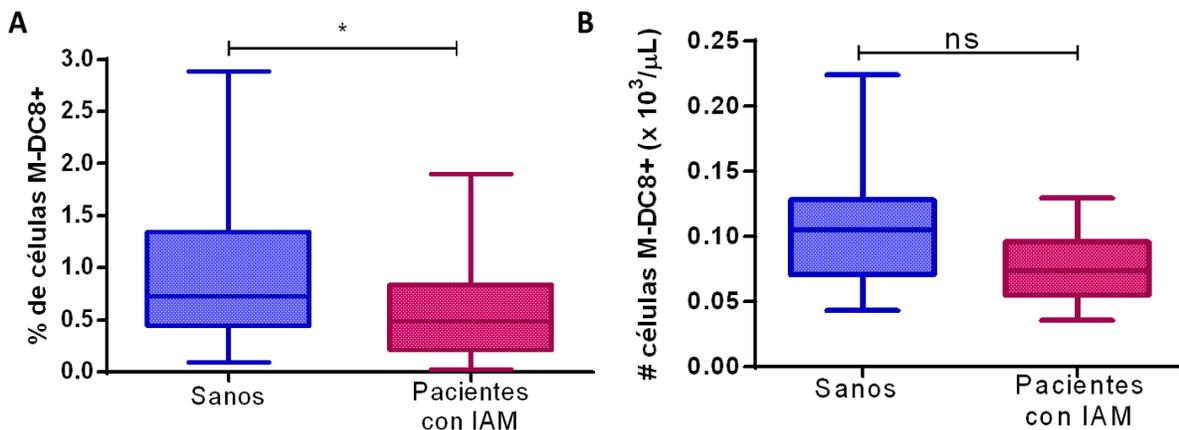


Figura 8. Frecuencia y números absolutos de las células dendríticas slan en sangre periférica de sujetos sanos y de pacientes con infarto agudo del miocardio.

A. Se muestran los porcentajes en sangre periférica de células dendríticas slan. **B.** Números absolutos de células dendríticas slan en sangre periférica. Datos obtenidos de 25 sujetos sanos y 23 pacientes con infarto agudo del miocardio Prueba estadística U de Mann Whitney. Se indica la mediana y los rangos intercuartiles. (* $p < 0.05$; ns=sin diferencia estadística significativa).

Migración de las células dendríticas slan.

La migración de las células dendríticas slan en los pacientes en respuesta a CX₃CL1 fue de 13.46 % y en sujetos sanos fue de 6.99 %. Para la anafilotoxina C5a, las células provenientes de pacientes tuvieron un porcentaje de migración de 19.95 %, mientras que en sujetos sanos fue de 12.48 %. En respuesta a MCP-1, las células dendríticas slan de pacientes con infarto agudo del miocardio tuvieron un porcentaje de migración de 9.70 % y en donadores sanos fue de 2.87 %. Por último, el porcentaje de migración de las células dendríticas slan en pacientes con infarto agudo del miocardio en respuesta a la quimiocina CCL20 fue de 10.83 % y de 5.77 % en el grupo de sanos (Figura 9).

El porcentaje de migración de las células dendríticas slan de pacientes con infarto agudo del miocardio es mayor en respuesta a MCP-1 y CCL20, resultando semejante la migración entre los dos grupos de estudio, con las quimiocinas CX₃CL1 y C5a.

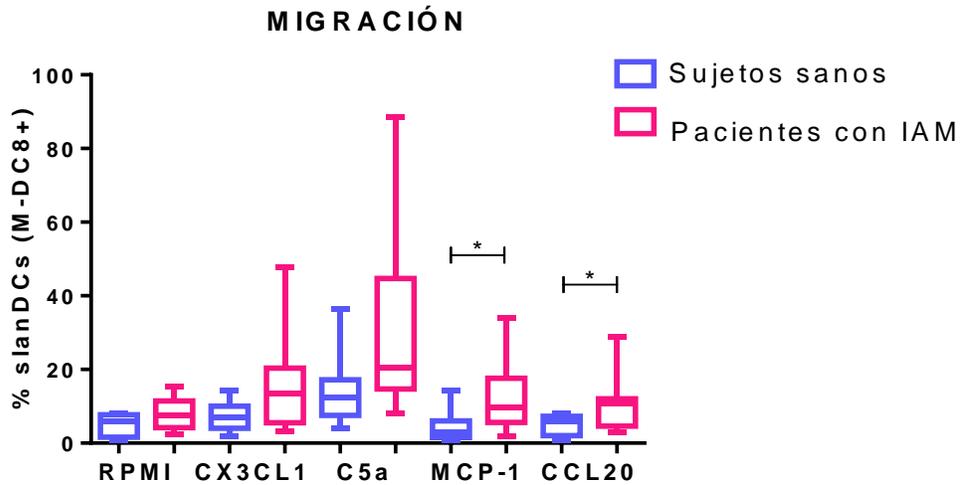


Figura 9. Migración de las células dendríticas slan de pacientes con infarto agudo del miocardio a través de un sistema transwell.

Se determinó la migración de las células dendríticas slan a partir de células mononucleares de pacientes con infarto agudo del miocardio y de sujetos sanos, ante el estímulo de diferentes agentes quimiotácticos (CX₃CL1, C5a, MCP-1 y CCL20) en un sistema transwell. El porcentaje de células que migraron se determinó por citometría de flujo. Datos obtenidos de 9 sujetos sanos y 12 pacientes con infarto agudo del miocardio, prueba estadística U de Mann Whitney (*p<0.05). Se indica la mediana y los rangos intercuartiles

Diferencia en la expresión de receptores de quimiocinas en células dendríticas slan de pacientes con infarto agudo del miocardio

La IMF de CX₃CR1 fue de 1285.0 en pacientes con infarto agudo del miocardio (Figura 10 A) y con un porcentaje de expresión del 55.80 % en las células dendríticas slan (Figura 11 A) y en sujetos sanos la IMF fue de 1403.0 (Figura 10 A) con un porcentaje de 73.65 % en las células dendríticas slan (Figura 11 A). Para la expresión del receptor C5aR, CCR2 y CCR6 encontramos diferencias en la expresión entre ambos grupos. En la expresión de C5aR, las células de los pacientes expresaron menos receptor (IMF de 1307.0) que en las células de sujetos sanos (IMF de 5870.0), del mismo modo, hubo menos células que expresaban el receptor 47.50 % y 96.25 %, respectivamente (Figura 10 B y 11 B). Por el contrario, la expresión de CCR2 y CCR6 en las células dendríticas slan de pacientes con infarto agudo del miocardio fue mayor tanto en IMF como en el porcentaje de células. En pacientes la IMF de CCR2 fue de 719.5 y 30.30 % de células positivas, mientras que, en sujetos sanos la IMF fue de 224.5 y 5.25 % (Figura 10 C y 11 C). Por otro lado, la IMF de CCR6 fue de 798.5 y 44.80 % de las células en pacientes con infarto agudo del miocardio contra 321.0 y 20.15 % en sujetos sanos (Figura 10 D y 11D).

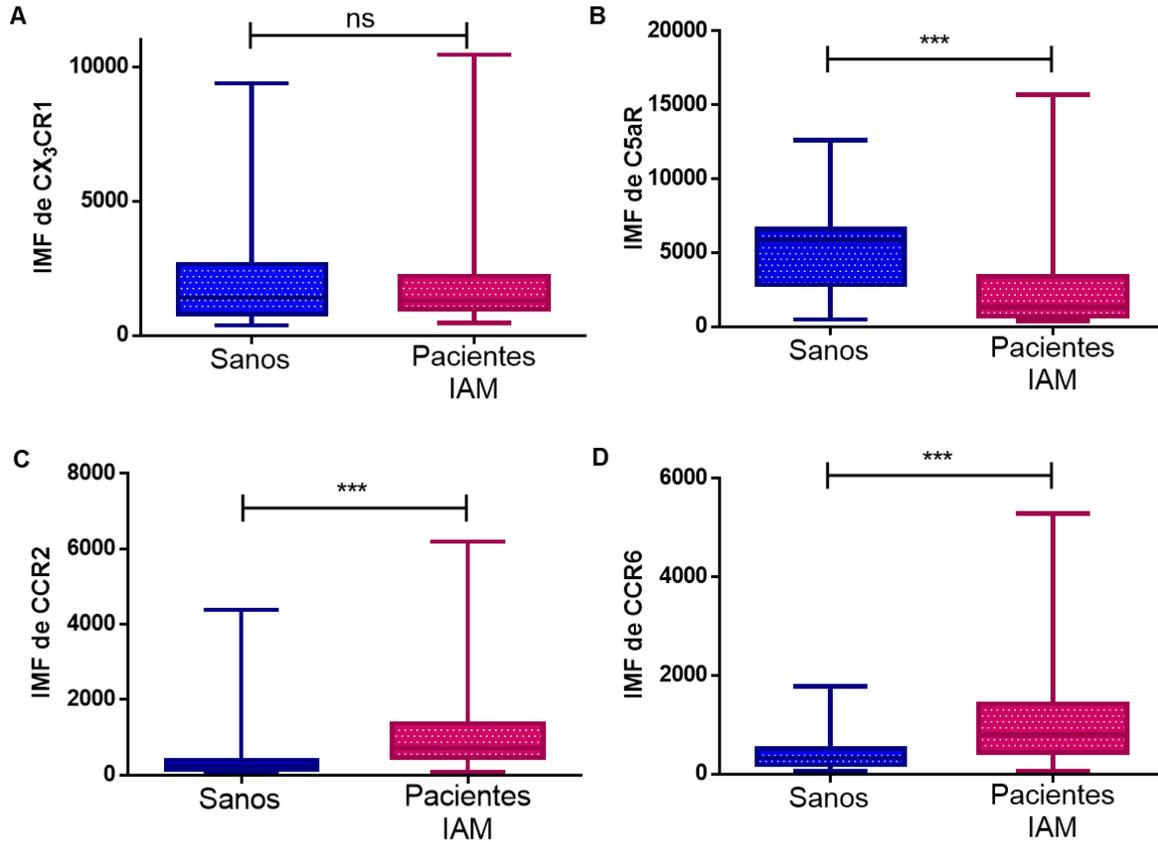


Figura 10. Expresión de receptores de quimiocinas en células dendríticas sanas de sujetos sanos en comparación con las células dendríticas sanas de pacientes con infarto agudo del miocardio.

Se determinó por citometría de flujo la expresión de **A.** CX₃CR1, **B.** C5aR, **C.** CCR2 y **D.** CCR6. Datos promedio de experimentos independientes de sujetos sanos (n=25) y pacientes con infarto agudo del miocardio (n=23). Los niveles de expresión están expresados como intensidad media de fluorescencia (IMF), prueba estadística U Mann Whitney. Se indica la mediana y los rangos intercuantiles. (ns=sin diferencia estadística significativa; ***p<0.001).

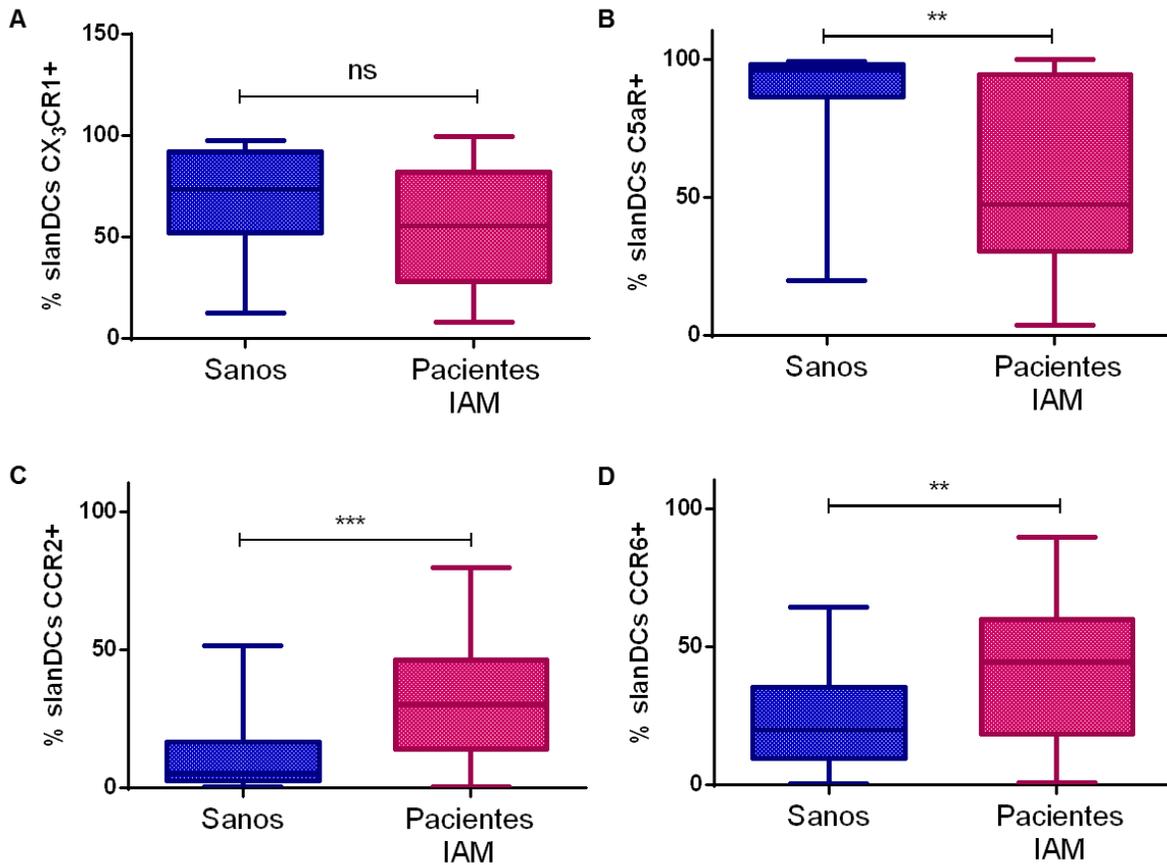


Figura 11. Porcentaje de expresión de los receptores de quimiocinas en las células dendríticas slan de sujetos sanos y pacientes con infarto agudo del miocardio.

Se indican los porcentajes de expresión celular de los diferentes receptores de quimiocinas en las células dendríticas slan en los grupos de estudio. **A.** CX₃CR1, **B.** C5aR, **C.** CCR2 y **D.** CCR6. Datos promedio de experimentos independientes de sujetos sanos (n=25) y pacientes con infarto agudo del miocardio (n=23). Prueba estadística U Mann Whitney. Se indica la mediana y los rangos intercuartiles. (ns = sin diferencia estadística significativa; **p<0.01; ***p<0.001).

Expresión de receptores de tipo Toll en células dendríticas slan activadas.

Encontramos que no hay diferencia en la expresan de TLR2 entre las células dendríticas slan de pacientes con infarto agudo del miocardio (IMF de 2257.0) y las células provenientes del grupo de sujetos sanos (IMF de 6659.0) (Figura 12A). Por el contrario, las células dendríticas slan provenientes de pacientes con infarto agudo del miocardio presentaron una mayor densidad de expresión de TLR4 (IMF de 1561.0) en comparación con el grupo de sujetos sanos (IMF de 672.0) (Figura 12B).

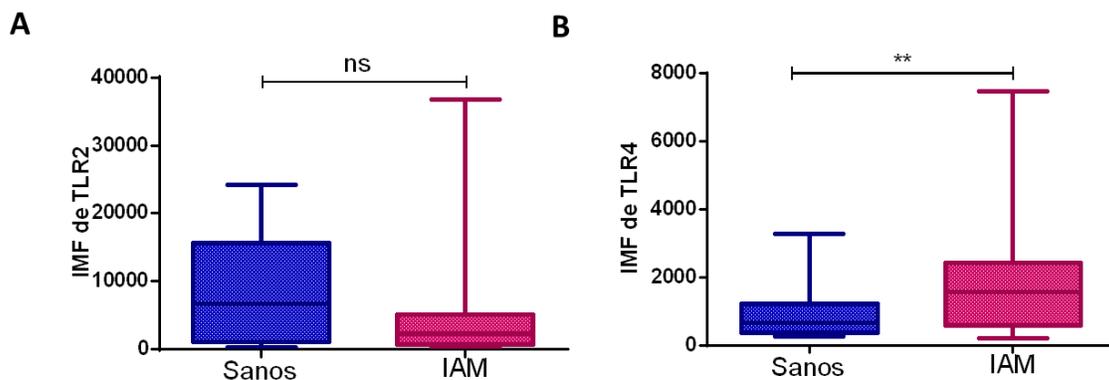


Figura 12. Expresión de receptores de tipo Toll en células dendríticas slan.

La expresión de los TLR se determinó por citometría de flujo. **A.** TLR2 y **B.** TLR4. Datos promedio de experimentos independientes de sujetos sanos (n=25) y pacientes con infarto agudo del miocardio (n=23). Los niveles de expresión están expresados como intensidad media de fluorescencia (IMF). Prueba estadística U de Mann Whitney. Se indica la mediana y los rangos intercuartiles. (ns = sin diferencia estadística significativa; **p<0.01).

Expresión de receptores de quimiocinas después de la activación

Las células dendríticas slan activadas con LPS (ligando de TLR4) tuvieron menor expresión de CX₃CR1 (IMF de 2072.33) en el grupo de sujetos sanos en comparación con las células no activadas (IMF de 3253.0), sin cambios en las células de pacientes con infarto agudo del miocardio (Figura 13 A). Para los otros recetores de quimiocinas C5aR, CCR2 y CCR6 la activación con LPS no indujo cambios en la expresión de los mismos en ambos grupos de estudio (Figura 13 B-D).

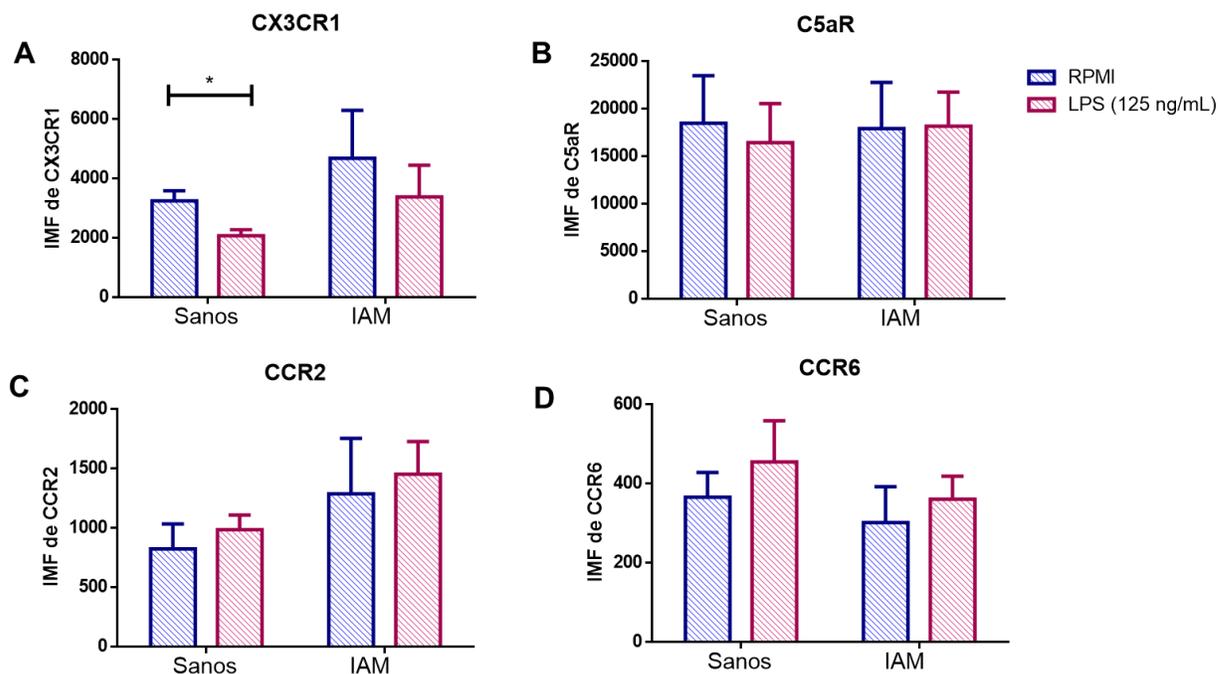


Figura 13. Expresión de receptores de quimiocinas en células dendríticas sanas activadas con LPS.

La expresión de los receptores se evaluó a partir de células enriquecidas y activadas con LPS (ligando de TLR4) durante 24 horas. **A.** CX₃CR1, **B.** C5aR, **C.** CCR2 y **D.** CCR6. Datos promedio de 4 experimentos independientes de sujetos sanos y pacientes con infarto agudo del miocardio. Los niveles de expresión están expresados como intensidad media de fluorescencia (IMF±SEM). Prueba estadística t de student (*p<0.05)

DISCUSIÓN

El infarto agudo del miocardio se presenta como consecuencia de una interrupción en el aporte de oxígeno y de nutrientes al corazón, ocasionando la muerte celular del músculo cardíaco. La respuesta inflamatoria del infarto agudo del miocardio es necesaria para la reparación del tejido, pero al mismo tiempo puede promover la muerte celular de los cardiomiocitos dando como resultado la expansión del infarto [56]. Este proceso inflamatorio agudo promueve: la señalización de diversos PRR y ésta a una activación celular; la activación del sistema del complemento; la generación de ROS y un aumento en la secreción de quimiocinas y citocinas, que en conjunto promueven la movilización de diferentes estirpes celulares para llevar a cabo la reparación del tejido, entre los diferentes tipos celulares que se movilizan se encuentran las células dendríticas [17].

Las células dendríticas tienen un papel esencial en la inducción de respuestas inmunes [33]. En circulación, se han descrito tres poblaciones de células dendríticas, siendo las de mayor proporción las células dendríticas slan [34], dichas células se caracterizan por ser las principales células secretoras de citocinas pro-inflamatorias [40-44]. Se ha descrito que se encuentran aumentadas en diversas patologías donde hay un proceso inflamatorio, así como también en cáncer [57-59], esta característica de las células dendríticas slan nos llevó a la hipótesis de que podrían estar migrando al tejido cardíaco infartado y quizás tengan una función importante en la respuesta inflamatoria que se lleva a cabo después del infarto agudo del miocardio.

En el presente estudio, inicialmente evaluamos la frecuencia y números absolutos de las células dendríticas slan en sangre periférica de los pacientes que presentaron un infarto agudo del miocardio y en sujetos sanos para su comparación. La disminución de la frecuencia de las células dendríticas slan puede ser causado por el aumento de otras poblaciones celulares mononucleares ya que se ha reportado que monocitos [60-61] y linfocitos [62] aumentan en pacientes con esta patología, y debido a que no se encontró una disminución significativa de los números absolutos

de las células dendríticas slan no podemos asegurar que el descenso en la frecuencia sea consecuencia de una disminución de las células dendríticas slan en circulación. Hasta la fecha no hay ningún reporte de las células dendríticas slan en las enfermedades cardiovasculares, sin embargo, en estudios previos se ha evaluado la frecuencia de las células dendríticas slan en otras enfermedades inflamatorias, en pacientes con enfermedad de Crohn, se encontró una disminución significativa en la frecuencia de las células slan en circulación y un aumento en el colon de los pacientes, sin embargo no evalúan los números absolutos [63.1], en cambio, en pacientes con psoriasis no hubo cambios en la frecuencia de las células dendríticas slan en circulación y también se encontró un aumento significativo de éstas células en la dermis de los pacientes [40], por lo que, para saber si las células dendríticas slan están migrando al tejido infartado es necesario evaluar la presencia de las células dendríticas slan en el tejido infartado. Con respecto a otras poblaciones de células dendríticas, se ha reportado una disminución de células dendríticas mieloides y de células dendríticas plasmacitoides en sangre periférica de pacientes con síndromes coronarios agudos [54-55], sugiriendo que las diferentes poblaciones de células dendríticas pueden estar migrando al tejido dañado. En modelos animales se ha demostrado que las células dendríticas mieloides y plasmacitoides migran al tejido necrótico después de un infarto, provocando la disminución de las diferentes poblaciones de células dendríticas en sangre periférica [50-51, 54].

La migración de las células dendríticas de la sangre a los tejidos y a los ganglios linfáticos está mediada en parte por las quimiocinas [64]. De acuerdo con esto, estudios previos han indicado que la migración de las células dendríticas slan a los tejidos inflamados en la enfermedad de psoriasis está mediada por un conjunto de receptores de quimiocinas, que incluyen CXCR4, CX₃CR1, además de C5aR, ocasionando la movilización de las células dendríticas slan en respuesta a CXCL12, CX₃CL1 y al componente C5a del complemento respectivamente [40, 58]. Adicionalmente las células dendríticas slan expresan CCR2 y CCR6 [37], dichos receptores están involucrados en el reclutamiento de otras poblaciones de células

dendríticas en pacientes con psoriasis y en procesos inflamatorios inducidos por patógenos [65-66], también, estos receptores se han visto involucrados en la migración de monocitos y células dendríticas al tejido infartado [17, 67]. Por lo que, a pesar de no haber encontrado cambios en el número de células dendríticas slan en sangre periférica, evaluamos la capacidad de migración *in vitro* en respuesta a CX₃CL1, C5a, MCP-1 y CCL20 y, encontramos que las células dendríticas slan de pacientes migran más en respuesta a las quimiocinas MCP-1 y CCL20 en comparación con la capacidad de migración que presentaron las células dendríticas slan provenientes de sujetos sanos, lo que sugiere que las células dendríticas slan de paciente con infarto agudo del miocardio podrían presentar una mejor capacidad de movilización en respuesta a estas quimiocinas.

La expresión de receptores de quimiocinas en las células es crítica para su migración, por esta razón, para dilucidar si estas moléculas de membrana son responsables del tipo de respuesta de migración presentada por las células dendríticas slan, medimos la densidad de expresión de CX₃CR1, C5aR, CCR2 y CCR6. Encontramos que la expresión de CCR2 y CCR6 es mayor en las células dendríticas slan provenientes de pacientes con infarto agudo del miocardio, además, hubo mayor número de células que expresan ambos receptores de quimiocinas, lo que es congruente con la respuesta de migración *in vitro* de las células dendríticas slan en respuesta a MCP-1 y CCL20. En conjunto, estos resultados indican que las células dendríticas slan de pacientes con infarto agudo del miocardio podrían estar respondiendo mejor a los estímulos de MCP-1 y CCL20 debido a la mayor expresión de los receptores de las quimiocinas antes mencionadas.

En estudios previos donde han evaluado la migración tanto *in vitro* como *in vivo* de células dendríticas, se ha reportado que CCL20 induce la migración de células dendríticas derivadas de células CD34+ de médula ósea y en las células de Langerhans [66, 68-71]. Con respecto a CCR2, se ha informado que las células dendríticas mieloides y células dendríticas plasmacitoides que expresan este

receptor responden al estímulo quimiotáctico de MCP-1 en condiciones de inflamación [72-73].

Cuando evaluamos la capacidad de migración, encontramos que la migración en las células dendríticas slan en respuesta a CX₃CL1 fue similar en ambos grupos de estudio, hecho que concuerda con la expresión de CX₃CR1, ya que tampoco se encontraron diferencias en la expresión del receptor y en el porcentaje de células que lo expresan. Caso contrario al observado con C5a, porque la expresión del receptor en el grupo de pacientes disminuyó significativamente con respecto al grupo de sujetos sanos, además, hubo menor porcentaje de células que expresan el receptor de C5a y en la migración *in vitro* se encontró que las células dendríticas slan de pacientes con infarto agudo del miocardio no disminuyeron su eficiencia en respuesta a la anafilotoxina. Esto podría deberse a que la migración ante el estímulo de C5a no es dependiente de la cantidad de receptor que se expresa en la superficie de membrana de las células, o quizás haya algún mecanismo de regulación en la función del receptor en las células de sujetos sanos que disminuya las funciones efectoras en la señalización de la unión de C5a con su receptor. Con respecto a este último punto, se ha descrito que C5a tiene otro receptor, C5L2, el cual se ha encontrado expresado en células humanas como por ejemplo: neutrófilos, monocitos, macrófagos, células dendríticas inmaduras, linfocitos, entre otras células [74]. Este receptor se expresa en coordinación con C5aR, y se ha descrito que puede estar involucrado en la regulación de las respuestas inflamatorias promovidas por la interacción de C5a con C5aR [75-76], por lo que, sería interesante evaluar la expresión de este receptor en las células dendríticas slan provenientes de pacientes con infarto agudo del miocardio, así como también en sujetos sanos.

Nuestros resultados apoyan la idea de que las células dendríticas slan podrían estar migrando en respuesta a estímulos quimiotácticos presentes en los pacientes con infarto agudo del miocardio (CX₃CL1, C5a, MCP-1 y CCL20), mejorando su capacidad de respuesta ante los estímulos de las quimiocinas MCP-1 y CCL20, lo que podría contribuir a que las células puedan migrar al tejido infartado.

La migración celular al tejido infartado es muy importante para poder llevar a cabo la reparación del tejido. Dentro de los mecanismos que se desarrollan en el proceso inflamatorio es la liberación de DAMPs, estas moléculas inducen la activación de las células inmunitarias innatas a través de sus receptores de reconocimiento de patrones, entre los que se han descrito TLR, diversos estudios han referido que, de este grupo de receptores TLR2 y TLR4 son mediadores importantes de la respuesta inflamatoria posterior al infarto [18-19]. Aunado a esto, se ha descrito que las células dendríticas slan expresan una amplia gama de TLR [39-40], dentro de los que se encuentran, los antes mencionados. En este sentido, evaluamos la expresión de receptores de las quimiocinas en slanDCs activadas. Primero medimos la expresión de TLR2 y TLR4, interesantemente encontrando que TLR4 está expresado en mayor densidad en las células dendríticas slan de pacientes con infarto agudo del miocardio, lo que le puede conferir una mejor capacidad de respuesta ante ligandos de este receptor, por lo que sería interesante evaluar si hay cambios en la secreción de citocinas en las células dendríticas slan cuando estén sean activadas con el ligando de TLR4, ya que como se ha mencionado, la estimulación de las células dendríticas slan con ligando de TLR4 fomenta la producción de TNF- α , IL-6 e IL-12. [40-42].

Al evaluar la expresión de receptores de quimiocinas en respuesta al LPS encontramos que no hay cambios en la expresión de los receptores C5aR, CCR2 y CCR6 en las células dendríticas slan en sujetos sanos y en pacientes con infarto agudo del miocardio, sin embargo, la activación de las células indujo una reducción significativa en la expresión de CX₃CR1 en sujetos sanos, sin cambios en el grupo de pacientes con infarto agudo del miocardio. Esto nos sugiere que la activación que puedan sufrir las células dendríticas slan vía TLR4 en el tejido infartado no induce cambios en la expresión de los receptores de quimiocinas evaluados. En la literatura, se menciona que las células dendríticas slan activadas expresan menos receptor de quimiocinas como CCR1, CCR5 y CXCR1 [36]. En otros tipos celulares, en donde se ha evaluado la expresión de diferentes receptores de quimiocinas en células activadas a través de LPS, se ha reportado tanto un aumento como una

disminución de la expresión de los receptores de quimiocinas [77-80], estas variaciones pueden ser por el tipo celular, el receptor evaluado, la concentración de LPS, entre otros. Nuestro hallazgo de la disminución en la expresión de CX₃CR1 en las células dendríticas sanas de sujetos sanos, concuerda con evidencias previas realizadas en monocitos, en los cuales evalúan la expresión a nivel de mRNA y/o de proteína, encontrando que los monocitos cultivados con LPS *in vitro* disminuyeron su expresión tanto a nivel de mRNA como de proteína influyendo en su capacidad de migración ante su ligando [81-82]. Sin embargo, en este estudio puede ser necesario aumentar el tamaño de muestra ya que solo evaluamos a cuatro sujetos sanos y a cuatro pacientes.

CONCLUSIONES

Las células dendríticas san después de un Infarto Agudo del Miocardio incrementan la expresión de los receptores de quimiocinas CCR2 y CCR6 mejorando la capacidad de migración de las células en respuesta a sus ligandos MCP-1 y CCL20, respectivamente, por lo que, estas características podrían contribuir a la migración de las células dendríticas san al tejido infartado durante el proceso inflamatorio.

LITERATURA CITADA

1. Peter Libby (2002). Inflammation in atherosclerosis. *Nature*; 420: 868-874.
2. Ruesga Zamora E.A., (2005). *Cardiología*. México. El Manual Moderno.
3. Kordalewska M., Markuszewski M. J. (2015). Metabolomics in cardiovascular diseases. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*; 113: 121-136.
4. World Health Organization. GLOBAL STATUS REPORT. [Consultado el 19 de marzo de 2017]. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/148114/1/9789241564854_eng.pdf?
5. World Health Organization. PROGRAMES, Cardiovascular diseases. [Consultado el 19 de marzo de 2017]. Disponible en: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/about_cvd/en/
6. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Principales causas de mortalidad en hombres; mujeres; y por grupos de edad. [Consultado el 19 de marzo de 2017]. Disponible en: <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/Default.aspx?t=mdemo124&s=est&c=23588>.
7. Nicoletti A., Caligiuri G., Hansson K. (2000). Immunomodulation of Atherosclerosis: Myth and reality. *Journal of Internal Medicine*; 247:397-495.
8. Ross R. (1999). Mechanisms of disease. Atherosclerosis- an inflammatory disease. *The New England Journal of Medicine*; 340:115-126. 9.1
9. Aldons J.L. (2000). Atherosclerosis. *Nature*; 407: 233-241.
10. Thygesen K., Alpert J.S., White H.D., et al. (2007). Universal definition of myocardial infarction: Kristian Thygesen, Joseph S. Alpert and Harvey D. White on behalf of the Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction. *European Heart Journal*; 28:2525-2538.
11. McLaren J., Daryn R., Tim G., Dipak P. (2011). Cytokines, macrophage lipid metabolism and foam cells: Implications for cardiovascular disease therapy. *Progress in Lipid Research*; 50: 331-347.
12. Hansson G.K., Hermansson A. (2011). The immune system in atherosclerosis. *Nature Immunology*; 12: 204-212.

13. Daubert M., Jeremias A. (2010). The utility of troponin measurement to detect myocardial infarction: review of the current findings. *Vascular Health Risk Management*; 6:691-9.
14. Frangogiannis N.G., Smith C.W., Entman M.L. (2002). The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovascular Research*; 53:31-47.
15. Viola J., Soehnlein O. (2015). Atherosclerosis – A matter of unresolved inflammation. *Seminars in Immunology*; 27: 184-193
16. Rahaman S.O., Lennon D.J., Febrario M., Podrez E.A., Hazen S.L., Silverstein R.L. (2006). A CD36- dependent signaling cascade is necessary for macrophage foam cell formation. *Cell Metabolism*; 4: 211-221.
17. Frangogiannis N.G. (2014). The inflammatory response in myocardial injury, repair and remodeling. *Nature reviews Cardiology*; 11:255-265.
18. Timmers L., et al. (2008). Toll-like receptor 4 mediates maladaptive left ventricular remodeling and impairs cardiac function after myocardial infarction. *Circulation Research*; 102:257–264.
19. Arslan F., et al. (2010). Myocardial ischemia/reperfusion injury is mediated by leukocytic toll-like receptor-2 and reduced by systemic administration of a novel anti-toll-like receptor-2 antibody. *Circulation*; 121:80–90.
20. Oyama J., et al. (2004). Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice. *Circulation*; 109:784–789.
21. Comerford I., McColl S.R. (2011). Mini-review series: focus on chemokines. *Immunology and Cell Biology*; 89:183-184.
22. Turner M.D., Nedjai B., Hurst T., Pennington D.J. (2014). Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research*; 1843: 2563-2582.
23. Bendall L. (2005). Chemokines and their receptors in disease. *Histology and Histopathology*; 20: 903-926.
24. Smit M.J., Munnik S.M., Leurs R., and Vischer H.F. (2015). Modulation of cellular signalling by herpesvirus-encoded G protein-coupled receptors. *Frontiers in Pharmacology*; 6:1-27.

25. Moser B., Willmann K. (2004). Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. *Annals of the Rheumatic Diseases*; 63:84-89.
26. Morimoto H., Takahashi M. (2007). Role of Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Myocardial Infarction. *International Journal of Biomedical Science*; 3(3):159-167.
27. Owen J. A., Punt J., Stranford, A., Jones P. P. (2014). *Kubi Inmunología*. Ciudad de México, México. McGraw-Hill Interamericana Editores S.A. de C.V.
28. Apostolakis S., Spandidos D. (2013). Chemokines and atherosclerosis: focus on the CX3CL1/CX3CR1 pathway. *Acta Pharmacologica Sinica*; 34: 1251-1256.
29. Frangogiannis N.G. (2007). Chemokines in ischemia and reperfusion. *Thrombosis and Haemostasis*; 97: 738-747.
30. Kang Yao; Shuning Zhang; Hao Lu; Xiaowu Hong; Juying Qian; Aijun Sun; Yunzeng Zou; Junbo Ge. (2015). Changes in fractalkine in patients with ST-elevation myocardial infarction. *Coronary Artery Disease*; 26:516–520.
31. Safa A, Rashidinejad HR, Khalili M, Dabiri S, Nemati M, Mohammadi MM, Jafarzadeh A. (2016). Higher circulating levels of chemokines CXCL10, CCL20 and CCL22 in patients with ischemic heart disease. *Cytokine*; 83:147-157.
32. Frangogiannis N.G. (2004). Chemokines in the ischemic myocardium: from inflammation to fibrosis. *Inflammation Research*; 53: 585-595.
33. Shortman K., Liu Y.J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nature Reviews Immunology*; 2:151–161.
34. Schäkel K., Mayer E., Federle C., Schmitz M., Riethmüller G., Rieber E.P. (1998). A novel dendritic cell population in human blood: one-step immunomagnetic isolation by a specific mAb (M-DC8) and in vitro priming of cytotoxic T lymphocytes. *European Journal Immunology*; 28:4084-4093.
35. Schakel K., Kannagi R., Knip B., Goto Y., Mitsuoka C., Zwirner J., et al. (2002). 6-Sulfo LacNAc, a novel carbohydrate modification of PSGL-1, defines an inflammatory type of human dendritic cells. *Immunity*; 17:289–301.

36. De Baey A., Mende I., Riethmueller G., Baeuerle P.A. (2001). Phenotype and function of human dendritic cells derived from M-DC8(+) monocytes. *European Journal of Immunology*; 31:1646-16455.
37. Lee S, Fernandez S., French M., Price P. (2011). Chemokine receptor expression on dendritic cells is normal in HIV-infected patients with a stable response to art, but chemokine levels remain elevated. *Journal of Medical Virology*; 83:1128-33.
38. Matzinger P. (2007). Friendly and dangerous signals: is the tissue in control? *Nature Immunology*; 8:11–13.
39. Schreibelt G., Tel J., Sliepen K.H., Benitez-Ribas D., Figdor C.G., Adema G.J., et al. (2010). Toll-like receptor expression and function in human dendritic cell subsets: implications for dendritic cell-based anti-cancer immunotherapy. *Cancer Immunology Immunotherapy*; 59:1573-1582.
40. Hänsel A., Günther C., Ingwersen J., Starke J., Schmitz M., Bachmann M., et al. (2011). Human slan (6-sulfo LacNAc) dendritic cells are inflammatory dermal dendritic cells in psoriasis and drive strong TH17/TH1 T-cell responses. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*; 127:787-794.
41. De Baey A., Mende I., Baretton G., Greiner A., Hartl W.H., Baeuerle P.A., et al. (2003). A subset of human dendritic cells in the T cell area of mucosa-associated lymphoid tissue with a high potential to produce TNF-alpha. *Journal of Immunology*; 170:5089-5094.
42. Schäkel K., von Kietzell M., Hänsel A., Ebling A., Schulze L., Haase M., et al. (2006). Human 6-sulfo LacNAc-expressing dendritic cells are principal producers of early interleukin-12 and are controlled by erythrocytes. *Immunity*; 24:767-777.
43. Schmitz M., Zhao S., Deuse Y., et al. (2005). Tumoricidal potential of native blood dendritic cells: direct tumor cell killing and activation of NK cell-mediated cytotoxicity. *Journal of Immunology*; 174: 4127-34.
44. Schmitz M., Zhao S., Schäkel K., et al. (2002). Native human blood dendritic cells as potent effectors in antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Blood*; 100: 1502–4.

45. Hänsel A., Günther C., Baran W., Bidier M., Lorenz H.M., Schmitz M., et al. (2013). Human 6-sulfo LacNAc (slan) dendritic cells have molecular and functional features of an important pro-inflammatory cell type in lupus erythematosus. *Journal of Autoimmunity*; 40:1-8.
46. Hänsel A., Günther C., Baran W., Bidier M., Lorenz H.M., Schmitz M., Bachmann M., Döbel T., Enk A.H., Schäkel K. (2013). Human 6-sulfo LacNAc (slan) dendritic cells have molecular and functional features of an important pro-inflammatory cell type in lupus erythematosus. *Journal of Autoimmunity*; 40:1-8.
47. Ghoreschi K., Bruck J., Kellerer C., Deng C., Peng H., Rothfuss O., Hussain R.Z., Gocke A.R., Respa A., Glocova I., Valtcheva N., Alexander E., Feil S., Feil R., Schulze-Osthoff K., Rupec R.A., Lovett-Racke A.E., Dringen R., Racke M.K., Rocken M. (2011). Fumarates improve psoriasis and multiple sclerosis by inducing type II dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*; 208: 2291-303.
48. Thomas K., Dietze K., Wehner R., Metz I., Tumani H., Schultheiss T., Gunther C., Schakel K., Reichmann H., Bruck W., Schmitz M., Ziemssen T. (2014). Accumulation and therapeutic modulation of 6-sulfo LacNAc (+) dendritic cells in multiple sclerosis. *Neurology Neuroimmunology and Neuroinflammation*; 1: e33.
49. Van der Borght K., Scott C. L., Nindl V., Bouché A., Martens L., Sichien D., Van Moorleghem J., Vanheerswynghels M., De Prijck S., Saeys Y., Ludewig B., Gillebert T., Guilliams M., Carmeliet P., Lambrecht B. N. (2017). Myocardial Infarction Primes Autoreactive T Cells through Activation of Dendritic Cells. *Cell Reports*; 18: 3005-17.
50. Anzai A., Anzai T., Nagai S., Maekawa Y., Naito K., Kaneko H., Sugano Y., Takahashi T., Abe H., Mochizuki S., Sano M., Yoshikawa T., Okada Y., Koyasu S., Ogawa S., Fukuda K. (2012). Regulatory role of dendritic cells in postinfarction healing and left ventricular remodeling. *Circulation*; 125: 1234-45.

51. Lee J. S., Jeong S. J., Kim S., Chalifour L., Yun T. J., Miah M. A., Li B., Majdoubi A., Sabourin A., Keler T., Guimond J. V., Haddad E., Choi E. Y., Epelman S., Choi J. H., Thibodeau J., Oh G. T., Cheong C. (2018). Conventional Dendritic Cells Impair Recovery after Myocardial Infarction. *The Journal of Immunology*; 201: 1784-98.
52. Santos-Zas I., Lemarié J., Tedgui A., Ait-Oufella H. (2019). Adaptive Immune Responses Contribute to Post-ischemic Cardiac Remodeling. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*; 5:198.
53. Yilmaz A., Weber J., Cicha I., et al. (2006). Decrease in circulating myeloid dendritic cell precursors in coronary artery disease. *Journal of the American College Cardiology*; 48: 70-80.
54. Kretzschmar D., Betge S., Windisch A. et al. (2012). Recruitment of circulating dendritic cell precursors into the infarcted myocardium and pro-inflammatory response in acute myocardial infarction. *Clinical Science*; 123: 387–398.
55. Daisuke Fukui, Hideo Yasukawa, et al. (2012). Transient reduction and activation of circulating dendritic cells in patients with acute myocardial infarction. *International Journal of Cardiology*; 160: 216-219.
56. Anzai T. (2013). Post-infarction inflammation and left ventricular remodeling: a double-edged sword. *Circulation Journal*; 77: 580-587.
57. Toma M., Wehner R., Kloß A., Hübner L., Fodelianaki G., Erdmann K., Füssel S., Zastrow S., Meinhardt M., Seliger B., Brech D., Noessner E., Tonn T., Schäkel K., Bornhäuser M., Bachmann M.P., Wirth M.P., Baretton G., Schmitz M. (2015). Accumulation of tolerogenic human 6-sulfo LacNAc dendritic cells in renal cell carcinoma is associated with poor prognosis. *Oncoimmunology*;4(6): e1008342.
58. Vermi W., Micheletti A., Lonardi S., Costantini C., Calzetti F., Nascimbeni R., Bugatti M., Codazzi M., Pinter P.C., Schäkel K., et al. (2014). slanDCs selectively accumulate in carcinoma-draining lymph nodes and marginate metastatic cells. *Nature Communications*; 5:3029.

59. Vermi W., Lonardi S., Bugatti M., Calzetti F., Micheletti A., Cassatella M.A. (2014). slanDCs in carcinoma-draining lymph nodes. *Oncoimmunology*; 3: e28246.
60. Patiño R., Ibarra J., Rodriguez A., Yagüe M.R., Pintor E., Fernández-Cruz A., Figueredo A. (2000). Circulating monocytes in patients with diabetes mellitus, arterial disease, and increased CD14 expression. *The American Journal of Cardiology*; 85: 1288-1291.
61. Tsujioka H., Imanishi T., Ikejima H., Kuroi A, Takarada S., Tanimoto T., Kitabata H., Okochi K, Arita Y., Ishibashi K., Komukai K., Kataiwa H., Nakamura N., Hirata K., Tanaka A., Akasaka T. (2009). Impact of heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets on myocardial salvage in patients with primary acute monocyte infarction. *Journal of the American College of Cardiology*; 54: 130-138.
62. Lluberas, N., Trías, N., Brugnini, A., Mila, R., Vignolo, G., Trujillo, P. Lens, D. (2015). Lymphocyte subpopulations in myocardial infarction: a comparison between peripheral and intracoronary blood. *Springer Plus*; 4 (744).
63. Bsati M., Chapuy L., Baba N., Rubio M., Panzini B., Wassef R., Richard C., Soucy G., Mehta H., Sarfati M. (2015). Differential accumulation and function of proinflammatory 6-sulfo LacNAc dendritic cells in lymph node and colon of Crohn's versus ulcerative colitis patients. *Journal of leukocyte biology*; 98: 641-81.
64. Premack B.A., Schall T.J. (1996). Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection. *Nature Medicine*; 2:1174–1178.
65. Vanbervliet B., Homey B., Durand I., Massacrier C., Aït-Yahia S., de Bouteiller O., Vicari A., Caux C. (2002). Sequential involvement of CCR2 and CCR6 ligands for immature dendritic cell recruitment: possible role at inflamed epithelial surfaces. *European Journal of Immunology*; 32:231-42.
66. Dieu M.C., Vanbervliet B., Vicari A., Bridon J.M., Oldham E., Aït-Yahia S., Brière F., Zlotnik A., Lebecque S., Caux C. (1998). Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *The Journal of Experimental Medicine*; 188:373-86.

67. Rothenbacher D., Müller-Scholze S., Herder C., Koenig W., Kolb H. (2006). Differential expression of chemokines, risk of stable coronary heart disease, and correlation with established cardiovascular risk markers. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*; 26:194-9.
68. Cédile O., Jørgensen L.Ø., Frank I., Wlodarczyk A., Owens T. (2017). The chemokine receptor CCR2 maintains plasmacytoid dendritic cell homeostasis. *Immunology Letters*; 192:72-78.
69. Liao F., Rabin R.L., Smith C.S., Sharma G., Nutman T.B. and Farber J.M. (1999). CC-Chemokine Receptor 6 Is Expressed on Diverse Memory Subsets of T Cells and Determines Responsiveness to Macrophage Inflammatory Protein 3 α . *Journal Immunology*; 162:186-194.
70. Schutyser E., Struyf S., Van Damme J. (2003). The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine and Growth Factor Reviews*; 14(5):409-26.
71. Greaves D.R., Wang W., Dairaghi D.J., et al. (1997). CCR6, a CC Chemokine Receptor that Interacts with Macrophage Inflammatory Protein 3 α and Is Highly Expressed in Human Dendritic Cells. *The Journal of Experimental Medicine*; 186:837-844.
72. Nakano H., Lyons-Cohen M.R., Whitehead G.S., Nakano K., Cook D.N. (2017). Distinct functions of CXCR4, CCR2, and CX3CR1 direct dendritic cell precursors from the bone marrow to the lung. *Journal of Leukocyte Biology*; 101:1143-1153.
73. Griffith J.W., Sokol C.L., Luster A.D. (2014). Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annual Review of Immunology*; 32: 659-702
74. Manthey H.D., Woodruff T.M., Taylor S.M., Monk P.N. (2009). Complement component 5a (C5a). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*; 41:2114-7.
75. Bamberg C.E., Mackay C.R., Lee H., Zahra D., Jackson J., Lim Y.S., et al. (2010). The C5a receptor (C5aR) C5L2 is a modulator of C5aR-mediated signal transduction. *The Journal of biological Chemistry*; 285(10):7633–44.

76. Sarma J.V., Ward P.A. (2012). New developments in C5a receptor signaling. *Cell Health Cytoskelet*; 4:73–82.
77. Kremlev S.G., Roberts R.L., Palmer C. (2004). Differential expression of chemokines and chemokine receptors during microglial activation and inhibition. *Journal of Neuroimmunology*; 149:1-9.
78. Bennett L.D., Fox J.M., Signoret N. (2011). Mechanisms regulating chemokine receptor activity. *Immunology*; 134:246-56.
79. Shirakawa A.K., Liao F., Zhang H.H., Hedrick M.N., Singh S.P., Wu D., Farber J.M. (2010). Pathway-selective suppression of chemokine receptor signaling in B cells by LPS through downregulation of PLC- β 2. *Cellular & Molecular Immunology*; 7:428-39.
80. Sica A., Sacconi A., Borsatti A., Power C.A., Wells T.N., Luini W., Polentarutti N., Sozzani S., Mantovani A. (1997). Bacterial lipopolysaccharide rapidly inhibits expression of C-C chemokine receptors in human monocytes. *The Journal of Experimental Medicine*; 185:969-74.
81. Pachot A., Cazalis M.A., Venet F., Turrel F., Faudot C., Voirin N., Diasparra J., Bourgoin N., Poitevin F., Mouglin B., Lepape A., Monneret G. (2008). Decreased Expression of the Fractalkine Receptor CX3CR1 on Circulating Monocytes as New Feature of Sepsis-Induced Immunosuppression. *Journal of Immunology*; 180:6421-9.
82. Ramos, María V et al. (2010). Interleukin-10 and Interferon- γ Modulate Surface Expression of Fractalkine-Receptor (CX3CR1) via PI3K in Monocytes. *Immunology*; 129: 600–609.