



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

**“Caracterización inmunofenotípica de poblaciones de
macrófagos M1 y M2 en enfermedad cardiovascular”**

Que para obtener el título de:

QUÍMICA FARMACEÚTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

MICHELLE CASTILLO GONZÁLEZ

TUTOR DE TESIS:

DR. LUIS CHÁVEZ SÁNCHEZ

Ciudad Universitaria, CDMX

2022





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DR. JOSÉ SULLIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ

VOCAL: DR. ISMAEL MANCILLA HERRERA


SECRETARIO: DR. LUIS CHÁVEZ SÁNCHEZ

1er. SUPLENTE: DR. OCTAVIO CASTRO ESCAMILLA

2° SUPLENTE: DR. ALBERTO GARCÍA LOZANO

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

ASESOR DEL TEMA:



DR. LUIS CHÁVEZ SÁNCHEZ.

SUSTENTANTE:

Michelle Castillo González.

MICHELLE CASTILLO GONZÁLEZ

AGRADECIMIENTOS

Al Fondo de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) por la financiación de este trabajo a través del programa FIS/IMSS/PROT/G18/1815.

Así como al programa de apoyo al fortalecimiento y desarrollo de la infraestructura científica y tecnológica con número 226292 de la convocatoria 2013 del CONACYT.

Resumen

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica considerada la primera causa de muerte en el mundo. En esta enfermedad se forma una lesión o placa en la íntima de las arterias donde una gran cantidad de moléculas y tipos celulares participan. Los macrófagos son las células más abundantes en la placa y se ha observado la presencia de macrófagos M1 y M2, cuyas funciones están relacionadas con la progresión o regresión de la placa, por ende, con el desarrollo de la enfermedad por lo que pueden convertirse en un posible blanco terapéutico en el futuro. A la fecha existe información limitada acerca de la caracterización de macrófagos M1 y M2 en las diferentes etapas de la enfermedad cardiovascular. Por ello se obtuvieron monocitos de pacientes con diferentes etapas de la enfermedad cardiovascular (cardiopatía isquémica) y se diferenciaron a macrófagos M1 y M2 a través de la adición de GM-CSF y M-CSF a (50 mg/mL), respectivamente, durante 6 días, posteriormente los macrófagos M1 se activaron con IFN- γ y LPS y los macrófagos M2 con IL-4 e IL-13 durante 24 horas. Al finalizar el cultivo los macrófagos M1 se marcaron con anticuerpos anti-CD80, anti-CD86, y anti-HLA-DR y los macrófagos M2 con anticuerpos anti-CD163, anti-CD206 y anti-CD36 y se midió la expresión de las moléculas a través de citometría de flujo. En la etapa de AE y AI, se observó el incremento de la expresión de moléculas co-estimuladoras en macrófagos M1, y el incremento de CD206 en macrófagos M2, con respecto a la expresión observada en sujetos sanos. En la etapa de IAM se observó además el incremento de CD36. Concluyendo que existe incremento en la expresión de moléculas co-estimuladoras, mientras que ocurre una regulación mediada por las moléculas expresadas en los macrófagos M2, que sin embargo se ve superada por el constante aumento de moléculas co-estimuladoras a medida que la enfermedad progresa.

Índice

Resumen	3
Índice	4
Tabla de figuras	6
Tabla de abreviaturas	7
Introducción	9
Marco Teórico	10
Enfermedades cardiovasculares	10
Aterosclerosis.....	10
El desarrollo de la placa aterosclerosa.....	11
Cardiopatía isquémica.....	13
Placa Estable	15
Placa Inestable.....	16
El infarto agudo al miocardio.....	18
Macrófagos	20
Macrófagos M1	20
Macrófagos M2	21
Macrófagos en enfermedad cardiovascular	23
Planteamiento del problema.....	24
Objetivo general	24
Objetivos específicos	25
Material y métodos	25
Tipo de estudio.....	25
Grupos de estudio	25
Criterios de inclusión para pacientes	26
Criterios de exclusión para pacientes	28
Criterios de no inclusión para pacientes	28
Criterios de inclusión para sujetos sanos.....	28
Criterios de exclusión para sujetos sanos.....	29
Definición de variables	30
Variables independientes	30
Variables dependientes	31
Metodología	33
Diagrama de flujo.....	33

Obtención de células mononucleares	34
Purificación de monocitos	34
Diferenciación de monocitos a macrófagos	34
Determinación de moléculas de superficie en macrófagos.....	35
Estrategia de análisis del fenotipo celular de macrófagos M1 y M2.....	36
Análisis estadístico.....	37
Resultados	38
Datos demográficos de los sujetos participantes en el estudio.....	38
Determinación de fenotipo de marcadores de macrófagos M1 en pacientes.....	41
Determinación de fenotipo de marcadores de macrófagos M2 en pacientes.....	42
Discusión	44
Conclusiones	48
Perspectivas.....	49
Referencias	50

Tabla de figuras

Figura 1. Inicio de la formación de una lesión aterosclerosa.....	13
Figura 2. Hallazgos fisiopatológicos en la cardiopatía isquémica.....	14
Figura 3.....	16
Figura 4. Estructura de la placa inestable.....	18
Figura 5. Estructura de la placa en el infarto agudo al miocardio.	19
Figura 6. Representación del modelo de clasificación de macrófagos en dos fenotipos macrófagos M1 y macrófagos M2.....	22
Figura 7. Estrategia de análisis de citometría de flujo.....	36
Figura 8. Caracterización de macrófagos M1 y M2.....	40
Figura 9. Expresión de marcadores de macrófagos M1 en pacientes con enfermedad cardiovascular y sujetos sanos.	42
Figura 10. Expresión de marcadores de macrófagos M2 en pacientes con enfermedad cardiovascular y sujetos sanos.	43

Tabla de abreviaturas

AE	Angina estable
AI	Angina inestable
APC	Afilococianina
APCCy7	Aloficocianina conjugada
BSA	Albúmina sérica bovina
CCS	Sociedad cardiovascular canadiense
CD	Clúster de diferenciación
CK-MB	Creatinina cinasa
DAMPS	Patrones moleculares asociados a daño
ECG	Electrocardiograma
ECV	Enfermedades cardiovasculares
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EROs	Especies reactivas de oxígeno
FcR	Receptores de la fracción cristalizable
FCS	Forward scatter (Detector frontal)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos
HLA	Antígeno leucocitario humano
IAM	Infarto agudo de miocardio
ICAM-1	Molécula de adhesión intracelular-1
IFN-γ	Interferón gamma
IL	Interleucina
IMF	Intensidad media de fluorescencia
iNOS	Sintetasa inducible de óxido nítrico
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LPS	Lipopolisacárido
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos

NFκB	Factor nuclear kappa b
NK	Asesinas naturales
OMS	Organización mundial de la salud
oxLDL	Lipoproteína de baja densidad oxidada
PBS	Solución amortiguadora de sales de fosfato
PE	Ficoeritrina
PECAM-1	Molécula de adhesión celular endotelial y plaquetaria
PECy5	Ficoeritrina conjugada a cianina 5
rpm	revoluciones por minuto
SD	Desviación estándar
SFB	Suero fetal bovino
SICA	Síndrome coronario agudo
SSC	Side scatter (Detector lateral)
SSI	Solución salina isotónica
TGF-β	Factor de crecimiento de tumor beta
Th	Linfocito T cooperador
TLR	Receptor de unión a ligandos tipo toll
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
Treg	Linfocito T regulador
UMAE	Unidad médica de alta especialidad
VCAM-1	Molécula de adhesión de células vasculares
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VSMC	Células vasculares de músculo liso

Introducción

Las enfermedades cardiovasculares representan la principal causa de muerte a nivel mundial. La causa principal de estas enfermedades es la aterosclerosis una enfermedad caracterizada por la formación de una placa en la íntima de las arterias de mediano y gran calibre. Desde el aspecto clínico, se observa que en el inicio de la enfermedad se forma una lesión en la arteria, que se denomina estría grasa, posteriormente, evoluciona a placa estable y finalmente a placa inestable, durante este proceso, la luz de la arteria va disminuyendo, lo que conlleva a la ruptura de la placa, y a la oclusión del vaso sanguíneo ocasionando un evento isquémico agudo (infarto agudo al miocardio o accidente cerebrovascular). No obstante, la enfermedad aterosclerosa comprende además la acumulación de lipoproteínas de baja densidad (LDL, por sus siglas en inglés), el daño al endotelio, y la participación de células de la respuesta inmune, estos procesos se desarrollan a través de años o décadas y suceden de manera continua, lo que convierte a la aterosclerosis en una enfermedad crónica e inflamatoria. Las células más abundantes en la placa aterosclerosa son los macrófagos, células de la respuesta inmune innata caracterizadas por su amplia plasticidad y respuesta de acuerdo con el microambiente en el que se encuentran. Así como en otras enfermedades, en aterosclerosis la participación de los macrófagos se estudia a través de los modelos de macrófago M1 y M2. Los hallazgos en aterosclerosis refieren que macrófagos M1 están relacionados con la producción de citocinas pro-inflamatorias, metaloproteinasas, y colagenasas, mientras que macrófagos M2 se vinculan con la producción de colágeno, de citocinas anti-inflamatorias, y con la expresión de receptores scavenger para facilitar el proceso de fagocitosis, debido a ello se considera que ambos tipos de macrófagos inciden de manera importante sobre el desarrollo o regresión de la placa aterosclerosa, sin embargo, gran parte de estos hallazgos se ha reportado en modelos murinos, y no se ha reportado el comportamiento de macrófagos humanos, específicamente en lo referente a la expresión de moléculas de superficie de macrófagos M1 y M2, por lo que a través de un modelo *in vitro* estudiamos la expresión de estas moléculas utilizando macrófagos derivados de monocitos de pacientes que cursan con las diferentes etapas de la enfermedad cardiovascular.

Marco Teórico

Enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son un conjunto de padecimientos del corazón y de los vasos sanguíneos. Las ECV comprenden a la cardiopatía isquémica, las enfermedades cerebrovasculares, arteriopatía periférica, trombosis venosa profunda y embolia pulmonar, entre otras¹. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), las ECV son las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo. Las ECV son responsables de 17,9 millones de muertes cada año, y representan el 44% de las muertes por enfermedades no transmisibles en todo el mundo. De estas muertes, se estima que 8.8 millones se debieron a cardiopatías isquémicas². A nivel nacional y en el mismo año, el 31% de las muertes ocurridas fueron a causa de ECV ocupando el primer lugar en causas de mortalidad nacional, siendo las enfermedades isquémicas del corazón las responsables del 63.13% del total de muertes por ECV. También a nivel nacional y con respecto a los grupos de edad, las ECV 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 años³. Predicciones futuras de la OMS sugieren que en 2030 el número de muertes por ECV podría llegar a 23,6 millones². La causa principal de las enfermedades cardiovasculares es el desarrollo de aterosclerosis⁴.

Aterosclerosis

La aterosclerosis es una enfermedad que se caracteriza por la acumulación progresiva de material fibroso y graso en la íntima de las arterias de mediano y gran calibre (coronarias, carótidas, iliacas y femorales)⁵, y que tiene como principal consecuencia el estrechamiento de los vasos sanguíneos⁶ mediante el desarrollo de una lesión que se denomina lesión o placa aterosclerosa^{7,8}.

De manera general, la placa aterosclerosa se compone de LDL, células del músculo liso, colágeno, desechos celulares, y macrófagos sin embargo, no consiste únicamente en la acumulación de elementos celulares y acelulares, ya que, la acumulación, activa a la respuesta inmune innata y adaptativa, que participan de manera importante en el

curso de la enfermedad, debido a ello la aterosclerosis se considera una enfermedad inflamatoria⁸.

Con relación a la sintomatología, esta enfermedad puede mantenerse asintomática durante décadas, ya que, al inicio de la enfermedad cuando la placa comienza a desarrollarse las arterias se expanden, el lumen permanece abierto y el suministro de sangre se mantiene⁹, no obstante, en etapas avanzadas, la placa causa un estrechamiento significativo en la arterias que compromete el suministro de sangre a los tejidos, lo que produce la manifestación de síntomas.

El desarrollo de la placa aterosclerosa

La concentración plasmática elevada de LDL, la participación de células inmunes y la respuesta inflamatoria son los principales factores que influyen en el desarrollo de una lesión aterosclerosa^{10,11,12}.

En la arteria, adyacente al lumen, se encuentra una capa de células endoteliales que, en condiciones normales, funciona como una barrera que evita el paso de células y moléculas hacia el espacio subendotelial y que asegura el paso de la sangre a través de las arterias a través de la liberación de factores anti-trombóticos, y anti-inflamatorios. Sin embargo, en condiciones de estrés hidrodinámico en las zonas de flujo turbulento o bifurcación arterial el endotelio se activa liberando sustancias pro-trombóticas, expresando moléculas de adhesión e incrementando su permeabilidad, lo que promueve el ingreso de lipoproteínas como la LDL a la íntima¹³. La LDL ingresa al espacio subendotelial y comienza a retenerse debido a su afinidad por proteoglicanos y moléculas de la matriz extracelular, presentes en la íntima¹⁴ (**Figura 1A**). Esta acumulación, induce la activación del endotelio y con ello la expresión de moléculas de adhesión que median las interacciones monocito-célula endotelial necesarias para la diapédesis, durante la fase de acoplamiento y rodamiento participa P-selectina, y durante el reconocimiento celular y adhesión, moléculas como: molécula de adhesión de células vasculares-1 (VCAM-1, por sus siglas en inglés), molécula de adhesión intracelular-1 (ICAM-1, por sus siglas en inglés), molécula de adhesión celular endotelial

y plaquetaria-1 (PECAM-1, por sus siglas en inglés)¹⁵. Además, se liberan factores quimio atrayentes como la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1, por sus siglas en inglés) que promueve la migración de los monocitos circulantes hacia la íntima, donde posteriormente se diferencian a macrófagos¹⁶(**Figura 1B**).

Derivado de la liberación de especies reactivas de oxígeno (EROs), así como de procesos enzimáticos, la LDL sufre modificaciones que se reconocen como patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, por sus siglas en inglés) a través de receptores que se denominan scavenger y que incluyen a clúster de diferenciación 36 (CD36)¹⁷ en los macrófagos. Los macrófagos pueden fagocitar a la lipoproteína de baja densidad oxidada (oxLDL, por sus siglas en inglés) y acumularla lo que deriva en su conversión a células espumosas^{18,19}. Las cuales liberan mediadores como interleucina-1 (IL-1), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α , por sus siglas en inglés) y MCP-1, que contribuyen en el inicio de la respuesta inflamatoria y en el reclutamiento de monocitos y linfocitos hacia la lesión aterosclerosa, lo que propicia la progresión de la placa y el desarrollo de la enfermedad cardiovascular²⁰. Este proceso se ilustra de manera breve en la **Figura 1C**.

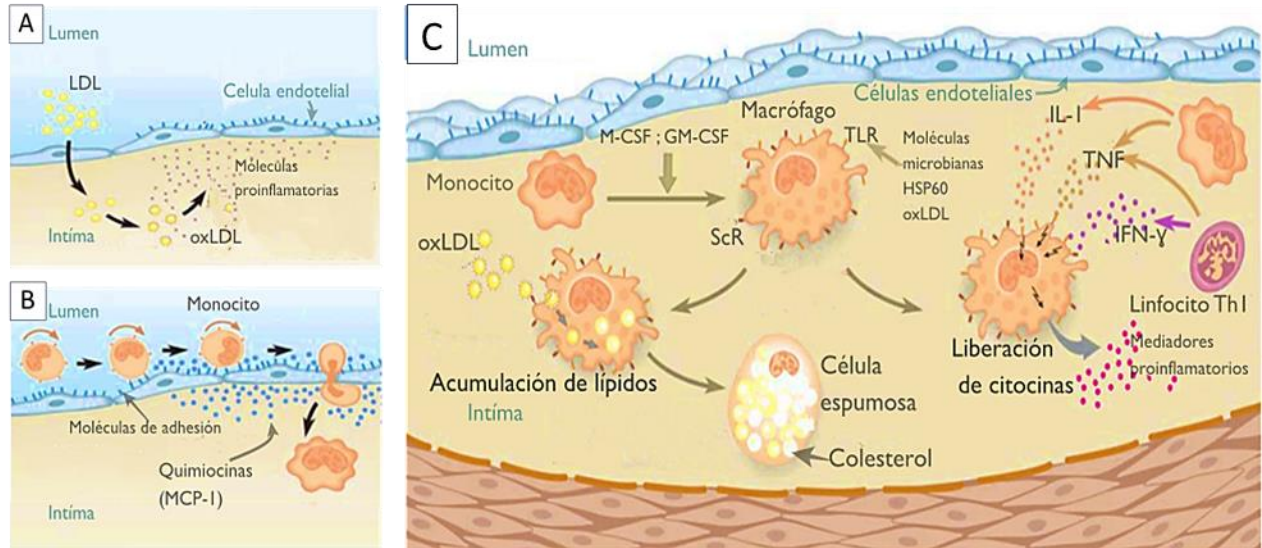


Figura 1. Inicio de la formación de una lesión aterosclerótica. A) El proceso aterogénico inicia con la captación de LDL hacia el espacio subendotelial donde se retiene debido a su afinidad por los proteoglicanos, esta acumulación produce la disfunción del endotelio, el cual libera quimiocinas y EROs que producen, la modificación de la LDL por oxidación (oxLDL) **B)** La activación del endotelio, produce la liberación de quimiocinas y la expresión de moléculas de adhesión por las células endoteliales, procesos que permiten la migración de los monocitos circulantes hacia la íntima **C)** En la íntima los monocitos se diferencian a macrófagos y a través de receptores scavenger y receptores tipo de unión a ligandos tipo toll (TLRs, por sus siglas en inglés) captan a la oxLDL, que acumulan y los transforma en una célula espumosa, y que a su vez también les permite comenzar a liberar diversas moléculas en respuesta a los estímulos del microambiente que los rodea. Este microambiente promueve la acumulación de células espumosas y el reclutamiento de otros tipos celulares como células dendríticas, células cebadas y linfocitos B y T, lo que a su vez conformara la estructura de la lesión. Modificado de: *Inflamación y aterosclerosis*¹⁴.

Cardiopatía isquémica

La cardiopatía isquémica es una enfermedad cardiovascular crónica y progresiva que se define como la acumulación dinámica y reversible de placa aterosclerótica en arterias epicárdicas²⁰, cuya principal consecuencia es el desequilibrio entre el aporte y demanda de oxígeno en el miocardio^{21,13}.

La cardiopatía coronaria engloba diversas presentaciones clínicas como la angina estable (AE) y los síndromes coronarios agudos (SCA): angina inestable (AI) e infarto agudo al miocardio (IAM), que constituyen un continuo en la historia natural de la cardiopatía coronaria y cuya manifestación principal es la angina: una sensación

incomoda en el tórax y las estructuras anatómicas vecinas inducida por el desequilibrio en la oxigenación^{20,13}. La evolución temporal y la gravedad del daño isquémico están directamente relacionados con diversas presentaciones clínicas de la cardiopatía isquémica¹³, como se muestra en la **Figura 2**. En esta enfermedad la placa aterosclerosa es considerada el sustrato anatómico de la enfermedad cardiovascular por lo que a través del avance de la enfermedad, la placa se denomina de la misma forma que la angina, es decir como placa estable e inestable²², como se mencionara posteriormente. De la misma forma en el infarto la placa aterosclerosa retoma su importancia, ya que el evento isquémico agudo (Infarto agudo al miocardio), de manera general deriva directamente de la rotura de la placa.

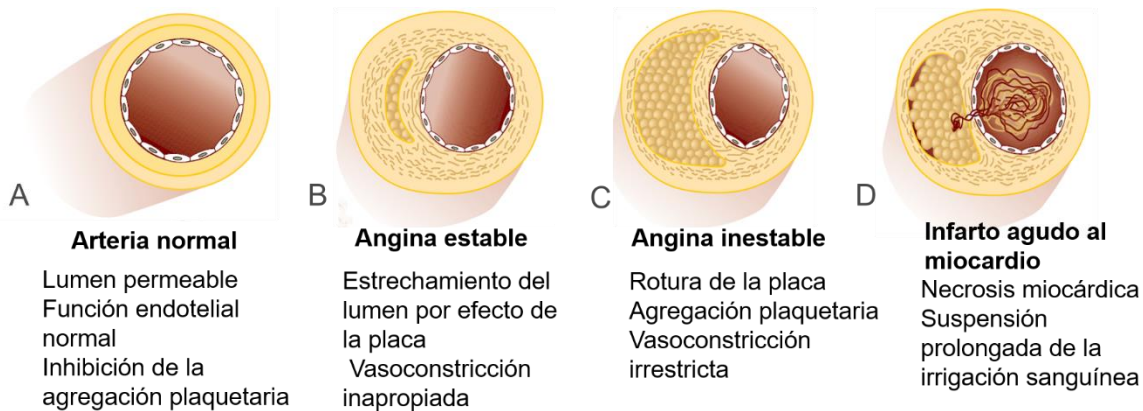


Figura 2. Hallazgos fisiopatológicos en la cardiopatía isquémica. **A)** Las arterias coronarias normales tienen un diámetro amplio, y su endotelio funciona con normalidad. **B)** En la angina estable la placa aterosclerosa y la vasoconstricción inapropiada (inducida por el endotelio disfuncional) disminuyen el lumen vascular y el flujo sanguíneo coronario. **C)** En la angina inestable continua la disminución de la irrigación sanguínea coronaria puede producirse disrupción la placa, y la formación de un trombo que se reabsorbe y no contribuye en la estenosis. **D)** En el infarto el trombo obstruye por completo la arteria. Modificado de: Cardiopatía isquémica¹³.

Placa Estable

En la placa aterosclerosa estable se han establecido los mecanismos de acumulación de lípidos, y la respuesta inflamatoria y anti-inflamatoria asociada, como se observa en la **Figura 3A**. La placa estable se caracteriza por la formación de un núcleo necrótico pequeño y una capa fibrosa íntegra. El núcleo necrótico es la estructura más interna de la placa aterosclerosa, y durante la placa estable se conforma de LDL, proteoglicanos, restos celulares y pocas células espumosas²³, se ha originado durante la etapa de transición de estría grasa a placa estable, y su desarrollo está ligado a la progresión de la enfermedad²⁴. Por otro lado, la capa fibrosa se forma gracias a la activación mutua de macrófagos y linfocitos T que liberan citocinas y factores de crecimiento que estimulan la proliferación y migración de células vasculares de músculo liso (VSMC, por sus siglas en inglés), hacia el endotelio^{25,26}. En el endotelio las VSMC adoptan un fenotipo secretor en vez de un fenotipo contráctil²² por lo que estas células se acumulan y sintetizan colágeno, fibronectina, y elastina^{27,28}, formando la capa fibrosa que funciona como una barrera física que reduce el contacto de material trombogénico (presente en el núcleo necrótico de la placa) con el endotelio²⁹ lo que se ilustra en la **Figura 3B**.

El microambiente de una placa estable se caracteriza por un fenotipo anti-inflamatorio y de reparación de tejido, mediado a través de la liberación de citocinas como: factor de crecimiento de tumor beta (TGF- β , por sus siglas en inglés) e IL-10 por las células T reguladoras, existe además un balance eficiente entre la entrada y salida de células inmunes, lo cual evita la acumulación de células necróticas y la liberación de citocinas pro-inflamatorias^{30,31}. Sin embargo, el desarrollo de la placa estable también causa el estrechamiento progresivo de la luz arterial, lo que puede derivar en una condición de isquemia crónica^{32,30} y en la presencia de sintomatología de angina estable¹³; dolor torácico de duración e intensidad definida que se acompaña de malestar general tras el esfuerzo físico, y que disminuye con el reposo o tras la administración de medicamentos como nitroglicerina, dichas condiciones pueden presentarse durante años^{33,34}.

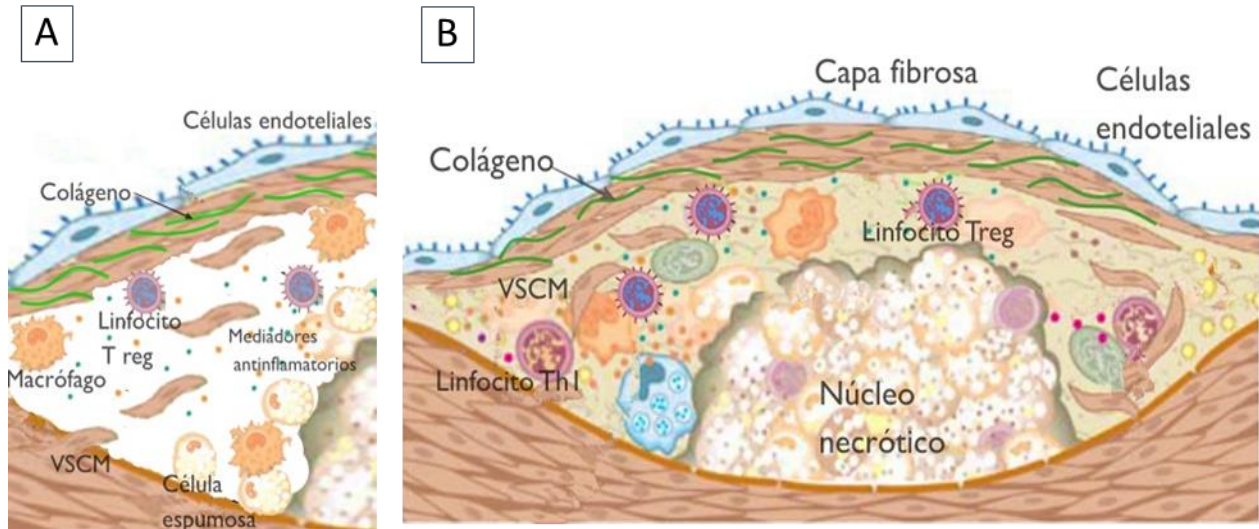


Figura 3. Estructura de la placa estable. **A)** Dos eventos relevantes en la formación de la placa estable son: la migración de las VSCM hacia el endotelio donde se encargan de producir el colágeno de la capa fibrosa y, la liberación de citocinas anti-inflamatorias principalmente por linfocitos T reguladores (Treg) y macrófagos que mantienen la estabilidad de la placa. **B)** La placa estable se conforma de un núcleo necrótico pequeño compuesto de células espumosas y desechos celulares, células anti-inflamatorias y la presencia de una gruesa capa fibrosa que proporciona estabilidad física a la placa además de un microambiente anti-inflamatorio. Modificado de: Inflamación y aterosclerosis¹⁴.

Placa Inestable

La placa inestable o vulnerable se define como una placa aterosclerosa que debido a su estructura y composición, puede desencadenar, de forma repentina, eventos que comprometan parcial o completamente la irrigación sanguínea los tejidos³⁵. En el ámbito clínico y de forma general, la placa inestable está relacionada con los síntomas de angina pecho inestable: dolor repentino, de mayor intensidad con respecto a eventos anteriores, y que se presenta inclusive en el reposo, con una duración mayor a 30 minutos y que no desaparece tras la ingesta de medicamentos^{36,13}. La placa aterosclerosa vulnerable se caracteriza por el adelgazamiento de la capa fibrosa, la formación de vasa-vasorum, alto contenido lipídico, y un núcleo necrótico que ocupa la

mayor parte de la estructura de la placa³⁷, características que se describen a continuación.

En la placa aterosclerosa inestable predomina un microambiente pro-inflamatorio, (ilustrado en la **Figura 4A**) derivado de la infiltración de células inmunes a la íntima y de la liberación de citocinas³⁸. Los macrófagos presentes en la placa liberan proteasas (colagenasa intersticial, gelatinasa y estromilina) que degradan la capa fibrosa⁴, y también factores angiogénicos como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEFG, por sus siglas en inglés), que permiten la formación de vasa-vasorum, a través de los cuales más células son reclutadas a la placa³⁹. Además se liberan citocinas pro-inflamatorias como interferón gamma (IFN- γ), TNF- α e IL-1^{14,39} provenientes de linfocitos T de la placa diferenciados hacia un perfil Th1 y de células endoteliales activadas, dichas citocinas contribuyen a la respuesta inflamatoria exacerbada en la placa inestable. La acumulación de lípidos continua, y propicia la formación de EROs, que promueven la muerte celular y el crecimiento del núcleo necrótico^{40,41} y la formación de células espumosas, que almacenan los lípidos y también liberan citocinas inflamatorias. Todas las características descritas anteriormente construyen una placa propensa a rotura (**Figura 4B**), lo hace más probable la presentación de eventos isquémicos graves en el paciente⁴².

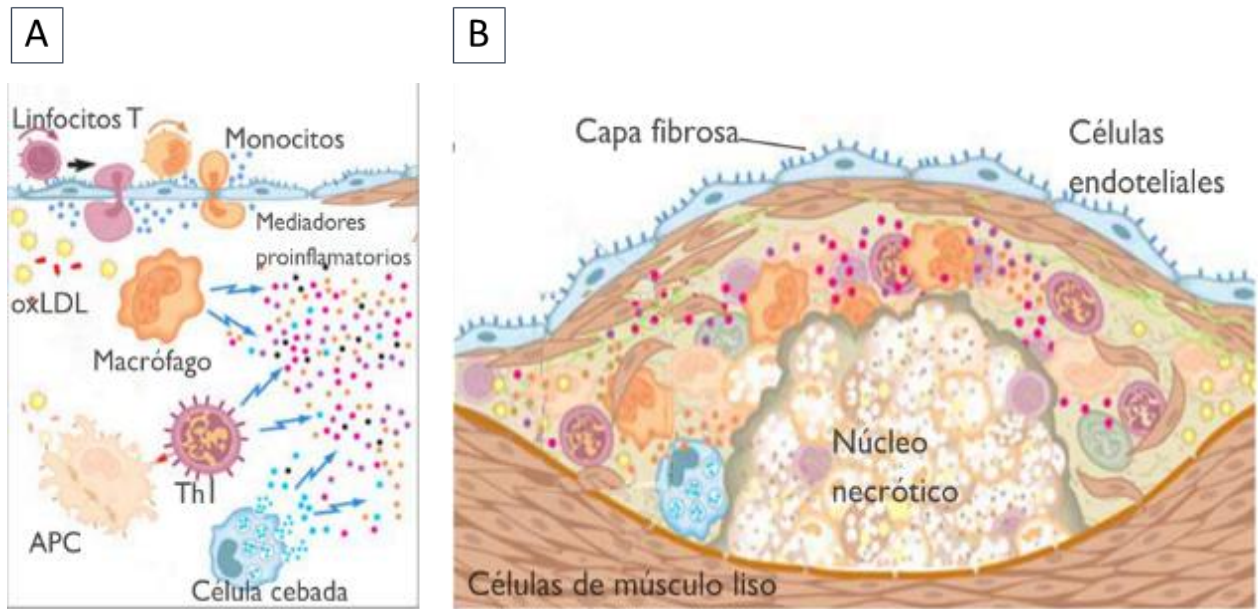


Figura 4. Estructura de la placa inestable. **A)** Este tipo de placa se forma como resultado del progreso de la enfermedad y presenta infiltración de macrófagos, células cebadas y linfocitos, además de LDL modificada que induce la liberación de proteasas y citocinas pro-inflamatorias, que producen la exacerbación de estado inflamatorio. **B)** La placa aterosclerosa inestable se caracteriza por el adelgazamiento de la capa fibrosa de células endoteliales y células del músculo liso, el crecimiento del núcleo necrótico y el incremento de la afluencia de macrófagos y linfocitos T cooperadores-1 (Th, por sus siglas en inglés) en los extremos de la placa, factores que en conjunto la hacen una placa propensa a rotura. Modificado de: *Inflamación y aterosclerosis*¹⁴.

El infarto agudo al miocardio.

La manifestación clínica más frecuente en el infarto agudo al miocardio (IAM) 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. También, existe la presencia de biomarcadores de daño miocárdico, entre estas se incluyen las troponinas (I y T) y la isoenzima MB de la creatinina cinasa (CK-MB) y cambios en las derivaciones del electrocardiograma (ECG), 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 patológicas⁴³.

En esta última etapa de la enfermedad aterosclerosa ocurre ruptura o ulceración de la placa fibrosa (**Figura 5A**); la vulnerabilidad de la placa es originada por un

adelgazamiento de la lesión debido a la acción de metaloproteinasas secretadas por los macrófagos. La degradación de la capa fibrosa conduce a una hemorragia, donde las plaquetas activadas se adhieren a la arteria lesionada ocasionando la formación de un trombo en la zona de la lesión vascular, el cual ocluye la luz de la arteria de manera parcial o total, e induce un estado inflamatorio^{44,40}, y anoxia celular prolongada que provoca la muerte de las células cardiacas⁴⁵ (**Figura 5B**).

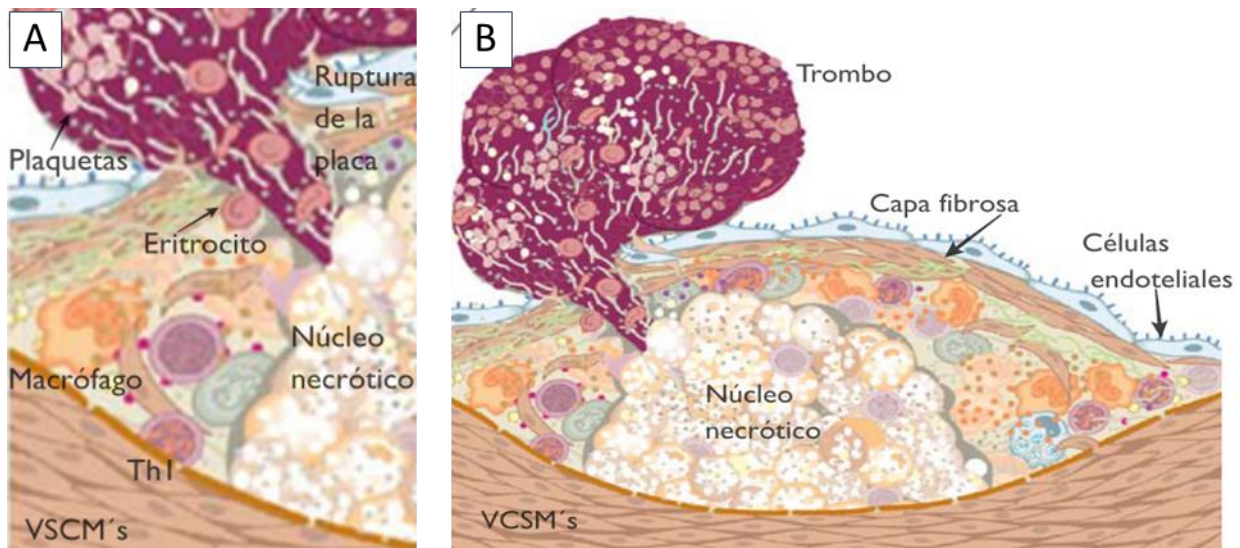


Figura 5. Estructura de la placa en el infarto agudo al miocardio. A) El infarto agudo al miocardio consiste en la oclusión del vaso sanguíneo que genera un evento isquémico, el cual puede producirse a través de la ruptura de una placa inestable que libera su contenido, y en respuesta a ello son reclutados plaquetas y factores de coagulación que generan un trombo en el sitio de la ruptura. **B)** Durante el infarto agudo al miocardio, la capa de células endoteliales-células del músculo liso se fragmenta, liberando su contenido, con lo cual las plaquetas se aglomeran en el sitio de ruptura para evitar una hemorragia, mientras que se forma un trombo que a su vez ocluye parcial o totalmente el lumen de la arteria. Modificado de: Inflamación y aterosclerosis¹⁴.

Macrófagos

Los macrófagos son una población heterogénea de células del sistema inmune innato presentes en todos los tejidos y órganos. Proviene de dos fuentes principales: saco vitelino durante el desarrollo temprano y derivados de los monocitos que circulan en sangre periférica. Asimismo, reciben diferentes denominaciones de acuerdo con su localización: en hígado: células de Kupffer, en sistema nervioso central: microglía, y en hueso: osteoclastos, por mencionar algunos^{46,47,48}.

La eliminación de células apoptóticas, fagocitosis, presentación de antígeno a los linfocitos T, así como la liberación de citocinas y quimiocinas constituyen las principales funciones de los macrófagos. Sin embargo, son células capaces de adaptar su fenotipo y respuesta, en función al microambiente donde se encuentran^{49,50}. Derivado de esta capacidad, las características fenotípicas y funcionales de los macrófagos pueden agruparse bajo un modelo que comprende dos fenotipos de macrófagos: macrófagos M1 y macrófagos M2⁵¹, lo cual se ilustra en la **Figura 6**.

Macrófagos M1

Los macrófagos M1, pro-inflamatorios, o activados clásicamente se caracterizan por la expresión de marcadores como CD80, CD86, CD68, antígeno leucocitario humano- DR (HLA-DR, por sus siglas en inglés) y la sintetasa inducible de óxido nítrico (iNOS) en el humano⁴⁸, la liberación de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-12, una aumentada capacidad de presentación de antígenos, capacidad microbicida (debido a la generación de EROS e intermediarios de alta toxicidad), e inducción de respuestas tipo 1 linfocitos T cooperadores (Th1)⁵². In vivo participan en la eliminación de patógenos durante infecciones, y en la resistencia a tumores. Este fenotipo de macrófagos se puede generar *in vitro* a través de la adición de lipopolisacárido (LPS) y citocinas pro-inflamatorias como TNF- α e IFN- γ ^{48,53}.

Macrófagos M2

Los macrófagos activados alternativamente o macrófagos M2, constituyen un grupo mucho más heterogéneo, ya que poseen una gran variedad de programas funcionales en respuesta a los estímulos del microambiente. El fenotipo M2 se divide en cuatro subgrupos: M2a, M2b, M2c y M2d⁵², si bien cada grupo tiene asociada la expresión de marcadores y liberación de citocinas específicas, los marcadores más comunes para macrófagos M2 son: CD206, CD209, factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, por sus siglas en inglés), IL-10, IL-12 y TGF- β ⁴⁸.

Este fenotipo de macrófago posee una alta capacidad fagocítica, propiedades pro-angiogénicas y pro-fibróticas, y son productores de componentes de matriz extracelular, median la eliminación de parásitos, remodelación de tejido, progresión de tumores, e inmuno-regulación. Participan en desórdenes fibróticos y crónicos como la fibrosis pulmonar, hepática, la esclerosis sistémica y la miocarditis viral, así como en las respuestas mediadas por linfocitos Th2^{48,54,55}.

Cada uno de los fenotipos de macrófagos puede generarse *in vitro* a través de la adición de los siguientes estímulos: M2a: IL-4, IL-13, M2b: complejos inmunes y LPS, M2c: TGF- β , IL-10 y glucocorticoides, M2d: IL-10 y adenosinas^{52,54}.

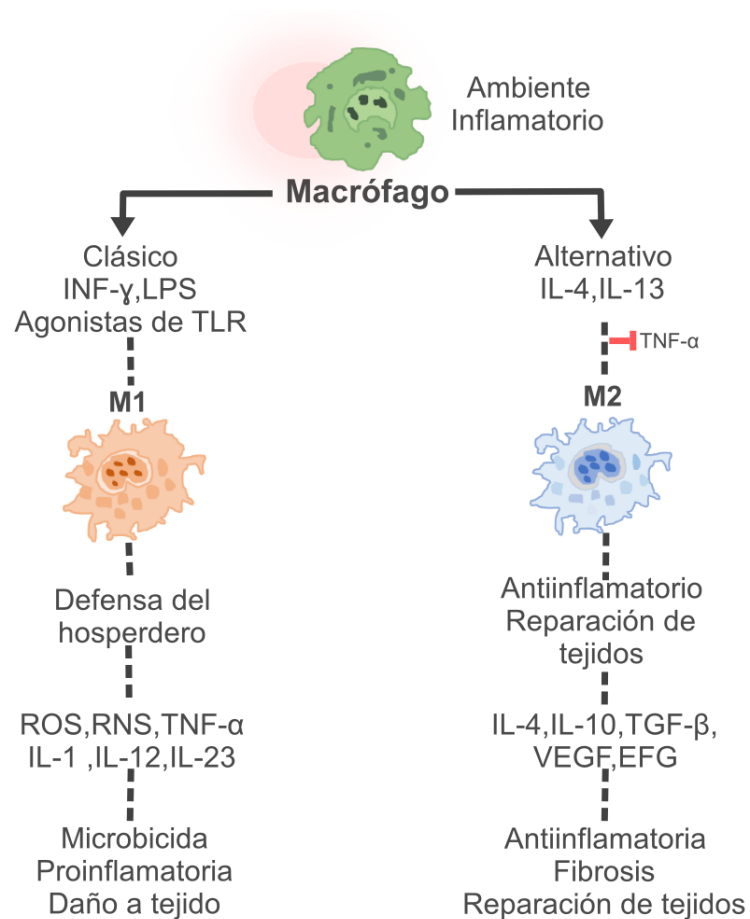


Figura 6. Representación del modelo de clasificación de macrófagos en dos fenotipos macrófagos M1 y macrófagos M2. A partir de un evento inflamatorio y de la presencia de estímulos específicos, el macrófago se diferencia hacia un perfil M1 ó M2 que comprende una función inmunológica definida, la producción de sustancias, citocinas y quimiocinas específicas y diversas funciones en condiciones patológicas. Modificado de: Plasticidad, polarización y función del macrófago en salud y enfermedad⁴⁸.

Macrófagos en enfermedad cardiovascular

La respuesta inflamatoria en las lesiones aterosclerosas induce el reclutamiento de monocitos hacia el espacio subendotelial donde se diferencian a macrófagos y dependiendo de las señales del microambiente se pueden diferenciar a macrófagos M1 o M2⁵⁶.

Mientras que la placa comienza a desarrollarse (durante la etapa de placa estable), la tasa de entrada de monocitos es baja, en comparación a una placa inestable. Predomina un ambiente de resolución de la inflamación y de reparación de tejidos. Al respecto, se ha demostrado que en etapas tempranas del desarrollo la placa aterosclerosa en el humano y ratón prevalecen macrófagos con un fenotipo M2,^{57,58} que se localizan en la superficie de lesiones pequeñas y contienen altos niveles de IL-4, la cual puede inducir y mantener el fenotipo de macrófagos M2, por lo que se sugiere que estos macrófagos mantienen un efecto ateroprotector promoviendo la proliferación de células vasculares que contribuyen al mantenimiento y reparación de la pared vascular⁵⁷.

El desarrollo de la enfermedad conduce de una placa estable a una inestable, en la cual hay muerte celular, así como ruptura de la capa fibrosa. En esta etapa se demostró en el ratón y humano un incremento en el número de macrófagos M1 en relación a los macrófagos M2 en la placa aterosclerosa^{57,59,60}.

Además, la oxLDL⁶¹ o bien la proteína C reactiva⁶² pueden contribuir a este cambio de macrófagos M2 hacia un fenotipo inflamatorio, caracterizado por la alta producción de IL-6 e IL-8⁶¹, las cuales favorecen un estado inflamatorio en la placa aterosclerosa. En etapas avanzadas de la lesión los macrófagos secretan metaloproteinasas que degradan la matriz de la capa fibrosa de la placa aterosclerosa, provocando la ruptura de la placa y como consecuencia el infarto agudo de miocardio⁶³.

En el IAM en el humano se ha demostrado que los macrófagos M1 se acumulan en la periferia de la zona del infarto y conforme avanza el tiempo del infarto los macrófagos migran al núcleo del infarto⁶⁴; de manera similar en las etapas tempranas del IAM en el modelos animales predominan los macrófagos M1⁶⁵ y se sugiere que los macrófagos M1, los cuales secretan citocinas pro-inflamatorias como TNF- α e IL-1 β que contribuyen a la activación del miofibroblasto, propiciando la secreción de colágeno y matriz

extracelular que inducen a la fibrosis del ventrículo^{66,67}, lo cual puede ser una causa de muerte en los pacientes. En contraste, en el modelo de ratón se sugiere que los macrófagos M2 ayudan a reconstruir el tejido a través de la remoción de tejido dañado y secreción de citocinas como IL-10, facilitando la cicatrización de las lesiones y manteniendo la contractilidad miocárdica, evitando la insuficiencia cardíaca^{67,68}.

Planteamiento del problema

La aterosclerosis se caracteriza por un alto contenido de macrófagos, particularmente macrófagos M1 y M2. En lesiones aterosclerosas estables prevalece un fenotipo de macrófagos M2 y en menor grado macrófagos M1. Sin embargo, conforme avanza las etapas a placa inestable e infarto agudo de miocardio, estas proporciones se invierten y prevalecen macrófagos M1 los cuales expresan en superficie otros marcadores como CD86. A la fecha, no existen estudios que evalúen los marcadores de superficie asociados a los macrófagos M1 y M2 diferenciados de monocitos de sangre periférica de pacientes con angina de pecho estable, inestable e infarto agudo de miocardio en el humano. Conocer los marcadores expresados en los macrófagos puede ayudar a comprender mejor el fenotipo M1 y M2 en las enfermedades crónicas e inflamatorias y a describir el fenotipo a través del desarrollo de la enfermedad.

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

¿Las condiciones de cada etapa de la enfermedad cardiovascular influirán en el fenotipo de marcadores superficie de macrófagos M1 y M2 diferenciados de monocitos humanos provenientes de sangre periférica?

Hipótesis

La expresión de los marcadores asociados fenotípicamente a macrófagos M1 aumentará a través de las etapas de desarrollo de la enfermedad, mientras que la expresión de los marcadores asociados a macrófagos M2 disminuirá conforme avanza la enfermedad.

Objetivo general

Determinar la expresión de marcadores de macrófagos M1 y M2 en pacientes con enfermedad cardiovascular, en comparación con sujetos sanos.

Objetivos específicos

1. Inducir *in vitro* la diferenciación de monocitos derivados de los pacientes con angina de pecho estable, inestable, infarto agudo al miocardio y sujetos sanos a macrófagos M1 y M2.
2. Evaluar los niveles de expresión de los marcadores de superficie asociados a macrófagos M1 y M2 derivados de monocitos de pacientes con angina de pecho estable, inestable, infarto agudo al miocardio y sujetos sanos.

Material y métodos

Tipo de estudio

Experimental

Grupos de estudio

Se incluyeron 15 casos concurrentes de pacientes que ingresaron a la unidad médica de alta especialidad (UMAE), Hospital de Cardiología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, y que cumplieron con los criterios de selección.

Este estudio fue aprobado por el Comité de Investigación Médica y Ética Humana del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) el 10 de julio de 2017 (R-2017-785-074). Este estudio se llevó a cabo de acuerdo con las directrices de la Declaración de Helsinki y se informó a todas las personas incluidas sobre la naturaleza del estudio. A todos los participantes se les pidió que firmaran una carta de consentimiento.

Para la toma de muestras, los pacientes con SICA se incluyeron dentro de las 24 horas de iniciados los síntomas y los pacientes con angina estable se consideraron después del cateterismo cardiaco diagnóstico una vez que se demostró la presencia de lesiones coronarias significativas. La toma de muestra de los pacientes con infarto agudo al miocardio incluyó las siguientes determinaciones: evaluación ECG de 12 derivaciones y de ser necesario el círculo completo, la determinación de marcadores de necrosis miocárdica ((CK-MB) y/o troponinas), y de marcadores inflamatorios de riesgo (proteína C reactiva, fibrinógeno), química sanguínea, hemoglobina, plaquetas y perfil de lípidos. Los sujetos sanos se reclutaron del banco de sangre.

Criterios de inclusión para pacientes

1. Pacientes de cualquier género, edad entre 37 a 75 años.
2. Pacientes con diagnóstico de angina inestable, dentro de las 24 horas de iniciados los síntomas.
3. Se considerará como angina inestable a los pacientes que tengan 2 o más de los siguientes criterios:
 - A. Dolor precordial de tipo isquémico con duración menor de 30 min. cuyo inicio de presentación desde el primer evento sea menor de 8 semanas, o que en este tiempo exista cambios en el patrón de presentación de los eventos de angina en pacientes con angina estable previa, o angina 48 horas a 4 semanas después de un infarto del miocardio. Acompañado o no de síntomas neurovegetativos.
 - B. Cambios electrocardiográficos en el segmento ST y/o en la onda T.
 - C. Ausencia de elevación de marcadores de necrosis miocárdica (CPK total o MB).
 - D. Firma de consentimiento informado.
4. Se considerarán pacientes con angina estable:
 - A. Pacientes en clase funcional II o III por angina de acuerdo con la clasificación de la Sociedad Cardiovascular Canadiense (CCS, por sus siglas en inglés).
 - B. Ausencia de datos que sugieran cambios en el patrón de presentación de los eventos de angina en al menos los últimos 2 meses, o la presencia de eventos de angina en reposo o presencia de cambios electrocardiográficos en el segmento ST en reposo.
 - C. Pacientes que ingresen al hospital programados para la realización de estudio angiográfico donde se demuestre la presencia de al menos 50% de estenosis de una o más arterias coronarias epicárdicas.
 - D. Firma de consentimiento informado.
5. Se considerarán pacientes con infarto agudo al miocardio con la presencia de biomarcadores de necrosis miocárdica ((CK-MB) y/o troponinas), más uno de los siguientes criterios:

- A. Dolor precordial de tipo isquémico ≥ 30 min. de duración, acompañado o no de disnea, diaforesis, náusea y/o vómito.
- B. Desnivel positivo del segmento ST igual o mayor de 1 mm en 2 o más derivaciones que vean la misma cara o presencia de BRIHH de reciente aparición.
- C. Presencia de ondas Q patológicas de Novo en por lo menos 2 derivaciones contiguas.
- D. Firma de consentimiento informado.

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.
6. Pacientes a los que no se logre obtener la cantidad de sangre necesaria para los ensayos.
7. Pacientes en los que no se logre obtener el número de monocitos necesarios para los experimentos.
8. Pacientes con mala ventana ecocardiográfica.
9. Pacientes con infarto del miocardio previo.

Criterios de no inclusión para pacientes

1. Datos de sangrado mayor activo.

Criterios de inclusión para sujetos sanos

1. Sujetos de cualquier género.
2. Edad entre 37 a 55 años
3. Sujetos sin datos electrocardiográficos o clínicos sugestivos de isquemia miocárdica, o alteraciones en el ritmo o la conducción.
4. Sujetos sin factores de riesgo cardiovascular mayor.
5. Firma de consentimiento informado.

Criterios de exclusión para sujetos sanos

1. Sujetos que presenten datos electrocardiográficos sugestivos de isquemia miocárdica.
2. Sujetos con antecedentes de enfermedad neoplásica, inflamatoria crónica o proceso infeccioso activo.
3. Antecedentes de tratamiento previo con antiinflamatorios o inmunosupresores.
4. Sujetos a los que no se logre obtener la cantidad de sangre necesaria para los ensayos.
5. Sujetos en los que no se logre obtener el número de monocitos necesarios para los experimentos

Definición de variables

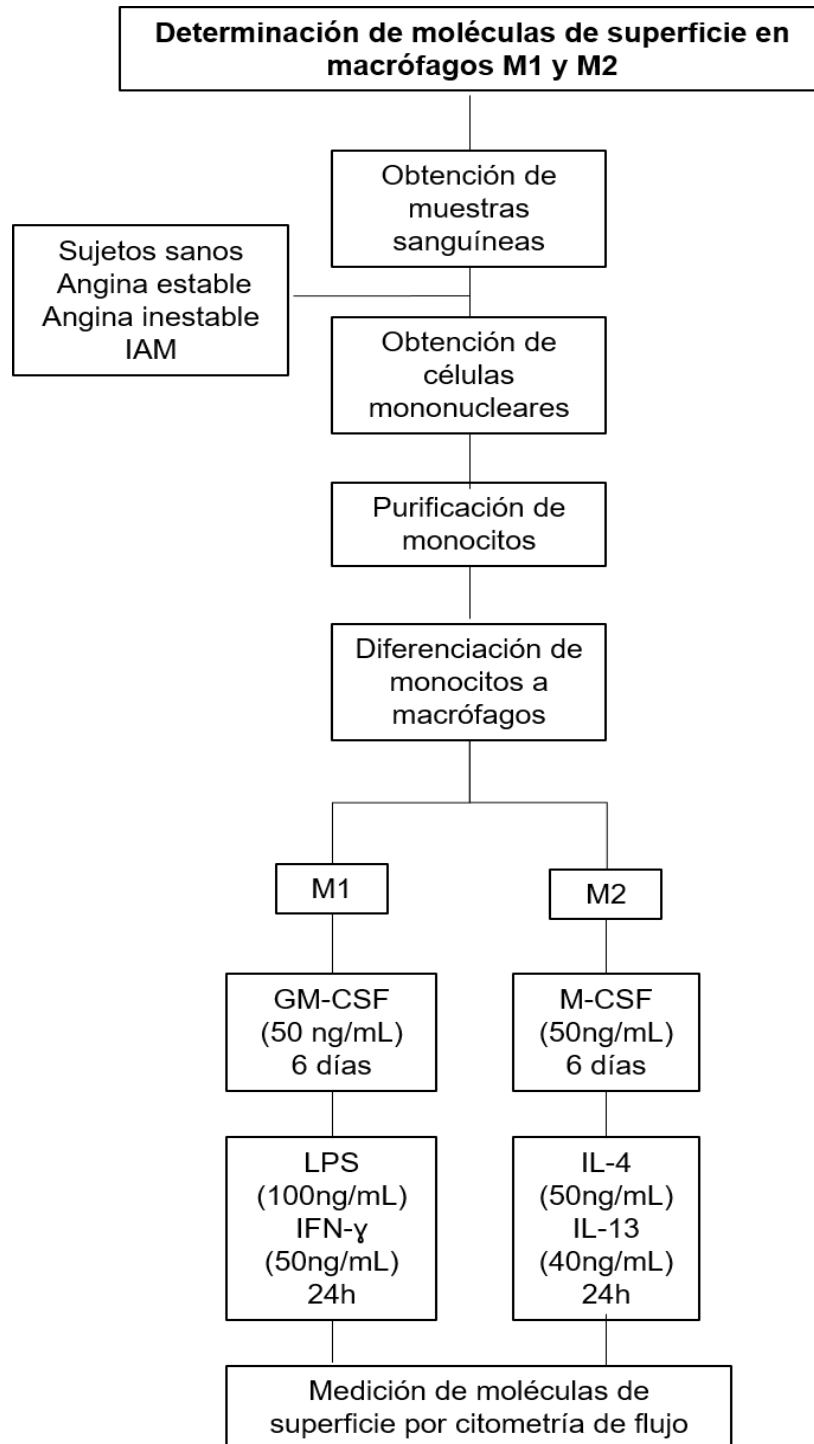
Variables independientes				
	Definición conceptual:	Definición operativa:	Tipo de variable	Escala de medición
Células provenientes de los diferentes grupos:				
<i>I. pacientes con síndrome coronario agudo</i>	Los pacientes con SICA son aquellos que presentan manifestación clínica de isquemia aguda o necrosis miocárdica aguda debida a reducción del flujo coronario, aporte de oxígeno miocárdico insuficiente, desequilibrio entre el aporte y demanda de oxígeno, asociada a la enfermedad arterial coronaria con erosión o ruptura de la placa aterosclerosa y la subsecuente oclusión parcial o total de la luz del vaso.	Se considera pacientes con SICA a aquellos que ingresen con diagnóstico de angina inestable, infarto agudo de miocardio sin elevación del segundo ST o infarto con elevación del segmento ST.	nominal	grupo I, grupo II y grupo III
<i>II. pacientes con angina estable</i>	Se considera paciente con angina estable aquel que presenta dolor precordial de tipo isquémico que no ha modificado su forma de presentación en los últimos 2 meses, habitualmente se presenta con el esfuerzo y cede con el reposo.	Se considerará pacientes con angina estable aquel que presenta eventos de angina en clase funcional II-III de la CCS, o bien, que cuente con prueba inductora de isquemia positiva, que requiera de estudio de angiografía coronaria donde se demuestre al menos la presencia de obstrucción de >50% de alguna arteria coronaria epicárdica.		
<i>III. sujetos sanos.</i>	Se considera un sujeto sano por la ausencia de enfermedad o estado patológico alguno	Se considera a sujetos sanos a aquellos en quienes de descarte la presencia de signos o síntomas de isquemia miocárdica, enfermedad inflamatoria crónica, neoplásica o infecciosa.		

<p>Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, por sus siglas en inglés)</p>	<p>Es una citocina producida por linfocitos T, macrófagos, células endoteliales y fibroblastos estromales activados que actúa sobre medula ósea para aumentar la producción de neutrófilos y monocitos.</p>	<p>Es una citocina que induce la activación de macrófagos y promueve la diferenciación de las células dendríticas y de monocitos a macrófagos.</p>	<p>nominal.</p>	<p>presente o ausente.</p>
<p>Factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF, por sus siglas en inglés)</p>	<p>Es una citocina producida por linfocitos T, macrófagos, las células endoteliales y fibroblastos estromales activados que actúa sobre medula ósea estimulando la producción de monocitos.</p>	<p>Es una citocina que induce la activación de macrófagos y promueve la diferenciación de los monocitos a macrófagos estimulando la producción de monocitos.</p>	<p>nominal</p>	<p>presente o ausente.</p>
<p>Variables dependientes</p>				
<p>Moléculas de superficie: CD80, CD86, HLA-DR, CD36, CD163, CD206 las células se evaluarán por</p>	<p>Definición conceptual</p>	<p>Definición operativa</p>	<p>Tipo de variable</p>	<p>Escala de medición</p>
	<p>CD80 y CD86 son moléculas de superficie celular presente en células presentadoras de antígenos. Proporciona un estímulo</p>	<p>Se realizarán las mediciones de las moléculas mediante citometría de flujo.</p>	<p>variable de razón.</p>	<p>cuantitativa continúa.</p>

<i>citometría de flujo</i>	necesario para la activación celular. HLA-DR es una molécula de superficie celular presente en las células presentadoras de antígenos. Proporciona un estímulo necesario para la activación de linfocitos CD36, CD163 y CD206 son receptores de reconocimiento de patrón. Proporcionan señales para la activación celular.			
-----------------------------------	--	--	--	--

Metodología

Diagrama de flujo



Obtención de células mononucleares

La muestra de sangre se diluyó en solución salina isotónica (SSI), en una relación 1:2. Posteriormente, se colocaron 7 ml de sangre diluida sobre 3 ml de Lymphoprep[®] (Stem Cell) en un tubo de 15 ml y se centrifugó a 2000 revoluciones por minuto (rpm) 30 minutos. Se recuperó la interfase formada entre el Lymphoprep y el plasma, y las células obtenidas se lavaron tres veces con SSI.

Purificación de monocitos

Se realizó la purificación de monocitos totales, mediante selección negativa utilizando el kit "Classical Monocyte Isolation Kit, human" (Miltenyi Biotec), de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Por cada 10^7 células mononucleares, se resuspendieron en 30 μ l de MACS buffer [Solución amortiguadora de sales de fosfato (PBS) 1X pH 7.4, albumina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés) 0.5%, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 2mM] y se adicionaron 10 μ l de anticuerpo bloqueador de receptores de la fracción cristalizable (FcR) y 10 μ l de coctel de anticuerpos biotinilados dirigidos a linfocitos T, linfocitos B, células NK, y granulocitos; luego se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionaron 30 μ l de buffer MACS y 20 μ l de microesferas magnéticas acopladas a anticuerpo anti-biotina, mezcla que se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se hizo pasar por la columna de separación LS (Miltenyi Biotec), recuperando la fracción negativa, correspondiente a lo monocitos totales.

Diferenciación de monocitos a macrófagos

Los monocitos (300,000 células/pozo) se cultivaron durante cinco días con GM-CSF (50 ng/ml) para macrófagos M1, y con M-CSF (50 ng/ml) para macrófagos M2. Posteriormente al sexto día, las células cultivadas con GM-CSF se estimularon con IFN- γ (50 ng/ml) y LPS (100 ng/ml) y los monocitos cultivados con M-CSF se trataron con IL-4 (50 ng/ml) e IL-13 (40 ng/mL), durante 24 horas.

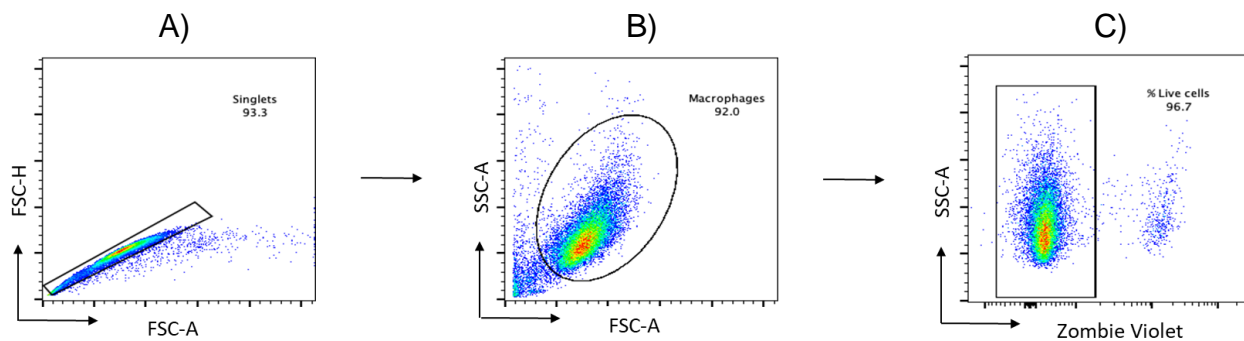
Determinación de moléculas de superficie en macrófagos.

Las células fueron marcadas con Zombie Violet™, como marcador de viabilidad. Los macrófagos M1 y M2, se incubaron con anticuerpos antihumanos (Biolegend): anti-CD80 acoplado a ficoeritrina conjugada a cianina 5 (PECy5), anti-HLA-DR acoplado a afilococianina conjugada a cianina 7 (APCCy7), anti-CD86 acoplado a afilococianina (APC) y anti-CD163-APC, anti-CD206 acoplado a ficoeritrina (PE), anti-CD36 acoplado a Isotiocianato de fluoresceína (FITC) respectivamente, durante 20 minutos a 4°C en oscuridad. Finalizada la incubación, las células se lavaron con FACS buffer (PBS 1X pH 7.4, BSA 0.5%, azida de sodio 0.01%, EDTA 2mM, y suero fetal bovino (SFB)) y se fijaron con 35 µl de para-formaldehído al 2%, para su análisis en el citómetro de flujo FACS Canto II, como se observa en la **Figura 7**. El análisis de expresión de moléculas se realizó mediante el software Flow Jo versión 10.

Estrategia de análisis del fenotipo celular de macrófagos M1 y M2

La estrategia de análisis que se empleó fue la misma para macrófagos M1 y macrófagos M2, brevemente consistió en excluir eventos dobles, delimitar la zona de macrófagos y seleccionar aquellas células que se encontraban viables, con esta selección se procedió a determinar de manera independiente y por separado la fluorescencia emitida por cada uno de los marcadores de macrófagos M1 y macrófagos M2.

M1



M2

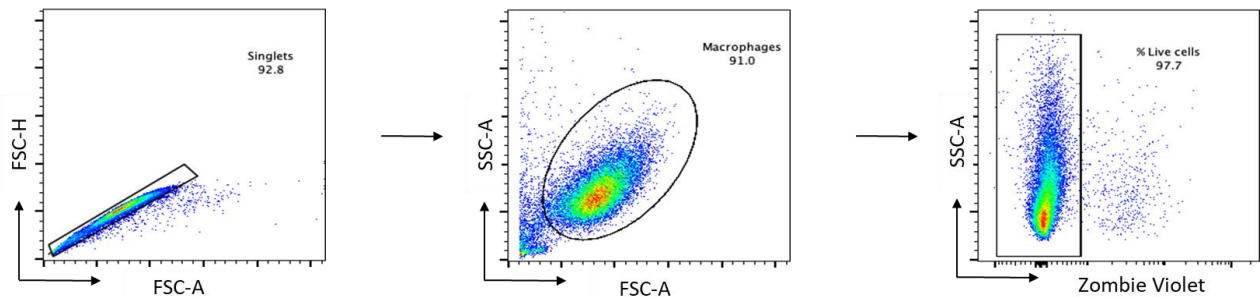


Figura 7. Estrategia de análisis de citometría de flujo. Cada fila de imágenes muestra la estrategia para cada fenotipo de macrófago. A) A partir de una gráfica de singletes FSC-A vs FSC-H (forward scatter-area vs forward scatter-height) se excluyeron eventos dobles, B) usando la gráfica de tamaño contra granularidad (FSC-A y SSC-A (side scatter-area) se delimitó la región de macrófagos y C) utilizando la gráfica de complejidad contra el marcador de viabilidad “Zombie Violet”, se excluyeron las células muertas del análisis, una vez delimitada esta zona, la expresión de los marcadores para macrófagos M1 (CD80, CD86, HLA-DR) y para macrófagos M2 (CD206,CD36,CD163) se determinó en una gráfica de complejidad contra la fluorescencia acoplada al marcador seleccionado.

Análisis estadístico

Para la comparación de las variables cuantitativas de los grupos se utilizó Kruskal-Wallis. Los datos están representados como media más desviación estándar (SD). Se considero un valor de $p \leq 0.05$. El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el programa de cómputo Graphpad Prism 7.

Resultados

Datos demográficos de los sujetos participantes en el estudio.

Se reclutaron 15 sujetos sanos para este estudio, 9 de ellos pertenecen al sexo masculino y 6 al sexo femenino, con una edad promedio de 38 años. En la siguiente tabla (Tabla 1), se muestran los datos demográficos de los pacientes reclutados para el estudio, se reclutaron 15 pacientes por grupo, cuyas características demográficas se muestran en la siguiente tabla. Para determinar si existían diferencias entre los grupos estudiados, los datos se analizaron estadísticamente a través de la prueba de U-Mann Whitney, sin embargo, no existen diferencias estadísticamente significativas con los parámetros evaluados a excepción del valor de CK-MB entre los pacientes con AE e IAM ($p < 0.0066$).

Tabla 1. Datos demográficos de los pacientes reclutados en el estudio.

Características	Grupo de pacientes			Análisis estadístico (resultado)
	AE n=15	AI n=15	IAM n=15	
Edad, (años)	60.3±10.6	60.8±8.6	62.6±10.6	ns
Sexo, (masculino/femenino)	14/1	9/6	11/4	ns
Diabetes mellitus	8/15	8/15	7/15	ns
Hipertensión	6/15	11/15	11/15	ns
Hiperlipidemia	6/15	7/15	10/15	ns
Fumadores	11/15	5/15	4/15	ns
Obesidad	6/15	8/15	7/15	ns
Índice de masa corporal, (kg/m ²)	28.8±6.0	29.1±5.2	28.1±5.0	ns
Creatinina sérica, (mg/dl)	1.19±0.98	0.82±0.14	1.55±2.25	ns
CK-MB máx., (IU/l)	24.5±14.6	41.6±32.6	192.4±127.6	*p<0.0066

ns: no significativo *Diferencia significativa entre el grupo AE e IAM

Los valores se muestran como la media ± desviación estándar de acuerdo con distribución empleada.

Caracterización del fenotipo de macrófagos M1 y M2.

Los monocitos totales obtenidos de sangre periférica de sujetos sanos se usaron para caracterizar la polarización de monocitos hacia macrófagos M1 y M2. Los monocitos se trataron con GM-CSF, IFN- γ y LPS para obtener macrófagos M1. Y con M-CSF, IL-4 e IL-13 para obtener macrófagos M2. Los marcadores CD80, CD86 y HLA-DR se han utilizado como marcadores fenotípicos de macrófagos M1, al evaluar la expresión de estos marcadores en los macrófagos M1 polarizados, encontramos un aumento

significativo en la expresión todos los marcadores con respecto a la expresión que se observó en los macrófagos M2 (En la **Figura 7** se muestra la estrategia de análisis de los marcadores en los macrófagos por citometría de flujo).

Mientras tanto, los macrófagos M2 expresaron una mayor cantidad de CD206, CD36, y CD163 de manera significativa en comparación con los macrófagos M1 (**Figura 8**). Los resultados obtenidos sugieren que los monocitos se polarizan a macrófagos M1 (GM-CSF, IFN- γ y LPS) y M2 (M-CSF, IL-4 e IL-13). Por lo que se procedió a usar estas condiciones para polarizar a monocitos derivados de sangre periférica de pacientes con AE, AI, IAM y sujetos sanos a macrófagos M1 y M2.

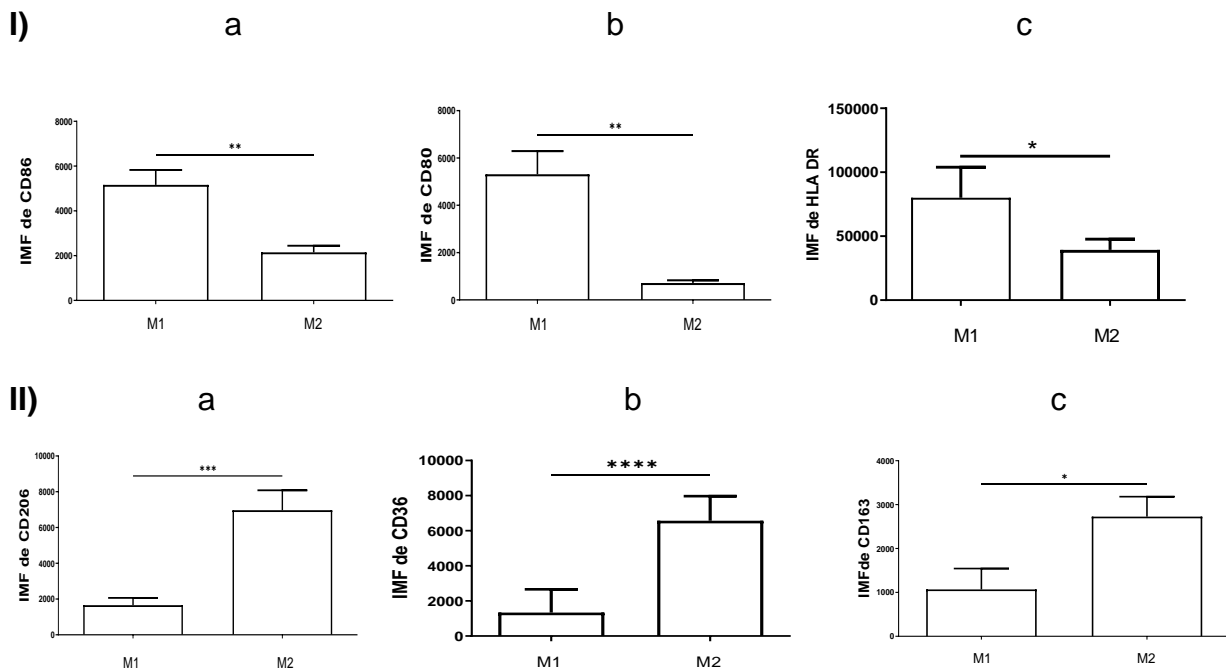


Figura 8. Caracterización de macrófagos M1 y M2. I) Los monocitos de sujetos sanos, fueron tratados durante 6 días con GM-CSF (25 ng/mL) y posteriormente con IFN- γ (50 ng/mL) y LPS (100 ng/mL) durante 24 horas para obtener macrófagos M1. II) Los macrófagos M2 fueron cultivados durante 6 días con M-CSF (50 ng/mL), y después durante 24 horas con IL-4 (50 ng/mL) e IL-13 (40 ng/mL). Se evaluaron los marcadores característicos asociados a macrófagos **M1 Ia) CD80, Ib) CD86 y Ic) HLA-DR** y a macrófagos **M2 IIa) CD206, IIb) CD36, IIc) CD163**. Los niveles de expresión están expresados como intensidad media de fluorescencia (IMF) y (media \pm SD) * p \leq 0.05, ** p <0.01, *** p <0.01, **** p <0.0001.

Determinación de fenotipo de marcadores de macrófagos M1 en pacientes

Los macrófagos M1 de los pacientes con AE expresan niveles más elevados de CD80 con una media de 13053 ± 9522 de IMF que los macrófagos M1 de sujetos sanos con una media de 5610 ± 3476 de IMF como se muestra en la **Figura 9A**. Mientras tanto, los macrófagos M1 de los pacientes con IA muestran un incremento significativo de CD80 con una media de 17667 ± 3231 y en el mismo sentido los pacientes con IAM muestran un incremento de 14628 ± 2197 en comparación con los sujetos sanos. En relación con las etapas de la enfermedad y los niveles de CD80 determinados Se observa un incremento gradual de la expresión de CD80 a medida que avanza la enfermedad (**Figura 9A**).

En tanto que, los niveles de CD86 incrementaron significativamente en pacientes con AE con una media de 26195 ± 4591 , en los pacientes con AI en 25009 ± 5528 y en los pacientes con IAM en 24076 ± 4470 de IMF en comparación con la expresión de CD86 en sujetos sanos con una media de 5739 ± 1088 . En relación con las etapas de la enfermedad la expresión de CD86 incrementa en la AE e IA, y disminuye en el IAM (**Figura 9B**). Además, los macrófagos M1 aumentan considerablemente los niveles de HLA-DR en pacientes con AE con una media de 30685 ± 6669 , pacientes con AI con una media de 33633 ± 5306 y pacientes con IAM con una media de 37033 ± 6162 de IMF con relación a sujetos sanos con una media de 8279 ± 1579 de IMF de HLA-DR. Los macrófagos M1 aumentan gradualmente los niveles de HLA-DR conforme progresa la enfermedad cardiovascular (**Figura 9C**).

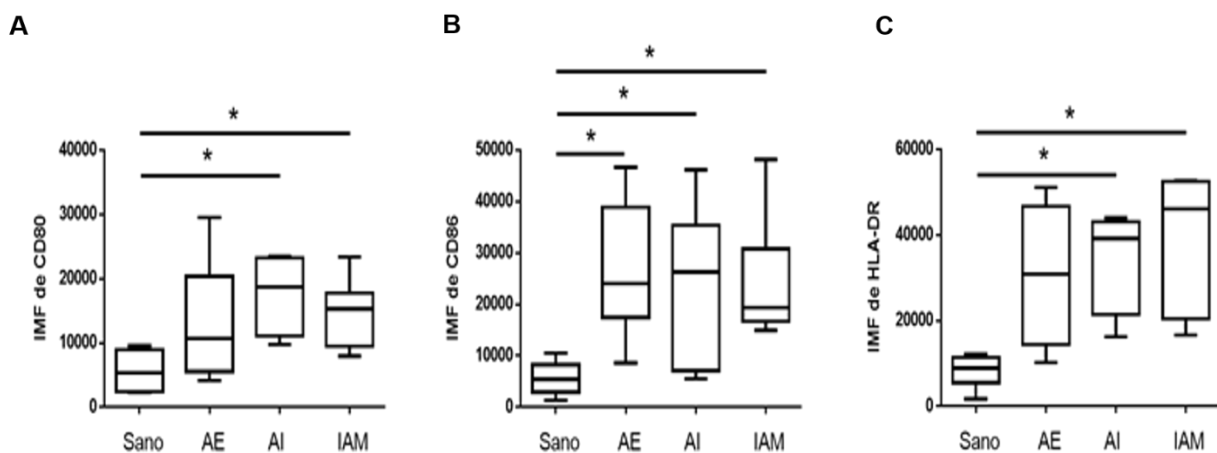


Figura 9. Expresión de marcadores de macrófagos M1 en pacientes con enfermedad cardiovascular y sujetos sanos. Se obtuvieron macrófagos M1 mediante el cultivo de monocitos de sangre periférica durante 6 días con RPMI+10%SFB-GM-CSF (50ng/mL) y 24h con IFN- γ (50ng/mL), LPS (100 ng/mL). A través de citometría de flujo se determinó la expresión de A) CD80, B) CD86 y C) HLA-DR. Los niveles de expresión se presentan como IMF y (media \pm SD). AE: Angina estable, AI: angina inestable, IAM: Infarto agudo al miocardio. * $p < 0.05$.

Determinación de fenotipo de marcadores de macrófagos M2 en pacientes

Los macrófagos M2 derivados de monocitos de pacientes con AE mostraron una media de 18699 ± 2200 de IMF de CD36 y los pacientes con AI presentaron una media de 16469 ± 4047 de IMF de CD36 y no se encontraron diferencias con respecto a los macrófagos M2 derivados de monocitos sanos que fue de 14237 ± 3516 de IMF de CD36 como se muestra en la **Figura 10A**.

Sin embargo, los macrófagos M2 de pacientes con STEMI mostraron una media de 35490 ± 6428 de IMF de CD36 que fue estadísticamente significativa con relación a la mostrada por los sujetos sanos (**Figura 10A**). Mientras tanto, al determinar los niveles de expresión de CD206 encontramos que los macrófagos M2 de sujetos sanos expresan una media de 4854 ± 1296 de IMF de CD206. Mientras tanto, los macrófagos M2 de pacientes con AE mostraron una media de 21028 ± 3219 , los macrófagos M2 de pacientes con AI una media de 21906 ± 4110 y los macrófagos M2 derivados de pacientes con STEMI una media de 36622 ± 6457 de IMF de CD206, en las tres condiciones de la enfermedad la expresión de CD206 en los macrófagos se encuentra

aumentada de manera significativa con relación a la expresión de este marcador en macrófagos M2 de sujetos sanos (**Figura 10B**). Al determinar la expresión de CD163 en macrófagos M2 de los pacientes con enfermedad cardiovascular no se encontraron diferencias significativas en relación con la expresada de macrófagos M2 de sujetos sanos (**Figura 10C**).

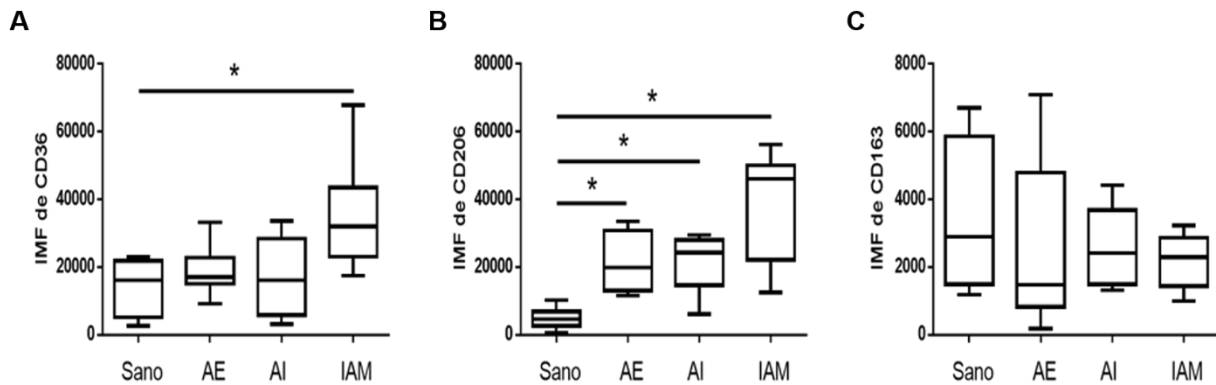


Figura 10. Expresión de marcadores de macrófagos M2 en pacientes con enfermedad cardiovascular y sujetos sanos. Se obtuvieron macrófagos M2 mediante el cultivo de monocitos de sangre periférica durante 6 días con RPMI+10%SFB-M-CSF (50ng/mL) y 24h con IL-4 (50ng/mL) e IL-13 (40 ng/mL). A través de citometría de flujo se determinó la expresión de A) CD36, B) CD206 y C) CD163. Los niveles de expresión se presentan como IMF y (media \pm SD). AE: Angina estable, AI: angina inestable, IAM: Infarto agudo al miocardio. * $p < 0.05$.

Discusión

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica, asociada con enfermedades cardiovasculares que involucran a la arteriopatía coronaria crónica (angina estable) y el SICA (angina inestable e infarto agudo de miocardio) que ocupa la primera causa de muerte en nuestro país^{4,69,70} y la principal causa de mortalidad en edad productiva y post productiva de 15 a 64 años y 65 años y más, respectivamente³. Con respecto a las características demográficas de los pacientes reclutados y el análisis realizado a los parámetros podemos observar que únicamente existen diferencias en los valores de CK-MB durante AE e IAM, al respecto se han reportado diferencias entre la expresión de esta enzima ya que aumenta en eventos de necrosis miocárdica, y es utilizada como un biomarcador de infarto agudo al miocardio⁷¹.

La relación entre macrófagos y aterosclerosis se ha estudiado en modelos murinos y humanos. Donde se conoce que los macrófagos participan principalmente en el control de la respuesta inmunológica de la placa aterosclerosa⁷². Dado que los macrófagos son una población altamente heterogénea, los macrófagos M2 y M1 están presentes en las todas la etapas de desarrollo de la placa aterosclerosa^{73,74,75,76,77,78} Se ha establecido que los monocitos provenientes de sangre periférica se reclutan al espacio subendotelial donde se diferencian a macrófagos y comienzan a formar una placa aterosclerosa que al inicio de la enfermedad posee una estructura estable, y actividad inflamatoria baja, donde los fenotipos de macrófago M1 y M2 coexisten en la placa⁵⁶.

Con el modelo de estudio de este protocolo determinamos *in vitro* el fenotipo de macrófagos M1 y M2 derivados de monocitos de pacientes con angina de pecho estable, inestable e infarto agudo de miocardio, así como de sujetos sanos. Los resultados obtenidos, mostraron que los macrófagos M1 presentaron una mayor expresión de moléculas co-estimuladoras (CD80 y CD86) en los tres grupos de los pacientes, mientras que los macrófagos M2 aumentaron la expresión de CD36 en los pacientes con IAM y de CD206 en pacientes con AE, AI e IAM.

Con base en lo mencionado anteriormente, determinamos el fenotipo de macrófagos M2, donde se encontró que los macrófagos M2 de pacientes con AE no presentaron cambios en CD163, y únicamente se observó un incremento no significativo con

respecto a los macrófagos de individuos sanos. Sin embargo, los macrófagos M2 de pacientes con AE expresaron altos niveles de CD206 en comparación con la expresión de este receptor en los macrófagos M2 de sujetos sanos. Evidencias previas han demostrado por inmunohistoquímica, la expresión de CD206 en placas estables de humanos⁷⁹ y la prevalencia de macrófagos M2 en las lesiones tempranas de placas aterosclerosas humanas^{57,58}. Asimismo, se ha observado que las placas aterosclerosas estables en modelos murinos contienen altos niveles de IL-4, esta interleucina induce la polarización de macrófagos hacia el fenotipo M2 y promueve en ellos el eflujo de colesterol y la capacidad de eferocitosis⁸⁰, también se ha relacionado a IL-4 en la proliferación de células vasculares⁵⁷. De esta forma IL-4 y los macrófagos M2 pueden contribuir al mantenimiento y reparación de la íntima evitando el desarrollo progresivo de lesiones aterosclerosas en la etapa de AE.

En esta misma etapa de la enfermedad determinamos que los macrófagos M1 de pacientes expresaron altos niveles de CD80, CD86 y HLA-DR. Resultados similares han observado el aumento de la expresión de CD80 y CD86 en macrófagos M1 en la etapa inicial de desarrollo de la placa, donde se concluye que los macrófagos M1 se encuentran activados^{81,58}. Es importante mencionar que la activación de macrófagos promueve la liberación de citocinas y la activación de otros tipos celulares,⁸² que a su vez podrían contribuir con la generación de un microambiente inflamatorio. Como se muestra en los resultados que sugieren que los macrófagos M1 derivados de los pacientes con angina estable e infarto agudo al miocardio aumentaron la expresión de los marcadores de superficie relacionados con el estado inflamatorio.

La acumulación progresiva y sostenida de lípidos y material celular generan el desbalance de la respuesta pro-inflamatoria y anti-inflamatoria, así, el desarrollo de la enfermedad conduce de una placa estable a una inestable^{57,7}. En este contexto, determinamos que los macrófagos M2 en la AI mantuvieron niveles elevados de CD206 con relación a los macrófagos M2 de sujetos sanos y ligeramente mostraron una disminución con los macrófagos M2 de pacientes con AE. En similitud con nuestros resultados se ha demostrado un incremento en la expresión de CD206 en las placas de pacientes con AI, aunque en menor grado que los pacientes con AE. Asimismo, un

análisis semicuantitativo de placas aterosclerosas reveló una menor expresión de CD206 (con respecto a los marcadores de macrófagos M1), en las zonas propensas a rotura⁵⁹. Sugiriendo una disminución de los macrófagos M2 en la capa fibrosa de la lesión a medida que se desarrolla la enfermedad.

CD36 funciona como un receptor “scavenger” en los macrófagos, capta lípidos oxidados como las oxLDL, y con ello propicia la formación de células espumosas que exacerban el estado inflamatorio en la placa aterosclerosa⁸³, altos niveles de CD36 soluble se han correlacionado positivamente con el desarrollo de la enfermedad⁸⁴. No obstante, en nuestro estudio observamos el aumento de la expresión de CD36 en la AE y AI sin encontrar diferencias significativas con respecto a la expresión en sujetos sanos.

Con respecto a los macrófagos M1 de los pacientes con AI, estos expresaron altos niveles de CD80, CD86 y HLA-DR con respecto a los sujetos sanos y ligeramente niveles mayores de CD80 y CD86 que los macrófagos M1 de pacientes con AE. En la literatura se han descrito resultados similares donde se observan altos niveles de expresión CD80 y CD86 en placas vulnerables con relación a las placas estables⁸⁵. Además, se ha observado en el ratón y humano un incremento en el número de macrófagos M1 en relación a los macrófagos M2 en la placa aterosclerosa^{57,59,60}. Se conoce que estímulos como la oxLDL⁶¹ o la proteína C reactiva⁶² en la placa aterosclerosa pueden contribuir al cambio de macrófagos M2 hacia un fenotipo inflamatorio, caracterizado por la alta producción de IL-6 e IL-8⁶¹, lo que favorece el estado inflamatorio en la placa aterosclerosa y por ende la presencia de macrófagos M1.

Cabe mencionar que CD80 y CD86 participan en el proceso de co-estimulación de linfocitos, evidencias *in vivo* han puesto de manifiesto que la deficiencia de CD80, CD86 en modelos murinos susceptibles de desarrollar placas aterosclerosas, muestran una reducción en el desarrollo de la placa, así como una disminución en la expresión de HLA-DR y CD3 en comparación con ratones susceptibles a desarrollar placas que expresan CD80 y CD86⁸⁵. Acorde con nuestros resultados, el incremento en la expresión de HLA-DR y moléculas co-estimuladoras en las etapas de AI e IAM, sugiere la participación dinámica de las moléculas de presentación de antígenos y moléculas co-estimuladoras en la progresión de la enfermedad cardiovascular.

En etapas avanzadas de la lesión los macrófagos secretan metaloproteinasas que degradan la matriz de la capa fibrosa de la placa aterosclerosa, provocando la ruptura de la placa y como consecuencia el infarto agudo de miocardio⁶³.

En el IAM los macrófagos M2 expresaron altos niveles de CD36 y CD206 en comparación con los macrófagos M2 de sujetos sanos, así como con los macrófagos M2 derivados de pacientes con AE y AI. En este sentido se ha demostrado una alta expresión de CD206 y CD36 en macrófagos M2 durante el IAM. CD36 es un receptor importante para la fagocitosis de neutrófilos apoptóticos, lo que contribuye a una disminución del proceso inflamatorio en el IAM^{86,87}. Por otro lado, los macrófagos M1 en el IAM expresaron altos niveles de CD80, CD86 y HLADR. Estos resultados sugieren que los macrófagos M1 se encuentran activados después del infarto, lo cual puede contribuir a la respuesta inflamatoria en el miocardio dañado. Existen reportes que refuerzan estos resultados, los cuales han demostrado que en las primeras 24 horas después del daño isquémico en el tejido cardiaco, los macrófagos M1 favorecieron el proceso inflamatorio^{65,88}. La sobreexpresión de estas moléculas co-estimuladoras en los macrófagos M1 de los pacientes con IAM podría mejorar su presentación y capacidad co-estimuladora para la activación de linfocitos T⁸⁸. desencadenando la respuesta inflamatoria después del infarto.

Conclusiones

En los pacientes con AE y AI los macrófagos M2 expresaron altos niveles de CD206 y los macrófagos M1 altos niveles de CD80 y CD86. Durante el IAM se mantuvo la expresión elevada de las moléculas mencionadas anteriormente, además se elevó la expresión de CD36 en macrófagos M2. Estos resultados sugieren que los macrófagos M2 podrían contribuir en la regulación de la respuesta inflamatoria en la AE y AI y con la remodelación de tejido en IAM a través de la expresión elevada de CD206 y CD36, sin embargo, podría ser superada por la alta expresión de marcadores co-estimuladores de macrófagos M1, relacionados con inflamación.

Perspectivas

En base a estos resultados se propone analizar los niveles de citocinas características para macrófagos M1 y M2 en el sobrenadante de los cultivos celulares y en el plasma de los pacientes.

Referencias

1. Kordalewska M, Markuszewski MJ. Metabolomics in cardiovascular diseases. *J Pharm Biomed Anal.* 2015;113:121-136. doi:10.1016/j.jpba.2015.04.021
2. PAHO, World Health Organisation (WHO). Noncommunicable Disease Mortality and Risk Factor Prevalence in the Americas. Published online 2019:40.
3. INEGI. Comunicado de prensa 538/19. Características de las defunciones registradas. Published online 2019:1-65.
<https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2019/EstSociodemograficas/DefuncionesRegistradas2019.pdf>
4. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(9):2045-2051. doi:10.1161/ATVBAHA.108.179705
5. Bertomeu A, Zambón D. La placa aterogénica: fisiopatología y consecuencias clínicas | Medicina Integral. *Elsevier, Med Integr.* 2018;40(9):39-405.
<https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-la-placa-aterogena-fisiopatologia-consecuencias-13041112>
6. Williams JW, Huang L hao, Randolph GJ. Cytokine Circuits in Cardiovascular Disease. *Immunity.* 2019;50(4):941-954. doi:10.1016/j.immuni.2019.03.007
7. Libby P, Buring JE, Badimon L, et al. Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Prim.* 2019;5(1):1-18. doi:10.1038/s41572-019-0106-z
8. Bäck M, Ketelhuth DFJ, Malin S, et al. *Immune-Mediated Mechanisms of Atherosclerosis.* Elsevier Inc.; 2018. doi:10.1016/b978-0-12-809657-4.99556-5
9. Suckling K, Glaxosmithkline R, City WG. K Suckling. *Ref Modul Biomed Res.* 2014;1(c):1-8. doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.00190-2
10. Glass, Christopher K JLW. Atherosclerosis: The Road Ahead Review. *Cell.* 2001;104:503-516. doi:10.5005/jp/books/12883_4
11. Carvajal Carvajal C. LDL oxidada y la aterosclerosis. *Med Leg Costa Rica.* 2015;32(1):161-169.
12. Lu H, Daugherty A. Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35(3):485-491. doi:10.1161/ATVBAHA.115.305380
13. Medicina DELA. *Bases de Las Cardiopatías.*
14. Gisterå A, Hansson GK. The immunology of atherosclerosis. *Nat Rev Nephrol.*

- 2017;13(6):368-380. doi:10.1038/nrneph.2017.51
15. Zhu Y, Xian X, Wang Z, Bi Y, Chen Q, Han X. Research Progress on the Relationship between Atherosclerosis and Inflammation. *Biomolecules*. 2018;1(II):1-11. doi:10.3390/biom8030080
 16. Moore KJ, Sheedy FJ, Fisher EA. Macrophages in atherosclerosis: A dynamic balance. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(10):709-721. doi:10.1038/nri3520
 17. Kattoor AJ, Kanuri SH, Mehta JL. Role of Ox-LDL and LOX-1 in Atherogenesis. *Curr Med Chem*. 2018;26(9):1693-1700. doi:10.2174/0929867325666180508100950
 18. Abdolmaleki F, Gheibi Hayat SM, Bianconi V, Johnston TP, Sahebkar A. Atherosclerosis and immunity: A perspective. *Trends Cardiovasc Med*. 2019;29(6):363-371. doi:10.1016/j.tcm.2018.09.017
 19. Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell*. 2011;145(3):341-355. doi:10.1016/j.cell.2011.04.005
 20. Neumann FJ, Sechtem U, Banning AP, et al. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes. *Eur Heart J*. 2020;41(3):407-477. doi:10.1093/eurheartj/ehz425
 21. Steinhubl SR. *Síndromes Coronarios Agudos*. Elsevier España, S.L.; 2006. doi:10.1016/b978-84-458-1536-6.50008-7
 22. da Luz PL, Chagas ACP, Dourado PMM, Laurindo FRM. Endothelium in Atherosclerosis: Plaque Formation and Its Complications. *Endothel Cardiovasc Dis Vasc Biol Clin Syndr*. Published online 2018:493-512. doi:10.1016/B978-0-12-812348-5.00033-7
 23. Martinet W, Schrijvers DM, De Meyer GRY. Necrotic cell death in atherosclerosis. *Basic Res Cardiol*. 2011;106(5):749-760. doi:10.1007/s00395-011-0192-x
 24. Aguiar-souto P, Ramón J. Angina crónica estable : fisiopatología y formas de manifestación clínica. Published online 2010:11-21.
 25. Loughrey CM, Young IS. *Clinical Biochemistry of the Cardiovascular System*. Third Edit. Elsevier Ltd.; 2014. doi:10.1016/B978-0-7020-5140-1.00038-9
 26. Watson MG, Byrne HM, Macaskill C, Myerscough MR. A two-phase model of early fibrous cap formation in atherosclerosis. *J Theor Biol*. 2018;456:123-136.

doi:10.1016/j.jtbi.2018.08.010

27. Luk E, Gotlieb AI. Atherosclerosis. *Pathobiol Hum Dis A Dyn Encycl Dis Mech*. Published online 2014:2970-2985. doi:10.1016/B978-0-12-386456-7.05504-0
28. Mooren FC, ed. Fibrous Cap BT - Encyclopedia of Exercise Medicine in Health and Disease. In: Springer Berlin Heidelberg; 2012:346. doi:10.1007/978-3-540-29807-6_2404
29. Maguire EM, Pearce SWA, Xiao Q. Foam cell formation: A new target for fighting atherosclerosis and cardiovascular disease. *Vascul Pharmacol*. 2019;112(July 2018):54-71. doi:10.1016/j.vph.2018.08.002
30. Linton MRF, Yancey PG, Davies SS et al. The Role of Lipids and Lipoproteins in Atherosclerosis. [Updated 2019 Jan 3].
31. Tabas I, Lichtman AH. Monocyte-Macrophages and T Cells in Atherosclerosis. *Immunity*. 2017;47(4):621-634. doi:10.1016/j.immuni.2017.09.008
32. Halvorsen B, Otterdal K, Dahl TB, et al. Atherosclerotic Plaque Stability-What Determines the Fate of a Plaque? *Prog Cardiovasc Dis*. 2008;51(3):183-194. doi:10.1016/j.pcad.2008.09.001
33. IQWiG. *Coronary Artery Disease: Overview*. Institute for Quality and Efficiency in Health Care (IQWiG); 2013. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK355313/>
34. Cassar A, Holmes DR, Rihal CS, Gersh BJ. Chronic coronary artery disease: Diagnosis and management. *Mayo Clin Proc*. 2009;84(12):1130-1146. doi:10.4065/mcp.2009.0391
35. Kubátová H, Poledne R, Piřha J. Immune cells in carotid artery plaques: What can we learn from endarterectomy specimens? *Int Angiol*. 2020;39(1):37-49. doi:10.23736/S0392-9590.19.04250-0
36. Regmi M, Siccardi MA. *Coronary Artery Disease Prevention*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547760/>
37. Skagen K, Skjelland M, Zamani M, Russell D. Unstable carotid artery plaque: New insights and controversies in diagnostics and treatment. *Croat Med J*. 2016;57(4):311-320. doi:10.3325/cmj.2016.57.311
38. Rev A, Mech P, Downloaded D, Hansson K, Robertson AL, Cecilia S. Inflammation and Atherosclerosis. Published online 2006:297-331.

doi:10.1146/annurev.pathol.1.110304.100100

39. Cioni G, Abouzaki NA, Jovin IS. *Acute Coronary Syndrome: Thrombotic Lesions in Patients with Unstable Angina*. Elsevier Inc.; 2018. doi:10.1016/B978-0-12-812615-8.00010-7
40. Ross R. Atherosclerosis-An inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340(2):115-126.
41. Siegel D, Devaraj S, Mitra A, Raychaudhuri SP, Raychaudhuri SK, Jialal I. Inflammation, atherosclerosis, and psoriasis. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2013;44(2):194-204. doi:10.1007/s12016-012-8308-0
42. Fayad ZA, Swirski FK, Calcagno C, Robbins CS, Mulder W, Kovacic JC. Monocyte and Macrophage Dynamics in the Cardiovascular System: JACC Macrophage in CVD Series (Part 3). *J Am Coll Cardiol*. 2018;72(18):2198-2212. doi:10.1016/j.jacc.2018.08.2150
43. Daubert MA, Jeremias A. The utility of troponin measurement to detect myocardial infarction: Review of the current findings. *Vasc Health Risk Manag*. 2010;6(1):691-699. doi:10.2147/vhrm.s5306
44. EA.Ruesga Zamora. Cardiología. In: *El Manual Moderno*; 2005:535-540.
45. Thygesen K, Alpert JS, White HD. Universal Definition of Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50(22):2173-2195. doi:10.1016/j.jacc.2007.09.011
46. Abbas, Abul K. et al. *Inmunología Celular y Molecular (8a. Ed.)*. Elsevier Health Sciences Spain - T; 2015.
47. P.Delves. *Roitt:Inmunología:Fundamentos*. Editorial Médica Panamericana; 2015.
48. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol*. 2018;233(9):6425-6440. doi:10.1002/jcp.26429
49. Mckarns SC, States U. *Innate Immunity and Inflammation*. Third Edit. Elsevier; 2018. doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.64228-9
50. Deleo FR, Institutes N, States MTU. *Phagocytes (Innate Immunity)*. 4th ed. Elsevier Inc.; 2019. doi:10.1016/B978-0-12-809633-8.90746-5
51. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm*. 2015;2015(Tamás Röszer):16.

52. Italiani P, Boraschi D. From monocytes to M1/M2 macrophages: Phenotypical vs. functional differentiation. *Front Immunol.* 2014;5(OCT):1-22. doi:10.3389/fimmu.2014.00514
53. Vogel DYS, Glim JE, Stavenuiter AWD, et al. Human macrophage polarization in vitro: Maturation and activation methods compared. *Immunobiology.* 2014;219(9):695-703. doi:10.1016/j.imbio.2014.05.002
54. Shrivastava R, Shukla N. Attributes of alternatively activated (M2) macrophages. *Life Sci.* 2019;224(December 2018):222-231. doi:10.1016/j.lfs.2019.03.062
55. Glezeva N, Horgan S, Baugh JA. Monocyte and macrophage subsets along the continuum to heart failure: Misguided heroes or targetable villains? *J Mol Cell Cardiol.* 2015;89:136-145. doi:10.1016/j.yjmcc.2015.10.029
56. Chinetti-gbaguidi G, Colin S, Staels B. Macrophage subsets in atherosclerosis. 2015;12(January). doi:10.1038/nrcardio.2014.173
57. Khallou-Laschet J, Varthaman A, Fornasa G, et al. Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis. *PLoS One.* 2010;5(1). doi:10.1371/journal.pone.0008852
58. de Gaetano M, Crean D, Barry M, Belton O. M1- and M2-type macrophage responses are predictive of adverse outcomes in human atherosclerosis. *Front Immunol.* 2016;7(JUL). doi:10.3389/fimmu.2016.00275
59. Stöger JL, Gijbels MJJ, van der Velden S, et al. Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2012;225(2):461-468. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2012.09.013
60. Mills CD, Lenz LL, Ley K. Macrophages at the fork in the road to health or disease. *Front Immunol.* 2015;6(FEB):1-6. doi:10.3389/fimmu.2015.00059
61. Van Tits LJH, Stienstra R, van Lent PL, Netea MG, Joosten LAB, Stalenhoef AFH. Oxidized LDL enhances pro-inflammatory responses of alternatively activated M2 macrophages: A crucial role for Krüppel-like factor 2. *Atherosclerosis.* 2011;214(2):345-349. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2010.11.018
62. Devaraj S, Jialal I. C-reactive protein polarizes human macrophages to an M1 Phenotype and inhibits transformation to the M2 phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(6):1397-1402. doi:10.1161/ATVBAHA.111.225508

63. Chávez-Sánchez L, Espinosa-Luna JE, Chávez-Rueda K, Legorreta-Haquet M V., Montoya-Díaz E, Blanco-Favela F. Innate Immune System Cells in Atherosclerosis. *Arch Med Res*. 2014;45(1):1-14.
doi:10.1016/j.arcmed.2013.11.007
64. Van Der Laan AM, Ter Horst EN, Delewi R, et al. Monocyte subset accumulation in the human heart following acute myocardial infarction and the role of the spleen as monocyte reservoir. *Eur Heart J*. 2014;35(6):376-385.
doi:10.1093/eurheartj/eh331
65. Troidl C, Möllmann H, Nef H, et al. Classically and alternatively activated macrophages contribute to tissue remodelling after myocardial infarction. *J Cell Mol Med*. 2009;13(9 B):3485-3496. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00707.x
66. Liu W, Zhang X, Zhao M, et al. Activation in M1 but not M2 macrophages contributes to cardiac remodeling after myocardial infarction in rats: A critical role of the calcium sensing receptor/NLRP3 inflammasome. *Cell Physiol Biochem*. 2015;35(6):2483-2500. doi:10.1159/000374048
67. Braga TT, Agudelo JSH, Camara NOS. Macrophages during the fibrotic process: M2 as friend and foe. *Front Immunol*. 2015;6(NOV):1-8.
doi:10.3389/fimmu.2015.00602
68. St. John Sutton MG, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: Pathophysiology and therapy. *Circulation*. 2000;101(25):2981-2988.
doi:10.1161/01.cir.101.25.2981
69. Leeper B, Cyr AM, Lambert C, Martin K. Acute coronary syndrome. *Crit Care Nurs Clin North Am*. 2011;23(4):547-557. doi:10.1016/j.ccell.2011.10.001
70. Secretaría de salud. No Title. Sistema de información de la secretaría de salud. Published 2018. <http://sinaiscap.salud.gob.mx:8080/DGIS/>
71. Piechota W. *Biomarkers in Ischemic Heart Disease - New Data*. Vol 8. Elsevier Inc.; 2006. doi:10.1016/B978-0-12-809657-4.10941-X
72. Mallat Z. Macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37(8):e92-e98.
doi:10.1161/ATVBAHA.117.309730
73. De La Paz Sánchez-Martínez M, Blanco-Favela F, Mora-Ruiz MD, Chávez-Rueda AK, Bernabe-García M, Chávez-Sánchez L. IL-17-differentiated macrophages

- secrete pro-inflammatory cytokines in response to oxidized low-density lipoprotein. *Lipids Health Dis.* 2017;16(1):1-9. doi:10.1186/s12944-017-0588-1
74. Rahman K, Vengrenyuk Y, Ramsey SA, et al. Inflammatory Ly6Chi monocytes and their conversion to M2 macrophages drive atherosclerosis regression. *J Clin Invest.* 2017;127(8):2904-2915. doi:10.1172/JCI75005
 75. Li J, Xue H, Li T, et al. Exosomes derived from mesenchymal stem cells attenuate the progression of atherosclerosis in ApoE ^{-/-} mice via miR-let7 mediated infiltration and polarization of M2 macrophage. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019;510(4):565-572. doi:10.1016/j.bbrc.2019.02.005
 76. Chinetti-gbaguidi G, Baron M, Bouhrel MA, et al. Display Low Cholesterol Handling but High Phagocytosis Because of Distinct Activities of the PPAR α and LXR β Pathways LOX. Published online 2011:985-995. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.233775
 77. Gong M. STAT6 Upregulation Promotes M2 Macrophage Polarization to Suppress Atherosclerosis. Published online 2017:240-249. doi:10.12659/MSMBR.904014
 78. Hanna RN, Shaked I, Hubbeling HG, et al. NR4A1 (Nur77) deletion polarizes macrophages toward an inflammatory phenotype and increases atherosclerosis. *Circ Res.* 2012;110(3):416-427. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.253377
 79. Varasteh Z, Mohanta S, Li Y, et al. Targeting mannose receptor expression on macrophages in atherosclerotic plaques of apolipoprotein E-knockout mice using Ga-NOTA-anti-MMR nanobody : non- invasive imaging of atherosclerotic plaques. *EJNMMI Res.* 2019;9(5):1-10.
 80. Bi Y, Chen J, Hu F, Liu J, Li M, Zhao L. M2 Macrophages as a Potential Target for Antiatherosclerosis Treatment. *Neural Plast.* 2019;2019. doi:10.1155/2019/6724903
 81. Valledor AF, Comalada M, Santamaría-Babi LF, Lloberas J, Celada A. Chapter 1 - Macrophage Proinflammatory Activation and Deactivation: A Question of Balance. In: Alt FW, Austen KF, Honjo T, Melchers F, Uhr JW, Unanue ERBT-A in I, eds. Vol 108. Academic Press; 2010:1-20. doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380995-7.00001-X
 82. Peled M, Fisher EA. Dynamic aspects of macrophage polarization during

- atherosclerosis progression and regression. *Front Immunol.* 2014;5(NOV):1-9. doi:10.3389/fimmu.2014.00579
83. Silverstein, RL, Li W., Park YM RO. Mechanisms of cell signaling by the scavenger receptor CD36: Implications in atherosclerosis and thrombosis. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2010;121:206-220.
84. Li RJ, Yang M, Li JF, Xue L, Chen YG, Chen WQ. Circulating CD36 and fractalkine levels are associated with vulnerable plaque progression in patients with unstable angina pectoris. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2014;41:863-869. doi:10.1111/1440-1681.12302
85. Müller A, Mu L, Meletta R, et al. Towards non-invasive imaging of vulnerable atherosclerotic plaques by targeting co-stimulatory molecules. *Int J Cardiol.* 2014;174:503-515. doi:10.1016/j.ijcard.2014.04.071
86. Yabluchanskiy A, Ma Y, Iyer RP, Hall ME, Lindsey ML. Matrix metalloproteinase-9: Many shades of function in cardiovascular disease. *Physiology.* 2013;28(6):391-403. doi:10.1152/physiol.00029.2013
87. DeLeon-pennell KY, Tian Y, Zhang B, et al. CD36 Is a Matrix Metalloproteinase-9 Substrate That Stimulates Neutrophil Apoptosis and Removal During Cardiac Remodeling. Published online 2015:14-25. doi:10.1161/CIRCGENETICS.115.001249
88. Ben-Mordechai T, Holbova R, Landa-Rouben N, et al. Macrophage subpopulations are essential for infarct repair with and without stem cell therapy. *J Am Coll Cardiol.* 2013;62(20):1890-1901. doi:10.1016/j.jacc.2013.07.057