



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POST GRADO
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI
UNIDAD MEDICA DE ALTA ESPECIALIDAD
HOSPITAL DE CARDIOLOGIA
"LUIS MENDEZ"

"COMPARACIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES DE MONOCITOS Y SU ASOCIACIÓN CON LA
RESPUESTA INFLAMATORIA DE PACIENTES CON DIFERENTES PRESENTACIONES
CLÍNICAS DEL SÍNDROME ISQUÉMICO CORONARIO"

TESIS

PARA OBTENER DIPLOMA DE ESPECIALIDAD EN CARDIOLOGIA

PRESENTA

CLAUDIA NORMA VILLANUEVA DE LA ROSA

TUTOR

M EN C DRA ALEJANDRA MADRID MILLER
JEFA DIVISION DE INVESTIGACION EN SALUD HOSPITAL DE CARDIOLOGIA CMN SXXI

D EN C. FRANCISCO BLANCO FAVELA.
JEFE DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOLOGÍA



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.

Subpoblaciones de monocitos en síndrome coronario

MEXICO FEBRERO 2013
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

DR. MOISES CUTIEL CALDERÓN ABBO
Director general
Unidad Médica de Alta Especialidad
Hospital de Cardiología, CMNSXXI "Luis Méndez"

DR MARTIN HORACIO GARRIDO GARDUÑO
Director médico
Profesor Titular del Curso de Cardiología
Unidad Médica de Alta Especialidad
Hospital de Cardiología, CMNSXXI "Luis Méndez"

DR. JESUS SALVADOR VALENCIA SANCHEZ
Director de Educación e Investigación en Salud
Unidad Médica de Alta Especialidad
Hospital de Cardiología, CMNSXXI "Luis Méndez"

M. En C. DRA M. ALEJANDRA MADRID MILLER
Jefa División de Investigación en Salud.
Unidad Médica de Alta Especialidad
Hospital de Cardiología, CMNSXXI "Luis Méndez"

D. En C. DR. FRANCISCO BLANCO FAVELA.
Jefe de la unidad de investigación médica en inmunología.
Unidad Médica de Alta Especialidad
Hospital de pediatría, CMNSXXI

CLAUDIA NORMA VILLANUEVA DE LA ROSA
Residente de Tercer Año de Cardiología
Unidad Médica de Alta Especialidad
Hospital de Cardiología, CMNSXXI "Luis Méndez"

Subpoblaciones de monocitos en síndrome coronario

INDICE

Resumen	3
Antecedentes	5
Justificación	10
Planteamiento del problema	11
Hipótesis	12
Objetivos	13
Diseño	14
Población diana	14
Población de estudio	14
Criterios de inclusión	14
Criterios de exclusión	15
Determinación de tamaño de muestra	15
Definición de Variables	16
Material y métodos	18
Análisis estadístico	19
Consideraciones éticas	19
Cronograma de actividades	20
Resultados	21
Discusión	25
Conclusiones	27
Tablas	28
Referencias bibliográficas	33

Subpoblaciones de monocitos en síndrome coronario

RESUMEN

“Comparación de las subpoblaciones de monocitos y su asociación con la respuesta inflamatoria de pacientes con diferentes presentaciones clínicas del síndrome isquémico coronario”

*Claudia Norma Villanueva de La Rosa, **Dra. Alejandra Madrid Miller, ***Dr. Francisco Blanco Favela, *** M en C Luis Chávez Sánchez.

*Residente de Cardiología **División de Investigación en Salud, UMAE Hospital de Cardiología, C.M.N. Siglo XXI., Unidad de Coronaria, Hospital de Cardiología, C.M.N. Siglo XXI.***Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Pediatría, C.M.N. Siglo XXI.

Marco Teórico: La enfermedad aterosclerosa se considera un proceso inflamatorio. Donde los monocitos juegan un papel relevante. Sin embargo, aun no se conoce el papel de las subpoblaciones de monocitos en la respuesta inflamatoria en la enfermedad aterosclerosa, ni su frecuencia en las diferentes presentaciones clínicas de los síndromes isquémicos coronarios. En la disección de la respuesta inmune se ha demostrado que las subpoblaciones de monocitos participan activamente en las enfermedades inflamatorias crónicas; a través de la secreción de citocinas pro-inflamatorias. Por lo que la pregunta es: ¿Cuál es la frecuencia de las diferentes subpoblaciones de monocitos y su asociación con la respuesta inflamatoria en pacientes con las diferentes presentaciones clínicas del síndrome isquémico coronario?

Objetivo: Determinar y comparar la frecuencia de las diferente subpoblaciones de monocitos entre los pacientes con diferentes presentaciones clínicas del síndrome isquémico coronario. Asociar el tipo de subpoblación con la respuesta inflamatoria y la presencia de complicaciones cardiovasculares a corto plazo en cada grupo de pacientes.

Material y Métodos: Se incluirán pacientes que ingresen de forma consecutiva al Hospital de Cardiología, CMN SXXI, con diagnóstico de síndrome isquémico coronario agudo y crónico, así como un grupo de sujetos sanos que acudan a banco de sangre. A partir de sangre periférica se enriquecerán los monocitos totales utilizando optiprep. Se analizaran moléculas de superficie celular: CD14, CD16, CD80, CD86, HLA-DR, CD40 y TLR2 y se determinara la expresión de IL-6, TNF, IFN- γ por citometria de flujo. Análisis estadístico: Análisis univariado de acuerdo a su distribución. El análisis bivariado con t de Student o U de Mann Whitney. Chi cuadrada y rho Sperman. Se considerara un valor de $p \leq 0.05$.

Recursos e infraestructura:

Pacientes: La Unidad de Cuidados Intensivos Cardiovasculares del Hospital de Cardiología, tiene un ingreso mensual promedio de 80 pacientes, de los cuales el 95 % aproximadamente es debido a síndrome coronario agudo. **Recursos físicos y materiales:** La Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Pediatría, CMN SXXI, cuenta con los recursos, equipos y reactivos necesarios para llevar al cabo los experimentos así como el personal capacitado.

Subpoblaciones de monocitos en síndrome coronario

Experiencia del grupo:

El grupo cuenta con más de 50 publicaciones, se le han otorgado diversos apoyos financieros del IMSS y de otras instituciones, ha graduado a diversos estudiantes de posgrado en ciencias en doctorado y maestría, así como, estudiantes de especialidad. El presente proyecto forma parte de una línea de investigación ya establecida.

Tiempo a desarrollarse:

El protocolo se desarrollara en 1 año.

Subpoblaciones de monocitos en síndrome coronario

Antecedentes

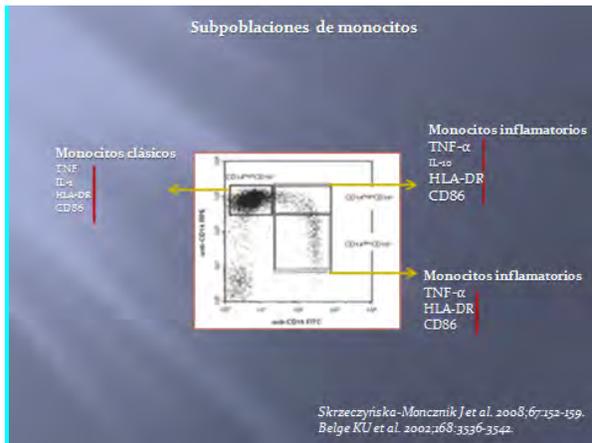
La aterosclerosis es una enfermedad multifactorial, progresiva, que en la actualidad se considera tiene un sustrato inflamatorio crónico [1], y es la causa del 80% de las patologías cardiovasculares, tanto a nivel arterial periférico, cerebrovascular, como arterial coronario. Ésta última tiene su traducción clínica como un síndrome isquémico coronario agudo o crónico, o incluso hasta la muerte. [2].

En México, como en el mundo, las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte en población mayor de 45 años, origina aproximadamente 81,242 muertes por año, de las cuales 60,610 se presentaron en individuos mayores de 65 años y alrededor de 20,631 en individuos en edad productiva, y en personas mayores de 75 años causa el 70% de todas las muertes [3]. Las enfermedades cardiovasculares son más frecuentes en el género masculino que en el femenino, con relación aproximada de 1:10; sin embargo, en mujeres después de los 65 años de edad, se pierde ésta relación y se vuelven tan vulnerables como los hombres. La forma más frecuente de presentación clínica de la enfermedad coronaria en las mujeres es la angina de pecho, mientras que en los hombres se presenta más a menudo en forma de infarto del miocardio [2].

Estudios epidemiológicos han demostrado que los factores de riesgo asociados con enfermedades cardiovasculares son: La dislipidemia, diabetes mellitus, hipertensión arterial sistémica, tabaquismo, síndrome metabólico, obesidad, inactividad física, así como infecciones por microorganismos como *Chlamydia pneumoniae* [4,5]. Entre estos; la dislipidemia, y en particular niveles elevados de colesterol total en suero, las altas concentraciones de lipoproteína de baja densidad (LDL) y bajas concentraciones de lipoproteína de alta densidad, han cobrado importancia como uno de los factores más importantes de riesgo de aterosclerosis [5].

Los monocitos son una población de células mononucleares, representan entre el 5% del total de las células mononucleares. En los humanos, los monocitos se pueden dividir en tres subpoblaciones con base en la expresión de CD14 (coreceptor de LPS) y CD16 (receptor Fc gamma III) [27]. Por lo tanto, tenemos a los monocitos CD14⁺⁺CD16⁻ que representan aproximadamente un 86.3 % \pm 6.8 de los monocitos circulantes; los monocitos CD14⁺⁺CD16⁺ constituyen aproximadamente el 6.3 \pm 2.3, y los CD14⁺CD16⁺⁺ representan un 7.3 \pm 5.1 [28]. Las diferentes subpoblaciones de monocitos también se diferencian en la expresión de otros marcadores de superficie además de CD14 y CD16. La subpoblación de monocitos CD14⁺⁺CD16⁺ y la CD14⁺CD16⁺⁺ expresan niveles más altos de CD80, CD86, HLA-DR que los monocitos CD14⁺⁺CD16⁻, lo que se asocia con una alta capacidad de presentación de antígeno y coestimulación a linfocitos T [29]. Por otro lado, los monocitos CD14⁺⁺CD16⁻ expresan altos niveles de CCR1, CCR2 y CXCR2 y bajos niveles de CX3CR1. Mientras que, los monocitos CD14⁺CD16⁺ expresan altos niveles de CX3CR1 y bajos niveles de CCR2; acorde con la expresión de receptores de quimiocinas los monocitos CD14⁺CD16⁻ migran en respuesta a la MCP-1 y los monocitos CD14⁺CD16⁺ responden a fractalquina [30,31]. Se ha demostrado que los monocitos CD14⁺CD16⁺ producen más citocinas pro-inflamatorias como TNF en comparación con los CD14⁺CD16⁻; también los monocitos CD14⁺CD16⁺ pueden producir niveles bajos de citocinas anti-inflamatorias como IL-10 [32,33].

Subpoblaciones de monocitos en síndrome coronario



Los monocitos CD14^{dim} CD16⁺ presentan un patrón de secreción de citocinas similar a los monocitos CD14⁺CD16⁺ [28].

Los monocitos juegan un papel central en diversas condiciones fisiopatológicas, particularmente en la progresión de enfermedades inflamatorias como lo son la artritis reumatoide, la psoriasis y la aterosclerosis entre otras [27]; siendo esta última enfermedad de especial interés para nuestra investigación. Hasta el momento se tiene poca evidencia de las subpoblaciones de monocitos en la enfermedad cardiovascular.

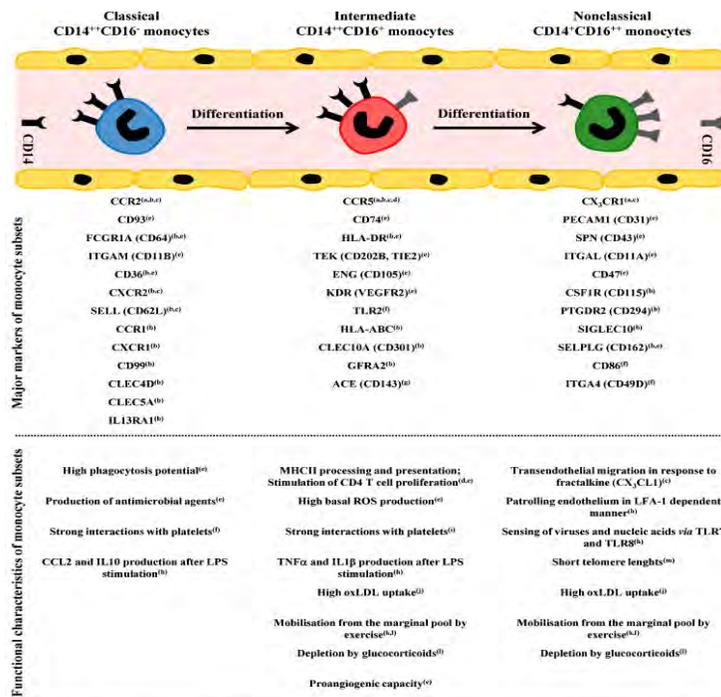
Se ha demostrado en pacientes con diabetes que presentan enfermedad arterial un incremento en el porcentaje de los monocitos CD14⁺CD16⁺ al compararse con los sujetos sanos. Adicionalmente este estudio demuestra una correlación positiva entre los niveles de proteína C reactiva y CD14 [34]. Por otro lado, se ha demostrado que el número de los monocitos CD14⁺CD16⁺ disminuye en pacientes que sufrieron infarto del miocardio. En contraste, los monocitos CD14⁺CD16⁻ incrementan su número después del infarto del miocardio; además este trabajo demostró que después de siete días de recuperación del infarto los monocitos CD14⁺CD16⁻ se asocian negativamente con el evento cardiaco, sugiriendo a la población de monocitos CD14⁺CD16⁻ como un marcador de recuperación del miocardio [35]. Otro estudio, demuestra que el número de monocitos CD14⁺CD16⁺ correlaciona positivamente con los niveles de LDL en plasma y correlaciona negativamente con los niveles de HDL [36]. Por otro lado, nosotros hemos demostrado que la LDLmm activa a monocitos y macrófagos favoreciendo la secreción de citocinas pro-inflamatoria, como TNF- α , IL-1 β e IL-6, asociándose con una actividad proaterogénica [11,12]. Otros estudios han demostrado que los monocitos CD14⁺CD16⁺ provenientes de sujetos hipercolesterolémicos exhiben un alto incremento en la internalización de LDLox a través de CD36. En contraste los monocitos CD14⁺CD16⁻ internalizan preferentemente LDLn. Además, los monocitos CD14⁺CD16⁺ presentan una alta adherencia hacia las células endoteliales en respuesta a LDLn o LDLox [37].

El proceso aterogénico se inicia con la disfunción endotelial que consiste en una pérdida de las funciones homeostáticas del endotelio (anti-adhesiva, anti-agregante, anti-proliferativa, anti-oxidante, anti-trombótica y reguladora del tono vasomotor), e incluyen un aumento de la permeabilidad endotelial a lipoproteínas de baja densidad las cuales son modificadas por

Subpoblaciones de monocitos en síndrome coronario

lipoperoxidación en el espacio subendotelial, iniciando la formación de la placa aterosclerosa [4,5].

Como consecuencia, se observa la expresión de moléculas de adhesión tales como: selectina E, selectina P, molécula de adhesión de plaquetas a células endoteliales-1, molécula de adhesión intercelular-1 y molécula de adhesión de células vasculares (VCAM)-1, las cuales producen la interacción entre los monocitos circulantes con las células endoteliales [17,18]. Adicionalmente, moléculas como la proteína quimiotractante de monocitos (MCP)-1 estimulan la migración de monocitos y acumulación de macrófagos en el sitio de la lesión [19]. En esta etapa de la lesión, las células musculares lisas migran a la placa estimuladas por el factor de crecimiento derivado de plaquetas y el factor de crecimiento de fibroblastos, entre otros estímulos [4,5]. Por otro lado, los monocitos/macrófagos son células efectoras esenciales en la enfermedad aterosclerosa y expresan en la superficie celular receptores “scavenger” los cuales identifican e internalizan las partículas de LDLox, induciendo su activación y transformación en células espumosas promoviendo el desarrollo de la placa aterosclerosa [20].



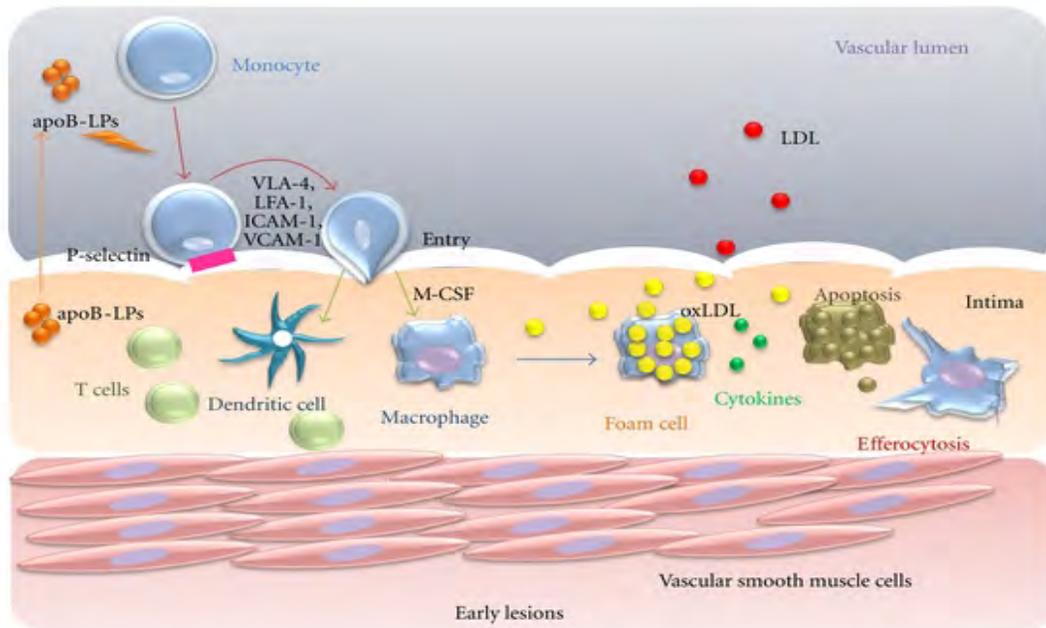
Adam M. Zawada Monocyte heterogeneity in human cardiovascular disease 2012 1273- 1284

En esta etapa de la lesión se genera la placa fibrosa caracterizada por un crecimiento extracelular de lípidos, particularmente colesterol, ésteres de colesterol y matriz derivada de células musculares lisas [4,5]. Los macrófagos activados presentes en la placa, secretan citocinas pro-inflamatorias, entre las que se encuentran interleucina (IL)-1 β , IL-8, TNF- α , factor estimulador de colonias de macrófagos y MCP-1. En etapas avanzadas de la placa aterosclerosa se presenta la muerte celular de macrófagos por la apoptosis o necrosis las cuales pueden ser generadas por la acumulación de lípidos; la muerte celular promueve el avance del núcleo necrótico en la placa. Además, los macrófagos producen citocinas pro-

Subpoblaciones de monocitos en síndrome coronario

inflamatorias como $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ y metaloproteinasas que pueden ser críticos en el daño a la lesión [5]. En la última etapa de la aterosclerosis ocurre la ruptura o ulceración de la placa fibrosa lo que conduce a síndromes como la angina inestable o al infarto de miocardio. La vulnerabilidad de la placa se origina por un adelgazamiento de la lesión y ocurre por inhibición de la secreción de matriz proveniente de células musculares lisas a través de $\text{IFN-}\gamma$ secretado por linfocitos T, así como, la degradación de la matriz de la capa fibrosa por medio de colagenasa, gelatinasa y estromilisina derivadas de macrófagos. La degradación de la capa fibrosa frecuentemente se origina en los hombros de la lesión y puede conducir a una hemorragia, las plaquetas activadas se adhieren a la arteria lesionada ocasionando la formación de un trombo y la oclusión de la arteria [4,6]. Los macrófagos presentes en la placa aterosclerosa se encuentran activados y secretan diversas citocinas proinflamatorias, entre las que se encuentran la IL-6 , $\text{TNF-}\alpha$, factor estimulador de colonias de macrófagos, entre otras [5].

La IL-6 es una citocina pro-inflamatoria multi-funcional, regula la respuesta humoral y celular, participa en el daño tisular y juega un papel central en el proceso inflamatorio [21]. La pueden producir monocitos y macrófagos [12]. Es el principal mediador de la respuesta de fase aguda y de la producción hepática de proteína C reactiva así como de fibrinógeno. La IL-6 también, provoca la migración y diferenciación de macrófagos e induce la síntesis de enzimas degradadoras de matriz extracelular, lo cual puede debilitar la placa aterosclerosa. Además, promueve la expresión de receptores de LDL-colesterol en la superficie de los macrófagos y estimula la proliferación de células musculares lisas, favoreciendo la progresión de la placa [22,23].



Subpoblaciones de monocitos en síndrome coronario

Otra citocina pro-inflamatoria importante es el TNF- α , siendo los monocitos y macrófagos sus principales productores, aunque también es secretado por linfocitos T, células asesinas naturales, células musculares lisas y células endoteliales. El TNF- α ejerce acciones pro-inflamatorias sobre estas células lo que favorece la progresión e inestabilización de la placa aterosclerosa. También estimula la producción de IL-6 en células musculares lisas de la placa, y la expresión de moléculas de adhesión como la selectina-E, ICAM-1, VCAM-1 por células endoteliales y macrófagos. Se ha identificado aumento en la producción de TNF- α por células mononucleares de pacientes después de un infarto agudo del miocardio. Además, la concentración del receptor soluble de TNF también se incrementa rápidamente en estos pacientes [24,25].

Con base en lo anterior, queda de manifiesto que en el desarrollo de la aterosclerosis participan diversos tipos celulares entre los que destacan los monocitos/macrófagos los cuales juegan un papel esencial en la inflamación y en el desarrollo de la placa aterosclerosa [26].

Subpoblaciones de monocitos en síndrome coronario

Justificación

La enfermedad arterial coronaria aterosclerosa en sus diferentes presentaciones clínicas como síndromes isquémicos agudos o crónicos, son la principal causa de muerte, por patología cardiovascular. En la actualidad la enfermedad aterosclerosa se considera un proceso inflamatorio y durante su desarrollo participan diversas estirpes celulares del sistema inmune que incluye a los monocitos que son considerados claves en la respuesta inflamatoria, además; poseen la capacidad de estimular a linfocitos T.

Recientemente se han de mostrado diferencias en la expresión de las subpoblaciones de monocitos en pacientes con enfermedad arterial coronaria crónica y también se ha demostrado un incremento en los monocitos CD14+CD16+ en sujetos con diabetes. Más aún se ha demostrado que la subpoblación CD14+CD16+ tiene la capacidad de inducir respuestas inflamatorias en enfermedades inflamatorias crónicas.

Sin embargo, no se ha estudiado cual es la frecuencia de estas subpoblaciones de monocitos en las diferentes presentaciones clínicas de los síndromes isquémicos coronarios, y que evalúen el tipo de respuesta inflamatoria que cada una de ellas, que sería de relevancia incluso terapéutica.

Subpoblaciones de monocitos en síndrome coronario

Planteamiento del problema

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica y progresiva, en la que participan diferentes estirpes celulares que incluye a las del sistema inmune, de las cuales, los monocitos parecen jugar el papel de mayor relevancia.

¿Cuál es la frecuencia de las diferentes subpoblaciones de monocitos y su asociación con la respuesta inflamatoria en pacientes con las diferentes presentaciones clínicas del síndrome isquémico coronario?

¿Cuál es el tipo de subpoblación de monocitos que se asocia con mayor respuesta inflamatoria en pacientes con síndrome coronario que presentan complicaciones cardiovasculares?

Subpoblaciones de monocitos en síndrome coronario

Hipótesis

1. Las subpoblaciones de monocitos CD14++CD16- serán más frecuentes en los pacientes con síndrome coronario agudo y se asociará a una mayor respuesta inflamatoria, que en los pacientes con cardiopatía isquémica crónica.
2. Los pacientes con síndrome coronario isquémico con subpoblaciones de monocitos CD14++CD16- y respuesta proinflamatoria se asociará con mayor frecuencia de complicaciones cardiovasculares intrahospitalarios.

Subpoblaciones de monocitos en síndrome coronario

Objetivo general

1. Determinar la frecuencia de las subpoblaciones de monocitos y el tipo de respuesta inflamatoria en los pacientes con síndrome isquémico coronario agudo y compararlo con pacientes con síndrome isquémico coronario crónico.
2. Asociar el tipo de subpoblación de monocitos y de respuesta inflamatoria con la presencia de complicaciones cardiovasculares intrahospitalarias en pacientes con síndrome isquémico coronario agudo y crónico.

Objetivos específicos

1. Determinar la distribución de las subpoblaciones de monocitos: CD14+CD16-, CD14+CD16+ y CD14dim CD16+ en pacientes con síndrome isquémico coronario agudo y compararlo con pacientes con síndrome isquémico crónico y sujetos sanos.
2. Determinar el patrón de expresión de las moléculas TLR2, HLA-DR, CD40, CD80, CD86 y distribución de las subpoblaciones de monocitos en los diferentes grupos de pacientes.
3. Determinar la secreción de las citocinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-6 en los monocitos CD14+CD16-, CD14+CD16+ y CD14dim CD16+ en pacientes con síndrome isquémico coronario agudo, crónico y sujetos sanos.
4. Asociar el tipo de subpoblaciones de monocitos y el tipo de respuesta inflamatoria con la presencia de complicaciones cardiovasculares intrahospitalarias, en los pacientes con síndrome isquémico coronario agudo y crónico.

Subpoblaciones de monocitos en síndrome coronario

Diseño del estudio

Transversal, comparativo, prospectivo.

Población Diana:

Pacientes que ingresen al hospital de cardiología de Centro Médico Nacional Siglo XXI con diagnóstico de síndrome coronario agudo o crónico, casos consecutivos con muestreo no probabilístico

Población de estudio:

Se incluirán pacientes consecutivos que ingresen a la UMAE Hospital de Cardiología de Centro Médico Nacional SXXI, con diagnóstico de síndrome isquémico coronario de acuerdo con los criterios de la AHA/ACC, que cumplan con los criterios de selección. Los pacientes con síndrome coronario agudo se incluirán dentro de las primeras 48 horas de iniciados los síntomas en el servicio de Urgencias, para la toma de muestras y los pacientes con angor estable se considerarán la toma de muestra después del cateterismo cardiaco diagnóstico una vez que se demuestre la presencia de lesiones significativas. El grupo de sujetos sanos, se reclutarán de banco de sangre. Ambos grupos serán sometidos a una valoración médica integral por un médico cardiólogo.

Criterios de Inclusión

1. Pacientes de cualquier género.
2. Pacientes con diagnóstico de infarto agudo del miocardio o angina inestable, dentro de las 72 hrs de iniciados los síntomas.
3. El diagnóstico de infarto se considerará con la presencia de elevación de marcadores de necrosis miocárdica como elevación de CPK total mayor al 150% de su valor basal normal o de niveles de troponinas, más 1 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 o negativo 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.
4. Se considerará como angina inestable con 2 de los siguientes criterios:
 - I. 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 hrs a 4 semanas después de un infarto del miocardio. Acompañado o no de síntomas neurovegetativos.
 - II. Cambios electrocardiográficos en el segmento ST y/o en la onda T.
 - III. Ausencia de elevación de marcadores de necrosis miocárdica (CPK total o MB).

Subpoblaciones de monocitos en síndrome coronario

5. Se consideraran pacientes con angor estable:
 - A. Se considerarán pacientes en clase funcional II o III por angina de acuerdo con la clasificación de la Sociedad Cardiovascular Canadiense (CCS)
 - B. Ausencia de datos que sugieran cambios en el patrón de presentación de los eventos de angina al menos en los últimos 2 meses o la presencia de eventos de angor en reposo o presencia de cambios electrocardiográficos en el segmento ST en reposo.
 - C. Pacientes que ingresen a nuestro 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.
6. Firma de consentimiento informado por escrito de su aceptación al presente estudio.

Criterios de exclusión

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.

Criterios de no Inclusión:

1. Negativa a firmar consentimiento informado.
2. Datos de sangrado mayor activo.

Tamaño de la muestra

Se calculo para una diferencia de proporciones de la frecuencia de subpoblaciones de monocitos en pacientes con cardiopatía isquémica crónica (referencia JACC 2012), que presentaron mayor eventos cardiovasculares en su seguimiento, no se cuentan con estudios de esta asociación en pacientes con síndrome isquémico coronario agudo. Se cálculo para un valor de delta de 89, con un poder de la prueba de 0.80 y valor de alfa del 95%, con los que nos da un tamaño de muestra de 26 por grupo. Sin embargo, considerando que no existen estudios en nuestra población a éste respecto se recalculará tamaño de muestra mediante cálculo del poder de la prueba una vez alcanzado el número de pacientes.

Subpoblaciones de monocitos en síndrome coronario

Variables

Definición de variables:

Grupos de estudio:

- I. pacientes con síndrome coronario agudo
- II. pacientes con angor estable
- III. sujetos sanos.

Definición conceptual: Los pacientes con síndrome coronario agudo 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 paciente con angor 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 considera que un sujeto sano a la ausencia de enfermedad o estado patológico alguno.

Definición operativa: se considera pacientes con síndrome coronario agudo 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. Se considerara pacientes con angor 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. Se considera a sujetos sanos a aquellos en quienes de descarte la presencia de signos o síntomas de isquemia miocárdica, enfermedad inflamatoria crónica, neoplásica o infecciosa.

Tipo de variable: nominal

Escala de medición: grupo I, grupo II y grupo III

Citocinas pro-inflamatorias:

Definición conceptual: Citocina pro-inflamatoria es un proteína producida por células activadas, participando en la inducción, expresión y regulación de otras moléculas inflamatorias.

Definición operacional: Se consideran citocinas pro-inflamatorias la IL-6, TNF- α e IFN- γ se realizaran mediciones de proteína intracelularmente mediante citometría de flujo.

Escala de medición: Variable de razón.

Tipo de Variable: Cuantitativa continúa.

Subpoblaciones de monocitos en síndrome coronario

Moléculas coestimuladoras: CD80, CD86, HLA-DR y CD40.

Definición conceptual: CD80 y CD86 es una molécula de superficie celular presente en células presentadoras de antígenos. Proporciona un estímulo 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 T. CD40 es una proteína de superficie celular que provoca una mayor expresión de moléculas coestimuladoras.

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

Escala de medición: Variable de razón.

Tipo de variable: Cuantitativa continua.

TLR2

Definición conceptual: Receptor tipo Toll reconoce una variedad de patrones moleculares asociados a patógenos.

Definición operacional: Se realizarán mediciones de la proteína de superficie celular mediante citometría de flujo.

Escala de medición: Variable de razón.

Tipo de variable: Cuantitativa continua.

Molécula CD14

Definición conceptual: CD14 glicoproteína anclada en la membrana celular, reconoce al LPS.

Definición operacional: Se realizarán mediciones de la proteína de superficie celular mediante citometría de flujo.

Escala de medición: Variable de razón.

Tipo de variable: Cuantitativa continua.

Molécula CD16

Definición conceptual: CD16 receptor de receptor Fc gamma III.

Definición operacional: Se realizarán mediciones de la proteína de superficie celular mediante citometría de flujo.

Escala de medición: Variable de razón.

Tipo de variable: Cuantitativa continua.

Complicaciones cardiovasculares.

Definición conceptual: se considerarán la presencia o recurrencia de eventos isquémicos sea angina o reinfarto, falla ventricular izquierda, necesidad de procedimientos urgentes de revascularización o incluso la muerte cardiovascular.

Definición operacional: Se considerarán la presencia de complicaciones cardiovasculares durante su estancia intra-hospitalaria.

Escala de medición: cualitativa, nominal

Categorías: presente o ausente

Subpoblaciones de monocitos en síndrome coronario

Métodos

Toma de muestras de sangre

La muestra sanguínea se obtendrá de vía venosa para los donadores sanos y a partir de catéter periférico para los pacientes, previa asepsia y antisepsia, se obtendrá un volumen de 20 ml de sangre venosa en tubos que contienen 1000 U heparina por ml de sangre. En caso de no contar con catéter periférico se realizará punción de vena periférica.

Obtención de monocitos

La obtención de los monocitos se realizará de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Brevemente; 20 ml de sangre heparinizada se centrifugará a 2000 rpm 20 min, se recuperará la capa de leucocitos. Posteriormente, se ajustará su densidad con optiprep (Axis-Shield, Liverpool, UK) y se realizará un gradiente de densidad que consiste en: 2 ml de la sangre más 3 ml de la densidad de 1.085 y finalmente se colocarán 4 ml de la densidad de 1.065 y se centrifugarán a 2700 rpm 15 min, se recuperará el anillo superior que corresponde a monocitos. Adicionalmente, se recuperará la banda a una densidad de 1.085 que corresponde a linfocitos T y B. Las células se lavarán 2 veces con PBS 1X, el paquete recuperado se resuspenderá en 2 ml de medio RPMI 10% de suero fetal bovino (SFB) (Invitrogen Carlsbad, CA).

Determinación de marcadores de superficie celular por citometría de flujo

Para la identificación de las subpoblaciones de monocitos se usarán los anticuerpos anti-humanos anti-CD14-APC y anti-CD16-FITC (eBioscience). Además, se añadirán los anticuerpos anti-CD80-PECy5, anti-CD86-PE, anti-CD40-PECy5, anti-HLA-DR-PE y anti-TLR2-FITC (eBioscience), los monocitos se incubarán 20 min a 4°C en oscuridad, posteriormente se lavarán con PBS-BSA- Na₃N 0.2% pH=7.4 y se fijarán con 35 µL de PBS p-formaldehído 1%, para su análisis en el citómetro de flujo FASC Calibur (BD Biosciences, San Jose, California, USA). Se realizarán las mediciones en células frescas y de cultivo celular.

Determinación de citocinas intracelulares por citometría de flujo

A los monocitos y linfocitos T, 10 horas antes de su cosecha se le añadirá 0.2 µL de Golgi Plug (BD Biosciences) por pozo; después los monocitos se tñerán con los anticuerpos anti-CD14-APC y anti-CD16-FITC. En otro ensayo los linfocitos T se tñerán con anticuerpo anti-CD4-FITC. Los monocitos y linfocitos se incubarán 20 min en oscuridad. Posteriormente se lavarán dos veces y se fijarán con paraformaldehído. Ambos tipos celulares se lavarán dos veces con Perma/Wash™ (BD Biosciences) y se añadirán 100 µL de la solución Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) por 20 min a 4°C en oscuridad. A los monocitos se les añadirán los anticuerpos monoclonales anti-humanos anti-IL-6-PE (eBioscience), anti-TNF-α-PE (eBioscience) y a los linfocitos T se les añadirá anti-IFN-γ-PE (BD Biosciences), las células se incubarán 20 min a 4°C en oscuridad, terminando la incubación se lavarán las células y se resuspenden en 350 µL de regulador para su análisis en el citómetro de flujo FASC Calibur (BD Biosciences).

Subpoblaciones de monocitos en síndrome coronario

Análisis estadístico

Análisis univariado de las variables continuas se describirán de acuerdo a su distribución (promedio \pm desviación estándar, mediana y percentiles). Las características demográficas de la población se expresarán en porcentaje de frecuencia. Para el análisis bivariado de variables continuas y comparación de grupos de pacientes se emplearán t de Student o U de Mann Whitney. Para la comparación de variables cualitativas se empleará Chi 2 o prueba exacta de Fisher de acuerdo con valores esperados. Para la comparación de variables cuantitativas entre grupos se empleará ANOVA o Kruskal Wallis de acuerdo con la distribución de los datos y homogeneidad de varianzas. Se considerará un valor de $p \leq 0.05$.

Recursos, financiamiento y factibilidad

Pacientes: La Unidad de Cuidados Intensivos Cardiovasculares del Hospital de Cardiología, tiene un ingreso mensual promedio de 80 pacientes, de los cuales el 95 % aproximadamente es debido a síndrome coronario agudo.

Recursos físicos y materiales: La Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Pediatría, CMN SXXI, cuenta con los recursos, equipo y reactivos necesarios para llevar al cabo los experimentos así como el personal capacitado.

Consideraciones éticas

El protocolo de investigación será sometido a la evaluación por el Comité de Nacional de Investigación en Salud.

El procedimiento que se hará es la obtención de sangre venosa periférica mediante punción de una vena antecubital superficial, y el riesgo del estudio se considera como mínimo de acuerdo con la Ley General de Salud. De cualquier forma, considerando que se incluirá un grupo de pacientes con síndrome coronario agudo, y que algunos de ellos pudieran estar recibiendo triple esquema antiagregante plaquetario o haber sido sometidos a trombólisis, pudiera aumentar el riesgo de que se presente hematoma en el sitio de punción o sangrados, que se catalogan como sangrados menores, esto es no tienen repercusión hemodinámica en paciente.

A todos los pacientes y sujetos sanos se les explicará detalladamente el procedimiento que se les realizará, los riesgos, las posibles complicaciones y lo que representa para su enfermedad, por lo que en acuerdo con ello se les solicitará firma en una hoja de consentimiento informado, para incluirse en el estudio (anexo de hoja de consentimiento informado).

Subpoblaciones de monocitos en síndrome coronario

Cronograma de actividades

	2°.	1er	2° Sem 2012			1er
	Sem 2011	Sem 2012				Sem 2013
	Nov/ Dic	Ene/ jul	Agos/Oct	Nov	Dic	Ene
Elaboración proyecto y Evaluación por Comité de Ética e Investigación						
Captación de pacientes						
Determinaciones de subpoblaciones de monocitos						
Análisis de resultados						
Tesis						
Difusión						

Subpoblaciones de monocitos en síndrome coronario

Resultados

En el estudio se incluyeron 46 pacientes, 20 de ellos con diagnóstico de SICA con elevación del segmento ST (grupo 1), 7 del grupo de SICA sin elevación del segmento ST (grupo 2), y 12 del grupo de cardiopatía isquémica crónica (grupo 3), 7 sujetos sanos.

La mediana de edad de los pacientes fue: para el grupo 1 de 62.45 años (46 - 96), para el grupo 2 de 62.0 años (52 -76), de 64.33 años (54 -79) en el grupo 3 y de 29 años para el grupo de sujetos sanos.

La distribución por género, mostró predominio del masculino en el grupo 1 (19 vs 1 femenino) y en el grupo 3 (10 vs 2), no así en el grupo 2 (4 hombres vs 3 mujeres).

En cuanto a los factores de riesgo cardiovascular se encontró mayor frecuencia de diabéticos y antecedente de tabaquismo en el grupo 2, la dislipidemia fue más frecuente en el grupo 3 y la hipertensión predominó en los pacientes del grupo 1. Tanto la obesidad, como la hipertensión arterial sistémica, fueron los factores de riesgo que se presentaron con mayor frecuencia en los 3 grupos. (en la tabla 1 se muestran características demográficas en la población).

La localización electroanatómica más frecuente fue en la cara anterior en los 3 grupos (10 en el grupo 1, 6 para el grupo 2, y 3 en el grupo 3)

Del total de 39 pacientes a 34 se les realizó un estudio angiográfico de arterias coronarias siendo más frecuente la enfermedad ateromatosa de múltiples vasos, 10 pacientes en el grupo 1, 5 en el grupo 2 y 4 en el grupo 3.

Se encontró que la fracción de expulsión se mantuvo similar entre los grupos.

Se observó que en el grupo 2 hubo una mayor frecuencia de complicaciones como isquemia recurrente falla ventricular izquierda, choque y muerte.

El recuento de los leucocitos totales fue mayor en el grupo 1 con una mediana de 10000 (4740 – 15800) y el de los monocitos totales fue similar en los 3 grupos (grupo 1: 655 rangos 220 -1870, grupo 2: 690 rangos 520-1270 y grupo 3: 500 rangos 320 -1180).

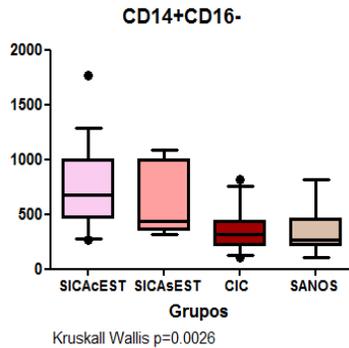
No se encontró asociación significativa entre las concentraciones entre CPK y fracción MB en las diferentes subpoblaciones en los pacientes con SICA, pero hubo una tendencia a presentar relación inversa entre las concentraciones de CPK total con la subpoblación de patrón intermedio.

Observamos que el recuento celular de monocitos CD14++ CD16– (patrón clásico) fue significativamente mayor en los pacientes que con SICA con elevación del segmento ST (grupo 1) y sin elevación del ST (grupo 2), con una mediana de 669 (256-1771) y 449 (314 – 1086) respectivamente, y menor el grupo de pacientes con cardiopatía crónica (grupo 3 con mediana de 266 [105 -812]), así como en sujetos sanos, $p= 0.0026$. (**gráfico 1**).

Subpoblaciones de monocitos en síndrome coronario

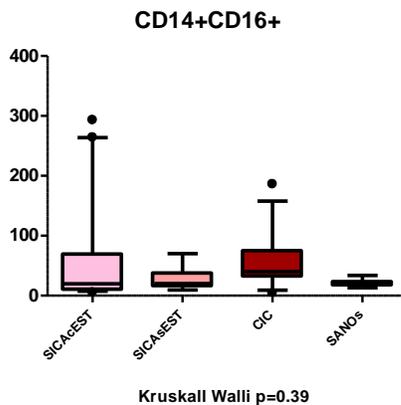
GRAFICO 1.0

Monocitos CD14 ++ y CD16 – en SICA cest SICA sest y CIC.



La cuantía de la subpoblación de monocitos con patrón CD14++ CD16+ (patrón intermedio) fue similar entre los grupos de pacientes con SICA [(mediana de 19.89 (5.5 - 293) en el grupo 1; 20.0 (9.46 - 70.3) en el grupo 2], no hubo diferencias estadísticamente significativa con respecto al grupo 3 [mediana de 40.0 (3.9 - 186.24)] y grupo 4 [mediana 18.1(13.14 -33.9)]. (**Gráfico 2**)

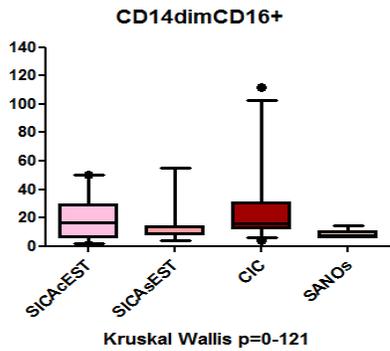
GRAFICO 2.0 subpoblacion de monocitos CD14 ++ 16 +.



La subpoblación de monocitos CD14+ CD16++ (no clásico) fue similar en cantidad en pacientes con SICA con elevación del segmento ST [mediana 16.4 (1.02 - 2757)], que en los pacientes del grupo 3 [mediana 15 (3.7 - 112)], en el grupo 2 las frecuencia fue menor [mediana de 13.5 (7.5 - 54.7)], así como, en los sujetos sanos [mediana de 7.36 (6.12 -82)] (p =NS), esto último probablemente debido al tamaño de muestra reducido.

Subpoblaciones de monocitos en síndrome coronario

GRAFICO 3.0 subpoblación de monocitos CD 14 dim CD16+

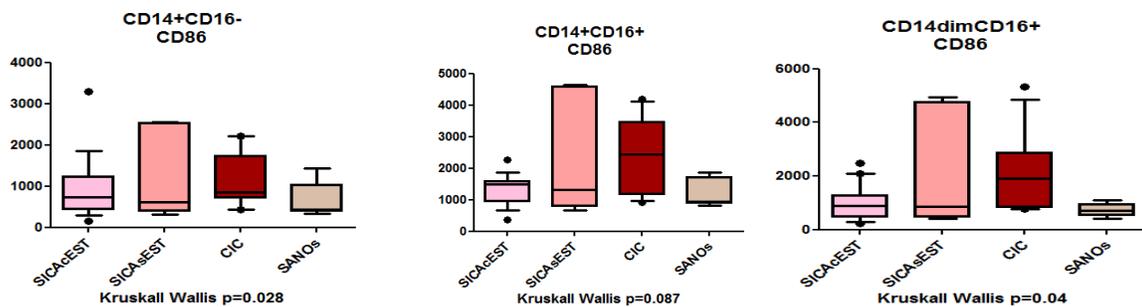


Se estudió también la molécula CD86 en las diferentes subpoblaciones de monocitos, la expresión en la subpoblación con patrón clásico, en el grupo 1 se encontró con valores de: mediana 731 (150 – 3291); en el grupo 2: mediana 612 (314 – 2563) en el grupo 3: mediana 855 (424 – 2216) predominando en este último; y en el grupo 4 una mediana 429 (331 – 1424). En la subpoblación de patrón intermedio la expresión de CD86 fueron los siguientes en el grupo 1: mediana 1490 (374 – 2278); en el grupo 2 mediana 1311 (670 – 4634); en el grupo 3 mediana 2445 (921 – 4190) mostrando nuevamente un predominio en este grupo; y en el grupo 4 : mediana de 951 (820 -1864).

Finalmente la expresión de CD86 en la subpoblación de patrón no clásico mostró una frecuencia mayor en los pacientes con cardiopatía isquémica crónica con una mediana 1922 (771 – 5339), en el grupo 1, la mediana de 902 (216-2482) ; en el grupo 2 la mediana de 862 (400- 4944) ; el grupo 4 : mediana de 751 (398 -1086).

GRAFICO 4.0

Comportamiento de CD 86 en las 3 subpoblaciones de monocitos en los diferentes grupos



Subpoblaciones de monocitos en síndrome coronario

Se realizó un análisis del comportamiento de las subpoblaciones de monocitos en relación con los factores de riesgo cardiovascular como diabetes mellitus siendo mayor la subpoblación de monocitos con patrón clásico en el grupo de pacientes con SICA cEST ($p = 0.0025$) (monocitos con patrón clásico: 368.7 (105-1771); patrón intermedio: 34.76 (9.46-293); patrón no clásico: 21.72 (6.12 -112))

En el grupo de pacientes con dislipidemia se encontró un aumento de la frecuencia de la subpoblación de monocitos con patrón clásico en el grupo 1 aunque en comparación con los no dislipidémicos existió un predominio de esta subpoblación. (Monocitos con patrón clásico : 449 (105- 1086); patrón intermedio: 28.58 (5.53-186.8); patrón no clásico:14 (1.02 112)).

El análisis del comportamiento de las subpoblaciones de monocitos en relación con la fracción de expulsión mostró un aumento de la población con patrón intermedio en el grupo con cardiopatía isquémica crónica. (FEVI > 50 % : monocitos con patrón clásico con una mediana de 416.2 (161.9- 1232); patrón intermedio mediana de 29.75 (3.9- 92.1); patrón no clásico mediana de 14.2 (1.7 -32.25); FEVI 40 -49 % : monocitos con patrón clásico con mediana de 629.24 (220.84 -1162); patrón intermedio, 20 (7.42 -186.2); patrón no clásico mediana de 14 (5.62 -112); FEVI 30-39 % : monocitos con patrón clásico con una mediana de 589.34 (217- 1086), patrón intermedio, mediana de 52 (33.8- 264), patrón no clásico una mediana de 15.76 (11.10 -29.41), sin embargo, la diferencia no fue estadísticamente significativa.

Así mismo se realizó un análisis de la molécula CD 86 en las 3 subpoblaciones de monocitos y la fracción de expulsión: FEVI > 50 % : monocitos con patrón clásico con una mediana de 735 (314-1862), patrón intermedio, 1450 (675-1871), patrón no clásico una mediana 784 (360-1107), FEVI 40-49 % : monocitos con patrón clásico con mediana de 612 (292- 2524), patrón intermedio mediana de 1212 (670- 4634), patrón no clásico una mediana de 1139 (455 - 4944); FEVI 30-39 % : monocitos con patrón clásico con una mediana 664.5 (150-1224), patrón intermedio, mediana de 1642 (374- 3788); patrón no clásico con mediana 1061 (216- 2482). Aun cuando, se observó una tendencia asociarse la FEVI más deteriorada con mayor frecuencia de la subpoblación de monocitos con patrón intermedio y no clásico, no hubo diferencias estadísticamente significativas.

El análisis de subpoblaciones de monocitos y la relación con el número de vasos afectados mostró que existe una mayor frecuencia de presentación de la subpoblación de patrón clásico en la enfermedad ateromatosa 1, 2 y 3 vasos con predominio de frecuencia en la enfermedad de 2 vasos. (afección de 1 vaso : monocitos con patrón clásico con un valor mediana de 353 (217 -1162), patrón intermedio, mediana de 30 (12.7- 46), patrón no clásico una mediana de 11 (3.75 - 32.25), afección de 2 vasos : monocitos con patrón clásico con un valor de mediana de 673 (161 - 1086), patrón intermedio (mediana de 53 (3.9-264), patrón no clásico una mediana de 17.7 (8.7 -29.41), afección de 3 vasos : monocitos con patrón clásico con un valor mediana de 449 (105- 1771), patrón intermedio mediana de 24.5(5.53- 293), patrón no clásico una mediana de 15 (1.02 -54.72), sanos : monocitos con patrón clásico con una mediana de 458 (220-961), patrón intermedio con mediana de 31 (13- 91), patrón no clásico una mediana de 16.3 (1.7- 24.55), $p=NS$

Subpoblaciones de monocitos en síndrome coronario

Discusión

Nuestro estudio mostró un aumento en la frecuencia de los monocitos con patrón clásico en los síndromes coronarios agudos, así como se describe en la literatura en el artículo de Tsujioka H. et al (38), en el que se asoció a esta subpoblación en la fase aguda del infarto del miocardio, en estadios diferentes, en determinaciones seriadas y se observó que esta subpoblación de monocitos es la predominante en SICA. En forma similar Shantsili y Lip G, en un estudio transversal, reportó que la subpoblación CD14++CD16- fue la predominante en pacientes con infarto agudo del miocardio. Los que se considera que este patrón se asocia a una fase aguda de la respuesta inflamatoria en la que existe un proceso de destrucción, aumento de la fagocitosis, liberación de citocinas y procesos de reparación aguda y neovascularización.

Por otro lado, Tsujioka H. et al.(38), al intentar asociar las 3 subpoblaciones de monocitos con los factores de riesgo cardiovascular tradicionales, no se evidenció diferencias estadísticamente significativas, a diferencia de lo que nosotros encontramos que si hubo un recuento mayor de la subpoblación con patrón clásico en los pacientes con diabetes mellitus. Consideramos que esto fue debido a que en nuestro estudio predominó la frecuencia de pacientes con Diabetes mellitus y que pese a el tamaño de muestra existieron diferencias significativas entre los grupos.

En aquellos pacientes no dislipidemicos el recuento de monocitos con patrón clásico fue más frecuente aunque hubo una tendencia sin embargo no existió diferencia estadísticamente significativa similar a lo que se encontró en la publicación de Tsujioka H et al (38). Al parecer distintos parámetros asociados al metabolismo lipídico, consumo de hipolipemiantes y la heterogeneidad de los monocitos parecen interactuar, así mismo, el ajuste en el índice de masa corporal se ha relacionado con el recuento total de células de otras subpoblaciones (patrón no clásico) en el estudio I LIKE HOME aunque tampoco se asoció con las subpoblaciones con patrón intermedio y no clásico.

En relación a las complicaciones cardiovasculares, en nuestro estudio se observó una tendencia de la frecuencia de la subpoblación con patrón clásico en estos pacientes a diferencia de lo encontrado en el estudio de Kyrill S. Rogacev et al (39) en el que se reportó una asociación de los monocitos con patrón intermedio asociados a eventos cardiovasculares como un factor predictor. Cabe mencionar que en este estudio la población en estudio confirió a los pacientes con angina estable programados para estudio angiográfico de coronarias que presentaron durante su seguimiento recurrencia de eventos cardiovasculares. Aunque estos hallazgos se encuentran en contraposición con un segundo estudio de cohorte sueco donde Berg et al (2012) en análisis univariados los recuentos celulares de las 3 subpoblaciones de monocitos fueron altos tanto en los casos como controles y posterior al ajuste de los confusores la subpoblación de monocitos con patrón clásico se asociaron como predictores de eventos cardiovasculares, aunque se reportaron que las diferencias podrían deberse a la técnica de procesamiento de las muestras, ya que en estos últimos, las muestras fueron congeladas antes de su lectura.

En el análisis de la molécula CD86 predominó su frecuencia en los pacientes con cardiopatía isquémica crónica no así en los pacientes con SICA siendo esta una molécula

Subpoblaciones de monocitos en síndrome coronario

por excelencia co-estimuladora de otras moléculas que participan en los procesos de inflamación. En el estudio de Tapp et al se evidenció la limitación de la falta de un marcador de monocitos como CD86 o HLADR ya que en este estudio solo se encontraron características dinámicas y funcionales de los monocitos de patrón intermedio en pacientes con SICA ceST, observándose un incremento dramático en estos pacientes en relación con los grupos control mientras que no se observaron diferencias entre los monocitos de patrón no clásico.

Análisis de las subpoblaciones de macrófagos proinflamatorios (CD86 + fuera de F4/80 +) revelaron un cambio en el radio inicial de las subpoblaciones reparativas/ proinflamatorias (0.85) a favor de las subpoblaciones reparativas 4 días después de la inducción de IAM en ratones y la inyección de liposomas.

Aunque en el momento no tenemos el análisis de otras moléculas probablemente se observará la asociación con el tipo de respuesta inflamatoria y su asociación en el contexto clínico.

Subpoblaciones de monocitos en síndrome coronario

Conclusiones

La frecuencia de presentación de la subpoblación de monocitos con patrón clásico fue mayor en el grupo de SICA con elevación del segmento ST.

La subpoblación de monocitos con patrón intermedio tuvo una mayor frecuencia de presentación en los pacientes con cardiopatía isquémica crónica.

La frecuencia de monocitos con patrón no clásico fue similar en los 3 grupos .

La frecuencia de expresión de CD 86 en la subpoblaciones fue mayor de monocitos patrón clásico y no clásico fue significativamente menor en el grupo de sujeto sano en comparación con pacientes con cardiopatía isquémica.

En sujetos sanos las subpoblaciones de monocitos mostraron una frecuencia mayor de la subpoblación con patrón clásico.

Se presentaron complicaciones cardiovasculares con mayor frecuencia en el grupo de Síndrome coronario agudo sin elevación del segmento hubo una tendencia a asociarse a un incremento en la frecuencia de la subpoblación con patrón clásico aunque sin diferencias significativas.

La expresión de CD 86 en la subpoblaciones de monocitos patrón intermedio fue mayor en el grupo de cardiopatía isquémica crónica.

Predominó la subpoblación de monocitos con patrón no clásico en los pacientes diabéticos con cardiopatía isquémica en comparación con los no diabéticos.

La expresión de CD86 en la subpoblación de monocitos con patrón clásico predominó en los pacientes diabéticos en comparación con los no diabéticos.

TABLAS

TABLA 1.1
CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS.

	SICA cEST (n=20)	SICA sEST (n=7)	CIC (n=12)
EDAD años Mediana (rangos)	62.45 (46- 96)	62.00 (52-76)	64 (54 - 79)
GENERO			
MASCULINO	19	4	10
FEMENINO	1	3	2
DM2	8	5	4
HAS	15	6	7
DLP	9	4	8
TAB	10	5	6
OB	5	1	3
Angor previo	7	4	11
IM previo	4	2	5

p= NS

TABLA 1.2
LOCALIZACION ELECTROCARDIOGRAFICA,
NUMERO DE VASOS AFECTADOS Y FEVI %

ECG Localización cambios	SICA cEST (n=20)	SICA sEST (n=7)	CIC (n=12)
ANTERIOR	10	6	3
INFERIOR	8	1	2
LATERAL	2	0	0
ENFERMEDAD CORONARIA (CTT n=34)			
• 1 VASO	3	0	3
• 2 VASOS	3	1	2
• 3 VASOS	10	5	4
• TCI	0	3	0
FEVI (%)	48 (35-80)	44 (35-50)	49 (30-75)

TABLA 1.3
TRATAMIENTO FARMACOLOGICO

	SICA cEST (n=20)	SICA sEST (n=7)	CIC (n=12)
ASA	18	7	12
CLOPIDOGREL	17	7	9
HBPM	16	7	9
BB	10	6	9
HNFRACC	10	4	5
IECA	14	5	9
ESTATINA	18	7	11
FIBRATO	2	-	-
INHIB IIB IIA	3	0	1
INOTROPICOS	2	4	3
ANTIINFLAM	-	2*	-

*Recibieron dosis única de diclofenaco en HGZ y domicilio

TABLA 1.4
COMPLICACIONES

	SICA cEST (n=20)	SICA sEST (n=7)	CIC (n=12)
ISQUEMIA RECURRENTE	1	2	1
FALLA VENTRICULAR	1	2	2
CHOQUE	1	1	1
MUERTE	-	1	-
Necesidad RVM urgente	1	0	0

TABLA 1.5
PARAMETROS LABORATORIALES

	SICA cEST (n=20)	SICA sEST (n=7)	CIC (n=12)
CK	454 (94-7325)	267 (48 -458)	111 (19-155)
CKMB	38 (14- 938)	26.75 (12.4 – 81.4)	15.2 (12.4 – 11.6)
HGB	15.2 (10.7 - 17)	13.1 (11.5 - 14.8)	14.2 (12.4, 16.8)
LEU	10.900(4.740, 15.800)	8.200 (6000, 20.800)	6.800 (4.400 , 10.400)
MON	655 (220- 1870)	690 (520- 1270)	500 (320, 1180)

TABLA 1.6
SUBPOBLACIONES DE MONOCITOS Y CD 86

	SICA cEST (n=20)	SICA sEST (n=7)	CIC (n=12)	SANOS (n= 7)
CD861	731 (150-3291)	612 (314- 2563)	855 (424-2216)	429 (331-1424)
CD862	1490 (374- 2278)	1311 (670- 4634)	2445 (921- 4190)	951 ((820- 1864)
CD 863	902 (216-2482)	862 (400-4944)	1922 (771-5339)	715 (398- 1086)
CD 14++CD16-	669 (256-1771)	449 (314 - 1086)	316 (105-812)	266 (105 – 812)
CD14++ CD16+	19.89 (5.53- 293)	20.0 (9.46 - 70.30)	40.0 (3.90 - 186.24)	18.1 (13.14 - 33.9)
CD14 +CD16++	16.4 (1.02- 2757)	13.5(7.51 - 54.72)	15 .0(3.75 - 112)	7.36 (6.12 - 82.0)

Subpoblaciones de monocitos en síndrome coronario

TABLA 1.7
SUBPOBLACIONES DE MONOCITOS Y FACTORES
DE RIESGO CARDIOVASCULAR

	NO DM	DM	NO DLP	DLP	NO TAB	TAB	NO HAS	HAS	NO OBS	OBS
CD 14++ CD16-	368.7 (105-1232)	464 (256-1771)	678 (161-1771)	449 (105-1086)	464 (161-1771)	459.8 (105-1232)	564.4 (161.9-1162)	461.3 (105-1771)	471.3 0 (161.9-1771)	409.9 (105-1086)
CD14++ CD16+	28.62 (3.9-92.7)	34.76 (9.46-293)	30.92 (3.9-293)	28.58 (5.53-186.8)	28.62 (3.9-293)	30.92 (5.53-264)	29.77 (3.90-186.2)	29.81 (5.53-293)	31.14 (3.9-293)	24.93 (7.42-264)
CD14+ CD16++	11.1 (1.02-32.25)	21.72 (6.12-112)	16.36 (1.70-54.72)	14 (1.02-112)	15 (1.7-49.9)	13.5 (1.02-112)	12.83 (3.75-112)	15 (1.02-54.72)	15.05 (1.02-112)	10.05 (1.70-29.41)

TABLA 1.8
SUBPOBLACIONES DE MONOCITOS Y FEVI

	FEVI % > 50	FEVI (40 -49)	FEVI (30-39)
CD 14++CD16-	416 .20 (161.9-1232)	629.24 (220.84-1162)	589.34 (217-1086)
CD14++CD16+	29.75 (3.90-92.10)	20 (7.42-186.20)	52 (33.80 -264)
CD14+CD16++	14.22 (1.7 -32.25)	14 (5.62 -112)	15.76 (11.10-29.41)

Subpoblaciones de monocitos en síndrome coronario

TABLA 1.9
SUBPOBLACIONES DE MONOCITOS , FEVI Y CD86

	FEVI % > 50	FEVI (40 -49)	FEVI (30-39)
CD86_1	735 (314 -1862)	612 (292 -2524)	664.5 (150-1224)
CD86_2	1450 (675 -1871)	1212 (670-4634)	1642 (374 -3788)
CD86_3	784 (360 -1107)	1139 (455 -4944)	1061 (216 -2482)

TABLA 1.10
SUBPOBLACIONES DE MONOCITOS Y NÚMERO DE VASOS AFECTADOS

	1 VASO	2 VASOS	3 VASOS	SANOS
CD 14++CD16-	353 (217-1162)	673 (161-1086)	449 (105-1771)	458 (220-961)
CD14++CD16+	30 (12.7 -46.21)	53 (3.9-264)	24.5 (5.53-293)	31 (13-91)
CD14+CD16++	11(3.75 -32.25)	17.7(8.7 -29.41)	15 (1.02-54.72)	16.3 (1.7-24.55)

TABLA 1.11
SUBPOBLACIONES DE MONOCITOS DIABETES MELLITUS Y CD 86

	NO DM CD86	DM CD86
CD 14++CD16-	744 (292-3291)	841 (150 -2563)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nicoletti A, Caligiuri G, Hansson K. Immunomodulation of atherosclerosis: myth and reality. *J Intern Med.* 2000;247:397-495.
2. Ruesga Zamora EA. *Cardiología.* 1a Ed. El Manual Moderno. México. 2005:535-540.
3. <http://inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estaadisticas/2006/muertos06.pdf>
4. Ross R. Mechanisms of disease. *New Engl J Med* 1999;340:115-126.
5. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420:868-874.
6. Segrest PJ, Jones MK, Hans De Loof, Dashti N. 2001. Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. *J Lipid Res* 42:1346-1367.
7. Jeon H, Blacklow SC. 2005. Structure and physiologic function of the low density lipoprotein receptor. *Annu Rev Biochem* 74:535-562.
8. Ylä-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Carew TE, Butler S, Witztum JL, Steinberg D. 1989. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest* 84:1086-1095.
9. Steinberg D. 1997. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation* 95:1062-1071.
10. Carpenter KL, Challis IR, Arends MJ. 2003. Mildly oxidised LDL induces more macrophage death than moderately oxidised LDL: roles of peroxidation, lipoprotein-associated phospholipase A2 and PPARgamma. *FEBS Lett* 553:145-50.
11. Chávez-Sánchez L, Madrid-Miller A, Chávez-Rueda K, Legorreta-Haquet MV, Tesoro-Cruz E, Blanco-Favela F. Activation of TLR2 and TLR4 by minimally modified low-density lipoprotein in human macrophages and monocytes triggers the inflammatory response. *Hum Immunol.* 2010 Aug;71(8):737-44.
12. Chávez-Sánchez L, Chávez-Rueda K, Legorreta-Haquet MV, Zenteno E, Ledesma-Soto Y, Montoya-Díaz E, Tesoro-Cruz E, Madrid-Miller A, Blanco-Favela F. The activation of CD14, TLR4, and TLR2 by mmLDL induces IL-1 β , IL-6, and IL-10 secretion in human monocytes and macrophages. *Lipids Health Dis.* 2010 Oct 14;9:117.
13. Miller YI, Viriyakosol S, Worrall DS, Boullier A, Butler S, Witztum JL. Toll-like receptor 4-dependent and -independent cytokine secretion induced by minimally oxidized low-density lipoprotein in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 Jun;25(6):1213-9.
14. Bae YS, Lee JH, Choi SH, Kim S, Almazan F, Witztum JL, Miller YI. Macrophages generate reactive oxygen species in response to minimally oxidized low-density lipoprotein: toll-like receptor 4- and spleen tyrosine kinase-dependent activation of NADPH oxidase 2. *Circ Res.* 2009 Jan 30;104(2):210-8, 21p.
15. Miller YI, Choi SH, Fang L, Harkewicz R. Toll-like receptor-4 and lipoprotein accumulation in macrophages. *Trends Cardiovasc Med.* 2009 Oct;19(7):227-32.
16. Morgan J, Leake D. Oxidation of low density lipoprotein by iron or copper at acidic pH. *J Lipid Res* 1995;36:2504-2512.

17. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Rev Immunol* 2007;7:678-689.
18. Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJ. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol* 1993;171:223-229.
19. Lucas A, Greaves RD. 2001. Atherosclerosis: role of chemokines and macrophages. *Expert Rev Mol Med* 5:1-18.
20. Dieckmann M, Dietrich MF, Herz J. Lipoprotein receptors--an evolutionarily ancient multifunctional receptor family. *Biol Chem*. 2010 Nov;391(11):1341-63.
21. Putoczki T, Ernst M. More than a sidekick: the IL-6 family cytokine IL-11 links inflammation to cancer. *J Leukoc Biol*. 2010 Dec;88(6):1109-17.
22. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. 2003. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signaling and its regulation. *Biochem J* 374:1-20.
23. Schieffer B, Selle T, Hilfiker A, Hilfiker-Kleiner D, Grote K, Tietge UJ, Trautwein C, Luchtefeld M, Schmittkamp C, Heeneman S, Daemen MJ, Drexler H. 2004. Impact of interleukin-6 on plaque development and morphology in experimental atherosclerosis. *Circulation* 110:3493-3500.
24. McKellar GE, McCarey DW, Sattar N, McInnes IB. 2009. Role for TNF in atherosclerosis? Lessons from autoimmune disease. *Nat Rev Cardiol* 6:410-417.
25. Bradley JR. 2008. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* 214:149-160.
26. Osterud B, Bjorklid E. Role of monocytes in atherogenesis. *Physiol Rev*. 2003 Oct;83(4):1069-112.
27. Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:421-52.
28. Skrzeczyńska-Moncznik J, Bzowska M, Loseke S, Grage-Griebenow E, Zembala M, Pryjma J. Peripheral blood CD14^{high} CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10. *Scand J Immunol*. 2008 Feb;67(2):152-9.
29. Grage-Griebenow E, Flad HD, Ernst M. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J Leukoc Biol*. 2001 Jan;69(1):11-20.
30. Weber C, Belge KU, von Hundelshausen P, Draude G, Steppich B, Mack M, Frankenberger M, Weber KS, Ziegler-Heitbrock HW. Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. *J Leukoc Biol*. 2000 May;67(5):699-704.
31. Ancuta P, Rao R, Moses A, Mehle A, Shaw SK, Luscinskas FW, Gabuzda D. Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16⁺ monocytes. *J Exp Med*. 2003 Jun 16;197(12):1701-7.
32. Ziegler-Heitbrock HW, Fingerle G, Ströbel M, Schraut W, Stelter F, Schütt C, Passlick B, Pforte A. The novel subset of CD14⁺/CD16⁺ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *Eur J Immunol*. 1993 Sep;23(9):2053-8.
33. Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, Espevik T, Ziegler-Heitbrock L. The proinflammatory CD14⁺CD16⁺DR⁺⁺ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol*. 2002 Apr 1;168(7):3536-42.

Subpoblaciones de monocitos en síndrome coronario

34. Patiño R, Ibarra J, Rodriguez A, Yagüe MR, Pintor E, Fernandez-Cruz A, Figueredo A. Circulating monocytes in patients with diabetes mellitus, arterial disease, and increased CD14 expression. *Am J Cardiol.* 2000 Jun 1;85(11):1288-91.
35. 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. Impact of heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets on myocardial salvage in patients with primary acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2009 Jul 7;54(2):130-8.
36. Rothe G, Gabriel H, Kovacs E, Klucken J, Stöhr J, Kindermann W, Schmitz G. Peripheral blood mononuclear phagocyte subpopulations as cellular markers in hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996 Dec;16(12):1437-47.
37. Mosig S, Rennert K, Krause S et al Different functions of monocyte subsets in familial hypercholesterolemia: potential function of CD14+ CD16+ monocytes in detoxification of oxidized LDL. *FASEB J.* 2009 Mar; 23(3):866-74.
38. Hiroto Tsujioka, Toshio Imanishi, Hideyuki et al impact of heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets on myocardial salvage in patients with primary acute myocardial infarction *J Am Coll* 2009, vol 54; 130-138.
39. Kyrill S. Rogacev, Bodo Cremers, Adam Zawada et al CD14++CD16+ Monocytes independently predict cardiovascular events. *J Am Coll* 2012 vol 60