

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---



FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI  
UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD  
HOSPITAL DE CARDIOLOGÍA

## ***“ EVALUACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES DE MONOCITOS PROVENIENTES DE PACIENTES CON INFARTO AGUDO DEL MIOCARDIO EN RESPUESTA A IL-17 Y SU ASOCIACIÓN CON EL DESENLACE CLÍNICO”***

**TESIS**

**PARA OBTENER DIPLOMA DE ESPECIALIDAD EN CARDIOLOGÍA**

PRESENTA

**DRA. NATALY ALEJANDRA PÉREZ VELÁZQUEZ  
RESIDENTE DEL 3ER AÑO DE CARDIOLOGÍA  
HOSPITAL DE CARDIOLOGÍA CMN SIGLO XXI.**

TUTOR

**M. EN C. Dra. Alejandra Madrid Miller  
Dirección de Enseñanza Hospital de Cardiología  
Centro Médico Nacional Siglo XXI**

**Dr. Luis Chávez Sánchez  
Unidad de Investigación Médica en Inmunología  
Hospital de Pediatría, C.M.N. Siglo XXI**



**CIUDAD DE MEXICO, 2016**



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.

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**

---

---

---

**DR. EFRAÍN ARIZMENDI URIBE**

**Director General**

Unidad Médica de Alta Especialidad

Hospital de Cardiología CMN SXXI

---

**DRA. GABRIELA BORRAYO SÁNCHEZ**

**Director Médico**

Unidad Médica de Alta Especialidad

Hospital de Cardiología CMN SXXI

---

**DRA. M. ALEJANDRA G. MADRID MILLER**

**Director de Educación e Investigación en Salud**

Unidad Médica de Alta Especialidad

Hospital de Cardiología CMN SXXI

---

**D. En C. DR. LUIS CHÁVEZ SÁNCHEZ**

**Unidad de Investigación Médica en Inmunología**

Hospital de Pediatría, C.M.N. Siglo XXI.

---

**NATALY ALEJANDRA PÉREZ VELÁZQUEZ**

**Residente de Tercer Año de Cardiología**

Unidad Médica de Alta Especialidad

Hospital de Cardiología CMN SXXI

El presente trabajo fue realizado en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología, de la Unidad Médica de Alta Especialidad del Hospital de Pediatría y en la Unidad Médica de Alta Especialidad del Hospital de Cardiología del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la dirección de la Dra. Alejandra Madrid Miller y el Dr. Luis Chávez Sánchez.

Este trabajo fue financiado con el apoyo del programa del Fondo de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) con número FIS/IMSS/PROT/G13/1221.

## **INDICE**

<b>1.- Índice</b>	<b>3</b>
<b>2.- Resumen</b>	<b>4</b>
<b>3.- Marco teórico</b>	<b>6</b>
<b>4.- Justificación</b>	<b>17</b>
<b>5.- Planteamiento del problema</b>	<b>18</b>
<b>6.- Hipótesis</b>	<b>19</b>
<b>7.- Objetivos generales y específicos</b>	<b>20</b>
<b>8.- Diseño</b>	<b>21</b>
<b>Población diana</b>	<b>21</b>
<b>Población de estudio</b>	<b>21</b>
<b>Criterios de inclusión</b>	<b>21</b>
<b>Criterios de exclusión</b>	<b>22</b>
<b>Tamaño de la muestra</b>	<b>22</b>
<b>9.- Definición de variables</b>	<b>23</b>
<b>10.- Material y métodos</b>	<b>25</b>
<b>11.- Análisis estadístico</b>	<b>28</b>
<b>12.- Recursos, financiamiento y factibilidad</b>	<b>28</b>
<b>13.- Aspectos éticos</b>	<b>28</b>
<b>14.- Cronograma de actividades</b>	<b>29</b>
<b>15.- Resultados</b>	<b>30</b>
<b>16.- Discusión</b>	<b>35</b>
<b>17.- Conclusiones</b>	<b>36</b>
<b>18.- Referencias bibliográficas</b>	<b>37</b>
<b>19.- Anexos</b>	<b>41</b>

## RESUMEN

### ***“Evaluación de la activación de las subpoblaciones de monocitos provenientes de pacientes con infarto agudo del miocardio en respuesta a IL-17 y su asociación con el desenlace clínico”***

\*Pérez- Velázquez, Nataly; \*\* Madrid- Miller, María Alejandra; \*\*\*Chávez- Sánchez, Luis; \*\*\*\*Garza-Reyes, Guadalupe Monserrat.

\*Residente de tercer año Cardiología, Hospital de Cardiología Centro Médico Nacional, Siglo XXI, \*\* Dirección de Enseñanza, Hospital de Cardiología Centro Médico Nacional Siglo XXI, \*\*\* Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, \*\*\*\* Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI.

**Antecedentes:** Las enfermedades cardiovasculares actualmente son la principal causa de muerte y México no escapa a esta situación. Siendo la enfermedad arterial coronaria la causa subyacente más común. La aterosclerosis es una enfermedad progresiva caracterizada por la acumulación de lípidos y elementos fibrosos en las arterias. Es una enfermedad inflamatoria crónica que involucra al sistema inmune innato y adaptativo. En lo particular, los linfocitos T cooperadores (Th) juegan un papel esencial en la respuesta inmune, secretando citocinas entre éstas la IL-17. Sin embargo, el papel que juega la IL-17 en la *activación de las subpoblaciones de monocitos* no se ha establecido.

**Objetivos:** Determinar la activación de las subpoblaciones de monocitos humanos en respuesta a la IL-17 y su asociación con el curso clínico de los pacientes con infarto agudo del miocardio con elevación del segmento ST (IAM CEST).

**Material y métodos:** Se trata de un estudio prospectivo, clínico- básico, concurrente, comparativo. Se incluirán pacientes de cualquier sexo, mayores de 40 años que ingresen con diagnóstico de IAM CEST al Hospital de Cardiología de Centro Médico Nacional SXXI, que ingresen en las primeras 24hrs de iniciado el cuadro y que firmen un consentimiento informado para su participación; se excluirán pacientes con enfermedades crónicas degenerativas o neoplásicas que tengan una esperanza de vida menor a 2 años, procesos infecciosos o que modifiquen la respuesta inflamatoria de los pacientes. Se realizarán dos tomas de muestra de los pacientes para evaluar las subpoblaciones de monocitos en respuesta a la IL-17, las primeras 24 horas de iniciados los síntomas y la segunda 5 días después del infarto. Las poblaciones de monocitos clásicos e intermedios se estimularán por separado con IL-17 y se recuperan los sobrenadantes. También, se recuperará el plasma de las muestras y se congelará. De los sobrenadantes y del plasma se determinarán los niveles de frataquina, IL-10, IL-17A, IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1, TNF- $\alpha$ , VEGF. Las variables clínicas a evaluar serán los eventos isquémicos recurrentes, sea angina, reinfarcto, necesidad de procedimientos de revascularización, muerte cardiovascular,

durante la hospitalización, a los 3 y a los 6 meses; el seguimiento se realizará vía telefónica, se revisarán los expedientes clínicos. Se relacionará la respuesta que presentan los monocitos estimulados con IL-17 con la evolución clínica que tengan los pacientes intrahospitalaria, a los 3 y 6 meses. Las variables continuas se describen como media  $\pm$  DE o mediana y rango intercuartil según corresponda. Las variables categóricas se expresan en frecuencias y proporciones, la comparación entre dos grupos se hará por T-student o U-mannwhitney.

**Recursos e infraestructura:** Pacientes: El Hospital de Cardiología, de Centro Médico Nacional Siglo XXI cuenta con servicio de urgencias y unidad coronaria para la atención de los pacientes con IAM CEST. El método de reperfusión será el indicado de acuerdo a su tiempo de evolución. Recursos físicos y materiales: La Unidad de Investigación Médica en Inmunología, UMAE Hospital de Pediatría, CMN SXXI, cuenta con los recursos, equipo y reactivos necesarios para llevar al cabo los experimentos, así como el personal capacitado.

**Tiempo a desarrollarse:** El protocolo se desarrollará en 2 años.

## MARCO TEORICO

### ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) actualmente son la principal causa de muerte en los países industrializados y se espera que también lo sean en países en vías de desarrollo en el año 2020. En la última década, las enfermedades cardiovasculares se han convertido en la causa individual de muerte más importante en todo el mundo. Entre ellas, la enfermedad arterial coronaria es la manifestación más prevalente, y se asocia a alta morbimortalidad, la aterosclerosis constituye el contribuyente más importante de esta carga creciente de enfermedad cardiovascular. La mayor disponibilidad de alimentos ricos en grasas saturadas, junto con una menor actividad física, provoca un aumento de la aterosclerosis. La Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó en el 2013 cerca de 17.3 millones de muertes por esta causa, de las cuales 7.4 millones fueron por cardiopatía isquémica, principalmente por Infarto Agudo del Miocardio (IAM) [2]. En México el último reporte del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) del 2015 113,240 muertes fueron por ECV, siendo la primera causa de mortalidad en el país, mientras que las enfermedades isquémicas del corazón con 77,284 muertes representaron la segunda causa de muerte. Los factores de riesgo que se han asociado a un aumento del riesgo de enfermedad arterial coronaria son: la edad avanzada, el tabaquismo, la hipertensión arterial, dislipidemia, (siendo el colesterol LDL un factor importante, ya que las concentraciones altas de éste predicen sistemáticamente el riesgo de episodios cardiovasculares), el síndrome metabólico, resistencia a la insulina y la diabetes mellitus, entre otros.

### FORMACION DE LA PLACA ATEROSCLEROTICA

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica que involucra al sistema inmune innato y adaptativo; desde la década pasada, se ha llegado a apreciar el rol prominente de la inflamación en la aterosclerosis y sus complicaciones. Mientras muchos clínicos previamente se referían al ateroma como una lesión blanda, la noción actual de que la inflamación y la respuesta inmune contribuyen a la aterogénesis ha ganado un creciente interés en el área de la biología molecular. <sup>1</sup> Rudolf Virchow reconoció la naturaleza inflamatoria de las placas ateroscleróticas, entendió la aterosclerosis como un proceso activo de reacción tisular más que una simple incrustación de trombo o depósito de material graso. Desde los días de Virchow, los patólogos han reconocido a las células espumosas cargadas de lípidos, como un sello distintivo del ateroma, muchas de las células espumosas surgen de fagocitos mononucleares, aunque las células del músculo liso y endoteliales pueden también cargarse con lípidos. <sup>2</sup>

Los primeros pasos de la aterogenia humana siguen siendo en gran medida objeto de conjetura. Tras el inicio de una dieta aterogénica, es decir, de una dieta rica en colesterol y grasas saturadas, se produce una acumulación de pequeñas partículas lipoproteicas en la

íntima arterial. Parece que éstas partículas lipoproteicas se adosan a los proteoglicanos de la íntima y tienden a reunirse en agregados.<sup>3</sup> La unión de las lipoproteínas a los proteoglicanos de la íntima conlleva la captura y retención de estas partículas y es la responsable de la prolongación de su tiempo de residencia<sup>3</sup>. Las partículas lipoproteicas unidas a los proteoglicanos son más proclives a la oxidación y a otras modificaciones químicas. Otros estudios sugieren una permeabilidad aumentada de la capa única endotelial en los lugares de lesión con predilección por las lipoproteínas de baja densidad (LDL)<sup>3</sup>. Otro aspecto clave de la aterogenia es la llegada y acumulación de leucocitos, que se produce también en las primeras fases de la producción de la lesión<sup>3</sup>. En general, las células endoteliales normales resisten las interacciones de adherencia con los leucocitos, incluso en los tejidos inflamados, la mayor parte de la llegada y tráfico de leucocitos tiene lugar en las vénulas poscapilares y no en las arterias<sup>3</sup>. Sin embargo, en una fase muy precoz tras el inicio de la hipercolesterolemia, los leucocitos se adhieren al endotelio y se mueven entre las uniones de las células endoteliales o incluso penetran a través de ellas (transcitos) para entrar en la íntima, donde comienzan a acumular lípidos y a convertirse en células espumosas<sup>3</sup>. Además de los monocitos, los linfocitos T también tienden a acumularse en las lesiones ateroscleróticas precoces humanas y animales. La adherencia de los monocitos y de los linfocitos T al endotelio está regulada por la expresión de determinadas moléculas de adherencia leucocitaria en la superficie de las células endoteliales<sup>4</sup>. Existen dos amplias categorías de moléculas de adherencia leucocitaria. Dentro de los miembros de la superfamilia de inmunoglobulina se encuentran estructuras tales como la molécula de adherencia celular vascular 1 (VCAM-1); esta molécula de adherencia tiene un interés especial en el contexto de la aterogenia precoz, pues interactúa con una integrina (antígeno-4 muy tardío (VLA-4) que se expresa característicamente solo en las clases de leucocitos que se acumulan en el ateroma inicial: los monocitos y los linfocitos T<sup>4</sup>. Otra molécula de adherencia leucocitaria, miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, es la molécula de adherencia leucocitaria intercelular-1 (ICAM-1); esta molécula es más ubicua, tanto en lo que se refiere a los tipos de leucocitos a los que se une, como en su amplia y constitutiva expresión a niveles bajos por las células endoteliales en muchas partes de la circulación<sup>4</sup>. Las selectinas constituyen otra amplia categoría de las moléculas de adhesión leucocitaria; de ellas, el prototipo es la E-selectina o CD62E, la cual preferentemente recluta leucocitos polimorfonucleares, un tipo de célula muy pocas veces encontrada en el ateroma temprano<sup>3</sup>.

Una vez adheridos al endotelio, los leucocitos deben recibir una señalización para penetrar la monocapa endotelial y entrar en la pared arterial. El concepto actual de la migración directa de los leucocitos, involucra la acción de proteínas conocidas como citocinas quimioatrayentes o quimiocinas<sup>5</sup>. Dentro de las muchas quimiocinas implicadas en la aterogenesis, dos son de particular interés en el reclutamiento de las células mononucleares características del ateroma temprano. Una de ellas, la proteína 1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1), o CCL2, es producida en el endotelio en respuesta a las lipoproteínas oxidadas y otros estímulos<sup>5</sup>. Otro grupo de citocinas quimiotácticas pueden aumentar la acumulación de linfocitos en las placas.

Los monocitos, una vez reclutados en la íntima arterial, pueden absorber los lípidos y convertirse en células espumosas o macrófagos cargados de lípidos. Aunque la mayoría de

las células pueden expresar el clásico receptor para LDL en su superficie celular, este receptor no interviene en la acumulación de células espumosas. En lugar del clásico receptor para LDL, varias moléculas conocidas como *receptores scavenger* parecen mediar la excesiva carga de lípidos característica de la formación de células espumosas<sup>6</sup>, estos receptores participan en la internalización de las lipoproteínas en el monocito. Otros receptores que se unen a lipoproteínas modificadas y que pudieran participar en la formación de células espumosas incluyen el CD36 y la macrosialina, esta última con unión preferencial para las formas de LDL oxidada<sup>6</sup>. Una vez que los macrófagos residen en la capa íntima y se convierten en células espumosas, se pueden replicar. Los factores que desencadenan la división celular de macrófagos en la placa aterosclerótica probablemente incluyen factores de crecimiento, como el factor estimulante de la colonia de macrófagos (M-CSF), factor estimulante de la colonia de granulocitos-macróforos (GM-CSF) y la interleucina-3.

Mientras que los eventos tempranos en el inicio de la placa de ateroma comprenden principalmente la función endotelial alterada y el reclutamiento y acumulación de leucocitos, así como la formación de la estría grasa, la evolución subsecuente del ateroma en placas más complejas involucra a las células musculares lisas (CML)<sup>10</sup>. Algunas de estas células probablemente llegan a la capa íntima en etapas tempranas de la vida, otras se acumulan en el ateroma avanzado después de su reclutamiento desde la capa media o surgen de precursores sanguíneos. En adición a su replicación, la muerte de las células musculares lisas puede participar también en la complicación de la placa aterosclerótica<sup>11</sup>. Algunas CML en el ateroma avanzado muestran fragmentación de su ADN nuclear que es característico de la muerte celular programada o apoptosis. La apoptosis puede ocurrir en respuesta a citocinas inflamatorias presentes en el ateroma. Además de estas citocinas, las células T del ateroma pueden participar en la eliminación de las CML; en particular, ciertas poblaciones de células T pueden expresar el ligando Fas en su superficie; el ligando Fas puede unirse a Fas presente en la superficie de las CML y, en conjunto con las citocinas proinflamatorias, conducir a la muerte de éstas<sup>11</sup>

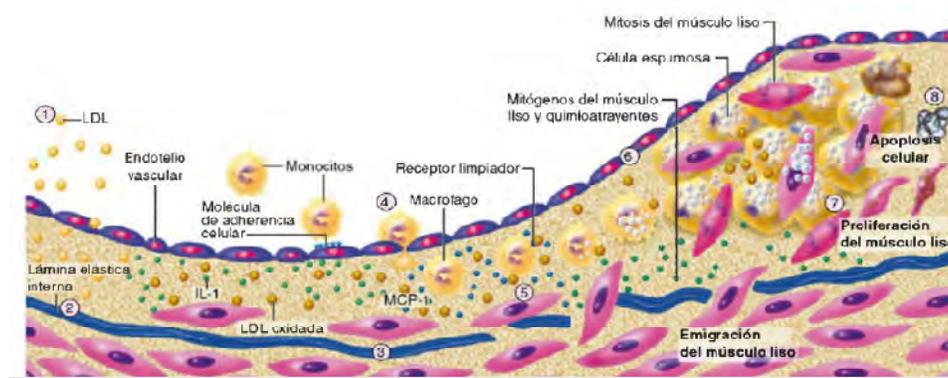


Fig. 1 Aterosclerosis

### INFARTO AGUDO DEL MIOCARDIO

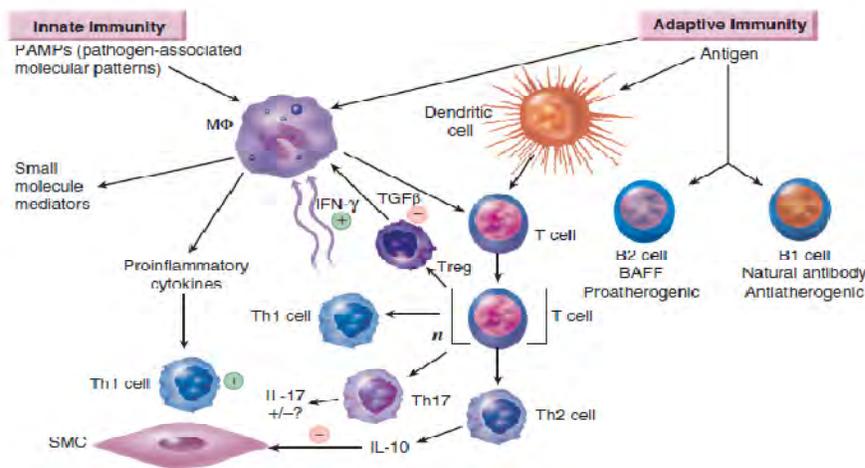
En condiciones normales, para cualquier nivel de demanda de oxígeno, el miocardio controlará el aporte de sangre oxigenada para prevenir la hipoperfusión de los miocitos y el desarrollo subsecuente de isquemia e infarto. Con la reducción del lumen de las arterias coronarias, la aterosclerosis limita los incrementos apropiados en la perfusión coronaria cuando la demanda de oxígeno está aumentada, como sucede durante el ejercicio. Cuando la estenosis es severa, la perfusión miocárdica en el estado basal se encuentra también reducida. El infarto agudo del miocardio usualmente ocurre cuando el flujo sanguíneo coronario disminuye abruptamente después de la oclusión trombótica de una arteria coronaria. Casi todos los síndromes coronarios agudos (SICA) resultan de la aterosclerosis, generalmente con trombosis coronaria sobreagregada causada por la ruptura o erosión de la lesión aterosclerótica. Cuando la trombosis coronaria aguda ocurre, el trombo intracoronario resultante puede ser parcialmente obstructivo, lo cual resulta en isquemia miocárdica en ausencia de elevación del segmento ST, o ser completamente obstructivo y causar isquemia miocárdica transmural e infarto agudo del miocardio con elevación del segmento ST (IAM CEST). Los pacientes se presentan con dolor precordial usualmente retroesternal, que varía en intensidad, prolongado (> 20 minutos), con irradiación al brazo y hombro izquierdo, mandíbula, cuello, o espalda. En la tercera definición universal del infarto agudo del miocardio, se señalan los siguientes criterios para el diagnóstico:

- Detección de una elevación y descenso de los valores sanguíneos de los biomarcadores cardiacos, de preferencia las troponinas, con al menos un valor por encima de la percentila 99 del valor límite de referencia
- Síntomas de isquemia
- Cambios nuevos o presumiblemente nuevos en el segmento ST- onda T, o nuevo bloqueo de rama izquierda del Haz de His (BRIHH)
- Desarrollo de ondas Q patológicas en el electrocardiograma.
- Evidencia por imagen de pérdida nueva de viabilidad miocárdica o nuevas anomalías de la movilidad regional de la pared miocárdica
- Identificación de trombo intracoronario por angiografía o autopsia.

### RESPUESTA INFLAMATORIA EN EL INFARTO

El IAM está asociado a una respuesta inflamatoria aguda, la cual es un prerrequisito para la reparación y cicatrización de la zona infartada. Los macrófagos cargados de lípidos sirven no sólo como un reservorio del exceso de lípidos, sino que, en la lesión aterosclerótica establecida, estas células son una rica fuente de mediadores inflamatorios,

incluyendo citocinas, quimiocinas y varios eicosanoides. Estas células fagocíticas también pueden elaborar grandes cantidades de especies oxidantes, como anión superóxido o ácido hipocloroso. Este ensamble de mediadores inflamatorios puede promover inflamación en la placa aterosclerosa y por lo tanto, contribuir a la progresión de las lesiones. La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica que involucra al sistema inmune innato y adaptivo<sup>12</sup>. El término *inmunidad innata* describe este tipo de amplificación de la respuesta inflamatoria que no depende de la estimulación antigénica. En adición a ésta, evidencia creciente apoya el rol prominente de la inmunidad antígeno-específica o *inmunidad adaptativa* en la progresión de la placa<sup>7</sup>. Los antígenos candidatos para la estimulación de esta inmunidad adaptativa incluyen lipoproteínas modificadas o nativas, proteínas de choque térmico, beta<sub>2</sub>- glicoproteína Ib y agentes infecciosos<sup>8</sup>. Las células presentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas o células endoteliales, permiten la interacción del antígeno con las células T de una manera que desencadenan su activación. Las células T activadas pueden secretar grandes cantidades de citocinas que pueden modular el proceso de aterogénesis<sup>8</sup>. Hay dos categorías generales para las células T cooperadoras: *Th1*, elaboran citocinas proinflamatorias como interferón-  $\gamma$ , linfotoxina, ligando CD40, y factor de necrosis tumoral-  $\alpha$ . *Th2*, elaboran citocinas como IL-10, pueden inhibir la inflamación en el contexto de la aterogénesis. Los linfocitos T citotóxicos, pueden expresar el ligando Fas y otros factores citotóxicos, que pueden promover la citolisis y apoptosis de células blanco, incluyendo células de músculo liso, células endoteliales y macrófagos<sup>9</sup>. Las células T reguladoras (Treg) pueden elaborar Factor de crecimiento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e IL-10, ambas citocinas pueden ejercer efectos antiinflamatorios.

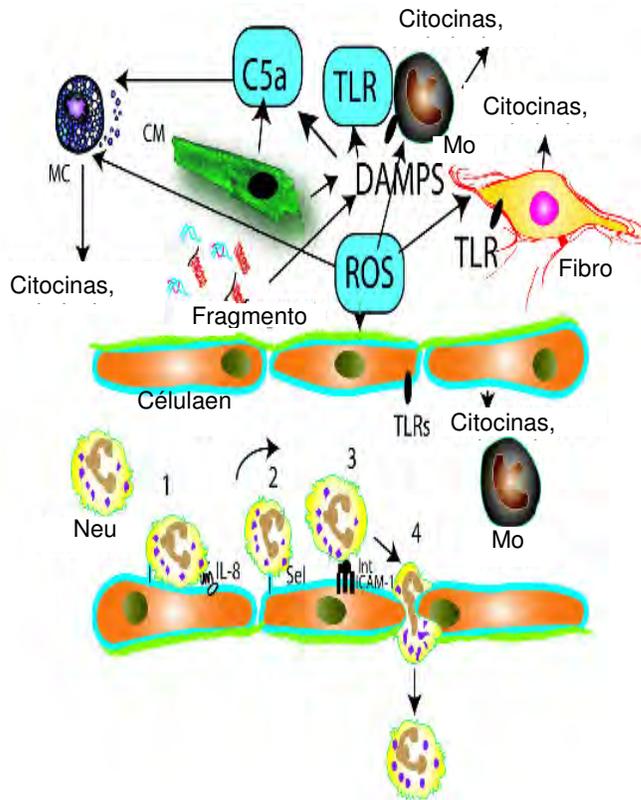


**Fig. 2 Inflamación en la aterosclerosis**

En el corazón infartado, la necrosis repentina de un gran número de cardiomiocitos resulta en la liberación de su contenido intracelular e inicia una intensa reacción inflamatoria [19], lo que conduce a la activación del complemento a través del corte de C3 [20,22]. Además, la matriz extracelular dañada libera señales de alarma endógenas como: fragmentos de hialuronana, proteínas de choque térmico, ATP y ADN mitocondrial, las cuales potencializan el estímulo inflamatorio [17, 18]. Los DAMPs exhiben sus funciones pro-inflamatorias a través de la activación de receptores tipo Toll (TLR), siendo TLR4 el principal receptor que media la respuesta inflamatoria en el corazón infartado.

Por otro lado, diversos tipos celulares están involucrados en la reacción inflamatoria en el IAM como los fibroblastos cardiacos que se encargan de sensar la isquemia y el daño en los cardiomiocitos y son las principales células productoras de citocinas inflamatorias y quimiocinas. El endotelio vascular también resulta una fuente importante de mediadores inflamatorios; la activación de TLRs y la cascada del complemento estimula la señalización por el factor nuclear (NF)- $\kappa$ B promoviendo un fenotipo inflamatorio en células endoteliales y fibroblastos [18,19].

En ausencia de inflamación los leucocitos no interaccionan con el endotelio vascular; cuando existe un estímulo inflamatorio el endotelio se activa por acción de citocinas, sobre-expresa moléculas de adhesión en su superficie, como selectinas y molécula de adhesión intracelular (ICAM)-1, favoreciendo la adhesión y migración de leucocitos al tejido infartado. (Figura 3). Es evidente que la respuesta inflamatoria en el IAM es compleja e involucra diversos tipos celulares y mediadores inflamatorios como citocinas, entre las que destacan IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  y recientemente se están explorando otras citocinas como IL-17 en el IAM.



**Figura 3. Reacción inflamatoria en el Infarto agudo del miocardio.** La necrosis de los cardiomiocitos (CM) y la matriz extracelular (MEC) dañada desencadena una reacción inflamatoria, donde hay activación de la cascada del complemento, activación de receptores tipo toll presentes en los diversos tipos celulares, lo cual lleva a la producción de citocinas y quimiocinas. Los leucocitos son reclutados al corazón infartado a través de la activación de la cascada de adhesión; el endotelio vascular activado secreta citocinas y quimiocinas, así como sobre-expresa moléculas de adhesión en su superficie lo que favorece el reclutamiento de neutrófilos y monocitos. (1) Los neutrófilos son capturados por el endotelio activado, (2) y ruedan por la superficie endotelial mediante interacciones donde se encuentran involucradas las selectinas (Sel), (3) los neutrófilos sientan quimiocinas y se activan las integrinas, iniciando la adhesión firme al endotelio, (4) finalmente los neutrófilos transmigran a través del endotelio hacia el área de infarto y ejercen sus funciones efectoras

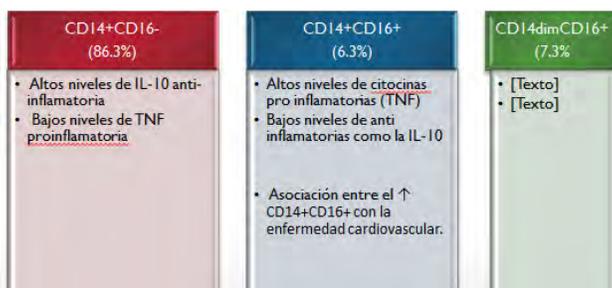
### SUBPOBLACIONES DE MONOCITOS

Los monocitos humanos representan del 5-10% del total de las células mononucleares de sangre periférica permanecen en circulación aproximadamente 72 horas y migran a los tejidos donde se diferencian en macrófagos o células dendríticas. En la actualidad, se consideran a los monocitos humanos como una población celular heterogénea y en base a la expresión de CD14 y de CD16 se han identificado tres subpoblaciones: los  $CD14^+CD16^-$  que representan un  $86.3\% \pm 6.8\%$  del total de los monocitos, los  $CD14^+CD16^+$  ( $6.3\% \pm 2.3\%$ ) y los  $CD14^{dim}CD16^+$  ( $7.3\% \pm 5.1\%$ )<sup>31,32</sup>. Por otro lado, otros autores solo consideran las subpoblaciones  $CD14^+CD16^-$  y  $CD14^+CD16^+$ <sup>33,34</sup> y son las subpoblaciones de monocitos con las que trataremos de contestar nuestras preguntas de investigación.

Los monocitos  $CD14^+CD16^+$  tienen una alta actividad estimuladora de linfocitos T, lo que sugiere que la activación de subpoblación de monocitos  $CD14^+CD16^+$  favorece un incremento de moléculas co-estimuladoras y HLA-DR, lo que facilita la presentación de antígeno<sup>35,36</sup>. Además, los monocitos  $CD14^+CD16^-$  expresan niveles más altos de CCR1, CCR2, CXCR2 y niveles bajos de CX3CR1, mientras los monocitos  $CD14^+CD16^+$  expresan altos niveles de CX3CR1<sup>34</sup>, así como de CCR2<sup>36</sup>, la expresión de los distintos receptores de quimiocinas en las subpoblaciones de monocitos, les permite migrar hacia un proceso

inflamatorio, a través de un gradiente de quimiocinas<sup>37,38,39</sup>. También, se ha demostrado que los monocitos de pacientes con infarto agudo del miocardio expresan altos niveles de CD11b en comparación con lo sujetos sanos<sup>40,41</sup>, estos datos sugieren que la alta expresión de CCR2 y CD11b en los monocitos de pacientes con infarto agudo del miocardio, les permite migrar y adherirse más eficientemente al endotelio, que los monocitos de los sujetos sanos.

Funcionalmente, los monocitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> y CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> producen altos niveles de citocinas pro-inflamatorias como TNF y bajos niveles de citocinas anti-inflamatorias como IL-10<sup>32,35</sup>. En contraste, los monocitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> producen altos niveles de IL-10 y bajos niveles de TNF<sup>35</sup>, estas evidencias demuestran que las subpoblaciones de monocitos humanos funcionalmente son diferentes, lo que sugiere que pueden desempeñar diferentes funciones en el IAM.



Se ha demostrado una asociación entre el incremento en el número de monocitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> con la enfermedad cardiovascular<sup>42-44</sup>. Un estudio ha demostrado una correlación positiva entre el número de monocitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> con los niveles de LDL en plasma y una correlación negativa con los niveles de HDL, sugiriendo que las subpoblaciones de monocitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> pueden tener un papel relevante en la patogénesis de la aterosclerosis<sup>45</sup>; en este contexto, se ha demostrado que los monocitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> exhiben un alto incremento en la internalización de LDLox a través de CD36<sup>46</sup>. Interesantemente, se ha demostrado que al sufrir un IAM, las subpoblaciones de monocitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> y CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> se encuentran aumentadas. Más aún, la magnitud de movilización de los monocitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> se asocia con la recuperación cardiaca, mientras que el número de los monocitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> no tienen al parecer ningún impacto sobre la recuperación cardiaca, lo que sugiere una dinámica específica de las subpoblaciones de monocitos después de un infarto agudo del miocardio<sup>44</sup>. Sin embargo, el papel biológico de la dinámica determinada de las subpoblaciones de monocitos en el IAM se desconoce.

## INTERLEUCINAS EN EL INFARTO AGUDO DEL MIOCARDIO: fractalquina, IL-10, IL-17A, IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP1, TNF, VEGF

La inflamación es un componente clave en todas las etapas de la enfermedad cardiovascular, en la que quimiocinas y citocinas juegan un papel crítico <sup>23</sup>. Las quimiocinas son pequeñas proteínas segregadas por las células sanguíneas, que ejercen la mayor parte de las funciones a través de la activación de receptores acoplados a la proteína G, son los responsables primarios de la migración de leucocitos hacia la región de la lesión tisular. Con base en la presencia y en la posición de los primeros residuos de cisteína, se hace una clasificación en 4 grupos: quimiocinas CC, que poseen dos cisteínas adyacentes; quimiocinas CXC, con un aminoácido entre los dos residuos de cisteína; quimiocinas C; y quimiocinas CX3C (fractalquina), con tres aminoácidos entre dos cisteínas. La expresión de citocinas proinflamatorias como TNF, IL-1 $\beta$  e IL-6 es marcada y consistentemente elevada en modelos experimentales de infarto del miocardio.

La fractalquina es el único miembro de la familia CX3C, compuesta por 373 aminoácidos; aparece en la membrana plasmática de las células endoteliales, macrófagos, células dendríticas, después de sufrir una acción de la enzima catepsina-S, su forma soluble es liberada y funciona como un agente quimiotáctico para células T, monocitos, entre otras células. Se supone que la fractalquina active los receptores CX3CR1 con la consecuente liberación de mediadores inflamatorios.

La IL-10 es un polipéptido no glucosilado con cerca de 18 kDA, sintetizado en células inmunológicas, su producción se ve alterada por muchas citocinas, como la IL-4, IL-13 y la IFN $\gamma$  y también por su propia autorregulación. Inhibe las citocinas proinflamatorias, principalmente TNF, IL-1 y la IL-6, producidas por macrófagos y monocitos activados, estimulando la producción endógena de citocinas antiinflamatorias.

La IL-17 es la citocina más ampliamente estudiada de los linfocitos Th17 y se ha descrito una asociación entre los niveles de IL-17 y la severidad de la enfermedad cardiovascular en estudios realizados en humanos, así como en modelos animales <sup>20,22</sup>, lo que sugiere una posible participación de la IL-17 en la patogénesis de la aterosclerosis. Algunas de las funciones de la IL-17 son la inducción de la proliferación, maduración y reclutamiento de macrófagos y de linfocitos <sup>24</sup>. La IL-17 induce la secreción de IL-6, IL-8, VEGF, PGE1 y PGE2 <sup>25</sup>, así como la expresión de quimiocinas como la MCP-1 (ligando de CCR2) <sup>26</sup>, además de moléculas de adhesión, entre las que se encuentran: VCAM-1 e ICAM-1 (ligando de CD11b) <sup>25,27,28</sup>. En el mismo contexto, la activación de monocitos con IL-17, facilita su reclutamiento al endotelio <sup>29,30</sup>, lo que sugiere que la IL-17 juega un papel relevante en el reclutamiento de monocitos. A pesar de las evidencias demostradas del efecto de la IL-17 en la respuesta inflamatoria, se desconoce si la IL-17 influya en la activación de los

monocitos y en el caso que así sea, cuáles serían las consecuencias funcionales de esta activación en la patogénesis del infarto agudo del miocardio (IAM).

La IL-1 desempeña un papel central en el inicio de las respuestas inflamatorias. Es producida por monocitos y macrófagos. Existen dos formas biológicamente activas: la IL-1 $\alpha$  y la IL-1 $\beta$ ; de éstas, la IL-1  $\beta$  es la isoforma que predomina en sangre periférica en humanos. La IL-1 se une a receptores que se encuentran en linfocitos T, fibroblastos, células endoteliales y hepatocitos. La IL-1 provoca la síntesis de prostaglandinas, leucotrienos factor activador de plaquetas y óxido nítrico sintasa en células musculares lisas. La IL-1 también, induce la expresión de genes para factores de la coagulación, la adhesión y migración de leucocitos a través del endotelio, así como, la síntesis de factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos e inhibidores de la fibrinólisis [27]. Se ha demostrado que la ausencia de IL-1 $\beta$  disminuye la severidad de la lesión en ratones propensos a desarrollar aterosclerosis.

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. 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

La proteína 1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1, por sus siglas en inglés monocyte chemoattractant protein 1), es expresada principalmente por células inflamatorias y estromales, como las células endoteliales. Se eleva rápidamente en el miocardio infartado y modula el reclutamiento de monocitos fagocíticos proinflamatorios que limpian el área de células muertas y detritos de la matriz extracelular.

Otra citocina pro-inflamatoria importante es el TNF- $\alpha$ , 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- $\alpha$  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- $\alpha$  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. El factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ , por sus siglas en

inglés, tumor necrosis factor), es una citocinaproinflamatoria capaz de ejercer diversos efectos en todos los tipos de células implicadas en el daño cardíaco y su reparación, mejora la apoptosis de los cardiomiocitos, suprime la contractilidad cardíaca y estimula la expresión de quimiocinas, citocinasproinflamatorias y moléculas de adhesión por las células endoteliales y leucocitos; además, regula el metabolismo de la matriz extracelular, en los fibroblastos, mejorando la actividad de las metaloproteinasas de la matriz extracelular y disminuyendo la síntesis de colágeno.

El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, por sus siglas en inglés, vascular endotelial growth factor) es un potente mitógeno para las células endoteliales. En modelos animales, la aplicación de VEGF recombinante a piernas isquémicas indujo la angiogénesis y mejoró la perfusión tisular.

## JUSTIFICACIÓN

La enfermedad arterial coronaria aterosclerosa en sus diferentes presentaciones clínicas como síndromes isquémicos agudos son la segunda causa de muerte general en nuestra población. En la actualidad la enfermedad aterosclerosa se considera un proceso inflamatorio y durante su desarrollo participan diversas citocinas pro-inflamatorias como la IL-17 y estirpes celulares del sistema inmune que incluye a los monocitos, los cuales son claves en la respuesta inflamatoria. Recientemente, se ha demostrado un incremento en la frecuencia de linfocitos Th17, así como de altos niveles de IL-17, IL-1, TNF entre otras, en pacientes con enfermedad cardiovascular, lo que se ha sido asociado con la respuesta inflamatoria. Diversas evidencias han demostrado al menos dos subpoblaciones de monocitos: los monocitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> y los CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, estas células se incrementan en pacientes con infarto agudo del miocardio. A pesar de las diversas evidencias que indican la participación de IL-17 y de las subpoblaciones de monocitos en la respuesta inflamatoria, se carece de información acerca del posible papel que juega la IL-17 en la activación de las subpoblaciones de monocitos de pacientes con infarto agudo del miocardio. Además, se pretende correlacionar la determinación de estas características inmunológicas con la evolución clínica de los pacientes determinando la asociación entre las características inmunológicas con los desenlaces clínicos, para evaluar la reincidencia de eventos isquémicos como angina recurrente, reinfarto, necesidad de cirugía de revascularización, y muerte cardiovascular. Será conveniente aclarar que este protocolo corresponde al tema prioritario de cardiopatía isquémica de la convocatoria de la Coordinación de Investigación en Salud: Concurso de apoyo financiero para el desarrollo de protocolos de investigación en salud en el IMSS.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la enfermedad cardiovascular se ha demostrado un incremento en la proporción de linfocitos Th17, así como de altos niveles de IL-17. En lo particular se ha demostrado un incremento en las subpoblaciones de monocitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> y CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> en sangre periférica de pacientes con infarto agudo del miocardio, lo que se asocia con una recuperación cardiaca, sugiriendo que la IL-17 y las subpoblaciones de monocitos puedan tener un papel relevante en la enfermedad. Durante la patogénesis de la aterosclerosis, los monocitos secretan diversas citocinas proinflamatorias en presencia de estímulos inflamatorios como TNF- $\alpha$ . Sin embargo, se desconoce si se modifican los niveles de citocinas como TNF $\alpha$ , IL-6, IL-10, TGF- $\beta$ , en las subpoblaciones de monocitos al estímulo de la IL-17. Además se asociarán los niveles circulantes de las citocinas fractalquina, IL-10, IL-17A, IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP1, TNF, VEGF de pacientes con IAM CEST con las subpoblaciones de monocitos. Por lo que el proyecto se dirige a contestar las siguientes preguntas:

1. Cuál será la activación de los monocitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> y CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> en respuesta a IL-17, en pacientes con infarto agudo del miocardio con elevación del segmento ST, durante las primeras 24 hrs del evento y a los 5 días del mismo
2. Cuáles serán los niveles de las citocinas fractalquina, IL-10, IL-17A, IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP1, TNF, VEGF en el suero de pacientes con IAM CEST, durante las primeras 24 hrs del evento y a los 5 días del mismo.
3. Cuáles serán las asociaciones entre la activación de las distintas subpoblaciones de monocitos y las citocinas en suero, con el desenlace clínico incluidos la presencia de angina, reinfarto, necesidad de revascularización o muerte cardiovascular, a los 3 y 6 meses de los pacientes con infarto agudo del miocardio.

## **HIPÓTESIS**

Las subpoblaciones de monocitos derivados de pacientes con IAM CEST secretarán citocinas como IL-6 en respuesta a IL-17. Los niveles de citocinas en circulación de los pacientes con IMA CEST se asociarán con la activación de las subpoblaciones de monocitos así como con angina, reinfarto, necesidad de revascularización o muerte cardiovascular, a los 3 y 6 meses de los pacientes con infarto agudo del miocardio.

### **OBJETIVO GENERAL:**

Determinar la activación de las subpoblaciones de monocitos humanos en respuesta a la IL-17 y su asociación con el curso clínico de los pacientes con infarto agudo del miocardio con elevación del segmento ST.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

1. Determinar los niveles de citocinas TNF, IL-6 producidas por los monocitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> y CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> en respuesta a IL-17, en pacientes con infarto agudo del miocardio con elevación del segmento ST, durante las primeras 24 hrs del evento y a los 5 días del mismo.
2. Determinar los niveles de citocinas proinflamatorias como fractalquina, IL-10, IL-17A, IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP1, TNF, VEGF en el suero de pacientes con IAM CEST, durante las primeras 24 hrs del evento y a los 5 días del mismo.
3. Determinar si existe asociación entre la activación de las distintas subpoblaciones de monocitos y los niveles de citocinas en suero, con el desenlace clínico incluidos la presencia de angina, reinfarto, necesidad de revascularización o muerte cardiovascular, a los 3 y 6 meses de los pacientes con infarto agudo del miocardio.

**Diseño del estudio:**

Se trata de un diseño transversal, clínico- básico, concurrente, comparativo.

**Población Diana:**

Pacientes que ingresen al Hospital de Cardiología de Centro Médico Nacional SXXI, que cumplan con los criterios de selección. Los pacientes con infarto agudo del miocardio se incluirán dentro de las 24 hrs de iniciados los síntomas para la toma de muestras y se realizará una segunda toma de muestras sanguíneas a los 5 días del infarto.

**Población de estudio:**

Se incluirán pacientes en forma consecutiva que ingresen al Hospital de Cardiología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, con diagnóstico de infarto agudo del miocardio. Para cada paciente que se incluya al presente protocolo, se verificará la evaluación realizada por el médico tratante, tanto en urgencias, como en piso de hospitalización, sobre su diagnóstico y estratificación de riesgo, así como el tratamiento inicial acorde con la estratificación de riesgo establecida. Cada paciente que se incluya deberá tener evaluación ECG de 12 derivaciones y de ser necesario el círculo completo, determinación de marcadores de necrosis miocárdica (como CPK MB y/o troponinas), marcadores inflamatorios de riesgo (proteína C reactiva, fibrinógeno), química sanguínea, hemoglobina, plaquetas y perfil de lípidos. La toma de muestra de sangre de los pacientes con IAM se realizará dentro de las primeras 24 horas de iniciado el evento agudo y a los 5 días del evento isquémico.

**Criterios de inclusión para pacientes**

1. Pacientes de cualquier género
2. Mayores de 40 años de edad
3. Pacientes con diagnóstico de infarto agudo del miocardio con elevación del segmento ST, que hayan ingresado a la UMAE Hospital de Cardiología del Centro Médico Nacional Siglo XXI dentro de las primeras 24 horas de iniciados los síntomas.
4. El diagnóstico de infarto agudo del miocardio con elevación del segmento ST se considerará de acuerdo con la Tercera Definición Internacional de Infarto, con elevación de troponina por arriba de la percentila 99 del límite superior del valor de referencia (en caso de no contar con determinación de troponina se tomará en cuenta elevación de CPK fracción MB superior a la percentila 99 del límite superior del valor de referencia), más uno de los siguientes criterios:

- A. Dolor precordial de tipo isquémico mayor a 20 minutos de duración, acompañado o no de disnea, diaforesis, náusea y/o vómito.
  - B. Desnivel positivo del segmento ST  $\geq 1$  mm en dos o más derivaciones contiguas, excepto V2 y V3 con puntos de corte  $\geq 1.5$  mm en mujeres,  $\geq 2$  mm en hombres mayores de 40 años, y  $\geq 2.5$  mm en hombres menores de 40 años, y/o la presencia de bloqueo de rama izquierda del Haz de His de reciente aparición.
5. Aceptación para participar en el estudio

### **Criterios de exclusión para pacientes**

1. Pacientes con inestabilidad hemodinámica, eléctrica o datos de choque.
2. Pacientes con complicaciones mecánicas del infarto.
3. Pacientes que cursen con síndrome anémico o que hayan recibido hemotransfusión en el último mes previo al ingreso.
4. Antecedentes de enfermedad neoplásica, inflamatoria crónica o proceso infeccioso activo.
5. Antecedentes de tratamiento previo con anti-inflamatorios o inmunosupresores.
6. Niveles de creatinina  $\geq 1.6$  mg/dl.
7. Trombocitopenia o discrasia sanguínea conocida.
8. Pacientes a los que no se logre obtener la cantidad de sangre necesaria para los ensayos.
9. Pacientes en los que no se logre obtener el número de monocitos necesarios para los experimentos.
10. Pacientes que no acepten participar en el estudio.

### **Tamaño de la muestra**

Dado que no existen referencias que demuestren la participación de la IL-17 en la activación de monocitos derivados de pacientes con infarto agudo del miocardio, el tamaño de muestra se calculó para diferencia de medias de los niveles de IL-17 de los pacientes con infarto agudo del miocardio en comparación con los pacientes con dolor torácico [11], con un valor de delta de 51.5,  $1-\alpha = 95\%$ , y  $1-\beta = 80\%$ , con lo que se consideraron 14 personas por grupo.

## **Variables**

Definición de variables:

### **Fractalquina**

Definición conceptual:

Definición operacional:

Escala de medición:

Tipo de variable:

### **IL-10**

Definición conceptual:

Definición operacional:

Escala de medición:

Tipo de variable:

### **IL-17A**

Definición conceptual:

Definición operacional:

Escala de medición: Presente o ausente

Tipo de variable: Nominal

### **IL-1 $\beta$**

Definición conceptual:

Definición operacional:

Escala de medición:

Tipo de variable:

### **IL- 6**

Definición conceptual:

Definición operacional:

Escala de medición:

Tipo de variable:

### **MCP-1**

Definición conceptual:

Definición operacional:

Escala de medición:

Tipo de variable:

### **TNF $\alpha$ :**

Definición conceptual: Se considera una citocinaproinflamatoria que activa las células endoteliales de los monocitos.

Definición operacional:  
Escala de medición:  
Tipo de variable:

**VEGF**

Definición conceptual:  
Definición operacional:  
Escala de medición:  
Tipo de variable:

**Infarto Agudo del miocardio con elevación del segmento ST:**

Definición conceptual:  
Definición operacional:  
Escala de medición:  
Tipo de variable:

**Angina recurrente:**

Definición conceptual:  
Definición operacional:  
Escala de medición:  
Tipo de variable:

**Reinfarto:**

Definición conceptual:  
Definición operacional:  
Escala de medición:  
Tipo de variable:

**Necesidad de procedimientos de revascularización:**

Definición conceptual:  
Definición operacional:  
Escala de medición:  
Tipo de variable:

**Muerte cardiovascular:**

Definición conceptual:  
Definición operacional:  
Escala de medición:  
Tipo de variable:

## **Material y métodos**

### Toma de muestras de sangre

Las muestras sanguíneas de pacientes con IAM se obtuvieron de vía venosa, catéter periférico o catéter central (el primer día y 5 días después del IAM), previa asepsia y antisepsia, se obtuvo un volumen de 20 ml de sangre que se colocó en tubos con EDTA.

### Obtención de células mononucleares

Las células mononucleares fueron obtenidas de sangre periférica de pacientes con IAM y donadores sanos mediante un gradiente de densidades de la siguiente manera. La sangre se diluyó en una relación 1:2 en solución salina isotónica 0.9%, posteriormente 40 ml de sangre diluida se colocaron sobre 10 ml de Lymphoprep (Axis-Shield, Cambridgeshire, UK) en un tubo de 50 ml y se centrifugó a 2000 rpm durante 30 minutos; concluido el tiempo de centrifugación se recuperó el anillo de la interfase (entre el Lymphoprep y el plasma) correspondiente a la células mononucleares y se lavaron dos veces con solución salina isotónica 0.9% a 1200 rpm por 15 minutos y 900 rpm 10 minutos; descartando el sobrenadante, el paquete celular se resuspendió en 1 ml de medio RPMI al 10% de suero fetal bovino (SFB).

### Purificación de monocitos humanos por selección negativa

Los monocitos fueron purificados empleando el “Kit Pan Monocytelsolation, human” (MiltenyiBiotec, BergischGladbach, Germany) para el aislamiento de monocitos totales por selección negativa. Brevemente, para  $10^7$  células mononucleares, se resuspendieron en 30  $\mu$ l de regulador MACS (PBS-BSA al 0.5%-EDTA), se adicionaron 10  $\mu$ l del reactivo para bloqueo de receptores Fc y 10  $\mu$ l de la mezcla de anticuerpos unidos a biotina, los cuales están dirigidos contra linfocitos T, linfocitos B, linfocitos NK, granulocitos, eritrocitos y plaquetas; se incubaron durante 5 minutos a 4°C, las células se lavaron con 1 ml de regulador MACS y se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos; el paquete celular se resuspendió en 60  $\mu$ l de regulador MACS y se adicionaron 20  $\mu$ l de perlas magnéticas acopladas a un anticuerpo anti-biotina (Anti-BiotinMicroBeads), se incubó por 10 minutos

a 4°C, posteriormente se lavaron con 1 ml de regulador MACS y se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos; el paquete celular se resuspendió en regulador MACS y se pasaron por una columna de separación LS MACS (MiltenyiBiotec), se lavó la columna y se recuperó la fracción negativa correspondiente a monocitos totales, las células se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos, el paquete celular se resuspendió en 1 ml de medio RPMI al 10% de suero fetal bovino (SFB)

#### Purificación de monocitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>

Los monocitos totales obtenidos anteriormente se centrifugaron a 1500 rpm por 10 minutos, para  $5 \times 10^7$  células se resuspendieron en 50  $\mu$ l de regulador MACS (PBS-BSA al 0.5%-EDTA) y se adicionaron 50  $\mu$ l de microperlas anti-CD16 (MiltenyiBiotec MACS), se incubó por 30 minutos a 4°C, posteriormente se lavaron con 1 ml de regulador MACS y se centrifugaron a 1500 rpm por 10 minutos; el paquete celular se resuspendió en regulador MACS y se pasaron por la columna de separación LS MACS (MiltenyiBiotec MACS), se lavó la columna, recuperando la fracción negativa correspondiente a monocitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>, las células se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos, el paquete celular se resuspendió en 1 ml de medio RPMI al 10% de suero fetal bovino (SFB). Se realizó una tinción de las células recuperadas con anticuerpo anti-CD14-APC y anti-CD16-PECy7 (eBioscience, San Diego, CA) y se evaluó en el citómetro de flujo MACS Quant (MiltenyiBiotec), el análisis de las moléculas se realizó mediante el Software FlowJo versión 7.6.5. (TreeStar, Inc.).

#### Purificación de monocitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>

Las monocitos totales obtenidos anteriormente se centrifugaron a 1500rpm por 10 minutos, para  $5 \times 10^7$  células se resuspendieron en 50 $\mu$ l de regulador MACS (PBS-BSA al 0.5%-EDTA) y se adicionaron 50 $\mu$ l de microperlas anti-CD16 (MiltenyiBiotec), se incubó por 30 minutos a 4°C, posteriormente se lavaron con 1ml de regulador MACS y se centrifugaron a 1500rpm por 10 minutos; el paquete celular se resuspendió en regulador MACS y se pasaron por la columna de separación LS MACS, se lavó la columna, ésta se removió del separador añadiendo 5-6ml de regulador MACS, se aplicó presión con el émbolo recuperando la fracción positiva correspondiente a los monocitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, las

células se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos, el paquete celular se resuspendió en 1 ml de medio RPMI al 10% de suero fetal bovino (SFB). Se realizó una tinción de las células recuperadas con anticuerpo anti-CD14-APC y anti-CD16-PECy7 (eBioscience) y se evaluó en el citómetro de flujo MACS Quant (MiltenyiBiotec MACS), el análisis de las moléculas se realizó mediante el Software FlowJo versión 7.6.5. (TreeStar, Inc.).

#### Determinación de TNF- $\alpha$ , IL-6.

Se determinaron las concentraciones de TNF- $\alpha$ , IL-6 por ELISA (eBioscienceInc) en sobrenadantes, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, se adicionaron 100  $\mu$ l del anticuerpo de captura toda la noche a 4°C, posteriormente se lavó 5 veces con PBS-Tween 0,05% (Sigma), después se adicionaron 200  $\mu$ l de regulador de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavó 5 veces la placa con PBS-Tween 0,05%, se adicionaron 100  $\mu$ l de las muestras y estándares 1 hora a temperatura ambiente, se lavó 5 veces la placa con PBS-Tween 0,05% y se adicionaron 100  $\mu$ l de avidina HRP 30 minutos a temperatura ambiente, después se adicionaron 100  $\mu$ l de sustrato y se realizó la lectura a 450 nm.

#### Determinación de fractalquina, IL-10, IL-17A, IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP1, TNF, VEGF por Multiplex

Las concentraciones de fractalquina, IL-10, IL-17A, IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP1, TNF, VEGF, se determinaron en suero usando Kit Human Cytokine/ Chemokine Magnetic Bead Panel. Un volumen de 50  $\mu$ l de las diluciones de los estándares y las muestras fueron colocadas en tubos y se mezclaron con 50  $\mu$ l de perlas de captura que están recubiertas con anticuerpos específicos de las citocinas y se adicionaron 50  $\mu$ l del reactivo de detección de citocinas marcado con PE. Los estándares y muestras fueron incubados por 3 horas a temperatura ambiente en oscuridad. La expresión de las citocinas fueron determinadas usando el equipo MAGPIX (eBioscienceInc).

#### Seguimiento clínico

Se realizará una revisión de los expedientes clínicos de los pacientes que acepten participar en el estudio y firmen la carta de consentimiento informado; del expediente clínico se recabará información demográfica, evolución clínica incluyendo complicaciones, resultados de estudios de laboratorio y gabinetes, así como de los procedimientos de revascularización realizados durante su hospitalización en caso de que se hayan realizado. Para la investigación de los desenlaces clínicos considerados en este estudio a 3 y 6 meses, se dará seguimiento vía telefónica y a través de la revisión de expedientes clínicos.

## **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 cuantitativas y comparación de grupos de pacientes se emplearán t de Student o U de Mann Whitney. El análisis de variables cuantitativas intragrupo se empleará t pareada o Wilcoxon, según su distribución. 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  $p \leq 0.05$ . El análisis estadístico de los datos se realizará utilizando el programa de cómputo SPSS 20.

## **Recursos, financiamiento y factibilidad**

El Hospital de Cardiología, del Centro Médico Nacional Siglo XXI tiene un ingreso mensual promedio de 80 pacientes con diagnóstico de síndrome coronario agudo, por lo cual, se cuenta con la cantidad suficiente de pacientes para poder realizar el protocolo de estudio. Se revisarán los expedientes clínicos para la obtención de los datos demográficos de los pacientes

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

## **Aspectos éticos**

Este protocolo corresponde a un estudio de riesgo mínimo de acuerdo al reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación, ya que se tomarán dos muestras de sangre a los pacientes con infarto agudo del miocardio. Los pacientes con infarto se incluirán dentro de las primeras 24 horas del evento, una vez que hayan recibido la terapia inicial de acuerdo con las guías de práctica clínica a criterio de su médico tratante y se haya estabilizado clínicamente al paciente. No se interferirá en ningún momento con las decisiones terapéuticas en cada caso, y no se incluirán pacientes inestables ni en estado crítico. Dado estas características se solicitará consentimiento verbal informado a los pacientes. Se mantendrá la confidencialidad de los datos personales de los pacientes, ya que no se incluirán en el protocolo sus nombres o datos de localización; así mismo, no se guardarán muestras sanguíneas de los pacientes, éstas serán utilizadas exclusivamente para la realización de los experimentos y análisis y posteriormente serán desechadas.

## CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

### Etapa 1

- Duración: 6 meses
- **Descripción de la etapa:** Estandarización de las técnicas en particular en cuanto a la capacidad de adhesión y migración de las subpoblaciones de monocitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> y CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, en las células HUVEC activadas con IL-17, en sujetos sanos, posteriormente estos datos se compararan con lo que se encuentren en los pacientes con infarto agudo del miocardio.
- **Productos entregables:** Se podría poner a la disposición de quien lo necesite la metodología para determinar adhesión y migración de las subpoblaciones de monocitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> y CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>.

### Etapa 2

- Duración: 6 meses
- **Descripción de la etapa:** Ensayos de adhesión y migración de las subpoblaciones de monocitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> y CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> derivadas de pacientes con infarto agudo del miocardio. También, se determinará el patrón de expresión de las moléculas: HLA-DR, CD40, CD86, CCR2 y CX3CR1 en las subpoblaciones de monocitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> y CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> al interactuar con las HUVEC estimuladas con IL-17, en pacientes con IAM y sujetos sanos.
- **Productos entregables:** Se podría poner a la disposición de quien lo necesite la metodología para determinar la expresión de moléculas HLA-DR, CD40, CD86, CCR2 y CX3CR1 por citometría de flujo.

### Etapa 3

- Duración: 6 meses
- **Descripción de la etapa:** Se cuantificarán los niveles IL-1 e IL-6 en el sobrenadante de los cultivos celulares derivados de pacientes con infarto agudo del miocardio y sujetos sanos. Además, se determinará la expresión HLA-DR, CD40, CD86, CCR2 y CX3CR1 en las subpoblaciones de monocitos al estímulo de la IL-17, en pacientes con infarto agudo del miocardio y sujetos sanos.
- **Productos entregables:** Se podría poner a la disposición de quien lo necesite la metodología para determinar IL-1 e IL-6 en sobrenadante por ELISA.

### Etapa 4

- Duración: 6 meses
- **Descripción de la etapa:** Se determinarán los niveles de IL-17 en suero y se realizarán los análisis estadísticos con las correlaciones de los resultados obtenidos en las etapas previas y se estructurará un manuscrito para su publicación.
- **Productos entregables:** Se podría poner a la disposición de quien lo necesite la metodología para determinar IL-17 en suero.

**Productos entregables:** Se podría transferir la tecnología con los parámetros de normalidad de las distintas moléculas determinadas. Además, los conocimientos generados permitirán en un futuro abordar mejor la enfermedad. Se enviará a publicar los resultados de este proyecto a una revista indexada y con circulación internacional. También, se graduará un alumno de Maestría en Ciencias. Por otro lado, se podrá dar apoyo técnico y científico en el uso del citómetro de flujo a cualquier Servicio o Unidad de Investigación que lo solicite

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Inflammation in atherosclerosis, Peter Libby, Cardiovascular Division, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital, and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, *Nature*, Vol 420, december 2002.
- 2.- Inflammation in atherosclerosis, Peter Libby, *ArteriosclerThrombVasc Biol.* 2012; 32:2045-2051.
- 3.-Braunwald
- 4.-Galkina E, Ley K: Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *ArteriosclerThrombVascBiol* 27:2292, 2007.
- 5.-Soehnlein O, Drechsler M, Doring Y, et al: Distinct functions of chemokine receptor axes in the atherogenic mobilization and recruitment of classical monocytes. *EMBO Mol Med* 5:471,2013.
- 6.-Kzhyshkowska J, Neyen C, Gordon S: Role of macrophage scavenger receptors in atherosclerosis. *Immunobiology* 217:492, 2012.
- 7.- Anderson J, Libby P, Hansson GK: Adaptive immunity and atherosclerosis. *ClinImmunol* 134:33, 2010.
- 8.-Tsimikas S, Hall JL: Lipoprotein (a) as a potencial causal genetic risk factor of cardiovascular disease: A rationale for increased efforts to understand its pathophysiology and develop targeted therapies. *J Am CollCardiol* 60:716, 2012.
- 9.- Ait- Oufella H, Taleb S, Mallat Z, Tedgui A: Cytokine network and T cell immunity in atherosclerosis. *SeminImmunopathol* 31:23, 2009.
- 10.- Gomez D, Owens GK: Smooth muscle cell phenotypic switching in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 95:156, 2012.
- 11.-Geng YJ, Libby P: Progression of atheroma: A struggle between death and procreation. *ArteriosclerThrombVascBiol* 22:1370, 2002.
- 12.- Montero-Vega MT. The inflammatory process underlying atherosclerosis. *Crit Rev Immunol* 2012;32:373-462.
- 13.- Dong C. Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17 producing cells. *Nat Rev Immunol* 2006;6:329-333.

- 14.-[Ivanov II](#), [Zhou L](#), [Littman DR](#). Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation. [SeminImmunol](#) 2007;19:409-417.
- 15.-[Dong C](#). TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. [Nat Rev Immunol](#) 2008;8:337-348
- 16.-[Bettelli E](#), [Korn T](#), [Kuchroo VK](#). Th17: the third member of the effector T cell trilogy. [CurrOpinImmunol](#) 2007;19:652-657.
- 17.- [Shah K](#), [Lee WW](#), [Lee SH](#), [Kim SH](#), [Kang SW](#), [Craft J](#), [Kang J](#). Dysregulated balance of Th17 and Th1 cells in systemic lupus erythematosus. [Arthritis Res Ther](#) 2010;12(2):R53-R62.
- 18.- [Koenders MI](#), [Lubberts E](#), [Oppers-Walgreen B](#), [van den Berselaar L](#), [Helsen MM](#), [Kolls JK](#), [Joosten LA](#), [van den Berg WB](#). Induction of cartilage damage by overexpression of T cell interleukin-17A in experimental arthritis in mice deficient in interleukin-1. [ArthritisRheum](#) 2005;52:975-983
- 19.- [Gao Q](#), [Jiang Y](#), [Ma T](#), [Zhu F](#), [Gao F](#), [Zhang P](#), [Guo C](#), [Wang Q](#), [Wang X](#), [Ma C](#), [Zhang Y](#), [Chen W](#), [Zhang L](#). A critical function of Th17 proinflammatory cells in the development of atherosclerotic plaque in mice. [J Immunol](#) 2010;185:5820-5827.
- 20.- [Eid RE](#), [Rao DA](#), [Zhou J](#), [Lo SF](#), [Ranjbaran H](#), [Gallo A](#), [Sokol SI](#), [Pfau S](#), [Poerber JS](#), [Tellides G](#). Interleukin-17 and interferon-gamma are produced concomitantly by human coronary artery-infiltrating T cells and act synergistically on vascular smooth muscle cells. [Circulation](#) 2009;119:1424-1432.
- 21.- [Liu Z](#), [Lu F](#), [Pan H](#), [Zhao Y](#), [Wang S](#), [Sun S](#), [Li J](#), [Hu X](#), [Wang L](#). Correlation of peripheral Th17 cells and Th17-associated cytokines to the severity of carotid artery plaque and its clinical implication. [Atherosclerosis](#) 2012;221:232-241.
- 22.- [Cheng X](#), [Yu X](#), [Ding YJ](#), [Fu QQ](#), [Xie JJ](#), [Tang TT](#), [Yao R](#), [Chen Y](#), [Liao YH](#). The Th17/Treg imbalance in patients with acute coronary syndrome. [ClinImmunol](#) 2008;127:89-97
- 23.- [Ait-Oufella H](#), [Taleb S](#), [Mallat Z](#), [Tedgui A](#). Recent advances on the role of cytokines in atherosclerosis. [ArteriosclerThrombVascBiol](#) 2011;31:969-979.
- 24.-[Onishi RM](#), [Gaffen SL](#). Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. [Immunology](#) 2010;129:311-321.
- 25.- [Jovanovic DV](#), [Di Battista JA](#), [Martel-Pelletier J](#), [Jolicoeur FC](#), [He Y](#), [Zhang M](#), [Mineau F](#), [Pelletier JP](#). IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. [J Immunol](#) 1998;160:3513-3521.

- 26.- [Shahrara S](#), [Pickens SR](#), [Mandelin AM 2nd](#), [Karpus WJ](#), [Huang Q](#), [Kolls JK](#), [Pope RM](#). IL-17-mediated monocyte migration occurs partially through CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 induction. [J Immunol](#) 2010;184:4479-4487
- 27.-[Kevil CG](#), [Patel RP](#), [Bullard DC](#). Essential role of ICAM-1 in mediating monocyte adhesion to aortic endothelial cells. [Am J Physiol Cell Physiol](#) 2001;281:C1442-C1447.
- 28.- [Erbel C](#), [Chen L](#), [Bea F](#), [Wangler S](#), [Celik S](#), [Lasitschka F](#), [Wang Y](#), [Böckler D](#), [Katus HA](#), [Dengler TJ](#). Inhibition of IL-17A attenuates atherosclerotic lesion development in apoE-deficient mice. [J Immunol](#) 2009;183:8167-8175
- 29.- [Usui F](#), [Kimura H](#), [Ohshiro T](#), [Tatsumi K](#), [Kawashima A](#), [Nishiyama A](#), [Iwakura Y](#), [Ishibashi S](#), [Takahashi M](#). Interleukin-17 deficiency reduced vascular inflammation and development of atherosclerosis in Western diet-induced apoE-deficient mice. [Biochem Biophys Res Commun](#) 2012;420:72-77.
- 30.- [Shahrara S](#), [Pickens SR](#), [Dorfleutner A](#), [Pope RM](#). IL-17 induces monocyte migration in rheumatoid arthritis. [J Immunol](#) 2009;182:3884-3891.
- 31.-[Serbina NV](#), [Jia T](#), [Hohl TM](#), [Pamer EG](#). Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. [Annu Rev Immunol](#) 2008;26:421-452.
- 32.- [Skrzeczyńska-Moncznik J](#), [Bzowska M](#), [Loseke S](#), [Grage-Griebenow E](#), [Zembala M](#), [Pryjma J](#). Peripheral blood CD14<sup>high</sup> CD16<sup>+</sup> monocytes are main producers of IL-10. [Scand J Immunol](#) 2008;67:152-159.
- 33.- [Sánchez-Torres C](#), [García-Romo GS](#), [Cornejo-Cortés MA](#), [Rivas-Carvalho A](#), [Sánchez-Schmitz G](#). CD16<sup>+</sup> and CD16<sup>-</sup> human blood monocyte subsets differentiate in vitro to dendritic cells with different abilities to stimulate CD4<sup>+</sup> T cells. [Int Immunol](#) 2001;13:1571-1581.
- 34.- [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;67:699-704.
- 35.- [Belge KU](#), [Dayyani F](#), [Horelt A](#), [Siedlar M](#), [Frankenberger M](#), [Frankenberger B](#), [Espevik T](#), [Ziegler-Heitbrock L](#). The proinflammatory CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>DR<sup>++</sup> monocytes are a major source of TNF. [J Immunol](#) 2002;168:3536-3542.
- 36.-[Grage-Griebenow E](#), [Flad HD](#), [Ernst M](#). Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. [J Leukoc Biol](#) 2001;69:11-20.

- 37.- [Ley K](#), [Laudanna C](#), [Cybulsky MI](#), [Nourshargh S](#). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. [Nat Rev Immunol](#) 2007;7:678-689.
- 38.- [Boring L](#), [Gosling J](#), [Cleary M](#), [Charo IF](#). Decreased lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. [Nature](#) 1998;394:894-897.
- 39.- [Leuschner E](#), [Dutta P](#), [Gorbatov R](#), [Novobrantseva TI](#), [Donahoe JS](#), [Courties G](#), [Lee KM](#), [Kim JI](#), [Markmann JF](#), [Marinelli B](#), [Panizzi P](#), [Lee WW](#), [Iwamoto Y](#), [Milstein S](#), [Epstein-Barash H](#), [Cantley W](#), [Wong J](#), [Cortez-Retamozo V](#), [Newton A](#), [Love K](#), [Libby P](#), [Pittet MJ](#), [Swirski FK](#), [Koteliansky V](#), [Langer R](#), [Weissleder R](#), [Anderson DG](#), [Nahrendorf M](#). Therapeutic siRNA silencing in inflammatory monocytes in mice. [Nat Biotechnol](#) 2011;29:1005-1010.
- 40.- [Shantsila E](#), [Wrigley B](#), [Tapp L](#), [Apostolakis S](#), [Montoro-Garcia S](#), [Drayson MT](#), [Lip GY](#). Immunophenotypic characterization of human monocyte subsets: possible implications for cardiovascular disease pathophysiology. [J Thromb Haemost](#) 2011;9:1056-1066.
- 41.- [Qi X](#), [Li J](#), [Gu J](#), [Li S](#), [Dang Y](#), [Wang T](#). Plasma levels of IL-8 predict early complications in patients with coronary heart disease after percutaneous coronary intervention. [Jpn Heart J](#) 2003;44:451-461.
- 42.- [Rogacev KS](#), [Ulrich C](#), [Blömer L](#), [Hornof F](#), [Oster K](#), [Ziegelin M](#), [Cremers B](#), [Grenner Y](#), [Geisel J](#), [Schlitt A](#), [Köhler H](#), [Fliser D](#), [Girndt M](#), [Heine GH](#). Monocyte heterogeneity in obesity and subclinical atherosclerosis. [Eur Heart J](#) 2010;31:369-376.
- 43.- [Rogacev KS](#), [Cremers B](#), [Zawada AM](#), [Seiler S](#), [Binder N](#), [Ege P](#), [Große-Dunker G](#), [Heisel J](#), [Hornof F](#), [Jeken J](#), [Rebling NM](#), [Ulrich C](#), [Scheller B](#), [Böhm M](#), [Fliser D](#), [Heine GH](#). CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes independently predict cardiovascular events: a cohort study of 951 patients referred for elective coronary angiography. [J Am Coll Cardiol](#) 2012;60:1512-1520.
- 44.- [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;54:130-138.
- 45.- [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;16:1437-1447.

46.- [Mosig S](#), [Rennert K](#), [Krause S](#), [Kzhyshkowska J](#), [Neunübel K](#), [Heller R](#), [Funke H](#). Different functions of monocyte subsets in familial hypercholesterolemia: potential function of CD14+ CD16+ monocytes in detoxification of oxidized LDL. [FASEB J](#) 2009;23:866-874.

ANEXOS



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**  
SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**  
**UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN**  
**Y POLITICAS DE SALUD**  
**COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD**

**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**  
**(ADULTOS)**

**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN**

Nombre del estudio:	Evaluación de la adhesión, migración y activación de las subpoblaciones de monocitos provenientes de pacientes con infarto agudo del miocardio en respuesta a IL-17
Patrocinador externo (si aplica):	
Lugar y fecha:	MÉXICO, DF
Número de registro:	R-2013-785-030
Justificación y objetivo del estudio:	Usted ha sido invitado a participar en este estudio porque, como ya le comenté su médico, usted sufrió un infarto en su corazón. Durante un infarto, existen ciertas células que se acumulan en las arterias de su corazón y que provocan que se inflame y se dañe, ocasionándole a usted problemas de salud importantes. Es por ello, que con este estudio pretendemos estudiar esas células que se acumulan en su corazón durante el infarto, para ver cómo funcionan y para poder investigar otras líneas de tratamiento que pudieran ayudarle a disminuir los eventos cardiovasculares agudos como nuevos infartos, y mejorar su pronóstico de vida.
Procedimientos:	Su participación en este estudio consiste en que nos permita tomarle dos muestra de sangre de aproximadamente 20 ml, (esto sería como dos cucharadas soperas de sangre), la primera muestra se le tomará al momento que acepte participar en este estudio, y la segunda se le tomará antes de que lo den de alta del hospital. Además, solicitamos su autorización para tomar información de su expediente referente a las enfermedades que usted padece, la forma en que ha respondido al tratamiento para su infarto y los resultados de los estudios que le realicen durante su hospitalización. Si usted acepta, lo contactaremos por vía telefónica a los 3 meses y 6 meses después de que haya sido dado de alta del hospital, para preguntarle cómo ha evolucionado y como ha respondido al tratamiento.
Posibles riesgos y molestias:	El riesgo que puede presentarse con la toma de muestras de sangre es que se le haga un moretón en el sitio por donde se le pique para sacar la sangre. No afectaremos su tratamiento, por lo que no implica un riesgo para su salud.
Posibles beneficios que recibirá al participar en el	

estudio:	
Información sobre resultados y alternativas de tratamiento:	Cualquier resultado de importancia para su enfermedad, se le dará a conocer a su médico familiar tratante.
Participación o retiro:	Voluntaria
Privacidad y confidencialidad:	Su participación en el estudio es totalmente confidencial, los datos que se obtendrán de su expediente, así como los resultados de los análisis de sus muestras de sangre se mantendrán en privado únicamente con las personas involucradas en este trabajo de investigación.
En caso de colección de material biológico (si aplica):	
<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<p>No autoriza que se tome la muestra.</p> <p>Si autorizo que se tome la muestra solo para este estudio.</p> <p>Si autorizo que se tome la muestra para este estudio y estudios futuros.</p>
Disponibilidad de tratamiento médico en derechohabientes (si aplica):	
Beneficios al término del estudio:	
En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a:	
Investigador Responsable:	Dra. María Alejandra Madrid Miller
Colaboradores:	Dra. Nataly Alejandra Pérez Velázquez
<p>En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a: Comisión de Ética de Investigación de la CNIC del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4° piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos, Colonia Doctores. México, D.F., CP 06720. Teléfono (55) 56 27 69 00 extensión 21230, Correo electrónico: <a href="mailto:comision.etica@imss.gob.mx">comision.etica@imss.gob.mx</a></p>	
<p>_____</p> <p>Nombre y firma del sujeto</p>	
<p>_____</p> <p>Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento</p>	
<p>Testigo 1</p>	
<p>Testigo 2</p>	

---

Nombre, dirección, relación y firma

---

Nombre, dirección, relación y firma

Este formato constituye una guía que deberá completarse de acuerdo con las características propias de cada protocolo de investigación, sin omitir información relevante del estudio

**Clave: 2810-009-013**

Protocolo de investigación

***“Evaluación de la activación de las subpoblaciones de monocitos provenientes de pacientes con infarto agudo del miocardio en respuesta a IL-17 y su asociación con el desenlace clínico”***

No. Registro CNI : \_\_\_\_

Hoja de Recolección de Datos

Folio \_\_\_\_\_

Nombre \_\_\_\_\_ Afiliación \_\_\_\_\_

Género M ( ) F ( ) Edad \_\_\_\_\_

Dirección \_\_\_\_\_ Teléfono \_\_\_\_\_

Fecha de ingreso: \_\_\_\_\_

DIAGNÓSTICO: fecha evento: \_\_\_\_\_ hora: \_\_\_\_\_

**IAMcEST ( ) IAMsEST ( ) Angina inestable ( ) Cardiopatía isquémica crónica ( ) Control Sano ( )**

Peso \_\_\_\_\_ Talla \_\_\_\_\_ IMC \_\_\_\_\_ Cintura \_\_\_\_\_ TA \_\_\_\_\_ FC: \_\_\_\_\_

Antecedentes:

Tabaquismo  SI  NO IT \_\_\_\_\_ DLP  SI  NO

DM  SI  NO HAS  SI  NO

AngorPrev  Si  NO IAM prev  SI  NO

ICP previo  SI  NO RVM Qxprev  SI  NO

ECG:

NORMAL:  SI  NO

	Anterior	Inferior	Lateral	VD
--	----------	----------	---------	----

ISENDO				
ISEPI				
LESENDO				
LESEPI				

BRHH  SI  NO BRDHH  SI  NO

ECO FEVI \_\_\_\_\_ MOVILIDAD:  NORMAL  ANORMAL

**Fibrinolisis:**  SI  NO Fármaco: \_\_\_\_\_ Criterios reperfusión:  SI  NO  
 CUALES: \_\_\_\_\_

**Cateterismo** Fecha: \_\_\_\_\_ tiempo transcurrido del evento SICA en hrs. \_\_\_\_\_

TCI \_\_\_\_\_ DA \_\_\_\_\_ Dx \_\_\_\_\_ Cx \_\_\_\_\_ MO \_\_\_\_\_ CD \_\_\_\_\_ DP \_\_\_\_\_ FEVI \_\_\_\_\_ D2VI \_\_\_\_\_

Enf. 1 vaso  Enf 2 vasos  Enf. 3 vasos

**ACTP PRIMARIA:**  SI  NO EXITOSA:  SI  NO  NO REFLOW

Angioplastía temprana (<72hrs)  SI  NO Angioplastía programada  SI  NO

Fecha: \_\_\_\_\_

Vaso \_\_\_\_\_ Stent \_\_\_\_\_ TIMI \_\_\_\_\_ BLUSH \_\_\_\_\_ Complicaciones: \_\_\_\_\_

**Revascularización quirúrgica:** S  O  Fecha: \_\_\_\_\_

Puentes: \_\_\_\_\_ Complicaciones: \_\_\_\_\_

**Tratamiento:**

AAS  SI  NO Inhibidores GPIIb/IIIa  SI  NO

Clopidogrel  SI  NO Heparina no fraccionada  SI  NO

Betabloqueado  SI  NO Heparina bajo peso  SI  NO

Estatinas  SI  NO ECAS  SI  NO

Fibratos:  SI  NO inotrópicos  SI  NO

**ANTIINFLAMATORIOS**  SI  NO Otros, cuales: \_\_\_\_\_

### Laboratorio

FECHA:			INGRESO	PICO MAXIMO
Colesterol		CPK		
Triglicéridos		CPK MB		
HDL		TROPONINAS		
LDL		FIBRINOGENO		
VLDL		HB		
PCR		LEUCOCITOS		
BNP		MONOCITOS		
HbA1c		SEGMENTADOS		
		LINFOCITOS		
		PLAQUETAS		
		GLUCOSA		
		CREATININA		

### Eventos cardiovasculares mayores intrahospitalaria:

Reinfarto  SI  NO Angina recurrente  SI  NO

Falla ventricular  SI  NO Choque  SI  NO

Muerte  SI  NO Necesidad revascularización urgente  SI  NO





**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**  
DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS  
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN Y POLÍTICAS DE SALUD  
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

30 de abril del 2013

Ref. 09-B5-61-2800/201300/ 1126

Dr. Chavez Sanchez Luis  
Unidad de Investigación Médica en Inmunología Siglo XXI  
Nivel Central

Presente:

Informo a usted que el protocolo titulado: **Evaluación de la adhesión, migración y activación de las subpoblaciones de monocitos provenientes de pacientes con infarto agudo del miocardio en respuesta a IL-17.**, fue sometido a la consideración de esta Comisión Nacional de Investigación Científica.

Los procedimientos propuestos en el protocolo cumplen con los requerimientos de las normas vigentes, con base en las opiniones de los vocales de la Comisión de Ética y Científica, se ha emitido el dictamen de **AUTORIZADO**, con número de registro: R-2013-785-030.

De acuerdo a la normatividad institucional vigente, deberá informar a esta Comisión en los meses de Enero y Julio de cada año, acerca del desarrollo del proyecto a su cargo.

Atentamente,

  
Dr. Fabio Salamanca-Gómez  
Presidente  
Comisión Nacional de Investigación Científica

Anexo comentarios:

 JM/IA/iah. F-CNIC-2013-22

**IMSS**

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

4º piso Edificio "E" de la Unidad de Congressos Av. Cuauhtémoc 330 Col. Doctores México 06720 56276900 ca 21210 comisa@cis.gob.mx