



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

TESIS

**“Efecto de las células estromales mesenquimales en  
macrófagos M1 y M2a en el STEMI”**

Que para obtener el título de:

**QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA**

PRESENTA:

**PAMELA MICHELLE SALINAS ARREOLA**

TUTOR DE TESIS:

**DR. LUIS CHÁVEZ SÁNCHEZ**

**CDMX**

**AÑO 2023**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: Dr. Mario Adán Moreno Eutimio  
**VOCAL:** Profesor: Dr. Ismael Mancilla Herrera  
**SECRETARIO:** Profesor: Dr. Luis Chávez Sánchez  
**1er. SUPLENTE:** Profesor: Dr. Edgar Ricardo Vázquez Martínez  
**2° SUPLENTE:** Profesor: Lic. Alejandro Torres Flores

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

**ASESOR DEL TEMA:**

\_\_\_\_\_ 

**Dr. Luis Chávez Sánchez**

**SUSTENTANTE (S):**

\_\_\_\_\_ 

**Pamela Michelle Salinas Arreola**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Fondo de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) por el financiamiento de este trabajo a través del programa R-2018-785-044.

Así como a mi tutor principal de tesis al Dr. Luis Chávez Sánchez, por su apoyo incondicional que me retroalimentó en mi formación académica.

## ÍNDICE

ÍNDICE.....	4
RESUMEN.....	7
LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
INTRODUCCIÓN.....	10
MARCO TEÓRICO.....	11
Enfermedades Cardiovasculares.....	11
ATEROSCLEROSIS.....	13
Definición.....	13
Fisiopatología de la aterosclerosis.....	13
Células que participan en la aterosclerosis.....	14
SÍNDROME CORONARIO AGUDO.....	16
Definición.....	16
Infarto Agudo de Miocardio (IAM).....	17
Componentes inmunológicos en el IAM.....	18
Macrófagos.....	19
Mecanismos de activación y polarización de macrófagos en la aterosclerosis.....	20
Macrófagos M1 y M2a en el IAM.....	24
Células estromales mesenquimales.....	26
Efecto de las MSC para polarizar macrófagos M1 y M2.....	27
Interacción de las MSC con los macrófagos induce la generación de linfocitos T reguladores.....	29
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	30
HIPÓTESIS.....	31
OBJETIVO.....	31
Objetivos específicos.....	31
Diagrama de flujo.....	32
METODOLOGÍA.....	33
Aspectos éticos.....	33
Criterios de inclusión y exclusión.....	33
Toma de muestra.....	34
Obtención de células mononucleares.....	34

Aislamiento de los monocitos clásicos .....	35
Ensayo de identificación de citocinas inflamatorias y anti-inflamatorias .....	35
Obtención de células estromales mesenquimales.....	36
Formación de monocapas de las células estromales mesenquimales .....	37
Polarización de monocitos a macrófagos M1 y M2a .....	37
Determinación de la expresión de marcadores asociados a macrófagos M0, M1 y M2a.....	38
Aislamiento de linfocitos T reguladores.....	38
Análisis estadístico .....	38
RESULTADOS.....	39
<i>Características de la población</i> .....	39
<i>Caracterización del microambiente inflamatorio y anti-inflamatorio en pacientes con STEMI.</i> .....	39
<i>Efecto de las MSC en el fenotipo de los macrófagos.</i> .....	41
<i>Evaluación de citocinas anti-inflamatorias en los cocultivos de MSC y macrófagos para     identificar el efecto de la polarización hacia M2.</i> .....	42
<i>Evaluación de la inducción de los linfocitos T reguladores (CD4+, CD25+, FoxP3+) en     cocultivos con MSC.</i> .....	44
DISCUSIÓN .....	46
CONCLUSIONES .....	50
PERSPECTIVAS.....	51
REFERENCIAS.....	51

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Defunciones por enfermedades del corazón por grupos de edad y sexo en México en el año 2021. ....	14
Figura 2. Composición de la placa de ateroma. ....	16
Figura 3. Infarto de miocardio tipo I. ....	20
Figura 4. Subpoblaciones de macrófagos en la placa aterosclerótica. ....	23
Figura 5. Cuantificación de citocinas inflamatorias y anti-inflamatorias en plasma de pacientes con STEMI. ....	43
Figura 6. El efecto de las MSC en la polarización de los macrófagos derivados de pacientes con STEMI. ....	45
Figura 7. Evaluación de citocinas IL-10 e IL-1RA en cocultivos de MSC y macrófagos.....	47
Figura 8. Efecto de las MSC y macrófagos en la generación de linfocitos T reguladores (CD4+, CD25+ y FoxP3+). ....	48
Figura 9. Conclusión. ....	53

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Activación de macrófagos M1 y M2 in vitro.....	24
Tabla 2. Criterios de inclusión y de exclusión.....	36
Tabla 3. Características de la población de estudio.....	41

## RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) representan la primera causa de muerte en México del total de enfermedades cardíacas, de las cuales, el 78.3% de los fallecimientos fue ocasionado por isquemia obstructiva total, siendo el infarto agudo del miocardio (IAM) tipo I el padecimiento que tiene más prevalencia. El IAM tipo I tiene diversas etiologías, sin embargo, en este escrito nos enfocaremos en la que corresponde con elevación en el segmento ST (STEMI) se refiere a la obstrucción total en las arterias coronarias que es generado por un trombo ocasionado por la inestabilidad de la placa aterosclerótica, lo que produce una desregulación en la producción de las células inmunológicas que altera la progresión de la enfermedad.

En este contexto, los macrófagos son células que pertenecen al sistema inmune innato que provienen de los monocitos que bajo ciertas condiciones se polarizan en macrófagos M1 que se caracterizan por mediar procesos inflamatorios, mientras que los macrófagos M2a intervienen en procesos antiinflamatorios. Sin embargo, se ha reportado que estos mecanismos de regulación en los pacientes con IAM no funciona adecuadamente, por ello se estableció un modelo que involucra a las células estromales mesenquimales (MSC), debido a que se ha descrito en ensayos in vitro que tienen la capacidad de favorecer la polarización de los macrófagos a un fenotipo M2 en modelos con ratones, así como la capacidad de interferir en el ciclo celular de los linfocitos T, disminuyendo su proliferación y favoreciendo su diferenciación a un fenotipo anti-inflamatorio desde un estado inflamatorio, así como la generación de moléculas como la interleucina 10 (IL-10) por parte de las MSC y de la interleucina del receptor antagónico 1 (IL-1RA) por parte de los macrófagos, lo que conlleva a la reparación de la función miocárdica. Sin embargo, los mecanismos inmunorreguladores de las MSC en el STEMI se desconocen, por esta razón se buscó dilucidar el efecto de las células estromales mesenquimales de médula ósea en cocultivo con los macrófagos M1 y M2a derivados de monocitos en pacientes con STEMI a partir de la expresión de marcadores de superficie, función y su capacidad para generar linfocitos T reguladores.

Se realizó un estudio que incluyó a 59 pacientes con STEMI (55 hombres y 4 mujeres) de entre 50 y 78 años de edad con riesgo cardiovascular, así como 20 sujetos sanos de entre 23 y 45 años de edad sin riesgo cardiovascular. A los cuales, se les analizaron citocinas inflamatorias



del plasma y se realizaron cocultivos de macrófagos M0, M1 y M2a con MSC de médula ósea. En lo anterior, se demostró que las MSC en cocultivos con macrófagos de los pacientes, favorecieron la polarización de los macrófagos de un fenotipo M1 a un M2a, aumentando significativamente los marcadores CD14, CD163 y CD206, así como un aumento en la proliferación de linfocitos T reguladores (Treg) CD4+, CD25+ y FoxP3+ derivados de los mismos pacientes, a diferencia de los cultivos sin MSC a través de la señalización de IL-10 e IL-1RA.

Estos resultados demuestran que los macrófagos M1 de los pacientes con STEMI en presencia de las MSC pueden dirigir la inflamación crónica de la enfermedad, aumentando la expresión de marcadores antiinflamatorios e induciendo la proliferación de linfocitos T reguladores en un microambiente en el que prevalecen las moléculas IL-10 e IL-1RA que podrían cumplir un papel regulador, además que la presencia de las MSC mejoran dicha expresión de citocinas, aumentan la inducción de marcadores M2 y la generación de células T reguladoras. Lo que sugiere que las MSC podrían ser utilizadas como un potencial terapéutico para la promover la remodelación del tejido cardíaco y disminuir el daño endotelial en los pacientes con STEMI.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<p><b>CCR:</b> Receptor de quimiocinas con motivo C-C <b>cTn:</b> Troponina cardiaca <b>DAMP:</b> Patrones Moleculares Asociados a Daño <b>DC:</b> Célula dendrítica <b>DMEM:</b> Medio Eagle Modificado de Dulbecco <b>ECV:</b> Enfermedad Cardiovascular <b>GM-CSF:</b> Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos <b>HLA-II:</b> Antígeno Leucocitario Humano clase II <b>IAM:</b> Infarto Agudo de Miocardio <b>ICAM:</b> Molécula de Adhesión Intercelular <b>IL:</b> Interleucina <b>IMSS:</b> Instituto Mexicano del Seguro Social <b>INF:</b> Interferón <b>LDL:</b> Lipoproteína de baja densidad <b>LPS:</b> Lipopolisacárido <b>MCP:</b> Proteína Quimioatrayente de Monocitos <b>M-CSF:</b> Factor Estimulante de Colonias de Macrófagos <b>MMP:</b> Metaloproteinasa</p>	<p><b>MSC:</b> Célula Estromal Mesenquimal <b>NET:</b> Trampa Extracelular de Neutrófilos <b>NF-<math>\kappa</math>b:</b> Factor Nuclear kappa b <b>NK:</b> Linfocito Asesino Natural <b>PAMP:</b> Patrones Moleculares Asociados a Patrones <b>PBMC:</b> Células Mononucleares de Sangre Periférica <b>PECAM:</b> Molécula de Adhesión de Células Endoteliales Plaquetarias <b>PSGL:</b> Ligando 1 de la Glicoproteína P-selectina <b>ROS:</b> Especies Reactivas de Oxígeno <b>RPMI:</b> Medio Roswell Park Memorial Institute <b>SCA:</b> Síndrome Coronario Agudo <b>TLR:</b> Receptor tipo Toll <b>TNF:</b> Factor de Necrosis Tumoral <b>Treg:</b> Linfocitos T reguladores <b>VEGF:</b> Factor de Crecimiento Vascular Endotelial <b>VSMC:</b> Células del Músculo Liso Vascular</p>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) representan la primera causa de muerte en México de acuerdo con estadísticas del 2022 y engloban una gran cantidad de padecimientos entre los cuales se encuentra el infarto agudo del miocardio (IAM), siendo el de tipo I el que tiene más incidencia con un 78.3% del total de defunciones por enfermedades del corazón [1,2]. El IAM engloba una respuesta inmunológica inflamatoria que mayoritariamente se encuentra desregulada debido a que el microambiente se encuentra regulado por los macrófagos, linfocitos, neutrófilos, entre otras células; siendo los macrófagos las células que tienen más relevancia debido a su gran distribución en la placa aterosclerótica [6,8,13].

Se ha reportado que los macrófagos M1 generan un ambiente inflamatorio controlado por citocinas pro-inflamatorias que promueven la inestabilidad de la placa y el daño endotelial, dicha población celular se encuentra abundantemente una vez ocurrido el IAM de forma temprana. Posteriormente, los macrófagos M2a intervienen en procesos antiinflamatorios que logran mejorar la estabilidad de la placa, favorecen la angiogénesis y remodelan el endotelio aórtico [36-38]. En este contexto, se ha reportado en ensayos in vitro que las células estromales mesenquimales (MSC) tienen la capacidad de favorecer la polarización de los macrófagos a un fenotipo M2 a partir de diversas citocinas como la IL-10 y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), lo que le confiere la capacidad de participar en procesos inmunorregulatorios. Lo anterior, promueve que los macrófagos recluten a otras células inmunológicas como monocitos, linfocitos T y aumentar una respuesta inmunológica reguladora mediada por linfocitos T reguladores (Treg) [45,48]. Sin embargo, se desconoce el mecanismo inmunoregulatorio que sucede en los pacientes con STEMI, por ello, se buscó evaluar el efecto de las MSC provenientes de médula ósea sobre la polarización de los macrófagos M1 y M2a derivados de monocitos clásicos de los pacientes con STEMI.

Debido a lo anterior, los resultados serán relevantes para dar a conocer si las MSC logran regular el ambiente inflamatorio a partir del cambio de polarización de macrófagos en un ambiente de IAM, evaluando marcadores de membrana, citocinas solubles, así como la funcionalidad de dichos marcadores para promover la proliferación de linfocitos T reguladores a partir de los macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica, con el propósito de

dilucidar si la interacción de las MSC con los macrófagos pueda ser de utilidad para implementar futuras terapias que favorezcan el control de la respuesta inmunológica en el STEMI.

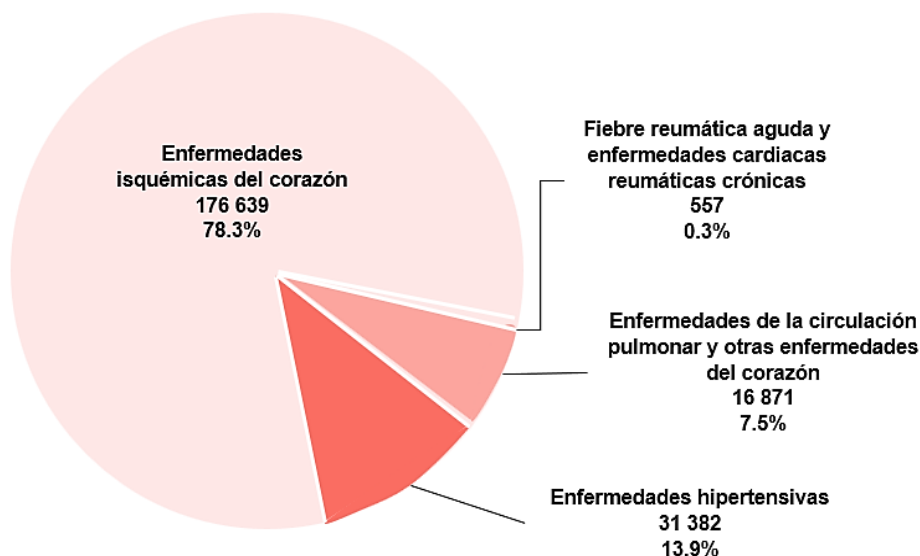
## MARCO TEÓRICO

### Enfermedades Cardiovasculares

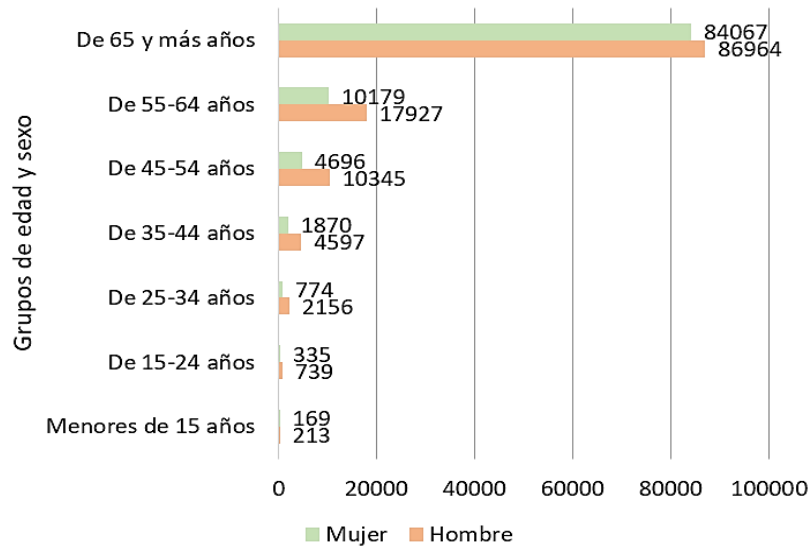
#### Epidemiología

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) consisten en desórdenes del corazón y de los vasos sanguíneos y son la primera causa de muerte a nivel mundial y de acuerdo con la OMS se calculó que fallecieron aproximadamente 17.9 millones de personas en el año 2021 a causa de ECV [1]. En México, del total de enfermedades cardíacas, que ascendieron a 225,449 casos en comparación con el año 2020 el 78.3% de las muertes por enfermedades del corazón fue ocasionado por una isquemia obstructiva total (**Figura 1A**). Además, del total de las muertes por enfermedades del corazón 102,127 (45.30%) corresponden a mujeres y el 123,313 de los casos (54.70%) corresponde a los hombres, siendo el grupo de 65 años y más la población que tuvo más fallecimientos (**Figura 1B**) [2].

#### DEFUNCIONES POR ENFERMEDADES DEL CORAZÓN



**DEFUNCIONES POR ENFERMEDADES DEL CORAZÓN SEGÚN GRUPOS DE EDAD Y SEXO**



**Figura 1. Defunciones por enfermedades del corazón por grupos de edad y sexo en México en el año 2021.** a) Porcentaje de incidencia del número de enfermedades isquémicas del corazón, enfermedades hipertensivas y otros padecimientos cardiacos. b) Número de defunciones por enfermedades cardiacas clasificados en edad y sexo. Fuente: INEGI 2022.

Las ECV tienen factores de riesgo como la dieta inadecuada, la inactividad física, el consumo de alcohol y de tabaco. Los efectos de estos factores de riesgo pueden manifestarse en personas con hipertensión, sobrepeso, obesidad, diabetes mellitus, hiperlipidemia e hiperglucemia [3, 4]. En este contexto de enfermedad cardiovascular, la aterosclerosis es la causa dominante, en el que está incluido el infarto agudo de miocardio (IAM), la insuficiencia cardíaca y el accidente cerebrovascular y en el que se relacionan los factores de riesgo clásicos [5]. A su vez, la aterosclerosis genera inflamación que desregula el ciclo de homeostasis de las células endoteliales, permitiendo el depósito de lipoproteínas que pueden fácilmente tener modificaciones como la oxidación lo que las vuelven moléculas inflamatorias que activan el endotelio vascular, favoreciendo el reclutamiento de diversas células inmunológicas [5,6].

## ATEROSCLEROSIS

### Definición

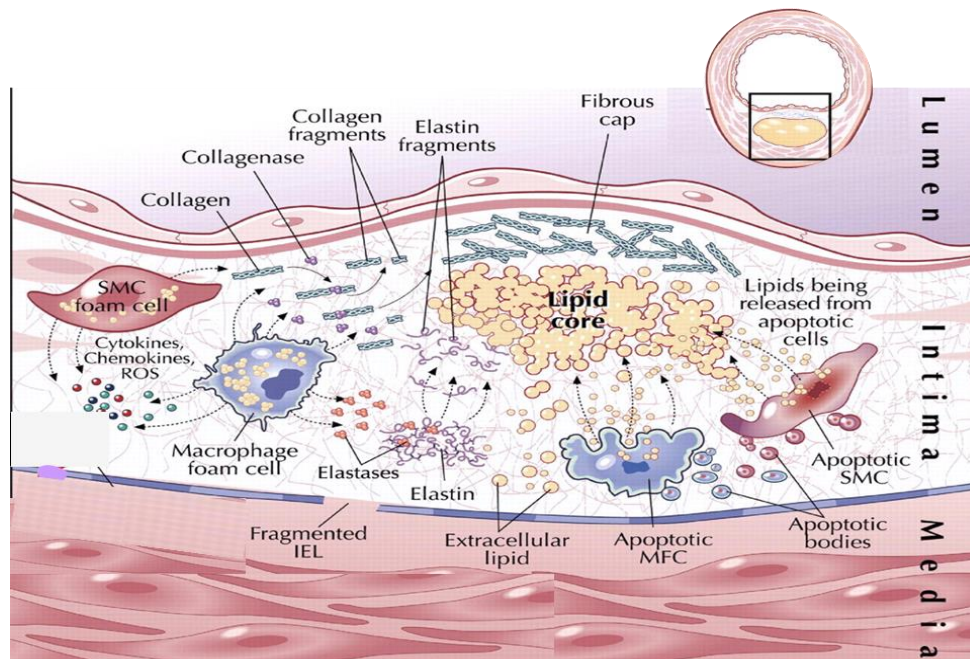
La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica que se localiza principalmente en la íntima de arterias coronarias especialmente donde se dividen los vasos, que se desarrolla por una obstrucción gradual de lipoproteína de baja densidad (LDL) lo que genera inflamación y el reclutamiento de células inmunocompetentes que son abundantes en las lesiones ateroscleróticas y en la producción de citocinas especialmente inflamatorias [5-7].

### Fisiopatología de la aterosclerosis

El desarrollo de la aterosclerosis comienza con disfunción endotelial y con la expresión de moléculas de adhesión como la molécula de adhesión de células endoteliales plaquetarias (PECAM-1), la molécula de adhesión de células vasculares (VCAM-1) y la molécula de adhesión intercelular (ICAM-1), así como citocinas como la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1) que le permiten a los monocitos ingresar a la íntima de la arteria mediante y diferenciarse a macrófago a partir del factor de crecimiento de colonias de macrófagos (MCS-F) y al factor de crecimiento de colonias de macrófagos y granulocitos (GMCS-F) cuando el LDL comienza a acumularse en la íntima de las arterias, en donde sufre modificaciones oxidativas para transformarse en LDL oxidada (OxLDL) que es captada y fagocitada por los macrófagos a partir de CD36 [6,7]. Sin embargo, la capacidad metabólica del macrófago se ve comprometida y promueve la generación de células espumosas que liberan factores de crecimiento y citocinas que inducen aún más el reclutamiento de células inmunológicas, lo que de forma gradual adelgaza la cubierta fibrosa de la íntima al reducir la síntesis de colágeno de las células del músculo liso vascular (VSMC) y favoreciendo su migración de la capa media a la íntima de la arteria donde se dividen y modifican la matriz extracelular (EMC) que, a su vez, contribuye a la formación de la cubierta fibrosa (**Figura 2**) [8-10].

La cubierta fibrosa está formada por un exceso de células apoptóticas que son fagocitadas por los macrófagos, lo que conduce al mal funcionamiento de la eferocitosis y la posterior muerte de los macrófagos que conlleva a la liberación de lípidos, mediadores proinflamatorios/protrombóticos como el factor tisular (TF) y las metaloproteinasas (MMP) que generan el adelgazamiento de la capa fibrosa [10]. Además, se ha reportado que en ratones que carecen

del receptor LDL y MMP-2 en las células sanguíneas de sangre periférica desarrollaron un engrosamiento significativamente menor de la íntima femoral después del daño arterial inducido y de lesiones ateroscleróticas en la aorta en comparación con ratones tipo (WT) [11]. Esta información sugiere que la acumulación de los macrófagos en el sitio de lesión genera que la liberación de factores proinflamatorios que promueven el adelgazamiento de la capa fibrosa arterial lo que empeora la estabilidad de la placa y favorece su ruptura.



**Figura 2. Composición de la placa de ateroma.** El esquema representa la progresión de la placa aterosclerótica desde etapas iniciales de disfunción endotelial por parte de las células del músculo liso (SMC) que conlleva la liberación de colágeno y elastina, hasta la complicación de la placa debido a la generación de ROS, citocinas proinflamatorias que favorecen el adelgazamiento de la pared endotelial, células espumosas y vasculares apoptóticas debido a la acumulación de LDL (tomado de Libby, P. et al., 2020).

### Células que participan en la aterosclerosis

En general, una lesión aterosclerótica se compone de lípidos como LDL y VLDL, células apoptóticas como macrófagos y células del músculo liso cuya población aumenta conforme evoluciona la placa, lo que contribuye a su desestabilización. En las placas avanzadas también se denota la presencia de hemorragia intravascular que se encuentra contenida en una cápsula

amorfa junto con los componentes anteriormente mencionados. La capa fibrosa se ubica entre la luz vascular y el núcleo necrótico y por lo regular es sumamente delgada debido al bajo contenido de colágeno, además, presenta un alto contenido de macrófagos (alrededor del 26%) que liberan MMP y produce que las VSMC se degraden y se reduzca la síntesis de colágeno respectivamente. Por lo cual, un núcleo necrótico grande (>30% del área de la placa aproximadamente) favoreciendo a la ruptura de la placa, lo que conlleva al desarrollo de un trombo luminal rico en plaquetas. También, en ultrasonidos intravasculares se han encontrado calcificaciones asociadas a una mayor estabilidad de la placa aterosclerótica [13-15].

El sistema inmunológico innato funciona como primera barrera del hospedero para combatir patógenos y ayudar a la recuperación de la homeostasis. Este sistema está compuesto por diversos tipos celulares como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas (DC) y células asesinas naturales (NK) [6]. Los macrófagos son la población inmunitaria mayoritaria que se encuentra en las placas arteriales y desempeñan un papel importante en la aterosclerosis, ya que se localizan en un ambiente repleto de citocinas proinflamatorias, estrés oxidativo y patrones moleculares asociados a daño (DAMP), lo que genera que los macrófagos desarrollen una elevada plasticidad que se modifica en la progresión de la enfermedad. Incluso, las células endoteliales en condiciones inflamatorias reclutan a los monocitos y linfocitos a partir de la unión del ligando 1 de la glicoproteína P-selectina (PSGL-1) con las P y L-selectinas de las células endoteliales activadas lo que aumenta la progresión de la aterosclerosis [8, 16, 17].

Además de los macrófagos, también participan los neutrófilos que son las células inmunológicas más abundantes que responden a diferentes antígenos y favorecen la respuesta inflamatoria a partir de mediadores como los leucotrienos, trampas extracelulares de neutrófilos (NET) que activan el endotelio y tienen efectos citotóxicos y trombóticos que pueden favorecer la formación de las placas ateroscleróticas. Además, su producción aumenta con la hipercolesterolemia y existe una correlación directa entre los neutrófilos en sangre periférica y el tamaño de lesiones ateroscleróticas en ratones [6, 18, 19]. Los linfocitos T CD8+ y los linfocitos T CD4+ son reguladores críticos en la respuesta inmunitaria adaptativa y pueden diferenciarse en diferentes subtipos de Th o en linfocitos Treg que pueden activar o regular las respuestas de otras células inmunológicas, así como ejercer efectos inflamatorios o antiinflamatorios en otras células [20]. Los datos de células individuales de placas ateroscleróticas humanas y células mononucleares



de sangre periférica (PBMC) mostraron que la mayoría de las células T CD4 + en la placa son células Th1 y Th2, y que las células Th1 están enriquecidas en lesiones ateroscleróticas en comparación con PBMC [19-21]. Mientras que los linfocitos T CD8+ secretan principalmente TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  para producir apoptosis e inflamación, en estudios previos se ha demostrado la infiltración de células T CD8+ en la aorta aterosclerótica de ratones mediante métodos recientes de secuenciación de ARN unicelular (scRNA-seq) y citometría por tiempo de vuelo (CyTOF) [22].

Los monocitos se encuentran en la circulación desde donde ingresan a los tejidos y representan del 4-12% de los leucocitos totales. Durante la aterogénesis, la hiperlipidemia aumenta el número de estas células en circulación y en humanos, se clasifican en tres tipos: monocitos clásicos (CD14<sup>++</sup>, CD16<sup>-</sup>), intermedios (CD14<sup>++</sup>, CD16<sup>+</sup>) y no clásicos (CD14<sup>-</sup>, CD16<sup>++</sup>). Los monocitos clásicos comprenden del 80-90%, los intermedios de un 2-11% ambos participan en procesos inflamatorios y fagocíticos, al igual que expresan CCR2 y producen IL-10 en respuesta a LPS. Mientras que los monocitos no clásicos constituyen de un 10-20% y su función principal es patrullar por los tejidos de forma sistémica y local [23]. En modelos animales se demostró que la inhibición o el antagonismo de la molécula CCR2 y la deficiencia o bloqueo de P-selectina, VCAM-1, ICAM-1 o PECAM-1 redujo la adhesión y el balanceo de los monocitos, así como el desarrollo de aterosclerosis en ratones [6]

## **SÍNDROME CORONARIO AGUDO**

### **Definición**

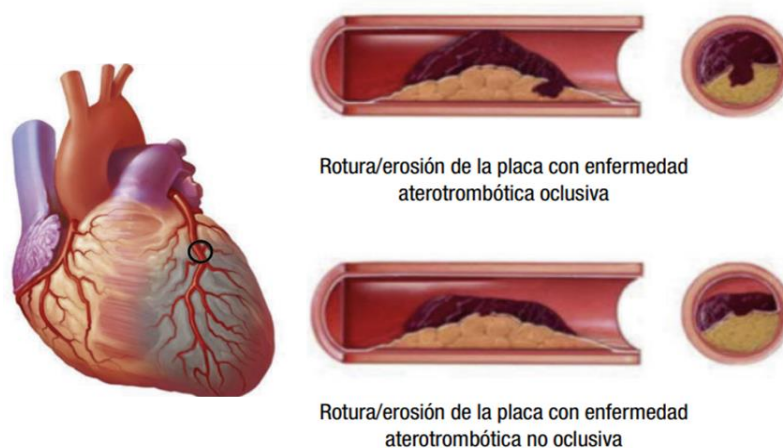
Los síndromes coronarios agudos (SCA) involucran un conjunto de entidades clínicas que involucran una obstrucción parcial o total de la arteria generada por un trombo provocado por la erosión de una placa vulnerable, cuyas complicaciones clínicas secundarias abarcan la isquemia o necrosis miocárdica. Los signos y síntomas del SCA comprenden en nivel de intensidad a angina de pecho inestable, infarto agudo al miocardio sin elevación (NSTEMI) y con elevación en el segmento ST (STEMI). Estudios recientes post mortem han demostrado que los pacientes que tuvieron factores cardiovasculares (como diabetes, hiperlipidemia y

tabaquismo) pueden tener varias placas rotas, aunque sólo una de ellas es la causante de las manifestaciones clínicas, así como que pueden manifestar SCA sin rotura de placa [24, 25].

### Infarto Agudo de Miocardio (IAM)

Inicia con la aparición de muerte celular miocárdica seguida de isquemia prolongada en el sitio de la lesión. Esto genera una necrosis progresiva debido a la muerte de los cardiomiocitos, que puede prolongarse por el aumento de la circulación colateral, la tasa de consumo de oxígeno miocárdico y las oclusiones y perfusiones intermitentes que pueden preconditionar el funcionamiento del corazón. El diagnóstico del infarto al miocardio se determina a partir de los valores de las troponinas cardíacas I (cTnI) y T (cTnT) que funcionan como biomarcadores para el daño miocárdico, así como el uso del biomarcador de alta sensibilidad (hs-cTn). Se considera que el daño es agudo si se observa un aumento o reducción de los niveles de cTn o un daño crónico si los valores de cTn están persistentemente elevados. También se incluye la historia clínica del paciente y el electrocardiograma. Los síntomas clínicos que desarrollan los pacientes pueden ser dolor torácico constante, molestias en extremidades superiores, epigástricas (al hacer esfuerzo o en reposo), fatiga y disnea; no obstante, estos síntomas no son específicos de la enfermedad. [26]

El infarto agudo del miocardio tipo I es causado por una enfermedad aterotrombótica que suele iniciarse por la rotura de la placa aterosclerótica cuyo componente trombótico puede ocasionar una embolización coronaria distal que ocasione una necrosis miocitaria, así como una hemorragia a través de la superficie rota que puede complicar su recuperación (**Figura 3**).



**Figura 3. Infarto de miocardio tipo I.** Se caracteriza por estar constituido por una acumulación de LDL e infiltraciones celulares contenidas por una capa fibrosa, que al vulnerarse ocasiona una erosión de la placa y, por ende, la generación de un trombo que puede obstruir por completo la luz arterial para conllevar a un IAM (tomado de Sambola, A. et al., 2019).

Se puede diagnosticar el infarto agudo de miocardio tipo 1 a partir de la detección de al menos una de las siguientes condiciones: síntomas de isquemia miocárdica aguda, nuevos cambios isquémicos en el ECG como la elevación del segmento ST, la evidencia por imagen de pérdida de miocardio viable o anomalías regionales en la motilidad de la pared del miocardio siguiendo un patrón compatible con etiología isquémica y por último, la identificación de un trombo coronario por angiografía con imagen intracoronaria o por autopsia [26, 27]

### **Componentes inmunológicos en el IAM**

Una vez generada la obstrucción de la arteria coronaria, conduce a la isquemia miocárdica aguda que induce lesión y muerte de constituyentes celulares como cardiomiocitos, células endoteliales, fibroblastos, entre otros. Lo que genera una respuesta inflamatoria aguda a partir de la activación de la cascada del complemento, producción de ROS, patrones moleculares asociados a daño (DAMP), que sirven como ligandos para los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) como los receptores tipo Toll y la familia de receptores tipo dominio de oligomerización de unión a nucleótidos de proteínas citosólicas (NLRP3, también conocidos como receptores tipo Nod) inflammasoma. También se liberan ATP, mtDNA y RNA que inducen inflamación a partir de la activación del inflammasoma NLRP3 y al unirse al receptor tipo Toll (TLR)-9 respectivamente. Además, se ha demostrado que la liberación de RNA extracelular por parte de los cardiomiocitos induce una respuesta proinflamatoria por la liberación de TNF- $\alpha$  y la activación de NF- $\kappa$ b. Mientras que los TLR actúan en respuesta a los DAMP, a partir de la activación del gen de respuesta primaria a diferenciación mieloide MyD88 y NF- $\kappa$ b que inducen la liberación de mediadores inflamatorios como IL-1 $\beta$  y pro-IL-18. [27]. Asimismo, se ha demostrado la importancia de que la inhibición farmacológica de TLR-2 o TLR-4 reduce el tamaño del infarto, así como la infiltración de neutrófilos, macrófagos y linfocitos T y favorece la remodelación del endotelio vascular [29].

Al mismo tiempo, las células endoteliales son activadas por el ambiente proinflamatorio anteriormente mencionado, lo que las hace generar ROS y una mayor cantidad de moléculas

que median la adhesión de leucocitos y plaquetas. Dicha infiltración está mediada por la molécula quimioatrayente de monocitos (MCP-1) que produce interacciones entre los monocitos y las células endoteliales, después los monocitos se diferencian a macrófagos en la zona de la íntima por la presencia del factor estimulante de colonias de macrófagos (MCS-F) y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GMCS-F) en el sitio de lesión, que en conjunto con la presencia de OxLDL favorece el desarrollo de un núcleo necrótico. Posteriormente, ocurre una remodelación negativa del tejido a partir de moléculas como IL-10 y metaloproteinasas MMP-3 y MMP-9 que resultan ser beneficiosas con respecto a la estabilización de la placa al promover la formación de una capa fibrosa. [30, 31]

### **Macrófagos**

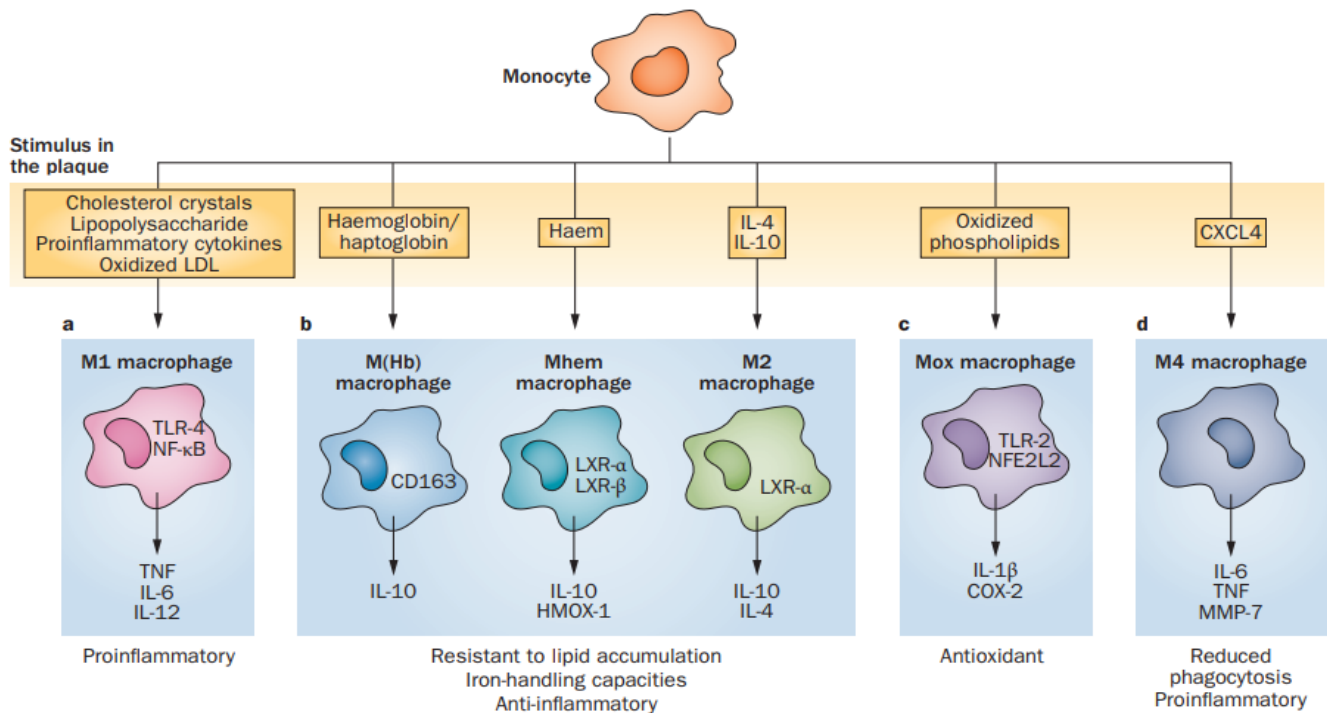
Los macrófagos son células inmunológicas que desempeñan un papel importante en la homeostasis del cuerpo mediante la eliminación de microorganismos, desechos y reparación de tejidos, sin embargo, también participan en la regulación de la inmunidad innata a partir de la presentación de antígenos a linfocitos T en los tejidos y mediando procesos inflamatorios crónicos como la aterosclerosis. A su vez, ejercen procesos como fagocitosis y apoptosis de células, secreción de moléculas inmuno-efectoras, factores de crecimiento y de remodelación de la matriz extracelular. Los macrófagos se pueden encontrar en casi todos los órganos del cuerpo (hígado, pulmones, cerebro, piel, etc.), se originan principalmente de los sacos vitelinos embrionarios que se mantuvieron en los tejidos periféricos por autorrenovación de vasos sanguíneos y se pueden regenerar a partir de los monocitos circulantes que surgen de los progenitores de la médula ósea en la etapa adulta. [32]

Se distinguen por ser células fagocíticas profesionales, ya que tienen la capacidad de expresar receptores en su superficie que detectan señales que comúnmente no se encuentran en tejidos sanos. Por ejemplo, los macrófagos expresan receptores scavenger que son responsables de detectar patógenos opsonizados, algunos tipos de PAMP como lipoproteínas bacterianas, fagocitosis de células apoptóticas (CD36) y LDL oxidado o acetilado además de expresar TLR [32].

## **Mecanismos de activación y polarización de macrófagos en la aterosclerosis**

El fenotipo de los macrófagos se modifica de acuerdo a los estímulos del microambiente independientemente del órgano en el que residen, lo que les confiere a estas células una alta plasticidad. Se ha descrito que los macrófagos se dividen tradicionalmente en M1 proinflamatorios y en M2 antiinflamatorios dependiendo de las citocinas que se liberen durante la homeostasis o en alguna enfermedad. Por ejemplo, los DAMP y las citocinas inflamatorias como el TNF- $\alpha$  y el IFN- $\gamma$  inducen el fenotipo M1 (activación clásica) a diferencia de las citocinas antiinflamatorias como IL-10, IL-4 e IL-13 que inducen el fenotipo M2 (activación alternativa). [8, 32, 33]

La polarización hacia un fenotipo M1 requiere de la inducción del LDL oxidado en la placa, que activa la vía PI3K-AKT- mTOR-HIF1 $\alpha$  (factor inducible por hipoxia 1-alfa), lo que regula a la alza el metabolismo de la glucólisis y disminuye la fosforilación oxidativa (vía OXPHOS) lo que genera citocinas inflamatorias en diversas enfermedades como la aterosclerosis, en donde se activan mecanismos como el sistema de NADPH oxidasa dentro de la lesión que liberan especies reactivas de oxígeno (ROS) e involucran la participación de células endoteliales que son activadas por lípidos como el oxLDL que ingresa a la íntima de los vasos sanguíneos y estimula a una gran cantidad de monocitos para que ingresen al endotelio en donde eventualmente se van a diferenciar a macrófagos que van a fagocitar las lipoproteínas modificadas, posteriormente, se van a convertir a células espumosas que formarán parte de la placa aterosclerótica [33]. Este proceso genera más inflamación y el reclutamiento de más monocitos al sitio que inducirá a la formación de un núcleo necrótico, cuyo efecto logra ser contrarrestado a partir de la generación de factores antiinflamatorios producidos por los macrófagos M2. En este contexto, se han identificado diversas subclases de macrófagos en la placa de ateroma con base en sus marcadores extracelulares, funciones y producción de citocinas.



**Figura 4. Subpoblaciones de macrófagos en la placa aterosclerótica.** Una vez que los monocitos son reclutados al interior de la placa de ateroma, se pueden diferenciar en diversos tipos de macrófagos, a) en M1 que median la defensa del huésped en un ambiente inflamatorio liberando TNF, IL-6 e IL-12; b) en M(Hb), Mhem y M2 que presentan resistencia a la acumulación de lípidos, capacidad de captar productos de hierro y propiedades antiinflamatorias liberando IL-10, hemooxigenasa 1 (HMOX-1) e IL-4 respectivamente; c) Mox que tiene propiedades antioxidantes y libera IL-1β y ciclooxigenasa 2 (COX-2); d) y de tipo M4 que es proinflamatorio pero con capacidad fagocítica reducida y produce IL-6, TNF y metaloproteína 7 (MMP-7) (modificado de Chinetti-Gbaguidi, G. et al., 2014).

De forma clásica, los macrófagos M1 pueden liberar citocinas de tipo Th1, lo que provoca la liberación de citocinas proinflamatorias como el IFN-γ, del factor de necrosis tumoral (TNF), IL-6, IL-1β y altas concentraciones de IL-12 e IL-23, así como una disminución de IL-10. Mientras que alternativamente los macrófagos M2 se subdividen en tres tipos principalmente: en M2a que inducen la liberación de citocinas tipo Th2 como la IL-4 e IL-13, los macrófagos M2b que inducen la inflamación a partir de la formación de complejos inmunes a partir de IL-1β o lipopolisacáridos, así como la liberación de IL-1 e IL-6 y en M2c que son inducidos en presencia de IL-10, el TGF-β o glucocorticoides. La generación de estos macrófagos ocurre a partir de

que los monocitos se diferencian en presencia del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) que induce una señalización de tipo tirosina-cinasa que activa diversos miembros de la cascada de señalización MAPK que está involucrada en procesos de proliferación celular y las vías Rac/JNK y Rac/p38 que son mediadoras en la apoptosis, inhibición de la proliferación y el estrés celular, por lo que M-CSF funciona como un agente mitogénico autocrino de los macrófagos [34,35].

En la **Figura 4** se muestra una variedad de los fenotipos de los macrófagos, por lo que la manera de identificarlos es mediante la cuantificación de sus marcadores de superficie y por las moléculas que secretan (**Tabla 1**).

**Tabla 1. Activación de macrófagos M1 y M2 in vitro.** Se muestran algunos marcadores y secreción de citocinas por los cuales se pueden identificar a las poblaciones de macrófagos M1 y M2 (Modificado de Huang, X., Li, Y., et al., 2018).

Macrófago	Expresión de marcadores	Secreción de citocinas
M1	CD68, CD86, CD80, MHCII, IL-1R, TLR2, TLR4, iNOS y SOCS3	TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 e IL-23
M2a	CD163, MHCII, SR, CD206, CD200R, TGM2, IL-1RII y DecoyR.	IL-10, TGF- $\beta$ e IL-1 $\alpha$
M2b	CD86 y MHCII	IL-1, IL-6, IL-10 y TNF- $\alpha$
M2c	CD163, TLR1 y TLR8	IL-10 y TGF- $\beta$
M2d	VEGF	IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ y TGF- $\beta$

IL-1RII: Receptor de interleucina tipo 2, DecoyR: Receptor *decoy* o tipo "señuelo", MHCII: Complejo Principal de Histocompatibilidad II, SR: Receptor scavenger, TGM2: Transglutaminasa 2, TNF- $\alpha$ : Factor de Necrosis Tumoral alfa, TGF- $\beta$ : Factor de Crecimiento Tumoral beta y VEGF: Factor de crecimiento Vascular Endotelial.

Dentro de las placas ateroscleróticas en los núcleos lipídicos, los macrófagos M1 activan vías del TLR4 o del factor nuclear kappa beta (NF- $\kappa$ B). Con respecto al receptor TLR4, una vez que es reconocido el LPS sufre un cambio conformacional del dominio TIR (receptor de Toll/interleucina) y promueve el reclutamiento del adaptador MyD88, seguido de (cinasa asociada a IL-1R) que se autofosforila y se une a TRAF6 (receptor factor 6 asociado a TNF) activando al complejo IKK (enzima cinasa kappa, que posee 3 dominios  $\gamma$ ,  $\alpha$  y  $\beta$ ) en donde

ocurre la fosforilación y proteólisis de la caja  $I\kappa\beta$ , lo que permite la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo. Este último, tiene un papel importante en la regulación de la expresión de genes relacionados con procesos inflamatorios, autoinmunes y apoptóticos, ya que puede regular la expresión de citocinas como IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ , y GM-CSF, así como moléculas de adhesión como ICAM y VCAM, proteínas de fase aguda, enzimas inducibles (iNOS y COX-2) y péptidos antimicrobianos. El TLR4 también puede iniciar su señalización de forma independiente de MyD88 para estimular la producción del interferón beta (IFN- $\beta$ ). Este mecanismo proinflamatorio a la par de los cristales de colesterol acumulados en las arterias y las lipoproteínas oxidadas induce aún más la polarización a un fenotipo de macrófago M1 [33, 35].

En cuanto a la expresión de moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86, son importantes para la presentación de antígenos, cuyo ligando de este último es CD28 que es un marcador inflamatorio conocido, al igual que CD38 en experimentos in vitro. Sin embargo, también se han analizado marcadores in vivo e in vitro respectivamente como las firmas moleculares de los macrófagos M1 inducidos con LPS en ratones donde se analiza la expresión de genes regulados por interferón gamma entre los que se encuentran *Irf9*, *Irf7*, *Irf35* e *Irf1*; así como las quimiocinas con motivo CXC CXCL-1 y CXCL-2 que reclutan neutrófilos y CXCL-5 que es un potente quimioatrayente para las células T, etc. Además de factores asociados a TNFR (TRAF) que codifica para *Traf2* y *Tnfrif3* que se expresan en los macrófagos in vitro para la regulación de la señalización de TLR y la inducción de citocinas proinflamatorias e interferones que responden ante la presencia de LPS, como lo es el LDL oxidado [36].

Mientras que en los macrófagos M2a activados alternativamente con IL-4 o IL-13 se activa la vía de señalización JAK-STAT, PPAR, AMPK y/o TGF- $\beta$ . Para el caso de la vía AKT, se activa el metabolismo de OXPHOS a partir de la acción de IL-4, lo que induce a los macrófagos a tener un perfil inmunosupresor. Mientras que los receptores activados por el receptor proliferador de peroxisomas (PPAR) tiene la capacidad de captar lípidos y participa en la polarización hacia un fenotipo M2 así como la inhibición de la expresión de factores proinflamatorios. Además, la vía STAT6 actúa como un mecanismo a la respuesta antiinflamatoria compensatoria y tiene como objetivo equilibrar la secreción de citocinas inflamatorias y antiinflamatorias, a partir de la estimulación de IL-4 e IL-13 que son secretadas principalmente por los linfocitos Th2. Para el



caso de los niveles de TGF- $\beta$ , estos se ven aumentados después de entrar en contacto con el oxonmanoil-colesterol que es uno de los productos de oxidación en la placa aterosclerótica, así como los metabolitos de esfingolípidos que van a cambiar el fenotipo de M1 a M2 [33,37]. También los fosfolípidos pueden polarizar a un macrófago Mox, que tiene poca capacidad fagocítica y quimiotáctica y pueden expresar marcadores proinflamatorios como IL-1 $\beta$  y COX-2 a partir de un mecanismo dependiente de TLR-2, en ratones se ha visto que los macrófagos Mox representan el 30% del total de macrófagos en las placas ateroscleróticas avanzadas [33].

También, se ha encontrado que los macrófagos M2a encontrados en las placas ateroscleróticas humanas también pueden inducir la polarización de una población CD68+ MMR+, así como que la IL-4 induce la proliferación de los macrófagos in situ. La identificación de los macrófagos M2a se puede revelar a partir de experimentos in vitro donde se identifica la presencia de algunos marcadores de membrana característicos como lo son el CD163 y CD206 a partir de citometría de flujo (**Tabla 1**). El marcador CD206 induce la expresión de citocinas antiinflamatorias como TGF- $\beta$ , IL-10 y el receptor de quimiocina (CCL) -18 [36, 38].

### **Macrófagos M1 y M2a en el IAM**

El infarto agudo de miocardio puede deberse a dos factores clave, el primero radica en la hipoxia generada por un trombo consecuente de una inestabilidad y ruptura de la placa; y el segundo por la muerte de los cardiomiocitos provocando necrosis del tejido cardíaco. En ambos casos se activa la cascada inflamatoria que involucra la participación de los macrófagos M1 y M2 en diferentes etapas del infarto.

Ambos fenotipos de macrófagos que se encuentran en la placa aterosclerótica temprana, sin embargo, cuando el microambiente de la misma se desestabiliza provoca la hemorragia intraplaca que rompe pequeños vasos que contienen eritrocitos que pueden ser fagocitados por los macrófagos lo que aumenta el contenido de hierro y la liberación del grupo hemo al ambiente dando lugar a los macrófagos M(Hb). Estos macrófagos son una subpoblación que presenta CD68, CD206, CD130 y CD163 que le permite eliminar complejos de hemoglobina-haptoglobina después de una hemorragia intraplaca, por lo que tiene propiedades antiinflamatorias debido a su mayor expresión de ferroportina lo que disminuye la concentración de ROS. Incluso se ha

observado que los macrófagos M2 in vitro también contribuyen a la liberación de hierro a partir de la fagocitosis de eritrocitos senescentes y células apoptóticas [38].

Tras la ruptura de la placa aterosclerótica, puede provocar a formación de un trombo que si obstruye por completo la luz arterial se genera un IAM. Es aquí cuando entra la reparación cardiaca que consta de varias fases: Fase inflamatoria temprana (primeras 72 h), fase proliferativa (de 7-10 días) y fase de maduración (de 9-10 días). En la primera fase se produce la reabsorción del tejido necrótico y adelgazamiento de la zona lesionada del miocardio, lo que conduce a la expansión del infarto y comienza la participación de células inmunes que captan los DAMPS y PRR del microambiente. Las primeras células que participan son los macrófagos M2 que derivan en un 90% de los monocitos clásicos de sangre periférica (CD14 high, CD16 low) que se caracterizan por su alta expresión de CD62 y CCR2 que permite que se acumulen en la zona de lesión donde hay un mayor gradiente de MCP-1 y quimiocinas CCL2 y CCL7. Una vez que alcanzan su pico máximo de proliferación (3 días) se encargan de disminuir el tejido necrótico y bajo ciertas condiciones se diferencian en macrófagos M1 que promueven una inflamación aguda por la liberación de IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y óxido nítrico. Lo que les permite localizarse en las zonas más inestables de la placa y que fagociten los restos celulares. Se ha reportado que la alta concentración de estos componentes inflamatorios son un peor pronóstico para pacientes con ECV como diabetes y obesidad [37, 39].

Posteriormente, en la etapa final de la inflamación, se degrada la matriz extracelular y se fagocitan las células muertas por eferocitosis a partir de los macrófagos M2 que absorben los cuerpos apoptóticos que se generan en el IAM, generando citocinas antiinflamatorias como TGF- $\beta$ , IL-10, lipoxinas, etc. Así como la expresión del gen mielopitelial reproductivo de tirosina cinasa (MerTK), el cual, se ha documentado que evita que incremente el tamaño del infarto y se favorezca la eferocitosis [38, 39].

En la fase proliferativa o de reparación consiste en la cicatrización de la lesión miocárdica intraplaca, además del inicio de la señalización antiinflamatoria y la proliferación de fibroblastos que migran a zona endotelial. La etapa de maduración depende de la continuidad y eficacia de las etapas anteriores para la remodelación de la matriz extracelular y restauración de la función cardiaca, que es fomentada por la limitación de infiltración de células polimorfonucleares,

disminución de la vascularización, de la permeabilidad y de la eliminación de restos celulares y componentes de la matriz extracelular [39].

### **Células estromales mesenquimales**

Las células estromales mesenquimales (MSC) son células indiferenciadas que se caracterizan por tener alta capacidad de diferenciación a lo largo de diversos linajes y de autorrenovarse, lo cual, las hace candidatas a aplicaciones clínicas. Además, se pueden aislar de una gran variedad de tejidos, como de piel, cordón umbilical, placenta, médula ósea, tejido adiposo, etc. Debido a su capacidad de recolección y la cantidad obtenida hacen que estas fuentes sean más prácticas para un mayor número de aplicaciones clínicas experimentales [40].

En experimentos *in vitro*, se pueden identificar por su expresión de CD105, CD90, CD73 y CD44, así como ser negativas para los marcadores hematopoyéticos como HLA-DR, CD14, CD45, CD19 y CD34, marcadores de linaje endotelial como CD31. Además, de la capacidad de adherirse en plástico en medio de cultivo estándar con un 20% de suero fetal bovino y de diferenciarse en adipocitos condroblastos y osteoclastos con eficiencia [39]. Existen estudios que han demostrado que las MSC se encuentran de forma residual en los tejidos de casi todos los órganos del cuerpo, al igual que sus efectos inmunorreguladores en procesos inflamatorios debido a su secreción de citocinas como IL-10, GM-CSF y M-CSF para tener un efecto directo o indirecto de forma que afecta a las células vecinas (paracrina) [41].

También, se han descrito sus capacidades inmunorreguladoras sobre células T y macrófagos en enfermedades cardiovasculares en el contexto del infarto del miocardio, así como en promover la regresión de la placa a partir de regular la función de las células endoteliales en modelos de ratón [41]. De igual manera, las MSC pueden favorecer el ambiente tumoral a partir de diversos mecanismos como la angiogénesis [41]. Así como reducir los niveles de factores inflamatorios como la IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ , mientras aumentan los factores anti-inflamatorios como IL-10 y TGF- $\beta$ , que están asociados a una mayor expresión de VEGF que mejoran gradualmente la supervivencia de los cardiomiocitos [43]. Por lo cual, la resolución de la inflamación se traduce a una mejora en la protección y en la función cardíaca.

En cuanto a la aterosclerosis, las MSC tienen un papel importante en la migración y en la proliferación de las células progenitoras endoteliales (EPC) en experimentos *in vitro* de cocultivos, así como en estudios con ratones Apo E (-/-) en tratamiento con OxLDL donde se observó que inactivó la vía Akt/óxido nítrico sintasa (eNOS) indujo la degradación de eNOS e inhibió la producción de óxido nítrico (NO) en las células endoteliales, sin embargo, en presencia de cocultivos con MSC se revirtieron los efectos de OxLDL lo que reestableció el funcionamiento de la vía Akt/eNOS y mejoró la formación de la placa de ateroma a partir de la secreción de IL-8 y la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP) -2 o CXCL2 por parte de las MSC, ya que al ser bloqueadas con anticuerpos contra IL-8 y MIP-2 se inhibió el efecto de las MSC en su función protectora en el endotelio [42,44]. Del mismo modo, las MSC han demostrado ejercer efectos inhibitorios sobre las VSMC, ya que pueden inmunorregularlas inhibiendo su proliferación y evitando que las VSMC secreten sustancias inflamatorias y favorezcan la generación de células espumosas en etapas tempranas de formación de la placa, y en etapas avanzadas, evita la secreción de proteínas de la matriz extracelular y fibras de colágeno para la formación de placas estables [45].

### **Efecto de las MSC para polarizar macrófagos M1 y M2**

Estudios previos de cultivos celulares han descrito que las células estromales mesenquimales derivadas de tejidos sanos que están en contacto con macrófagos favorecen la polarización a un fenotipo M2 o antiinflamatorio. Y reducen la expresión de CD80 y CD86, que participan en la coestimulación de linfocitos T en un ambiente estimulado por GM-CSF [46]. Cabe recalcar que estos últimos marcadores se encuentran en macrófagos M1 que están involucrados mayoritariamente en la etapa aguda del IAM y que son esenciales para el comienzo de la restauración y función del tejido endotelial arterial, adicionalmente, un desequilibrio entre la polarización a un fenotipo M1 y M2 puede desencadenar procesos de inflamación persistente o de reparación aberrante [47, 48].

Para el caso de los macrófagos M2, se ha comprobado en modelos de ratón *in vitro* que las MSC aumentan la expresión de los marcadores CD206 y CD163 en presencia de GM-CSF y LPS, favoreciendo la polarización de un fenotipo M1 a un M2 en el IAM [49]. Así como Zhang X. y colaboradores, han reportado que a partir de células estromales mesenquimales de encía humana (GMSC) inhibe la formación de células espumosas en macrófagos, reduce la

proliferación de un fenotipo inflamatorio (M1) y favoreció la polarización M2, lo que disminuyó la deposición de lípidos en la placa de ateroma en ratones ApoE (-/-). Al igual que han demostrado que al trasplantar MSC CD146+ después de un IAM se logra regenerar el tejido cardíaco a partir de la inducción de la polarización de los macrófagos a un fenotipo M2, mientras que al administrar TNF- $\alpha$  en ratones trasplantados con MSC previno la polarización antes mencionada, provocando el deterioro de la función cardíaca [49,50].

Existe evidencia que hay una modulación paracrina de IL-10 secretada por las MSC hacia los macrófagos, dicha citocina es anti-inflamatoria e inhibe la proliferación de factores inflamatorios, la secretan los monocitos, macrófagos, mastocitos, MSC, los linfocitos en menor cantidad. La cual, a partir de CCL-2 y CXCL-12 cooperan como un heterodímero para regular la expresión de IL-10 en macrófagos CCR-2 *in vitro*, además que la expresión de CCL-2 por parte de las MSC es necesaria para inducir la polarización de macrófagos *in vivo* que residen en el intestino en un modelo murino al que se le indujo colitis con dextrano sulfato de sodio (DSS) [51].

En modelos de animales, se ha demostrado que aumenta la concentración de IL-10 significativamente en el suero después de 6h de haber sido realizada la reperfusión miocárdica. Y en pacientes con IAM, se ha encontrado que si aumentan los niveles séricos de IL-10 dentro de las primeras 24h posteriores a la angioplastia (mecanismo para conseguir la reperfusión), les proporciona una protección contra el desarrollo de la insuficiencia cardíaca [52,53]. En otros estudios, se han infundido con IL-10 a ratones con una bomba miniosmótica y se obtuvo un aumento en las concentraciones plasmáticas de esta citocina después de 7 días de tratamiento y de un infarto del miocardio, así como una disminución de la dilatación del ventrículo izquierdo, atenuó la inflamación generada por el infarto y mostró una expresión genética significativamente elevada de los marcadores M2: Arg1, Ym1 (activación alternativa) y TGF- $\beta$ 1 [54].

En modelos de inflamación de córnea en ratones, se demostró que las MSC trasplantada pueden preconditionar a los monocitos y macrófagos para favorecer el control de la inflamación de la enfermedad ocular, expresando una mayor cantidad de MHC II, CD11b e IL-10 y disminuyendo los niveles de los linfocitos T y manteniendo la proliferación de los linfocitos T reguladores FoxP3+, desarrollado en un ambiente inducido por TNF- $\alpha$  [55]. Y también las MSC tienen la capacidad de liberar vesículas extracelulares (p. ej.: exosomas y microvesículas) que

protegen a los ratones de la isquemia miocárdica e inhiben la señalización de los TLR en los macrófagos [56].

### **Interacción de las MSC con los macrófagos induce la generación de linfocitos T reguladores**

Los linfocitos T cumplen un papel importante en la remodelación y la evolución del IAM, ya que se ha demostrado que en estudios donde se analizan estas células en sangre periférica en pacientes con síndromes coronarios agudos que pueden reflejar la activación de los linfocitos T para revelar parte del proceso de inflamación cardíaca [57]. Se ha reportado en estudios con ratones que las células T CD4<sup>+</sup> contribuyen a la lesión por isquemia-reperfusión, de tal manera que aumenta la aglomeración celular lo que contribuye al aumento del tamaño del infarto [57,58]. Y que la proporción de linfocitos Th1/Th2 está directamente involucrada en el IAM y en el grado de afectación de la enfermedad de las arterias coronarias (EAC) [59].

También, se ha encontrado que la cadena pesada de miosina  $\alpha$  (MYHCA) es un autoantígeno cardíaco que es reconocido por las células T a partir del TCR y genera que se induzca un fenotipo T regulador cuando se transfirieron a ratones infartados, lo que generó un efecto cardioprotector [60]. Lo anterior se debe a que en el IAM se generan citocinas proinflamatorias (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, etc.) que junto autoantígenos, promueven que las células T adquieran un fenotipo efector (IL-17/INF- $\gamma$ ) por la acción de células dendríticas [61].

Se sabe que las MSC tienen la capacidad de interferir en el ciclo celular de los linfocitos T, disminuyendo su proliferación y favoreciendo su diferenciación a un fenotipo anti-inflamatorio desde un estado inflamatorio (Th1, Th17, etc.), al igual que regulan la función de las células T reguladoras (Treg) [49]. Esta inmunosupresión la realizan las MSC a partir de la secreción de factores solubles como TGF- $\beta$ , INF- $\gamma$ , óxido nítrico (NO), IL-2, prostaglandina E2 (PGE2), indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) e IL-10 [62]. Y se ha demostrado que los exosomas de MSC derivadas de cordón umbilical tienen actividad inmunosupresora debido a que expresa marcadores como TGF- $\beta$ , INF- $\gamma$ , IDO e IL-10 que inducen la proliferación de linfocitos Treg [63]. Y en pacientes con STEMI se sabe que hay una disminución en la proporción de linfocitos Treg CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> lo que podría relacionarse con la aparición de SCA [64].

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las ECV en México corresponden a la primera causa de muerte en hombres y mujeres, dentro de las cuáles el IAM afecta más a la población debido a que los pacientes resultan gravemente dañados por la enfermedad, por lo que requieren una regeneración efectiva después de su estabilización por reperfusión.

En este contexto, los macrófagos son células inmunológicas que pertenecen al sistema inmune innato que provienen de los monocitos que bajo ciertas condiciones se polarizan en macrófagos M1 que se caracterizan por mediar procesos inflamatorios, mientras que los macrófagos M2a intervienen en procesos antiinflamatorios. Sin embargo, se ha reportado que estos mecanismos de regulación en los pacientes con IAM no funciona adecuadamente, por ello se estableció un modelo que involucra a las células estromales mesenquimales (MSC), debido a que se ha descrito en ensayos *in vitro* que tienen la capacidad de favorecer la polarización de los macrófagos a un fenotipo M2 en modelos con ratones, así como la capacidad de interferir en el ciclo celular de los linfocitos T, disminuyendo su proliferación y favoreciendo su diferenciación a un fenotipo anti-inflamatorio desde un estado inflamatorio, al igual que regulan la función de las células T reguladoras a partir de la liberación de citocinas como TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , óxido nítrico (NO), IL-2, prostaglandina E2 (PGE2), indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) e IL-10 por parte de las MSC, lo que conlleva a la reparación de la función miocárdica.

Por ello, es importante determinar un mecanismo por el cual las MSC podrían mediar la polarización de los macrófagos M2a y estos a su vez la de los linfocitos Treg en el STEMI a partir de marcadores de superficie y función. Lo que nos dirige a plantear la pregunta de investigación: ¿Cómo las MSC podrán influir en la polarización de los macrófagos M1 y M2a derivados de monocitos de pacientes con IAM con elevación en el segmento ST (STEMI)?

## **HIPÓTESIS**

Las MSC derivadas de médula ósea promoverán la polarización hacia un fenotipo funcional de macrófagos M2a en condiciones polarizantes de M1 y M2a a partir de monocitos de pacientes con STEMI.

## **OBJETIVO**

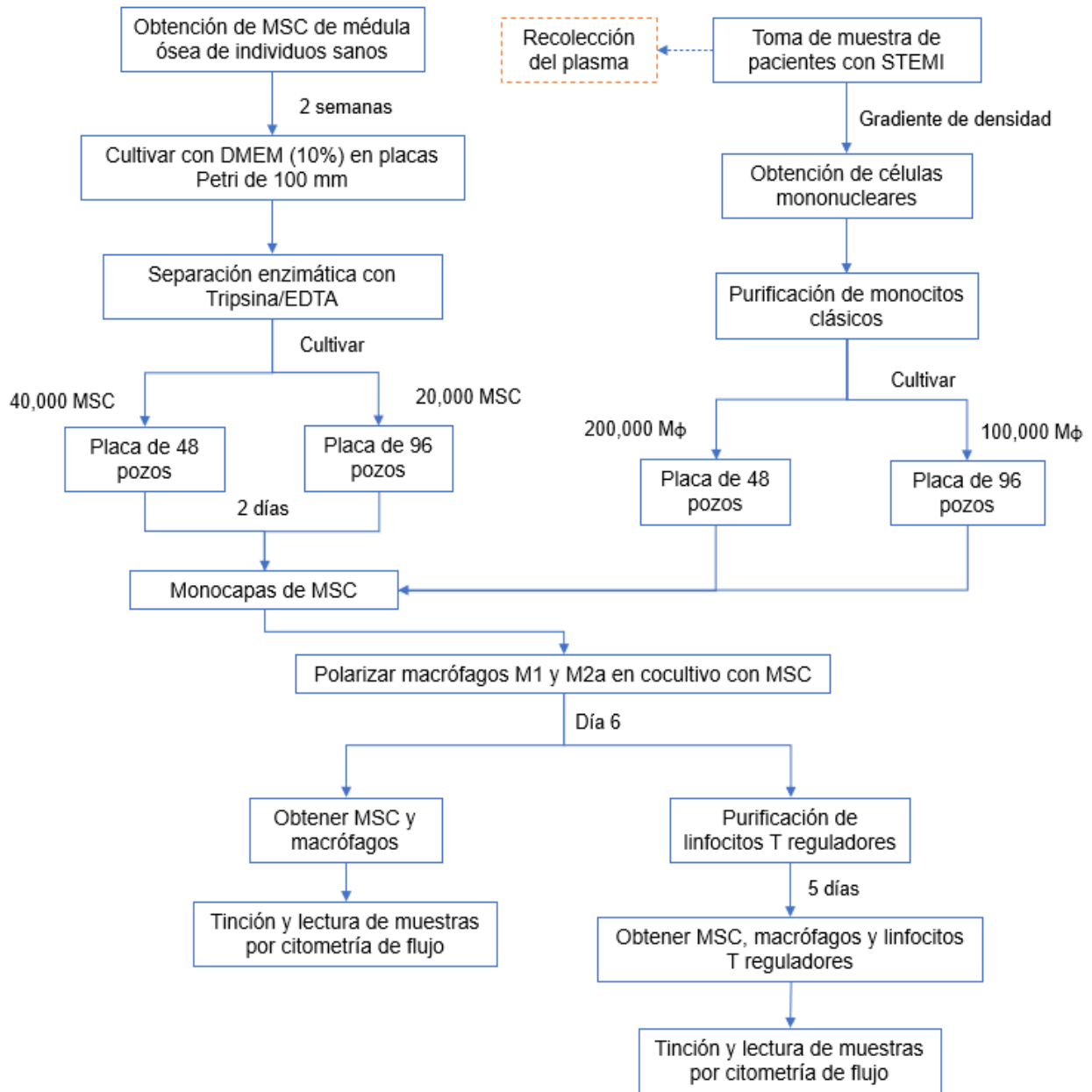
Evaluar el efecto inmunomodulador de las células estromales mesenquimales de médula ósea en el fenotipo y función de los macrófagos M1 y M2a derivados de monocitos en pacientes con STEMI.

### **Objetivos específicos**

- Determinar el microambiente celular a partir de la cuantificación de citocinas inflamatorias y anti-inflamatorias circulantes en pacientes con STEMI.
- Evaluar los niveles de expresión de los marcadores característicos de macrófagos M1 y M2a derivados de monocitos en pacientes con STEMI y en sujetos sanos en presencia de MSC.
- Identificar el posible mecanismo de regulación de las MSC sobre los macrófagos M1 y M2a a través de ensayos de cocultivos.
- Evaluar las capacidades de inducir células T reguladoras en presencia de MSC y macrófagos M1 y M2a en pacientes con STEMI y en sanos.



## Diagrama de flujo



## METODOLOGÍA

### Aspectos éticos

Este trabajo se condujo considerando las pautas de la declaración de Helsinki de la Asociación Médica. Adoptada por la 18ª Asamblea Médica mundial en Helsinki, Finlandia en junio de 1964 y enmendada por la 64ª Asamblea General, en Fortaleza, Brasil de octubre 2013. Este trabajo es parte del proyecto autorizado por el Comité Nacional de Ética, Comité Nacional de Bioseguridad y el Comité Nacional de Investigación Científica del IMSS con número de registro R-2018-785-044.

### Criterios de inclusión y exclusión

A continuación, en la **Tabla 2** se presentan los criterios de inclusión y de exclusión para los pacientes y sujetos sanos.

**Tabla 2. Criterios de inclusión y de exclusión.** Se muestran los criterios de inclusión y exclusión para los pacientes con STEMI y de los sujetos sanos incluidos en este estudio.

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
<ul style="list-style-type: none"><li>● Se incluyeron las muestras de pacientes con Infarto Agudo de Miocardio (IAM) tipo I con elevación en el segmento ST (igual o mayor a 1 mm.)</li><li>● Género femenino o masculino, de 35-75 años de edad.</li><li>● Diagnóstico dentro de las 24 horas que iniciaron los síntomas.</li><li>● Presentar dolor precordial isquémico mayor a 30 minutos de duración.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>● Los pacientes que cursan por un síndrome anémico.</li><li>● Tener antecedentes de enfermedad neoplásica, inflamatoria crónica o proceso infeccioso activo o COVID-19.</li><li>● Estar en tratamiento previo con antiinflamatorios o inmunosupresores.</li><li>● Pacientes con antecedentes de abuso y consumo de anfetaminas, cocaína y opioides.</li></ul>

<ul style="list-style-type: none"> <li>● Pacientes con disnea, diaforesis, náusea y vómito.</li> <li>● Con bloqueo en la rama izquierda doloroso (BRIHH), niveles elevados de CPK, mioglobina y troponinas.</li> <li>● Sujetos sanos que no hayan recibido tratamiento previo con anti-inflamatorios o inmunosupresores.</li> <li>● Todos aquellos pacientes y sanos que aceptaron el consentimiento informado.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Presentar niveles de creatinina mayores o iguales a 1.6 mg/dL, falla orgánica renal, trombocitopenia.</li> <li>● Pacientes y sujetos sanos a los que no se logre obtener la cantidad de sangre necesaria para los ensayos y en los que no se logre obtener el número de monocitos necesarios para los experimentos.</li> <li>● Los pacientes que hayan tenido un infarto del miocardio con anterioridad.</li> <li>● Sujetos sanos que presentaron datos electrocardiográficos sugestivos de isquemia miocárdica.</li> <li>● Sujetos sanos con antecedentes de enfermedad neoplásica, inflamatoria crónica o con proceso infeccioso activo</li> </ul>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

### **Toma de muestra**

A los pacientes diagnosticados con IAM tipo I con elevación en el segmento ST que acudieron al UMAE, Hospital de Cardiología del Centro Médico Nacional Siglo XXI que cumplieron los criterios de inclusión para el estudio y firmaron el consentimiento informado correspondiente, se les tomó una muestra de sangre vía intravenosa en tubos (15 mL) BD Vacutainer con EDTA.

### **Obtención de células mononucleares**

A partir de la sangre obtenida, se obtuvo el plasma por centrifugación a 2000 rpm (717 g) por 30 min y se recolectó en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se almacenaron a -70°C, para posteriormente ser analizadas con el kit LEGENDplex (BioLegend, San Diego, CA, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante. La sangre restante se diluyó en una proporción 1:2

con solución salina estéril al 0.9% pH 7.3, posteriormente de 7 a 8 mL de sangre diluida se le agregaron a 3 mL de Lymphoprep en un tubo Falcon de 15 mL y se centrifugó a 2000 rpm (717 g) por 30 min; luego se recolectó el anillo situado entre el Lymphoprep y el plasma restante. Se realizaron dos lavados con solución salina estéril (0.9%, pH 7.3), el primero fue de 1500 rpm durante 15 min. y el segundo fue de 900 rpm (145 g) por 10 min. Se realizó el conteo del botón celular y se adicionó 1 mL de RPMI 1640 (GIBCO, Invitrogen) suplementado con suero fetal bovino (SFB) (Invitrogen, GIBCO) al 50% y con DMSO al 10%, se almacenó a -70°C por 24 h y después a -35°C para el posterior aislamiento de monocitos.

### **Aislamiento de los monocitos clásicos**

Se realizó el aislamiento de los monocitos CD14+ CD16+ mediante selección negativa con el kit "Classical Monocyte Isolation Kit, human" (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) de acuerdo a las especificaciones de fabricante. Por cada 10 millones de células obtenidas se suspendieron 30 µL de MACS Buffer (PBS pH 7.2, BSA al 0.5% y EDTA 2 mM), seguido a esto se adicionaron 10 µL de FcR Blocking Reagent, 10 µL de Classical Monocyte Biotin-Antibody Cocktail, 5 µL de Thrombocyte Removal Reagent, se homogenizó y se dejó incubar por 5 min a temperatura ambiente. Después, se adicionaron 30 µL de MACS Buffer y 20 µL de Anti-Biotin Microbeads, se homogenizó y se incubó nuevamente por 5 min a temperatura ambiente y se procedió a realizar la separación magnética con una columna MACS (Miltenyi Biotec MACS), la columna se preparó con 3 mL de MACS Buffer y se depositó la muestra preparada la cual se le realizaron lavados con MACS Buffer hasta su completa recolección.

### **Ensayo de identificación de citocinas inflamatorias y anti-inflamatorias**

Para determinar las concentraciones de las moléculas solubles presentes en el plasma almacenados previamente a -70°C hasta el día de su uso. La identificación de citocinas se realizó empleando perlas de citometría LEGENDplex (BioLegend, San Diego, CA, EUA). El kit se utilizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las muestras se analizaron en su totalidad en el mismo día a una tasa de adquisición baja en un citómetro de flujo espectral Aurora (Cytek Biosciences, Fremont, CA, EUA). Los datos se analizaron con el software LEGENDplex versión 9 (BioLegend).

### **Obtención de células estromales mesenquimales**

Las células de la médula ósea se recolectaron de acuerdo con los lineamientos de ética institucional, con el consentimiento informado obtenido de donantes hematológicamente sanos del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Ciudad de México, México. Se obtuvieron muestras de BM-MSC (n = 6). Brevemente, las BM-MSC se enriquecieron mediante un procedimiento de selección negativa (sistema RosetteSep™; StemCell Technologies Inc. (STI)) y 50 µL de cóctel de enriquecimiento de células mesenquimales (contiene anticuerpos monoclonales contra CD3, CD14, CD19 y CD38; así como CD66b y glicoforina A) por mililitro de aspirado de MO no diluido. La muestra se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente y luego se diluyó con PBS que contenía suero bovino fetal (FBS) al 2%. Posteriormente, la muestra diluida se colocó en capas sobre medio de gradiente de densidad Ficoll (Pharmacia Biotech) y se centrifugó durante 25 minutos a 1500 rpm. La interfaz de plasma se lavó con PBS que contenía FBS al 2% y EDTA 1 mM. Luego, las células se mantuvieron en medio de Dulbecco bajo en glucosa (HyClone).

Posteriormente, las células se suspendieron en medio Eagle modificado por Dulbecco con bajo contenido de glucosa (LgDMEM; Gibco) suplementado con FBS al 10 % y se sembraron en frascos de cultivo de células T25 (Corning Inc.). Después de 4 días, las células no adherentes se eliminaron mediante pipeta y se añadió medio nuevo. Cada 5 días se cambió el medio. Cuando los cultivos alcanzaron una confluencia del 80%, se le agregó tripsina al 0,05%, EDTA 0,53 mM (Gibco) y se volvieron a cultivar en matraces T75 (Corning). En el quinto pase, las células se utilizaron para ensayos de cultivo. Los fenotipos de las BM-MSC se caracterizaron mediante el análisis de las moléculas CD90, CD73, CD13, CD34, CD31, CD14, CD105, CD29, HLA-DR y CD10 (BD Biosciences).

La muestra se descongeló gradualmente, se le agregaron 500 µL de DMEM (Cytiva) suplementado con L-glutamina (1 mM), estreptomina (1mM), penicilina (1 mM) y gentamicina (1 mM) atemperado y se vertió en una caja Petri de 100 mm con 6 mL de DMEM (Cytiva) suplementado con SFB (Biowest) al 10%. Posteriormente, se realizó un lavado en un tubo de centrifugación de 15 mL y se centrifugó a 1200 rpm por 5 min. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió con 6 mL de DMEM (Biowest) suplementado con SFB (Biowest) al 10% y se depositó nuevamente a la caja Petri de 100 mm. Se incubó por 24 horas a 37°C y se cambió el

medio por completo. En los días 3, 5 y 7 se añadió 1.5 mL de DMEM (Biowest) suplementado con SFB (Biowest) al 10% hasta completar 1 semana o hasta observar al microscopio que las células se encuentran adheridas.

### **Formación de monocapas de las células estromales mesenquimales**

Una vez transcurridas 2 semanas de la formación de la monocapa de las células mesenquimales y de que se obtuviera una confluencia de aproximadamente el 85% se procedió a realizar su obtención mediante una separación enzimática con tripsina (Trypsin-EDTA (0.05%), phenol red, Gibco) se incubó a 37°C por 6 min. Se observaron al microscopio y se inactivó con 200 µL de SFB (Biowest) filtrado, se recolectó el contenido en un tubo Falcon de 15 mL y se centrifugó a 1200 rpm por 5 min. Se decantó el sobrenadante, se suspendió la muestra con 800 µL de DMEM (Biowest) suplementado y se contaron las células.

Se cultivaron 20,000 células mesenquimales en DMEM (Gibco) suplementado con 10% SFB (Biowest) en una placa para ELISA de 96 pozos que se utilizará para los ensayos de cocultivo contacto directo entre MSC y macrófagos, así como para la placa Transwell de 96 pozos para ensayos sin contacto directo célula-célula y se cultivaron 40,000 células en la placa de 48 pozos para ensayos de control durante 2 días o hasta que las células logren formar una monocapa. Una vez constituida la monocapa, se agregaron por cada paciente 90,000 monocitos por pozo y 180,000 monocitos por cada pozo de la placa de 48 pozos.

Se cultivaron 20,000 células mesenquimales por cada pozo en una placa Transwell en la parte superior durante 2 días o hasta que las células logren formar una monocapa. En la parte inferior de la placa Transwell se colocaron 100,000 monocitos por pozo con DMEM (Cytiva) reducido en glucosa suplementado y al 10% de SFB (Biowest). El experimento se monitoreó por 1 semana en la cual se polarizó y se activó a macrófagos que correspondían a M0, M1 y M2a.

### **Polarización de monocitos a macrófagos M1 y M2a**

Los monocitos (100,000 monocitos por pozo) obtenidos de las muestras de pacientes con STEMI y de los sujetos sanos se cultivaron en placas de 96 pozos y en placas para ELISA y en cajas Transwell bajo las siguientes condiciones: RPMI 1640 y DMEM (Cytiva) ambos suplementados al 10% con SFB y con 10 µL de GMCS-F (1000 ng/mL) para macrófagos M1 y con 10 µL de MCS-F (1000 ng/mL) para macrófagos M2 durante 5 días. En el día 6 se activaron

los macrófagos M1 con INF- $\gamma$  (50 ng/mL) y LPS (100 ng/mL) y los macrófagos M2 se activaron con IL-4 (50 ng/mL) e IL-13 (40 ng/mL) durante 24 h.

### **Determinación de la expresión de marcadores asociados a macrófagos M0, M1 y M2a**

Después de polarizar y activar a los macrófagos de controles sanos y de pacientes con infarto agudo de miocardio, se recolectaron los sobrenadantes y los macrófagos se cosecharon con 200  $\mu$ L de solución salina/EDTA estéril (1mM). Se adicionaron 500  $\mu$ L de solución salina (0.9%) /EDTA (1 mM) estéril y se centrifugó a 1200 rpm por 5 min. Se agregaron 10  $\mu$ L del panel de marcadores extracelulares por cada tubo: CD14-BV510, CD80-PE, CD86-APC, HLA-DR-PECy7, CD206 PECy5 y CD163-FITC. Además, se identificaron a la población de las MSC con el marcador CD90-Pacific Blue. Se determinó la viabilidad celular empleando el reactivo Ghost Dye-APC/PeCy7 (Biolegend). La lectura de los marcadores se realizó en el citómetro de flujo (Aurora, Cytex) y el análisis de expresión se realizó con el Software Flowjo versión 8.1.0

### **Aislamiento de linfocitos T reguladores**

Se evaluó el efecto de los cocultivos de MSC y macrófagos en la generación de linfocitos T reguladores en una placa Transwell 96 pozos con un tamaño de poro de 0.4  $\mu$ m en medios inductores para los fenotipos M0, M1 y M2 después de 6 días de cultivo. Se obtuvieron los linfocitos T CD4+ a partir de una purificación por selección positiva a partir de perlas CD4 MicroBeads (Miltenyi Biotec) con RPMI (HyClon) suplementado al 10% de SFB (Corning). Después de 5 días de cocultivo, las células se lavaron con solución salina-EDTA (1 mM), se centrifugaron a 1200 rpm por 5 minutos y fueron marcadas con anticuerpos CD4-FITC (BD Biosciences), CD25-PE (BD Biosciences) y FoxP3-PECy7 (eBioscience). Posteriormente, se evaluaron en el citómetro espectral AURORA (Cytex) y analizaron con el programa Flowjo versión 8.1.0

### **Análisis estadístico**

Todos los análisis fueron realizados con el programa GraphPad Prism versión 9 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA), considerando una  $p < 0.05$  para resultados estadísticamente significativos. Los niveles de citocinas circulantes de los cocultivos fueron analizados a partir de la prueba U Mann–Whitney y una prueba post hoc Kruskal–Wallis.

## Resultados

### **Características de la población**

Las características de la población se muestran en la **Tabla 3**. Los pacientes con STEMI comprendieron en 55 hombres y 4 mujeres con una edad media de  $66 \pm 12$  años. De los cuales, 27 tenían diabetes mellitus tipo 2, 37 tenían hipertensión arterial sistémica, 33 eran fumadores, 28 tenían obesidad y 37 tenían hiperlipidemia. Se incluyeron 20 sujetos sanos; fueron 9 hombres y 11 mujeres con una edad promedio de  $34 \pm 11$  años, sin factores de riesgo cardiovascular.

**Tabla 3. Características de la población de estudio.** Se observa la clasificación de la población a partir de su edad, sexo y algunos factores de riesgo cardiovascular.

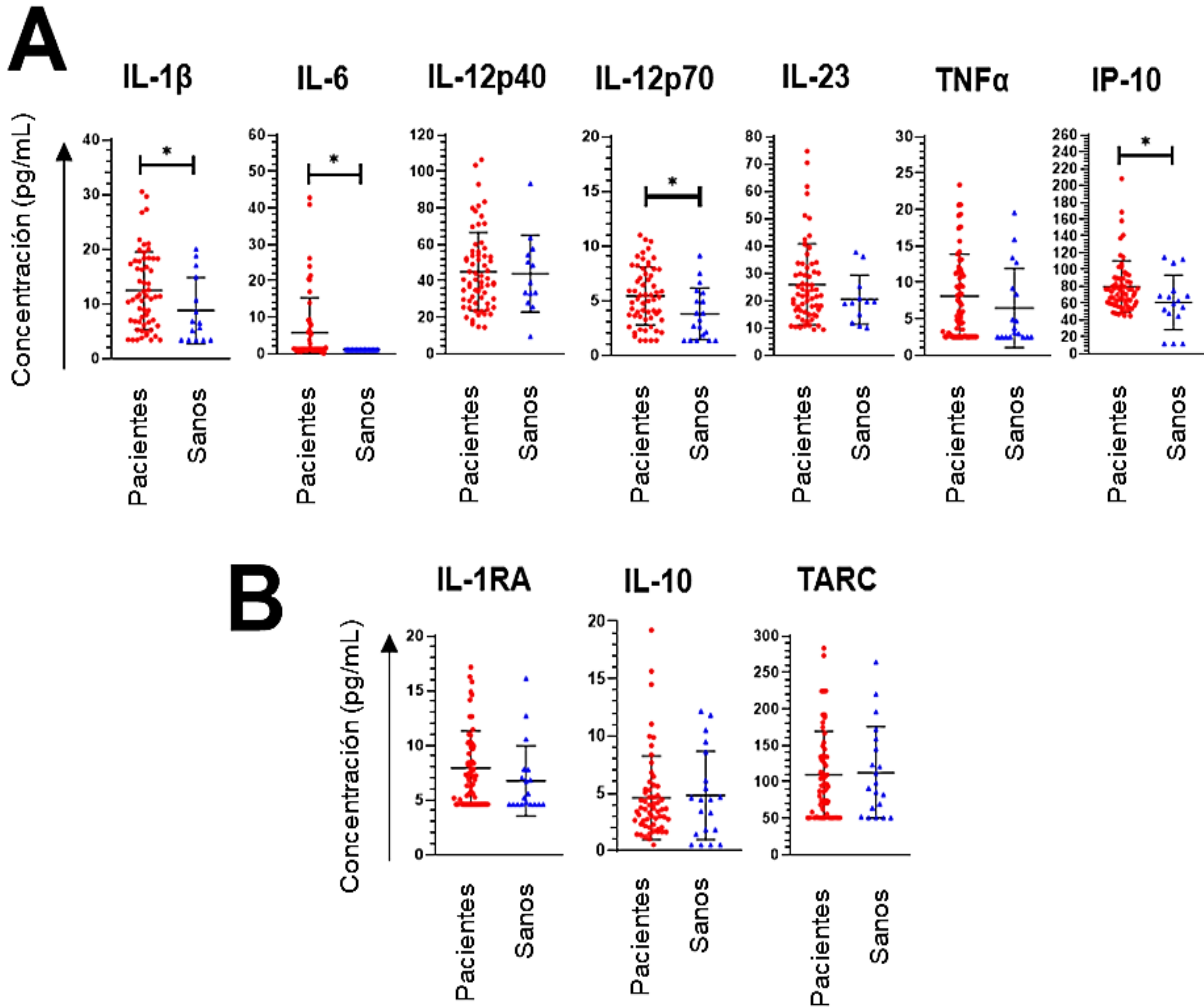
Demografía	Sujetos sanos	Pacientes con STEMI
Media de edad (años) $\pm$ DE	$34 \pm 11$	$66 \pm 12$
Mujer, n (%)	11 (55%)	4 (7%)
Hombre, n (%)	9 (45%)	55 (93%)
Obesidad, n (%)	0	28 (47%)
Tabaquismo, n (%)	0	33 (56%)
Diabetes mellitus tipo 2, n (%)	0	27 (45%)
Hipertensión, n (%)	0	37 (62%)
Hiperlipidemia, n (%)	0	37 (62%)

### **Caracterización del microambiente inflamatorio y anti-inflamatorio en pacientes con STEMI.**

Se analizó el microambiente de citocinas inflamatorias y anti-inflamatorias asociadas a macrófagos M1 y M2a circulantes en los pacientes y sujetos sanos. Se encontró que el ambiente que predomina en los pacientes con STEMI es de carácter inflamatorio, ya que presentaron altas concentraciones de IL-1 $\beta$  (STEMI  $12.41 \pm 8.74$  pg/mL; sanos  $7.08 \pm 6.05$  pg/mL), IL-6 (STEMI  $5.78 \pm 9.47$  pg/mL; sanos  $1.20 \pm 0.00$  pg/mL), IL-12p40 (STEMI  $5.42 \pm 2.63$  pg/mL; sanos  $3.78 \pm 2.36$  pg/mL), y la proteína inducible por interferón, IP-10 (STEMI  $79.35 \pm 30.51$ ; sanos  $60.82 \pm 32.52$  pg/mL) (**Figura 5A**). Mientras que en las citocinas anti-inflamatorias IL-1RA, IL-10 y TARC no se encontró diferencia significativa (**Figura 5B**), lo que sugiere que los



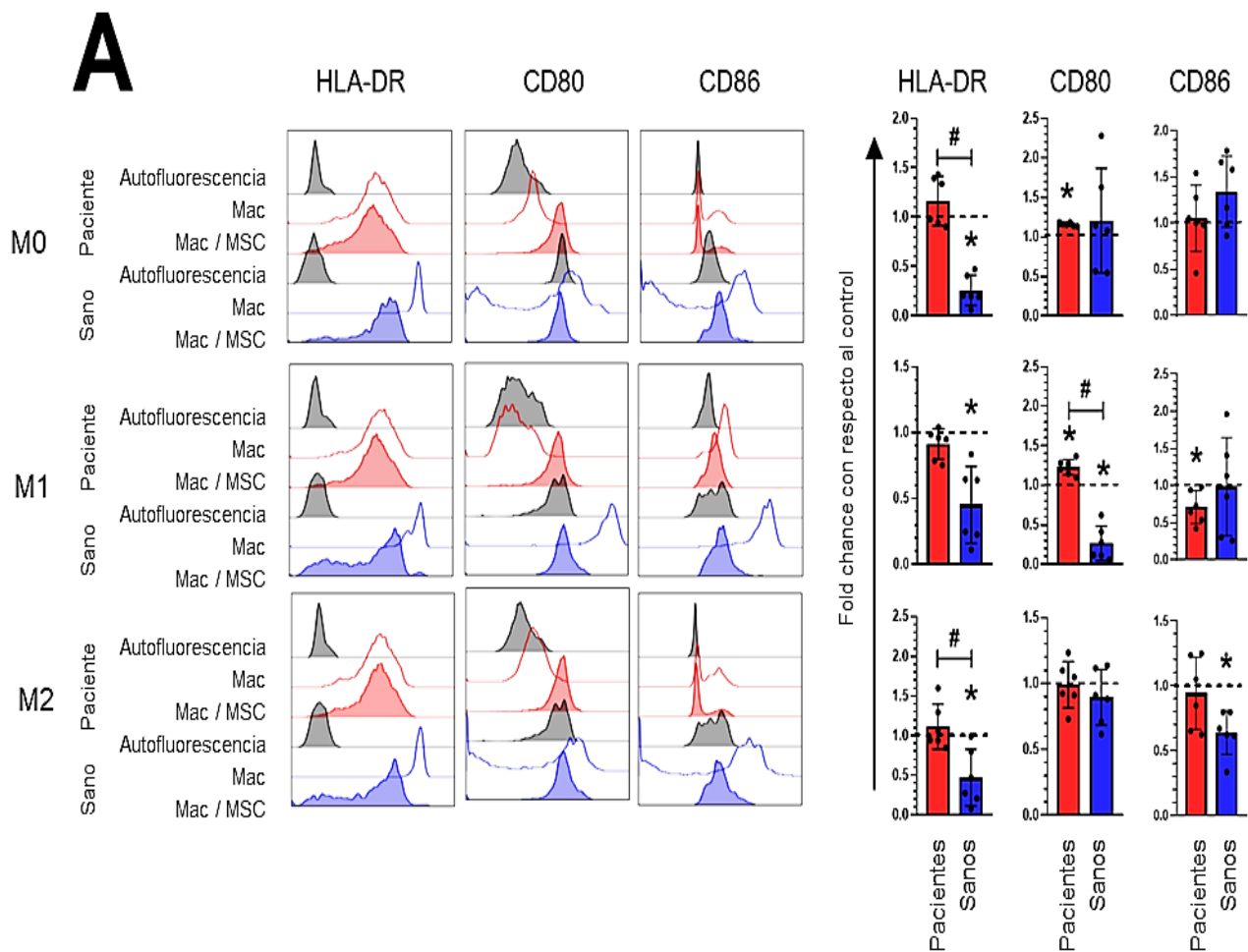
pacientes con STEMI tienen una mayor concentración de citocinas inflamatorias asociadas a macrófagos M1 y que pueden influir predominantemente en la enfermedad.

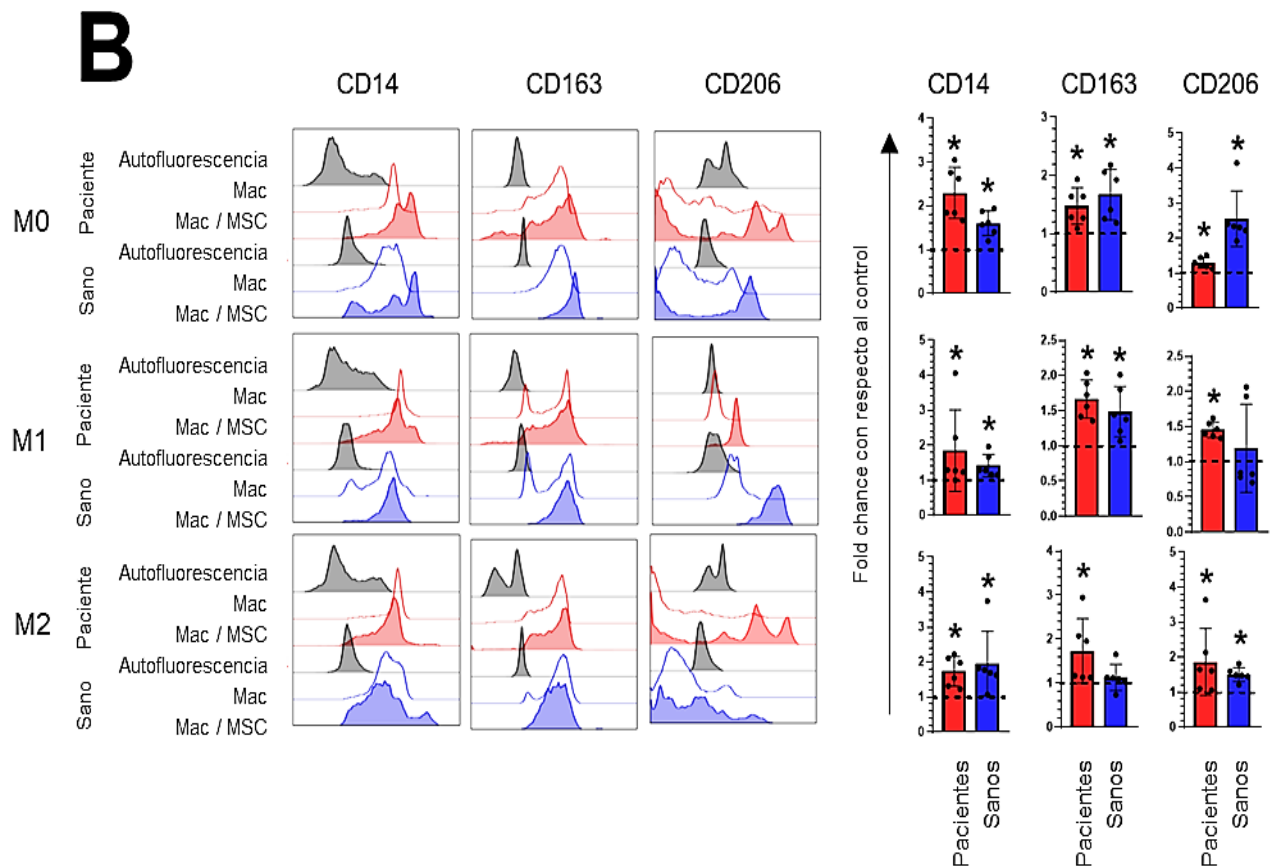


**Figura 5. Cuantificación de citocinas inflamatorias y anti-inflamatorias en plasma de pacientes con STEMI.** (A) Se analizó la concentración de las citocinas inflamatorias características de los macrófagos M1 en el plasma de los pacientes. (B) Concentración de citocinas anti-inflamatorias características de macrófagos M2. Se determinaron los niveles de citocinas por citometría de flujo. Pacientes con STEMI n= 64. Sujetos sanos n= 19. p<0.05.

### Efecto de las MSC en el fenotipo de los macrófagos.

Se analizó el efecto de las MSC en la polarización de los macrófagos. Se analizaron marcadores fenotípicos de macrófagos M1 como HLA-DR, CD80 y CD86 en medios inductores de M1 y M2. En la **Figura 6A** muestra un incremento de los marcadores HLA-DR y CD80 en los pacientes con STEMI solo con medio de cultivo sin inductores y en un medio M1 a diferencia de los individuos sanos. El marcador CD86 disminuye en macrófagos M1 de los pacientes con STEMI comparado con los controles. De la misma manera, se evaluaron los marcadores fenotípicos de M2 como CD14 (cambio de veces: M0:  $2.29 \pm 0.58$ ; M1:  $1.84 \pm 1.16$ , M2:  $1.73 \pm 0.42$ ), CD163 (cambio de veces: M0:  $1.47 \pm 0.31$ ; M1:  $1.66 \pm 0.26$ , M2:  $1.73 \pm 0.73$ ) y CD206 (cambio de veces: M0:  $1.29 \pm 0.15$ ; M1:  $1.45 \pm 0.11$ , M2:  $2.84 \pm 2.73$ ) y se observó que aumentó su expresión en cocultivos con MSC tanto de los pacientes como los controles (**Figura 6B**). Lo que sugiere que las MSC inducen un fenotipo M2 de macrófagos en medios inductores M1 y M2.



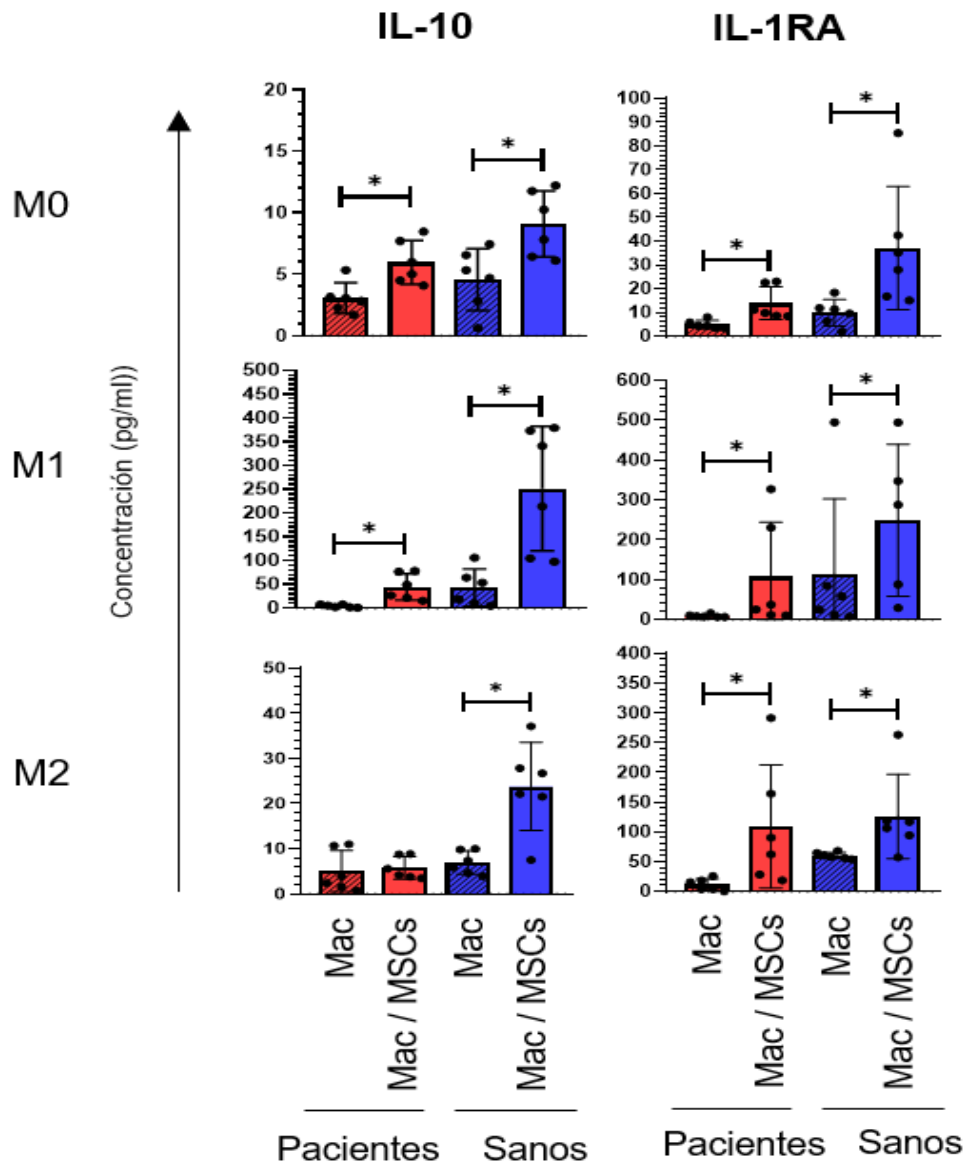


**Figura 6. El efecto de las MSC en la polarización de los macrófagos derivados de pacientes con STEMI.** (A) Histogramas representativos de marcadores asociados a M1. (B) Histogramas que representan el grado de expresión de marcadores M2. M0: Ausencia de medio inductor. M1: Presencia de medio inductor de polarización M1. M2: Presencia de medio inductor de polarización M2a. n= 6, p<0.05.

***Evaluación de citocinas anti-inflamatorias en los cocultivos de MSC y macrófagos para identificar el efecto de la polarización hacia M2.***

Se analizaron los sobrenadantes de los cocultivos después del día 6, ya que se ha reportado que las MSC secretan diversos factores solubles que inducen la polarización de macrófagos M2. Por lo que se evaluó la concentración de IL-10 (M0:  $5.96 \pm 1.78$  pg/mL; M1:  $44.81 \pm 27.83$  pg/mL) e IL-1RA (M0:  $13.97 \pm 6.92$  pg/mL; M1:  $107.07 \pm 136.95$  pg/mL; M2:  $109.45 \pm 103.53$  pg/mL).

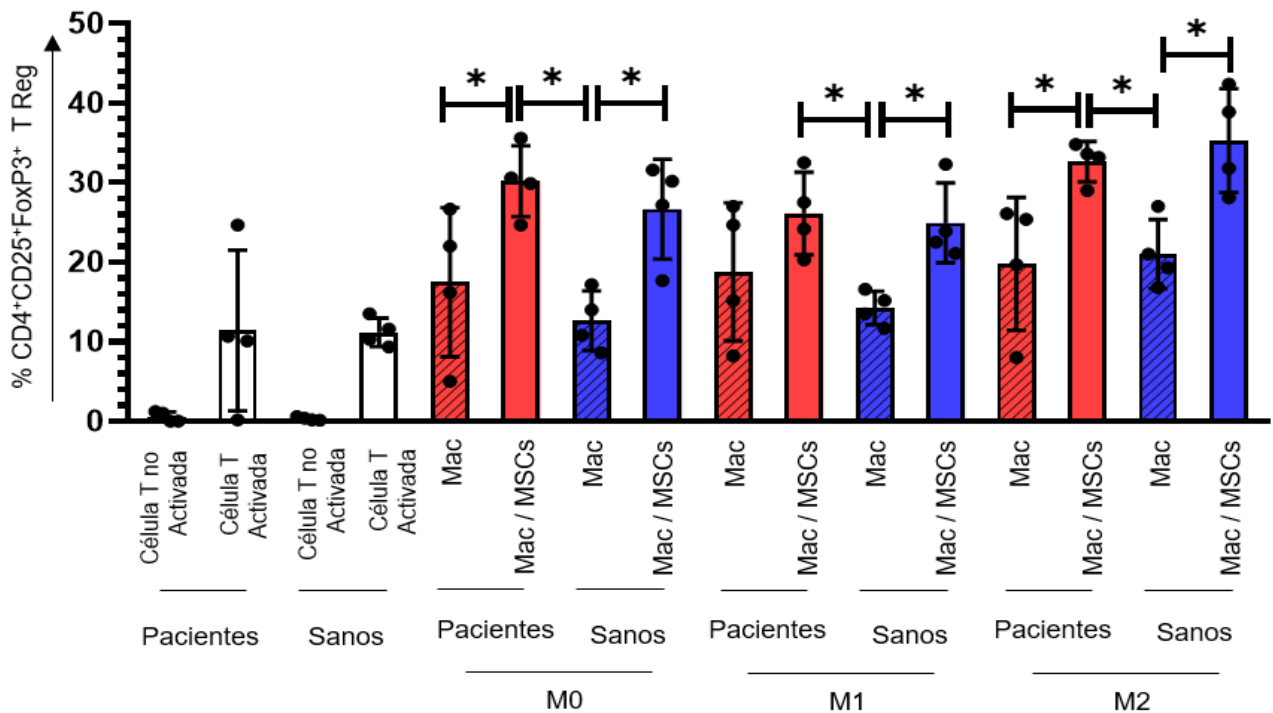
pg/mL) en diferentes condiciones M0, M1 y M2, en donde se incrementó su concentración favoreciendo un fenotipo M2 (**Figura 7**). Por lo cual, las MSC favorecen la expresión de los marcadores anti-inflamatorios asociados a la polarización de macrófagos M2.



**Figura 7. Evaluación de citocinas IL-10 e IL-1RA en cocultivos de MSC y macrófagos.** Se determinaron los niveles de IL-10 e IL-1RA en diferentes condiciones para analizar la concentración (pg/mL) en la que se inducía la expresión de marcadores CD163 y CD206 característicos de macrófagos M2. n= 6, p<0.05. M0: Ausencia de medio inductor. M1: Presencia de medio inductor de polarización M1. M2: Presencia de medio inductor de polarización M2a.

**Evaluación de la inducción de los linfocitos T reguladores (CD4+, CD25+, FoxP3+) en cocultivos con MSC.**

Se analizó la inducción de los linfocitos T reguladores en cocultivos de MSC y macrófagos. Se encontró que los cocultivos con MSC aumenta la proliferación de linfocitos T reguladores en una condición M2 (STEMI: 19.80% ± 8.35; STEMI/BM-MSc: 32.65% ± 2.52), a diferencia de los medios con condiciones M0 (STEMI 17.57% ± 9.18; STEMI/BM-MSc: 30.2% ± 4.45) y M1 en donde no hubo diferencia significativa entre los cultivos en presencia o ausencia de MSC. En los individuos sanos se determinó que tan solo en presencia de MSC es suficiente para aumentar significativamente la proliferación de linfocitos T reguladores (**Figura 8**).



**Figura 8. Efecto de las MSC y macrófagos en la generación de linfocitos T reguladores (CD4+, CD25+ y FoxP3+).** Se representa el porcentaje de proliferación de los linfocitos T reguladores en medios con y sin MSC. M0: Ausencia de medio inductor. M1: Presencia de medio inductor de polarización M1. M2: Presencia de medio inductor de polarización M2a. n= 6, p<0.05.

## Discusión

Las ECV continúan siendo la primera causa de muerte en México y en el mundo [1,2], dentro de las cuales, se encuentra el IAM que activan la respuesta inmunológica inflamatoria reclutando a diferentes células como los macrófagos y monocitos que son los que principalmente participan y los que contribuyen al desarrollo y progresión de la enfermedad [26,28,30]. Por su parte, se ha encontrado que los mecanismos de reparación y remodelación miocárdica de los pacientes con infarto no está regulada adecuadamente incluso después de la reperfusión, por lo que han sugerido diversos modelos para ayudar a dilucidar el mecanismo de regulación de los procesos inflamatorios y anti-inflamatorios que participan [28,39]. Las MSC se caracterizan por tener un potencial efecto inmunorregulatorio en diversas células del sistema inmune, así como ser utilizadas en terapias celulares en diversas enfermedades inflamatorias [41]. Sin embargo, no se ha reportado el efecto de las MSC de médula ósea en los macrófagos derivados de pacientes con STEMI, que presentan una alta producción de citocinas inflamatorias y una respuesta anti-inflamatoria deficiente, lo que empeora el pronóstico de los pacientes [65].

### **El microambiente de los pacientes con STEMI.**

En las primeras etapas del IAM, se ha reportado que hay una mayor población de macrófagos M1 debido a que se genera una isquemia obstructiva que desencadena factores inflamatorios como: IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ , y GM-CSF los cuales, generan daño en el endotelio por la inducción de la liberación de metaloproteinasas y ROS que promueve la diapédesis de otras células inmunológicas como monocitos, linfocitos T, neutrófilos, entre otros [6,33,35]. Los factores que desencadenan la inflamación exacerbada en los pacientes con STEMI están implicados en la remodelación después del infarto [66]. En los resultados mostrados en la **Figura 5A**, se aprecia que hay una alta concentración de citocinas inflamatorias que están relacionadas con la polarización de macrófagos M1 (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p70 e IP-10) en pacientes con STEMI que en individuos sanos.

Otros estudios han demostrado que en pacientes con STEMI que se elevan las concentraciones de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-12p70, lo que demuestra la poca respuesta a los mecanismos de reparación que tienen los pacientes con insuficiencia cardiaca avanzada [67]. La falta de regulación de la respuesta inflamatoria en sometidos a la reperfusión coronaria puede generar más morbilidad

y mortalidad [66]. La IP-10 es una citocina con propiedades proinflamatorias y antiangiogénicas, la cual, presenta altos niveles en pacientes con infarto, evidencias previas la han asociado a un incremento del tamaño del infarto, así como una mayor generación de células T efectoras en la fase aguda del STEMI [68]. También los pacientes presentan un incremento de TNF- $\alpha$  que participa en la implementación de ROS y el deterioro de la vasodilatación mediada por óxido nítrico (NO), por lo que está asociadas con el curso y el desarrollo del infarto al estar asociada con MIP-1 $\beta$  que es liberado por los monocitos [69]. Por lo que estos resultados indican que un microambiente inflamatorio que condiciona a la diferenciación de macrófagos M1 predomina en los pacientes con STEMI lo que podría determinar el pronóstico de la enfermedad.

### **Las MSC favorecen un fenotipo M2a en el STEMI.**

Se ha encontrado que las MSC de médula ósea pueden favorecer la secreción de citocinas o factores que inmunorregulan a otras células de forma paracrina, en este contexto, en un ambiente inflamatorio donde principalmente participan linfocitos, monocitos y macrófagos [40]. En el IAM se encuentran mayoritariamente los macrófagos M1 resultado de la lesión tisular que desencadenó el infarto, liberando TNF, NO, IL-1, IL-12 e IL-23 que pueden inducir a linfocitos de tipo Th1 y Th17 [70]. De acuerdo con la **Figura 6A** se determinó que los macrófagos M0 en cocultivos con MSC presentan un incremento de HLA-DR, CD80 y CD86; en tanto la expresión de estos marcadores se mantuvo en los macrófagos M1 de los pacientes a comparación de los sujetos sanos, en los cuales decreció su expresión. Se ha descrito que estos marcadores se pueden expresar a partir de la concentración de óxido nítrico [71].

Para el caso de los macrófagos M1 en presencia de MSC en un medio inductor M2, aumentó la expresión de los marcadores CD14, CD163 y CD206 (**Figura 6B**). Se ha reportado que el aumento del fenotipo M2 está relacionado al incremento de la concentración de PGE2 y de TNF- $\alpha$  a partir de la inducción de IL-10 secretada por las MSC [48]. Así como que en modelos de ratones trasplantados con MSC con lesión miocárdica se demostró que se induce un fenotipo M2 y que en presencia de TNF- $\alpha$  ayuda a mantener dicha polarización desfavoreciendo el ambiente inflamatorio [49]. En ratones con cardiomiopatía diabética (DCM) caracterizada por una inflamación miocárdica crónica, se implantaron MSC las cuales mejoraron la estructura cardíaca e incrementaron el fenotipo M2 aliviando la inflamación, al igual que en estudios in vitro donde se pretrataron las MSC con COX-2 generó la polarización M2 [72]. Estudios previos han



analizado que la IL-4 e IL-13 ayudan a polarizar los macrófagos M1 a M2 [46]. Por lo tanto, se demuestra que las MSC de médula ósea contribuyen a la polarización de macrófagos M2 derivados de pacientes STEMI en comparación de medios sin MSC y de individuos sanos, asimismo este cambio de polarización podría modular la respuesta inflamatoria en el infarto.

### **Las MSC regulan la polarización de macrófagos M2 a partir de la secreción de IL-10 e IL-1RA**

En la **Figura 7**, se encontró en los sobrenadantes de los cocultivos de MSC de médula ósea con macrófagos M1 se incrementa la concentración de IL-10 e IL-1RA, las cuales están relacionadas hacia una polarización M2. Las MSC secretan diversos factores solubles como IL-10 que favorece la comunicación entre los macrófagos y conduce a una polarización de tipo M2 a partir de la expresión de factores como CCL-2 y CXCL-12, así como IL-8 que ejerce una función protectora en el endotelio lo que promueve la estabilización de la placa evitando su ruptura [44,51]. Se ha reportado que las concentraciones de IL-10 en el plasma en modelos murinos con isquemia miocárdica está elevada después de la reperfusión, lo que disminuye el tejido necrótico y, por ende, el tamaño del infarto; mientras que el tratamiento con IL-10 en ratones con infarto del miocardio dio como resultado una disminución del ventrículo izquierdo del corazón y una reducción significativa de la inflamación [73,74]. Otros estudios en modelos de ratón, han reportado que las MSC previamente condicionadas con INF- $\gamma$  e IL-1 $\beta$  suprimieron la expresión genes inflamatorios en macrófagos M1 durante el proceso de polarización y aumentó la expresión de genes característicos de macrófagos M2a, M2b y M2c durante la polarización M2a [75]. Además, se puede corroborar con otros estudios que los macrófagos también secretan IL-10, lo que favorece la activación de fibroblastos incrementando su proliferación, migración y producción de colágeno, el cual, puede contribuir a la polarización de macrófagos [74,75].

Adicionalmente, se identificó que la IL-1RA aumenta su concentración en cocultivos con MSC a diferencia de los cultivos con sólo macrófagos tanto de pacientes como de individuos sanos en condiciones M1. Apoyando lo anterior, resultados previos han demostrado que la regulación de los niveles de IL-1RA está involucrado en la remodelación cardíaca en los pacientes con STEMI, es una citocina antiinflamatoria que es regulada por IL-1 $\beta$  y está relacionada con procesos isquémicos [76,77].

Además, el bloqueo de IL-1 mediante un anticuerpo monoclonal en pacientes con afectación cardíaca, se demostró que evita la prevalencia de efectos aterotrombóticos recurrentes [78]; por lo que la IL-1RA está correlacionada con la gravedad de la inflamación [77]. Estos resultados demuestran que las MSC de médula ósea modulan la polarización de los macrófagos derivados de pacientes con STEMI a un fenotipo M2a a través de IL-10 e IL-1RA.

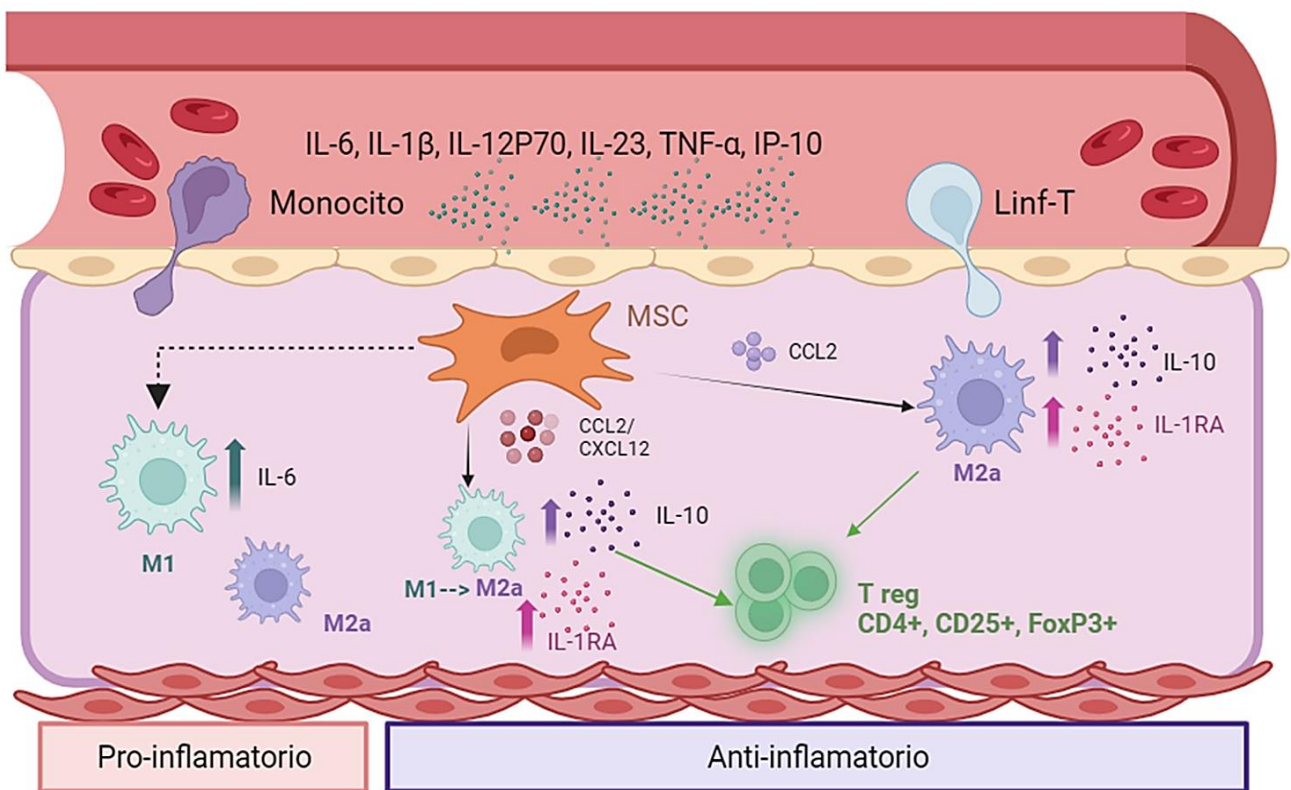
### **Los cocultivos MSC-macrófagos inducen la proliferación de linfocitos T reguladores.**

Estudios previos han reportado el papel importante de los linfocitos T reguladores, ya que ayudan en el proceso de inflamación cardíaca y su proporción de linfocitos Th1 y Th2 está directamente involucrada en el IAM [57, 59]. Se determinó el efecto de las MSC de médula ósea en la generación de los linfocitos T reguladores CD4+, CD25+ y FoxP3+ dependientes del fenotipo de macrófagos M1 y M2. Se ha reportado que en células Treg (CD4+, FoxP3+, CD73+) contribuyen a la reparación cardíaca aumentando su función protectora e inmunosupresora [79]. Al igual que la participación de IP-10 sobre la proliferación de las células T CD4+ efectoras que ejerce un efecto positivo en la recuperación de la función sistólica cardíaca en los pacientes después del STEMI [68].

Se encontró que en cocultivos con MSC y macrófagos M1 y M2 aumenta significativamente la proliferación de linfocitos T reguladores a diferencia de los cultivos sin MSC tanto de pacientes como de individuos sanos. Por lo cual, estos resultados sugieren que las MSC participan en la generación de linfocitos T reguladores independientemente del medio inductor M1 o M2 en el STEMI, lo que puede contribuir a la regulación de la inflamación en el IAM.

## CONCLUSIONES

Las MSC tienen la capacidad de inducir la reparación del endotelio cardiaco a partir de la inducción de la polarización de los macrófagos de un fenotipo M1 a un M2a anti-inflamatorio a partir de la secreción de citocinas solubles como IL-10 e IL-1RA que además de servir como inmunorreguladoras, va a favorecer la proliferación de linfocitos T reguladores (CD4+, CD25+, FoxP3+) que modularan el microambiente de los pacientes con STEMI. Esto podría ser de utilidad para futuras terapias donde se empleen a las MSC de médula ósea para atenuar la respuesta de los macrófagos M1 y promover la recuperación de los pacientes con STEMI.



**Figura 9. Conclusión.** Tanto en los pacientes con STEMI como en los sujetos sanos en cocultivos con MSC y macrófagos, se observó un aumento en la polarización del fenotipo M2a en condiciones M1, lo que induce la proliferación de linfocitos Treg a partir de la secreción de citocinas anti-inflamatorias como IL-10 e IL-1RA que contribuirán a la modulación del ambiente inflamatorio. Realizado con BioRender.com

## PERSPECTIVAS

Con estos experimentos se espera analizar el efecto de los sobrenadantes de los cocultivos sobre la actividad funcional de las células endoteliales en procesos de angiogénesis y de migración celular.

## REFERENCIAS

1. OMS. (2023, enero). Enfermedades Cardiovasculares. Recuperado 12 de enero de 2023, de: [https://www.who.int/es/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab\\_1](https://www.who.int/es/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab_1)
2. INEGI. (2023, enero). ESTADÍSTICA DE DEFUNCIONES REGISTRADAS DE ENERO A JUNIO DE 2022 (PRELIMINAR). Recuperado 12 de enero de 2023, de <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2023/DR/DR-Ene-jun2022.pdf>
3. Del Consumidor, P. F. (s. f.). No rompas más tu corazón. Salud cardiovascular. gov.mx. <https://www.gob.mx/profeco/documentos/no-rompas-mas-tu-corazon-salud-cardiovascular?state=published>
4. Poznyak, A., Grechko, A. V., Poggio, P., Myasoedova, V. A., Alfieri, V., & Orekhov, A. N. (2020). The Diabetes Mellitus-Atherosclerosis Connection: The Role of Lipid and Glucose Metabolism and Chronic Inflammation. *International journal of molecular sciences*, 21(5), 1835. <https://doi.org/10.3390/ijms21051835>
5. Frostegård J. (2013). Immunity, atherosclerosis and cardiovascular disease. *BMC medicine*, 11, 117. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-11-117>
6. Chávez, L, Espinosa, J.E, Chávez, K, Legorreta, M.V, Montoya, E, Blanco, F. (2014). Innate Immune System Cells in Atherosclerosis, *Archives of Medical Research*, 45 (1), pp. 1-14, <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2013.11.007>

7. Ley, K., Miller, Y. I., & Hedrick, C. C. (2011). Monocyte and macrophage dynamics during atherogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 31(7), 1506–1516. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.221127>
8. Xu, H., Jiang, J., Chen, W., Li, W., & Chen, Z. (2019). Vascular Macrophages in Atherosclerosis. *Journal of immunology research*, 2019, 4354786. <https://doi.org/10.1155/2019/4354786>
9. Shan, R., Liu, N., Yan, Y., & Liu, B. (2021). Apoptosis, autophagy and atherosclerosis: Relationships and the role of Hsp27. *Pharmacological research*, 166, 105169. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105169>
10. Badimon, L., & Vilahur, G. (2014). Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *Journal of internal medicine*, 276(6), 618–632. <https://doi.org/10.1111/joim.12296>
11. Momi, S., Falcinelli, E., Petito, E., Ciarrocca Taranta, G., Ossoli, A., & Gresele, P. (2022). Matrix metalloproteinase-2 on activated platelets triggers endothelial PAR-1 initiating atherosclerosis. *European heart journal*, 43(6), 504–514. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab631>
12. Libby, P., & Ridker, P. M. (2006). Inflammation and atherothrombosis: from population biology and bench research to clinical practice. *Journal of the American College of Cardiology*, 48(9S), A33-A46
13. Rognoni, A., Cavallino, C., Veia, A., Bacchini, S., Rosso, R., Facchini, M., Secco, G. G., Lupi, A., Nardi, F., Rametta, F., & Bongo, A. S. (2015). Pathophysiology of Atherosclerotic Plaque Development. *Cardiovascular & hematological agents in medicinal chemistry*, 13(1), 10–13. <https://doi.org/10.2174/1871525713666141218163425>
14. Badimon, L., & Vilahur, G. (2014). Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *Journal of internal medicine*, 276(6), 618–632. <https://doi.org/10.1111/joim.12296>

15. Sakakura, K., Nakano, M., Otsuka, F., Ladich, E., Kolodgie, F. D., & Virmani, R. (2013). Pathophysiology of Atherosclerosis Plaque Progression. *Heart Lung and Circulation*, 22(6), 399-411. <https://doi.org/10.1016/j.hlc.2013.03.001>
16. Moore, K. J., Sheedy, F. J., & Fisher, E. A. (2013). Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nature reviews. Immunology*, 13(10), 709–721. <https://doi.org/10.1038/nri3520>
17. Luo, W., Wang, H., Ohman, M. K., Guo, C., Shi, K., Wang, J., & Eitzman, D. T. (2012). P-selectin glycoprotein ligand-1 deficiency leads to cytokine resistance and protection against atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice. *Atherosclerosis*, 220(1), 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.10.012>
18. An, Z., Li, J., Yu, J., Wang, X., Gao, H., Zhang, W., Wei, Z., Zhang, J., Zhang, Y., Zhao, J., & Liang, X. (2019). Neutrophil extracellular traps induced by IL-8 aggravate atherosclerosis via activation NF- $\kappa$ B signaling in macrophages. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 18(21), 2928–2938. <https://doi.org/10.1080/15384101.2019.1662678>
19. Drechsler, M., Megens, R. T. A., Van Zandvoort, M. A. M. J., Weber, C., & Soehnlein, O. (2010). Hyperlipidemia-Triggered Neutrophilia Promotes Early Atherosclerosis. *Circulation*, 122(18), 1837-1845. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.110.961714>
20. Saigusa, R., Winkels, H., & Ley, K. (2020). T cell subsets and functions in atherosclerosis. *Nature reviews. Cardiology*, 17(7), 387–401. <https://doi.org/10.1038/s41569-020-0352-5>
21. Fernandez, D. M., Rahman, A. H., Fernandez, N. F., Chudnovskiy, A., Amir, E. D., Amadori, L., Khan, N. S., Wong, C. K., Shamailova, R., Hill, C. A., Wang, Z., Remark, R., Li, J. R., Pina, C., Faries, C., Awad, A. J., Moss, N., Bjorkegren, J. L. M., Kim-Schulze, S., Gnjjatic, S., ... Giannarelli, C. (2019). Single-cell immune landscape of human atherosclerotic plaques. *Nature medicine*, 25(10), 1576–1588. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0590-4>
22. Schäfer, S., & Zerneck, A. (2020). CD8+ T Cells in Atherosclerosis. *Cells*, 10(1), 37. <https://doi.org/10.3390/cells10010037>
23. Gerhardt, T., & Ley, K. (2015). Monocyte trafficking across the vessel wall. *Cardiovascular research*, 107(3), 321–330. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv147>

24. Vilariño, J. O., Esper, R., & Badimón, J. J. (2004). Fisiopatología de los síndromes coronarios agudos. Tres paradigmas para un nuevo dogma. *Revista Española de Cardiología*, 4, 13-24. <https://www.revespcardiol.org/es-fisiopatologia-los-sindromes-coronarios-agudos--articulo-13071736>
25. Overbaugh K. J. (2009). Acute coronary syndrome. *The American journal of nursing*, 109(5), 42–53. <https://doi.org/10.1097/01.NAJ.0000351508.39509.e2>
26. Sambola, A., Viana-Tejedor, A., Bueno, H., Barrabés, A. M., & Delgado, V. (2019). Comentarios al consenso ESC 2018 sobre la cuarta definición universal del infarto de miocardio. *Revista Española de Cardiología*, 72(1), 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.recesp.2018.11.009>
27. Pollard, T. (2000). THE ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION. *Atención primaria: Clínicas en consultorio*, 27(3), 631–649. [https://doi.org/10.1016/s0095-4543\(05\)70167-6](https://doi.org/10.1016/s0095-4543(05)70167-6)
28. Ong, S. B., Hernández-Reséndiz, S., Crespo-Avilan, G. E., Mukhametshina, R. T., Kwek, X. Y., Cabrera-Fuentes, H. A., & Hausenloy, D. J. (2018). Inflammation following acute myocardial infarction: Multiple players, dynamic roles, and novel therapeutic opportunities. *Pharmacology & therapeutics*, 186, 73–87. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.01.001>
29. Arslan, F., Smeets, M. B., O'Neill, L. A., Keogh, B., McGuirk, P., Timmers, L., Tersteeg, C., Hofer, I. E., Doevendans, P. A., Pasterkamp, G., & de Kleijn, D. P. (2010). Myocardial ischemia/reperfusion injury is mediated by leukocytic toll-like receptor-2 and reduced by systemic administration of a novel anti-toll-like receptor-2 antibody. *Circulation*, 121(1), 80–90. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.880187>
30. Sakakura, K., Nakano, M., Otsuka, F., Ladich, E., Kolodgie, F. D., & Virmani, R. (2013). Pathophysiology of Atherosclerosis Plaque Progression. *Heart Lung and Circulation*, 22(6). <https://doi.org/10.1016/j.hlc.2013.03.001>
31. Johnson, J. L., Dwivedi, A., Somerville, M., George, S. J., & Newby, A. C. (2011). Matrix metalloproteinase (MMP)-3 activates MMP-9 mediated vascular smooth muscle cell migration and neointima formation in mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 31(9), e35–e44. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.225623>

32. Hirayama, D., Iida, T., & Nakase, H. (2017). The Phagocytic Function of Macrophage-Enforcing Innate Immunity and Tissue Homeostasis. *International journal of molecular sciences*, 19(1), 92. <https://doi.org/10.3390/ijms19010092>
33. Koelwyn, G. J., Corr, E. M., Erbay, E., & Moore, K. J. (2018). Regulation of macrophage immunometabolism in atherosclerosis. *Nature immunology*, 19(6), 526–537. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0113-3>
34. Huang, X., Li, Y., Fu, M., & Xin, H. B. (2018). Polarizing Macrophages In Vitro. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1784, 119–126. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7837-3\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7837-3_12)
35. Murphy, K., Travers, P., & Walport, M. (2009). *Inmunología de Janeway* (7.a ed., Vol. 1). McGraw Hill Education. pp. 249-250.
36. Orecchioni, M., Ghosheh, Y., Pramod, A. B., & Ley, K. (2019). Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages. *Frontiers in immunology*, 10, 1084. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01084>
37. Wang, S., Liu, R., Yu, Q., Lin, D., Bi, Y., & Liu, G. (2019). Metabolic reprogramming of macrophages during infections and cancer. *Cancer Letters*, 452, 14-22. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.03.015>
38. Chinetti-Gbaguidi, G., Colin, S., & Staels, B. (2014). Macrophage subsets in atherosclerosis. *Nature Reviews Cardiology*, 12(1), 10-17. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2014.173>
39. Kologrivova, I. V., Shtatolkina, M., Суслова, Т. Е., & Ryabov, V. V. (2021). Cells of the immune system in cardiac remodeling: main players in resolution of inflammation and repair after myocardial infarction. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.664457>
40. Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. (2011). Células madre mesenquimales. *Trasplante de Células*, 20(1):5-14. <https://doi.org/10.3727/096368910X>
41. Julianna Kobolak, Andras Dinnyes, Adnan Memic, Ali Khademhosseini, Ali Mobasher, Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche, *Methods*. 2016;99(1): 62-68. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.09.016>.



42. Lin, Y., Zhu, W., & Chen, X. (2020). The involving progress of MSCs based therapy in atherosclerosis. *Stem cell research & therapy*, 11(1), 216. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01728-1>
43. Shabbir, A., Zisa, D., Lin, H., et al. (2010). Activation of host tissue trophic factors through JAK-STAT3 signaling: a mechanism of mesenchymal stem cell-mediated cardiac repair. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 299(5), H1428–H1438. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00488.2010>
44. Lin, Y. L., Yet, S. F., Hsu, Y. T., Wang, G. J., & Hung, S. C. (2015). Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Atherosclerotic Lesions via Restoring Endothelial Function. *Stem cells translational medicine*, 4(1), 44–55. <https://doi.org/10.5966/sctm.2014-0091>
45. Cheng, G., Wang, X., Li, Y., & He, L. (2017). Let-7a-transfected mesenchymal stem cells ameliorate monocrotaline-induced pulmonary hypertension by suppressing pulmonary artery smooth muscle cell growth through STAT3-BMP2 signaling. *Stem cell research & therapy*, 8(1), 34. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0480-y>
46. Abumaree, M. H., Al Jumah, M. A., Kalionis, B., Jawdat, D., Al Khaldi, A., Abomaray, F. M., Fatani, A. S., Chamley, L. W., & Knawy, B. A. (2013). Human placental mesenchymal stem cells (pMSCs) play a role as immune suppressive cells by shifting macrophage differentiation from inflammatory M1 to anti-inflammatory M2 macrophages. *Stem cell reviews and reports*, 9(5), 620–641. <https://doi.org/10.1007/s12015-013-9455-2>
47. Mirza, R., DiPietro, L. A., & Koh, T. J. (2009). Selective and specific macrophage ablation is detrimental to wound healing in mice. *The American journal of pathology*, 175(6), 2454–2462. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.090248>
48. Saldaña, L., Bensiamar, F., Vallés, G., Mancebo, F. J., García-Rey, E., & Vilaboa, N. (2019). Immunoregulatory potential of mesenchymal stem cells following activation by macrophage-derived soluble factors. *Stem cell research & therapy*, 10(1), 58. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1156-6>

49. Zhang, B., Zhao, N., Zhang, J., Liu, Y., Zhu, D., & Kong, Y. (2019). Mesenchymal stem cells rejuvenate cardiac muscle through regulating macrophage polarization. *Aging*, 11(12), 3900–3908. <https://doi.org/10.18632/aging.102009>
50. Zhang, X., Huang, F., Li, W., Dang, J. L., Yuan, J., Wang, J., Zeng, D. L., Sun, C. X., Liu, Y. Y., Ao, Q., Tan, H., Su, W., Qian, X., Olsen, N., & Zheng, S. G. (2018). Human Gingiva-Derived Mesenchymal Stem Cells Modulate Monocytes/Macrophages and Alleviate Atherosclerosis. *Frontiers in immunology*, 9, 878. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00878>
51. Giri, J., Das, R., Nylen, E., Chinnadurai, R., & Galipeau, J. (2020). CCL2 and CXCL12 Derived from Mesenchymal Stromal Cells Cooperatively Polarize IL-10+ Tissue Macrophages to Mitigate Gut Injury. *Cell reports*, 30(6), 1923–1934.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.01.047>
52. Domínguez Rodríguez, A., Abreu González, P., García González, M. J., & Ferrer Hita, J. (2005). Asociación entre concentraciones séricas de interleucina 10 y desarrollo de insuficiencia cardíaca en pacientes con infarto agudo de miocardio tratados con angioplastia primaria [Association between serum interleukin 10 level and development of heart failure in acute myocardial infarction patients treated by primary angioplasty]. *Revista española de cardiología*, 58(6), 626–630.
53. Yang, Z., Zingarelli, B., & Szabó, C. (2000). Crucial role of endogenous interleukin-10 production in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation*, 101(9), 1019–1026. <https://doi.org/10.1161/01.cir.101.9.1019>
54. Jung, M., Ma, Y., Iyer, R. P., DeLeon-Pennell, K. Y., Yabluchanskiy, A., Garrett, M. R., & Lindsey, M. L. (2017). IL-10 improves cardiac remodeling after myocardial infarction by stimulating M2 macrophage polarization and fibroblast activation. *Basic research in cardiology*, 112(3), 33. <https://doi.org/10.1007/s00395-017-0622-5>
55. Ko, J. H., Lee, H. J., Jeong, H. J., Kim, M. K., Wee, W. R., Yoon, S. W., Choi, H., Prockop, D. J., & Oh, J. Y. (2015). Mesenchymal stem/stromal cells precondition lung monocytes/macrophages to produce tolerance against allo- and autoimmunity in the eye. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(1), 158–163. <https://doi.org/10.1073/pnas.1522905113>

56. Phinney, D. G., Di Giuseppe, M., Njah, J., Sala, E., Shiva, S., et al. (2015). Mesenchymal stem cells use extracellular vesicles to outsource mitophagy and shuttle microRNAs. *Nature communications*, 6, 8472. <https://doi.org/10.1038/ncomms9472>
57. Hofmann, U., & Frantz, S. (2016). Role of T-cells in myocardial infarction. *European heart journal*, 37(11), 873–879. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv639>
58. Yang, Z., Day, Y. J., Toufektsian, M. C., Xu, Y., Ramos, S. I., Marshall, M. A., French, B. A., & Linden, J. (2006). Myocardial infarct-sparing effect of adenosine A2A receptor activation is due to its action on CD4+ T lymphocytes. *Circulation*, 114(19), 2056–2064. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.649244>
59. Li, C., Zong, W., Zhang, M., Tu, Y., Zhou, Q., Ni, M., Li, Z., Liu, H., & Zhang, J. (2019). Increased Ratio of Circulating T-Helper 1 to T-Helper 2 Cells and Severity of Coronary Artery Disease in Patients with Acute Myocardial Infarction: A Prospective Observational Study. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, 25, 6034–6042. <https://doi.org/10.12659/MSM.913891>
60. Rieckmann, M., Delgobo, M., Gaal, C., Büchner, L., Steinau, P., et al. (2019). Myocardial infarction triggers cardioprotective antigen-specific T helper cell responses. *The Journal of clinical investigation*, 129(11), 4922–4936. <https://doi.org/10.1172/JCI123859>
61. Van der Borght, K., Scott, C. L., Nindl, V., Bouché, A., Martens, L., et al. (2017). Myocardial Infarction Primes Autoreactive T Cells through Activation of Dendritic Cells. *Cell reports*, 18(12), 3005–3017. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.079>
62. Zhao, J., Chen, J., Huang, F., et al. (2019). Human gingiva tissue-derived MSC ameliorates immune-mediated bone marrow failure of aplastic anemia via suppression of Th1 and Th17 cells and enhancement of CD4+Foxp3+ regulatory T cells differentiation. *American journal of translational research*, 11(12), 7627–7643.
63. Zhang, Q., Fu, L., Liang, Y., Guo, Z., Wang, L., Ma, C., & Wang, H. (2018). Exosomes originating from MSCs stimulated with TGF- $\beta$  and IFN- $\gamma$  promote Treg differentiation. *Journal of cellular physiology*, 233(9), 6832–6840. <https://doi.org/10.1002/jcp.26436>

64. Lin, Y. Z., Lu, S. H., Lu, Z. D., Huang, Y., Shi, Y., Liu, L., Wang, X. Y., & Ji, Q. W. (2013). Downregulation of CD4+LAP+ and CD4+CD25+ regulatory T cells in acute coronary syndromes. *Mediators of inflammation*, 2013, 764082. <https://doi.org/10.1155/2013/764082>
65. Konijnenberg, L. S. F., Damman, P., Duncker, D. J., Kloner, R. A., Nijveldt, R., van Geuns, R. M., Berry, C., Riksen, N. P., Escaned, J., & van Royen, N. (2020). Pathophysiology and diagnosis of coronary microvascular dysfunction in ST-elevation myocardial infarction. *Cardiovascular research*, 116(4), 787–805. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz301>
66. Konijnenberg, L. S. F., Damman, P., Duncker, D. J., Kloner, R. A., Nijveldt, R., et al. (2020). Pathophysiology and diagnosis of coronary microvascular dysfunction in ST-elevation myocardial infarction. *Cardiovascular research*, 116(4), 787–805. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz301>
67. Wilkowska, A., Piękła, M., Rynkiewicz, A., Wdowczyk-Szulc, J., Trzonkowski, P., & Landowski, J. (2015). Increased plasma pro-inflammatory cytokine concentrations after myocardial infarction and the presence of depression during next 6-months. *Psychiatria polska*, 49(3), 455–464. <https://doi.org/10.12740/PP/33179>
68. Sopova, K., Tual-Chalot, S., Mueller-Hennessen, M., Vlachogiannis, N. I., Georgiopoulos, G., et al. (2023). Effector T cell chemokine IP-10 predicts cardiac recovery and clinical outcomes post-myocardial infarction. *Frontiers in immunology*, 14, 1177467. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1177467>
69. Kalinskaya, A., Dukhin, O., Lebedeva, A., Maryukhnich, E., Rusakovich, G., Vorobyeva, D., Shpektor, A., Margolis, L., & Vasilieva, E. (2022). Circulating Cytokines in Myocardial Infarction Are Associated With Coronary Blood Flow. *Frontiers in immunology*, 13, 837642. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.837642>
70. Murray, P. J., & Wynn, T. A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature reviews. Immunology*, 11(11), 723–737. <https://doi.org/10.1038/nri3073>
71. Albina, J. E.; Caldwell, M. D.; Henry, W. L., Jr; Mills, C. D. Regulation of macrophage functions by L-arginine. *J Exp Med*, 1989, 169, 1021–1029.

72. Jin, L., Deng, Z., Zhang, J., Yang, C., Liu, J., Han, W., Ye, P., Si, Y., & Chen, G. (2019). Mesenchymal stem cells promote type 2 macrophage polarization to ameliorate the myocardial injury caused by diabetic cardiomyopathy. *Journal of translational medicine*, 17(1), 251. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-1999-8>
73. Yang, Z., Zingarelli, B., & Szabó, C. (2000). Crucial role of endogenous interleukin-10 production in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation*, 101(9), 1019–1026. <https://doi.org/10.1161/01.cir.101.9.1019>
74. Jung, M., Ma, Y., Iyer, R. P., DeLeon-Pennell, K. Y., Yabluchanskiy, A., Garrett, M. R., & Lindsey, M. L. (2017). IL-10 improves cardiac remodeling after myocardial infarction by stimulating M2 macrophage polarization and fibroblast activation. *Basic research in cardiology*, 112(3), 33. <https://doi.org/10.1007/s00395-017-0622-5>
75. Holthaus, M., Santhakumar, N., Wahlers, T., & Paunel-Görgülü, A. (2022). The Secretome of Preconditioned Mesenchymal Stem Cells Drives Polarization and Reprogramming of M2a Macrophages toward an IL-10-Producing Phenotype. *International journal of molecular sciences*, 23(8), 4104. <https://doi.org/10.3390/ijms23084104>
76. Orrem, H. L., Shetelig, C., Ueland, T., Limalanathan, S., Nilsson, P. H., et al. (2018). Soluble IL-1 receptor 2 is associated with left ventricular remodelling in patients with ST-elevation myocardial infarction. *International journal of cardiology*, 268, 187–192. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2018.05.032>
77. Scărlătescu, A. I., Micheu, M. M., Popa-Fotea, N., Pascal, A. M., Mihail, A. M., Petre, I., Deaconu, S., Vîjîiac, A., & Dorobanțu, M. (2022). IL-6, IL-1RA and Resistin as Predictors of Left Ventricular Remodelling and Major Adverse Cardiac Events in Patients with Acute ST Elevation Myocardial Infarction. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 12(2), 266. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12020266>
78. Buckley, L. F., & Abbate, A. (2018). Interleukin-1 blockade in cardiovascular diseases: a clinical update. *European heart journal*, 39(22), 2063–2069. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy128>

79. Zhuang, R., Meng, Q., Ma, X., Shi, S., Gong, S., Liu, J., Li, M., Gu, W., Li, D., Zhang, X., Wang, Z., Ge, X., Tang, J., Lin, F., Liang, X., Zheng, L., Liu, Z., & Zhou, X. (2022). CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup> regulatory T cell promotes cardiac healing post-myocardial infarction. *Theranostics*, 12(6), 2707–2721. <https://doi.org/10.7150/thno.68437>