



**Universidad de Concepción
Facultad Farmacia**

Tesis

**Caracterización de los estímulos quimiotácticos
obtenidos de sangre coronaria de pacientes
infartados y su efecto migratorio y funcional sobre
monocitos circulantes.**

POR

MAURICIO NAZAL JOFRÉ

Plan de trabajo de tesis presentado a la Facultad de Farmacia de la Universidad
de Concepción para optar al título profesional de Bioquímico

Profesor guía/Profesor patrocinante: Dra. Estefanía Nova Lamperti
Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología.
Facultad de Farmacia.
Universidad de Concepción

Enero, 2022

Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

© 2021, Mauricio Antonio Nazal Jofré

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

Facultad de Farmacia

Examen de Titulo

El día de mayo del 2021, El sr. Mauricio Antonio Nazal Jofre, rindió su Examen de Titulo, para optar al Título de Bioquímico, presentando su Tesis titulada “*Caracterización de los estímulos quimiotácticos obtenidos de sangre coronaria de pacientes infartados y su efecto migratorio y funcional sobre monocitos circulantes*”.

La comisión de Examen de Titulo acordó este examen con una calificación de

Dra. Estefanía Nova Lamperti

Profesora Tutora

Dra. Liliana Lamperti Fernández

Miembro de la Comisión

Dr. Claudio Aguayo Tapia

Miembro de la Comisión

Concepción, 2021

Tabla de contenido

Índice de Figuras.....	7
Índice de Tablas.....	9
1. Abstract.....	10
2. Resumen.....	12
3. Introducción.....	14
3.1. Enfermedades Cardiovasculares (ECV).	14
3.2. Infarto agudo al miocardio (IAM).	15
3.3. Aterosclerosis.....	15
3.4. Rol de las quimioquinas en aterosclerosis	16
3.4.1. CCL2.....	17
3.4.2. CCL5.....	17
3.4.3. CXCL9.....	18
3.4.4. CXCL10.....	18
3.4.5. IL-8.....	19
3.5. Monocitos y su rol en la formación de la placa aterosclerótica.	20
3.6. Diferenciación a macrófagos y formación de células espuma.	20
3.7. Receptores Scavenger.....	22
3.8. Receptores LOX-1	23
3.9. LOX-1 en monocitos	25

4. Problema	26
5. Pregunta de Investigación	27
6. Hipótesis.....	28
7. Objetivos	29
7.1. Objetivo General	29
7.2. Objetivos Específicos.....	29
8. Materiales y métodos	30
8.1. Métodos	30
8.1.1. Obtención de muestras	30
8.1.2. Identificación y cuantificación de quimioquinas.....	31
8.1.3. Aislamiento de monocitos desde sangre periférica.....	32
8.1.4. Ensayo de migración a quimioquinas de sangre coronaria.....	33
8.1.5. Ensayos de funcionalidad de monocitos CD14 ⁺	34
8.1.6. Análisis estadísticos.....	34
9. Resultados	36
9.1. Participantes del estudio	36
9.2. Objetivo 1	38
9.2.1. Identificación y cuantificación de quimioquinas.....	38
9.2.2. Concentración de quimioquinas en pacientes infartados y en controles.	41

9.2.3. Correlación entre la concentración de quimioquinas en sangre coronaria y sangre periférica de pacientes infartados.....	43
9.3. Objetivo 2	48
9.3.1. Migración de monocitos hacia sangre coronaria de pacientes infartados	48
9.4. Objetivo 3	55
9.4.1. Ensayos de funcionalidad de monocitos CD14 ⁺	55
10. Discusión.....	63
11. Conclusiones.....	77
12. Proyecciones.....	79
13. Referencias	81
14. Anexo-1	88
14.1. Consentimiento informado.....	88
15. Anexo-2	93
15.1. Manejo de residuos biológicos.	93

Índice de Figuras

Figura 1: Porcentajes de distintas causas de muerte ocurridas en Chile en el año 2014.....	14
Figura 2: Esquema general del reclutamiento e internalización de monocitos y la posterior formación de células espuma.	22
Figura 3: Modelo tridimensional de la estructura de LOX-1 sin el dominio citoplasmático.	23
Figura 4: Curvas de calibrado utilizadas para cuantificar quimioquinas.....	40
Figura 5: Concentraciones de quimioquinas en pacientes infartados y controles.	42
Figura 6: Correlación entre niveles de quimioquinas en sangre coronaria y sangre periférica.	45
Figura 7: Comparación entre concentración de quimioquinas en circulación coronaria y periférica.	47
Figura 8: Estrategia de gating utilizada para analizar migración de monocitos hacia plasma de pacientes y controles.	50
Figura 9: Migración de monocitos hacia plasmas obtenidos de pacientes y controles.	52
Figura 10: Correlación entre migración de monocitos e IL-8.	54
Figura 11: Estrategia de gating utilizada para el análisis de ensayos de funcionalidad.....	57

Figura 12: Expresión de moléculas coestimuladoras en monocitos..... 60

Figura 13: Correlación entre la expresión de CXCR3 y la concentración de MIG.
..... 62

Índice de Tablas

Tabla 1: Identificación de pacientes participantes en el estudio..... 37

Tabla 2: Cuantificación de quimioquinas en sangre coronaria y periférica.

..... 39

1. Abstract

Cardiovascular diseases are the leading cause of death worldwide, with an estimated 17.9 million deaths per year, mainly at the expense of strokes and acute myocardial infarction. The latter are developed mainly by the rupture of atheromatous plaques in coronary blood arteries. Currently, many mechanisms are known that are directly or indirectly involved in the plaque formation, one of them is the transformation of macrophages into foam cells in the sub-endothelial space. Several receptors have been implicated in this transformation, one of them is the type 1 lectin receptor for oxidized low-density lipoprotein (LDL) (LOX-1), which is also increased in circulating monocytes with a CXCR3 migratory profile. However, it is not entirely clear whether the plaque-mediated released factors influence the migration and activation of circulating monocytes towards the dysfunctional zone of the endothelium during plaque formation. The aim of this project was to characterize circulating chemoattractant factors in coronary and peripheral blood from patients with infarction and their potential role at inducing monocyte migration and activation. The results showed that patients with infarction exhibited more chemokines than healthy controls, especially CXCR3 ligands CXCL9 and CXCL10. In addition, samples from patients with infarction were able to induce monocyte migration and the upregulation of chemokine receptors CXCR3 and CCR6 in monocytes CD14⁺. In summary, our data showed

that patients with infarction have more circulating chemokines than healthy controls and these factors may promote monocytes migration to the inflammatory areas during plaque formation.

2. Resumen

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en el mundo, con un estimado de 17.9 millones de muertes al año, a expensas principalmente de accidentes cerebrovasculares e infarto agudo al miocardio. Estos últimos se producen principalmente por la ruptura de placas ateromatosas que se están formando en arterias de sangre coronaria. Actualmente, se conocen muchos mecanismos que están implicados directa o indirectamente en la formación de las placas, uno de los principales es la transformación de macrófagos en células de espuma en el espacio subendotelial. Varios receptores han sido implicados en la transformación de los macrófagos a células de espuma, uno de ellos es el receptor de lectina tipo 1 para lipoproteína de baja densidad (LDL) oxidada (LOX-1), el cual también se encuentra aumentado en monocitos circulantes con alto perfil migratorio mediado por CXCR3, pero no está del todo claro si factores secretados por pacientes con infarto influye en la migración y el reclutamiento de monocitos hacia la zona disfuncional del endotelio durante la formación de la placa. En este proyecto se tiene como objetivo caracterizar los factores quimio atrayentes en sangre coronario y periférica obtenida de pacientes con infarto y evaluar su potencial efecto sobre la migración y activación de monocitos. Los resultados mostraron que los pacientes infartados presentaban más quimioquinas circulantes, especialmente CXCL9 y CXCL10, en comparación

a los controles sanos. Además, las muestras de pacientes infartados promovieron la migración de monocitos y la sobreexpresión de los receptores de quimioquinas CXCR3 y CCR6 en la superficie de monocitos. En resumen, nuestros datos mostraron que los pacientes con infarto tienen más quimioquinas circulantes que los controles sanos y estos factores pueden promover la migración de monocitos a las zonas de mayor inflamación durante la formación de placa.

3.Introducción

3.1.Enfermedades Cardiovasculares (ECV).

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) representan la primera causa de muerte en Chile y el mundo, el año 2016 ocurrieron un estimado de 17.9 millones de muertes a causa de enfermedades cardiovasculares, lo que representa un 31% de todas las muertes ocurridas en el mundo, de estas muertes un 85% fueron a causa de infarto agudo al miocardio y accidentes cerebrovasculares (World Health Organization, 2020).

En Chile, en el 2014 las enfermedades cardiovasculares representaron un 27.52% (**Figura 1.**) del total de defunciones ocurridas, esto representa 28.064 defunciones, a expensas principalmente de accidente cerebrovasculares (8.603) y de infarto agudo al miocardio (8.102) (Gobierno de Chile, 2016).

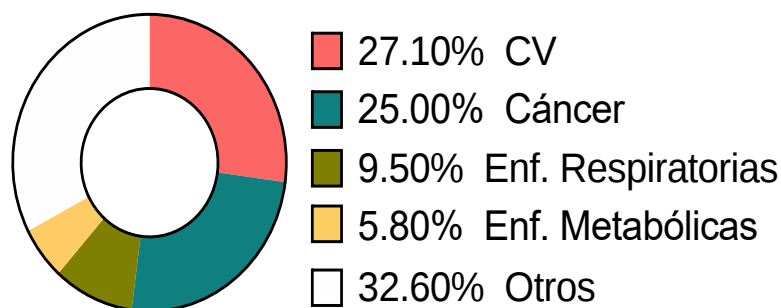


FIGURA 1: PORCENTAJES DE DISTINTAS CAUSAS DE MUERTE OCURRIDAS EN CHILE EN EL AÑO 2014.

3.2. Infarto agudo al miocardio (IAM).

El infarto agudo al miocardio está definido como una necrosis del miocardio causada por un síndrome isquémico inestable (Thygesen et al., 2012). Existen diversos tipos de infarto agudo al miocardio, siendo el principal el tipo 1, que es un infarto producido por una aterotrombosis coronaria (Anderson & Morrow, 2017). Esto se produce por la ruptura parcial o total de una placa aterosclerótica que ha estado en formación durante años en las arterias de los pacientes (Libby, 2013).

3.3. Aterosclerosis.

La aterosclerosis, como fue mencionado anteriormente, es la causa más común de infarto agudo al miocardio, en donde la formación de la placa aterosclerótica en base a lípidos ocurre lentamente en arterias de mediano y gran tamaño (Gistera & Hansson, 2017). En la aterosclerosis, la formación de la placa y el crecimiento de ésta puede causar estenosis de la arteria, que es un estrechamiento de la arteria, principalmente causada por la acumulación de LDL oxidada (oxLDL) en el espacio subendotelial de las arterias (Libby et al., 2011). La acumulación de colesterol es la etapa inicial del proceso inflamatorio crónico

que ocurre en la pared arterial, generando un ambiente favorable para el reclutamiento de diversas células del sistema inmune, capaces de infiltrarse en el espacio subendotelial ayudando en la formación de la placa y a mantener un ambiente proinflamatorio crónico. Una de las principales células del sistema inmune implicadas en la formación de la placa, son los monocitos, y las principales proteínas quimioattractantes de estas células son las quimioquinas.

3.4.Rol de las quimioquinas en aterosclerosis

Las quimioquinas son una familia de citoquinas quimiotácticas de bajo peso molecular (8-17 kDa aproximadamente). Su función principal es coordinar el tráfico de leucocitos y su activación en un contexto fisiológico y fisiopatológico (Apostolakis & Spandidos, 2013). Las quimioquinas se clasifican por su estructura, de acuerdo con el número y la especiación de sus cisteínas conservadas en el dominio N-terminal, en 4 grupos: CXC, CC, C y CX3C (Murphy et al., 2000). En el presente se caracterizarán 5 quimioquinas de interés para este estudio.

3.4.1.CCL2/MCP-1

También llamada MCP-1 (Monocyte Chemoattractan protein-1). Su rol principal es el reclutamiento de monocitos y su posterior transformación a macrófagos, regulando su quimiotaxis y su adhesión a través de la activación de β 1-integrinas, estos mecanismos están asociados principalmente a una prolongación del estado inflamatorio en los tejidos. Si bien CCL2 se puede unir a CCR1-5, su principal receptor y al que se une con mayor afinidad es a CCR2, presente principalmente en monocitos (Yao et al., 2016).

3.4.2.CCL5/RANTES

CCL5, también conocida como RANTES, se une principalmente al receptor CCR5, aunque también presenta afinidad por los receptores CCR1 al CCR4. Es inducido principalmente por NF- κ B y es expresado por linfocitos T, macrófagos y epitelios. Su principal rol es el reclutamiento de diferentes tipos de leucocitos a sitios donde se presenta inflamación, por lo tanto, es una quimioquina pro-aterogénica (Schaller et al., 2017).

3.4.3.CXCL9/MIG

Su principal receptor es el CXCR3, su función mayormente descrita es la atracción de linfocito T activados, principalmente linfocitos Th1; la expresión de CXCL9 está inducida principalmente por IFN- γ que se correlaciona con la infiltración de linfocitos T en diversas enfermedades, lo que sugiere que CXCL9 puede estar implicada en la infiltración de estos linfocitos (Chang & Chen, 2016).

3.4.4.CXCL10/IP10

También conocida como IP10 (interferón-gamma induced protein 10), pertenece a la familia de las CXC y actúa principalmente interaccionando con el receptor CXCR3, es secretada por varios tipos de células, entre ellas, células endoteliales, linfocitos T, monocitos y otras células del sistema inmune. Esta quimioquina está exacerbada en enfermedades inflamatorias como la aterosclerosis (Xia et al., 2016). Su principal función es la regulación del tráfico de células del sistema inmune, sobre todo de linfocitos, como su nombre lo implica, el interferón gamma es el principal inductor de la secreción de esta quimioquina, pero también puede ser inducida por otras citoquinas proinflamatorias como TNF- α . Además de inducir el tráfico y la migración de

células del sistema inmune, IP10 también es capaz de inducir la migración proliferación de células endoteliales y de células vasculares de musculo liso. En cuanto a su rol en la aterosclerosis es importante mencionar que esta quimioquina y su receptor esta expresada durante todas las etapas de formación y crecimiento de la placa, se ha observado que una inhibición de esta quimioquina reduce la aterogénesis y, por lo tanto, el tamaño de la lesión, también se observó un fenotipo de placa más estable cuando no había presencia de esta quimioquina (van den Borne et al., 2014).

3.4.5.CXCL8/IL-8

Es una quimioquina proinflamatoria producida principalmente por monocitos, macrófagos, neutrófilos y células endoteliales por mencionar solo algunas (Maynard et al., 2020). IL-8 pertenece a la familia de las CXC y su principal función es regular la migración y activación de neutrófilos desde sangre periférica hasta el tejido donde se presenta la inflamación (Puthothu et al., 2006). La interleucina 8 es una de las principales quimioquinas presentes en enfermedades proinflamatorias como la aterosclerosis, ya que, además de inducir la migración de células del sistema inmune es capaz de inducir la proliferación de células endoteliales (El Ayadi et al., 2018).

3.5.Monocitos y su rol en la formación de la placa aterosclerótica.

Los monocitos son células del sistema inmunes que están en libre circulación en la sangre (van Furth & Beekhuizen, 1998). Como se evidencia anteriormente, el proceso de formación de la placa ateromatosa es un proceso inflamatorio crónico. Durante este proceso, células dañadas del endotelio liberan MCP-1 (Lin et al., 2014), que es una potente quimioquina atrayente de monocitos que es producida por distintos tipos celulares como el endotelio (Deshmane et al., 2009), además de otras quimioquinas participantes en el reclutamiento de monocitos. Debido a este mismo ambiente proinflamatorio, tanto los monocitos como las células de la pared endotelial presentan una mayor expresión de moléculas de adhesión en su superficie celular. Esto permite una adhesión exacerbada de monocitos a la pared del endotelio iniciando un proceso también exacerbado de infiltración de monocitos a la íntima y subíntima del endotelio donde se está formando la placa ateromatosa.

3.6.Diferenciación a macrófagos y formación de células espuma.

Los monocitos al infiltrar en el espacio subendotelial se diferencian en macrófagos principalmente del tipo M1 (Kadl et al., 2010), que son del tipo

proinflamatorio. La formación de células de espuma ocurre durante la etapa temprana de formación de la placa ateromatosa, este proceso ocurre principalmente por el incremento en la interiorización de oxLDL. En la **Figura 2** se observa un esquema general de este proceso, a la vez que existe una disminución en el eflujo de colesterol desde el interior del macrófago, esto lleva a la acumulación intracelular de colesterol esterificado. La formación de ésteres de colesterol y la acumulación de este en el citoplasma del macrófago será lo que determine si el macrófago se transformara en una célula de espuma o no, existen dos enzimas principales involucradas en la formación y acumulación de colesterol esterificado, nCEH y ACAT1 (Yu et al., 2013). La acumulación de células de espuma en el espacio subendotelial junto con la acumulación de otro tipo de moléculas, como lípidos y otras células, llevan a la formación de un core lipídico y de células apoptóticas que finalmente será el core de la placa ateromatosa. **(Figura 2)**

Existen diversos receptores implicados en la formación de las células de espuma, principalmente receptores de tipo scavenger que participan activamente en la internalización de oxLDL y además en la regulación del proceso inflamatorio inducido por la placa (Maguire et al., 2019).

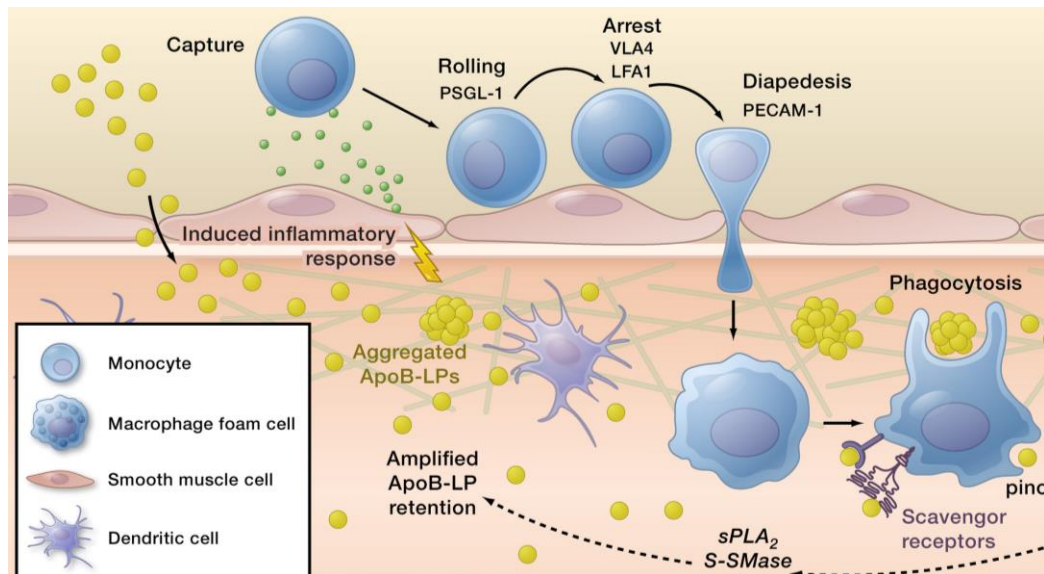


FIGURA 2: ESQUEMA GENERAL DEL RECLUTAMIENTO E INTERNALIZACIÓN DE MONOCITOS Y LA POSTERIOR FORMACIÓN DE CÉLULAS ESPUMA.

3.7.Receptores Scavenger

Los receptores scavenger constituyen una gran familia de proteínas de membrana presentes en diferentes células que cumplen una gran variedad de funciones biológicas, en la actualidad existen 8 clases de estos receptores. Originalmente se pensaba que estos receptores sólo interactuaban con lipoproteína de baja densidad modificada, pero posteriormente se descubrió que se unen a una variedad de ligandos (PrabhuDas et al., 2017). Originalmente se pensaba que sólo se unían a LDL modificada, debido a que estos receptores se

descubrieron en un contexto de estudio de aterosclerosis, ya que juegan un rol muy importante en la internalización de oxLDL y, por lo tanto, en la formación de la placa (Zani et al., 2015). Dentro de este tipo de receptores se encuentra el receptor LOX-1.

3.8.Receptores LOX-1

El receptor de oxLDL tipo lectina 1 (LOX-1), es una glicoproteína de membrana de tipo 2 compuesta de 273 residuos y 4 dominios, un dominio N-terminal, un único dominio transmembrana, una región extracelular denominada “NECK” y un dominio tipo lectina de tipo C en el extremo C- terminal (**Figura 3**) (Raniolo et al., 2016).

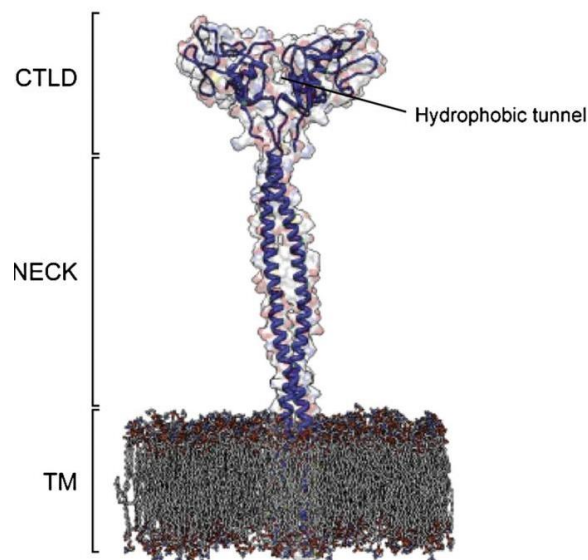


FIGURA 3: MODELO TRIDIMENSIONAL DE LA ESTRUCTURA DE LOX-1 SIN EL DOMINIO CITOPLASMÁTICO.

Existen múltiples factores que inducen la sobreexpresión de LOX-1 en macrófagos y en distintos tipos celulares como las células endoteliales, los factores más importantes son las citoquinas proinflamatorias que son secretadas por la placa ateromatosa como la IL-1, el interferón gamma (IFN-gamma) y el factor de necrosis tumoral (TNF-alfa). También se ha visto que las mismas moléculas de LDL oxidado son capaces de aumentar la expresión de LOX-1 (Chistiakov et al., 2016). Estudios demuestran que la unión oxLDL – LOX-1 resulta en un aumento en la expresión de moléculas de adhesión y de citoquinas como MCP-1, a su vez, estas moléculas aumentan la expresión de LOX-1 en células endoteliales y en macrófagos. Además, LOX-1 aumenta el estrés oxidativo, lo que contribuye a una mayor formación de oxLDL contribuyendo aún más a perpetuar el estado proinflamatorio que existe en el endotelio.

LOX-1 en células endoteliales aumenta la disfunción endotelial mediante varios mecanismos, principalmente mediante el aumento en la expresión de moléculas de adhesión como VCAM-1 y ICAM-1 (Li & Mehta, 2000), y el aumento de MCP-1 promoviendo así el reclutamiento y la migración de monocitos hacia el endotelio disfuncional.

Este receptor también tiene un efecto sobre macrófagos. Se ha visto la expresión de LOX-1 está aumentada en estados proinflamatorios, contribuyendo a una internalización exacerbada de oxLDL. Además, LOX-1 está implicado en la inhibición de la migración de los macrófagos desde el espacio subendotelial hacia

circulación, promoviendo la acumulación de macrófagos y por tanto una acumulación de células de espuma (Kattoor et al., 2019).

3.9.LOX-1 en monocitos

El receptor LOX-1 ha sido estudiado en diversos tipos de células distintas, como en macrófagos, en células endoteliales, células de musculo liso y en otros tipos celulares del sistema inmune, aun así, no existen estudios, actualmente, que evalúen la función de LOX-1 en monocitos en circulación. Datos preliminares del laboratorio han demostrado que existe un aumento en la expresión de LOX-1 en monocitos circulantes con perfil migratorio CXCR3⁺ y un aumento de monocitos LOX-1⁺ en pacientes que han sufrido un infarto agudo al miocardio (IAM) (Trabajo fin de carrera, Eritson Castro). Estos resultados del laboratorio demuestran que monocitos LOX-1⁺ podrían tener una relación con el desarrollo de la enfermedad cardiovascular, es por esto que en este trabajo se busca evaluar si los estímulos obtenidos de sangre coronaria de pacientes infartados juegan un rol importante en la funcionalidad y migración de los monocitos hacia los sitios de inflamación durante el proceso isquémico.

4.Problema

A pesar de que se conocen muchos mecanismos por los cuales los monocitos participan en la formación de las placas ateromatosas, aún no se logra dilucidar si los factores quimioattractantes de pacientes con infarto promueve la migración y cambios funcionales en monocitos CD14⁺.

5.Pregunta de Investigación

¿Cuál es la capacidad migratoria y moduladora de los estímulos que induce la placa ateromatosa sobre monocitos CD14⁺?

6.Hipótesis

Los estímulos que induce la placa ateromatosa de pacientes con infarto promueven la migración y modulación de monocitos CD14⁺.

7.Objetivos

7.1.Objetivo General

Caracterizar los estímulos quimiotácticos inducidos por la placa ateromatosa obtenidos de sangre coronaria de pacientes infartados y evaluar su efecto sobre la migración y funcionalidad de monocitos circulantes.

7.2.Objetivos Específicos

- Identificar y cuantificar factores quimiotácticos presentes en sangre coronaria de pacientes infartados.
- Evaluar la migración de monocitos hacia estímulos inducidos por la placa ateromatosa obtenidos de sangre coronaria de pacientes infartados.
- Analizar cambios funcionales de monocitos en presencia de estímulos inducidos por la placa ateromatosa obtenidos de sangre coronaria de pacientes infartados.

8. Materiales y métodos

8.1. Métodos

8.1.1. Obtención de muestras

La obtención de muestras de pacientes sanos usados como control se realizó en el departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción. Se obtuvieron todos los datos personales e información médica de los voluntarios previo a la extracción de toma de muestra de sangre. La extracción se realizó por venopunción y la sangre extraída fue recolectada en tubos con EDTA como anticoagulante; cada tubo con muestra de sangre presento un código de identificación único para cada voluntario.

La toma de muestra de sangre coronaria de pacientes infartados se realizó en el Hospital Guillermo Grant Benavente, en Concepción, en donde se extrajo un volumen de sangre de 4 mL aproximadamente, los cuales fueron almacenados en tubos con anticoagulante EDTA. Las muestras, fueron trasladadas a las dependencias de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción, asignándoles a cada paciente un código de identificación único. La recolección

de muestras y procesamiento estuvo a cargo de la MSc(c) Paola Lagos y la Dra. Estefanía Nova. Todas las muestras fueron tomadas antes del inicio de la tesis.

8.1.2. Identificación y cuantificación de quimioquinas.

Para la detección de quimioquinas presentes en sangre coronaria de pacientes infartados se usó el kit, BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Chemokine Kit de BD Biosciences. Este kit permite la identificación y cuantificación de 5 quimioquinas distintas (CCL5/RANTES, CXCL9/MIG, CCL2/MCP-1, CXCL10/IP10 y CXCL8/IL8). Se obtuvo plasma de pacientes mediante métodos estándar de centrifugación. Una vez obtenido el plasma, se agregaron 25 μ L de plasma de cada paciente en tubos. Para la realización del ensayo primero se debe preparar el mix de beads de captura, para esto se agregaron 2 μ L de cada bead de captura por cada tubo que se utilizó en el ensayo. Una vez listo el mix de beads de captura se agregaron 10 μ L de este mix a cada tubo de muestra. Posterior a esto se agregaron 10 μ L ficoeritrina conjugada a anticuerpos de detección a cada tubo. Se incubaron las muestras por 3 horas a temperatura ambiente y protegidas de la luz. Pasado el periodo de incubación, se agregó 1 mL de buffer de lavado a cada tubo y se centrifugaron a 200g por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en

300 μ L de buffer de lavado. Para la cuantificación de las quimioquinas, se interpolaron los datos obtenidos de cada quimioquina específica en las muestras, en los datos de una curva de calibrado provista por el kit, a partir de una solución estándar desde una concentración de 2500 pg/mL, utilizando diluciones seriadas de 1:2 hasta una concentración de 0 pg/mL. La lectura de las muestras se realizó mediante citometría de flujo en el citómetro LSR-Fortessa (BD Biosciences) y para su cuantificación se utilizó el software FCAP Array software.

8.1.3. Aislamiento de monocitos desde sangre periférica.

La purificación de monocitos para el estudio de migración y los ensayos de funcionalidad se realizó con el kit CD14 MicroBeads, que provee MiltenyBiotec. Como primer paso se aislaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) por métodos estándar de centrifugación por gradiente de densidad a 2000RPM por 20min a temperatura ambiente. Una vez obtenidos los PBMCs, se contaron y se añadieron los beads magnéticos con anticuerpos anti CD14 conjugados en su superficie, por 15 minutos a 4 °C. Luego se lavaron las células con buffer y se resuspendió el pellet en 500 μ L de MACS Buffer. Posterior a eso se procedió a la separación magnética, la cual se realizó colocando la columna en el separador magnético, siguiendo las instrucciones del

fabricante. Luego de 3 lavados, se descartaron las células obtenidas en la elusión en el separador magnético, y se colectaron los monocitos en el eluido.

8.1.4. Ensayo de migración a quimioquinas de sangre coronaria.

Se realizó el ensayo de migración de monocitos hacia quimioquinas presentes en plasma obtenido de sangre coronaria de pacientes infartados. Para realizar el ensayo se utilizó una cámara Transwell con un filtro con poros de 5 μm (Corning). Monocitos previamente aislados fueron sembrados en la cámara superior, y en la cámara inferior se agregaron 100 μL de plasma obtenido de pacientes infartados diluido 1:2 con PBS, además, como control se utilizó plasma obtenido de sangre periférica de personas sanas. Se incubaron por 1h a 37°C, y se procedió a remover la parte superior del transwell. Se calculó el total de monocitos que migraron hacia el plasma de pacientes infartados y se comparó con la cantidad de monocitos que migraron hacia el plasma de controles. Esto mediante citometría de flujo, específicamente utilizando el citómetro LSR-Fortessa (BD Biosciences).

8.1.5. Ensayos de funcionalidad de monocitos CD14⁺.

Los ensayos de funcionalidad se realizaron midiendo cambios de expresión de moléculas coestimuladoras mediante citometría de flujo. Los monocitos previamente aislados fueron cultivados en una placa de 48 pocillos por 3 días con plasma al 25% tanto de sangre coronaria como periférica de pacientes infartados. Posterior a los 3 días, los monocitos fueron fenotipados con anticuerpos anti-CD86, anti-CXCR3, anti-CCR6 y anti-HLA-DR y analizados por citometría de flujo.

8.1.6. Análisis estadísticos.

Los análisis estadísticos de los resultados obtenidos experimentalmente se realizaron utilizando el programa Prism – GraphPad. Se pesquisó la correlación existente entre los distintos datos obtenidos mediante los ensayos experimentales. Los análisis de correlación se hicieron utilizando un ensayo no paramétrico de Spearman entre los distintos datos con un intervalo de confianza del 95%, además, para los test comparativos primero se realizaron test de normalidad a los datos con el fin de utilizar un test paramétrico o no paramétrico según correspondiera. La correcta configuración de los parámetros del programa

Prism - GraphPad indicará la significancia de la correlación entre los distintos parámetros.

9.Resultados

9.1.Participantes del estudio

Para el desarrollo de este estudio, se obtuvieron muestras de sangre periférica y coronaria de pacientes con diagnóstico de infarto agudo al miocardio provenientes del Hospital Guillermo Grant Benavente. Además, se reclutaron individuos sin antecedentes de enfermedad cardiovascular como grupo control. El grupo de pacientes estuvo conformado por 25 individuos de edad 58 ± 35 años, siendo 20 de estos de género masculino y 5 de género femenino y el grupo control está conformado por 12 individuos siendo 6 de estos de género masculino y 6 de género femenino. En la **Tabla 1** se detalla la identificación que recibe cada paciente respecto a los análisis posteriores que se realizaron, las edades de cada paciente, así como su diagnóstico clínico. Cabe destacar que no fue posible obtener muestras de plasma de todos los pacientes debido a la baja calidad de éstas en algunos casos y a los excesivos tiempos de traslado desde el hospital al laboratorio, sin embargo, de las muestras sanguíneas correctamente almacenadas se obtuvieron tanto sangre periférica como coronaria de cada paciente. Una vez en el laboratorio, el plasma fue almacenado posterior a la centrifugación a -20°C hasta su uso.

TABLA 1: IDENTIFICACIÓN DE PACIENTES PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO.

Identificación	Género	Edad	Diagnostico
LOX1	M	40	IAM C/SDST pared arterial
LOX2	M	54	IAM C/SDST pared arterial
LOX3	M	58	IAM C/SDST K2
LOX4	M	45	IAM C/SDST pared inferior
LOX5	F	80	IAM C/SDST pared inferior
LOX6	M	64	IAM C/SDST Pared posterior KI
LOX7	M	93	IAM C/SDST PARED INFERIOR/BAVC
LOX8	M	64	IAM C/SDST PARED POSTERIOR
LOX9	M	50	IAM C/SDST PARED ANTERIOR
LOX10	M	49	IAM C/SDST PARED INFERIOR
LOX11	M	74	IAM C/SDST PARED INFERIOR
LOX12	M	31	IAM C/SDST PARED INFERIOR
LOX13	F	77	IAM C/SDST ANTERIOR EXTENSO
LOX14	M	63	IAM C/SDST PARED ANTERIOR
LOX15	M	70	IAM C/SDST ANTEROSEPTAL
LOX16	M	62	IAM C/SDST PARED INFERIOR
LOX17	M	68	IAM C/SDST PARED ANTERIOR EXTENSO
LOX18	M	58	IAM C/SDST PARED ANTERIOR EXTENSO
LOX19	F	53	IAM C/SDST ANTEROSEPTAL
LOX20	F	86	IAM C/SDST PARED INFERIOR
LOX21	M	52	IAM C/SDST PARED INFERIOR
LOX22	M	59	IAM C/SDST PARED INFERIOR-POSTERIOR-LATERAL KI
LOX23	M	47	IAM C/SDST PARED INFERIOR - LATERAL
LOX24	M	53	IAM C/SDST PARED INFERIOR
LOX25	F	52	IAM ANTERIOR EXTENSO

9.2.Objetivo 1

9.2.1.Identificación y cuantificación de quimioquinas

Para evaluar la presencia y concentración de quimioquinas a partir del plasma obtenido de sangre periférica y coronaria de pacientes que sufrieron infarto agudo al miocardio, se utilizó el kit BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Chemokine Kit de BD biosciences, que permite el analisis de 5 quimioquinas (IP-10/CXCL10, MCP-1/CCL2, MIG/CXCL9, RANTES/CCL5 e IL-8/CXCL8), las cuales han reportado jugar un rol importante en el proceso aterosclerótico e inflamatorio (Gencer et al., 2021).

Para realizar la cuantificación, se interpolaron los datos obtenidos por citometría de flujo para cada una de las quimioquinas específicas y se interpolaron en las curvas de calibrado preparadas para cada una de estas quimioquinas, con los reactivos estándar de concentración conocida que provee el kit (**Figura 4**). A partir de estas curvas se logró conocer la concentración de cada una de estas quimioquinas en cada una de las muestras que se analizaron (**Tabla 2**). Cabe destacar que todas las curvas de calibración fueron aceptadas por el programa FCap Array.

TABLA 2: CUANTIFICACIÓN DE QUIMIOQUINAS EN SANGRE CORONARIA Y PERIFÉRICA.

	IL-8		IP10		MCP-1		CXCL9		CCL5	
	Coronaria	Periférica	Coronaria	Periférica	Coronaria	Periférica	Coronaria	Periférica	Coronaria	Periférica
LOX1	3,5	3,8	190,5	382,04	6,22	8,85	38,51	74,28	435,34	459,4
LOX2	9,14	4,65	134,02	214,34	36,2	42,28	399,05	73,24	284,78	460,39
LOX4	4,61	3,18	88,21	25,65	7,67	6,33	39,57	11,1	277,71	780,71
LOX7	5,36	4,2	184,02	89,47	7,8	7,29	205,62	32,9	1280,21	594,85
LOX8	4255,98	2510,33	725,35	511,84	113,58	162,61	465,31	357,96	57,74	56,69
LOX10	13,29	6,56	145,81	86,57	9,86	16,52	81,78	15,72	573,88	779,32
LOX11	2776,45	4,89	68,19	34,78	5,21	3,79	235,71	4,74	590,71	429,62
LOX12	66,76	15,07	228,46	268,64	6,99	10,18	121,23	23,57	1055,96	1490,44
LOX13	14,84	53,22	44,77	190,91	38,24	70,04	10,81	150,48	2270	1164,4
LOX14	33,73	16,62	198,46	163,1	31,68	51,71	184,67	39,92	1024,76	755,95
LOX18	10,38	7,46	223	742,03	21,94	52,25	73,53	117,61	1397,97	909,08
LOX21	155,45	9,22	278,61	164,02	11,64	28,61	128,51	57,44	1412,34	780,59
LOX22	9,47		120,51		65,53		20,84		897,84	

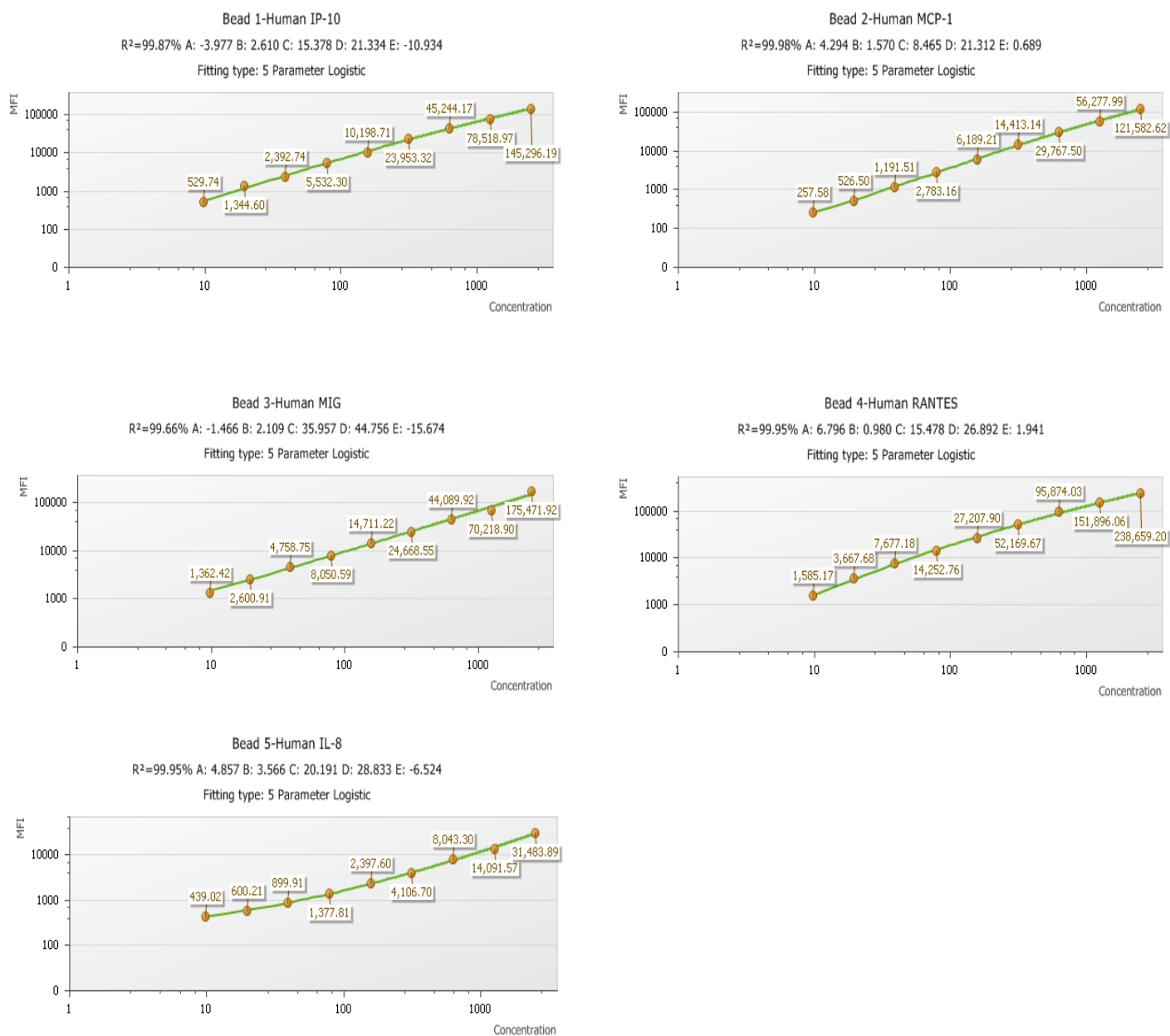


FIGURA 4: CURVAS DE CALIBRADO UTILIZADAS PARA CUANTIFICAR QUIMIOQUINAS.

Curvas de calibrado realizadas para cuantificar las quimioquinas, a partir de un estándar de concentración conocida (2500 pg/mL), en diluciones seriadas 1:2 para cada una de las quimioquinas identificadas por el kit: (A) IP10/CXCL10, (B) MCP-1/CCL2, (C) MIG/CXCL9, (D) RANTES/CCL5 y (E) IL-8/CXCL8.

9.2.2. Concentración de quimioquinas en pacientes infartados y en controles.

Una vez terminada la identificación y cuantificación de quimioquinas de interés, se analizaron sus niveles entre pacientes y controles. Se pudo observar que las concentraciones de cuatro de las cinco quimioquinas estudiadas (IL-8/CXCL8, IP10/CXCL10, MIG/CXCL9 y RANTES/CCL5 (**Figura 5.A, Figura 5.B, Figura 5.C, Figura 5.D**) fueron significativamente mayores en pacientes con IAM respecto a los controles, mientras que en el caso de MCP-1/CCL2 (**Figura 5.E**) sus concentraciones no mostraron una diferencia significativa.

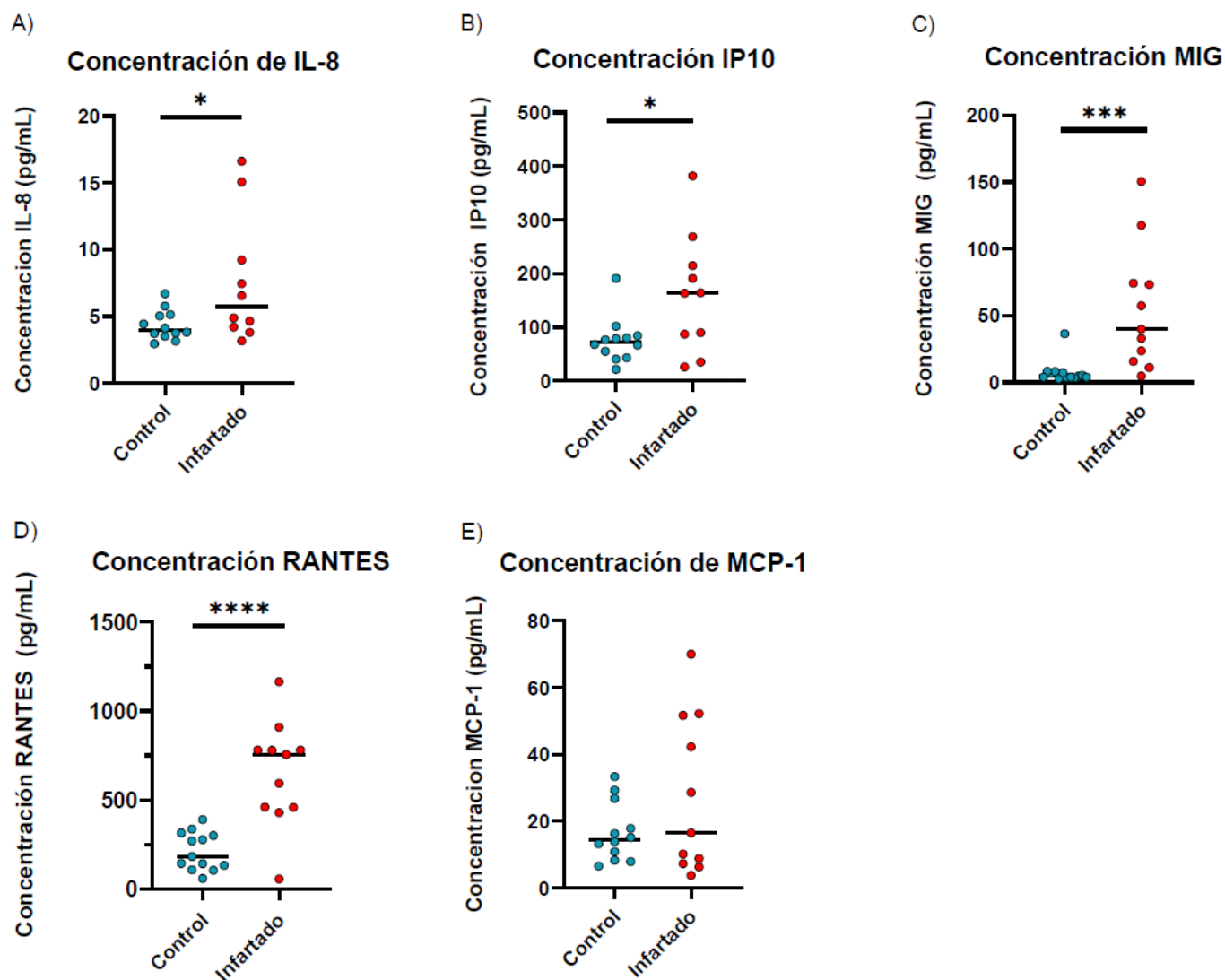


FIGURA 5: CONCENTRACIONES DE QUIMIOQUINAS EN PACIENTES INFARTADOS Y CONTROLES.

Medición de (A) IL-8/CXCL8, (B) IP10/CXCL10, (C) MIG/CXCL9, (D) RANTES/CCL5 y (E) MCP-1/CCL2 en plasma de sangre periférica de pacientes infartados (n=11) y controles sanos (n=12) mediante Cytokine bead Array. El análisis se realizó mediante t test considerando $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) y $p < 0.0001$ (****).

9.2.3. Correlación entre la concentración de quimioquinas en sangre coronaria y sangre periférica de pacientes infartados.

Posterior a la cuantificación de quimioquinas, se realizó un análisis de correlación entre las quimioquinas de sangre coronaria y periférica de los pacientes utilizando el coeficiente de Spearman y un intervalo de confianza del 95%. Además, se realizó un análisis de regresión lineal.

Utilizando este criterio, se observó una correlación significativa en cuatro de estas 5 quimioquinas, estas fueron: IP10/CXCL10, MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5 e IL-8/CXCL8.

Para la IP10/CXCL10 se observó una correlación positiva moderada (**Figura 6.A**), con un valor $r=0.5874$ entre las concentraciones de esta quimioquina en sangre periférica versus la concentración en sangre coronaria.

Para MCP-1, también conocida como CCL2, se observó un valor $r=0.9161$ lo que indica una correlación positiva y de magnitud (**Figura 6.B**), fuerte entre las concentraciones de esta quimioquina en un ambiente de circulación coronaria y un ambiente de circulación periférica.

CCL5/RANTES, mostro una correlación positiva (**Figura 6.C**), con un valor $r=0.6014$, como se puede observar en el valor r , la positividad indica una relación

directa entre ambas concentraciones, el valor positivo de esta correlación se condice con la evidencia que existe, que indica que, en aterosclerosis, la concentración de esta quimioquina se encuentra elevado tanto localmente como sistemáticamente.

Finalmente, de las 5 quimioquinas que se cuantificaron, la última que mostro una correlación significativa fue la IL-8/CXCL8 con un valor $r=0.9000$, en la prueba de coeficiente de Spearman, lo que denota una correlación positiva de magnitud alta, esto también observable en el gráfico (**Figura 6.D**), donde la línea de tendencia formada a partir del analisis de regresión lineal tiene una pendiente más plana que la línea de tendencia del resto de las quimioquinas.

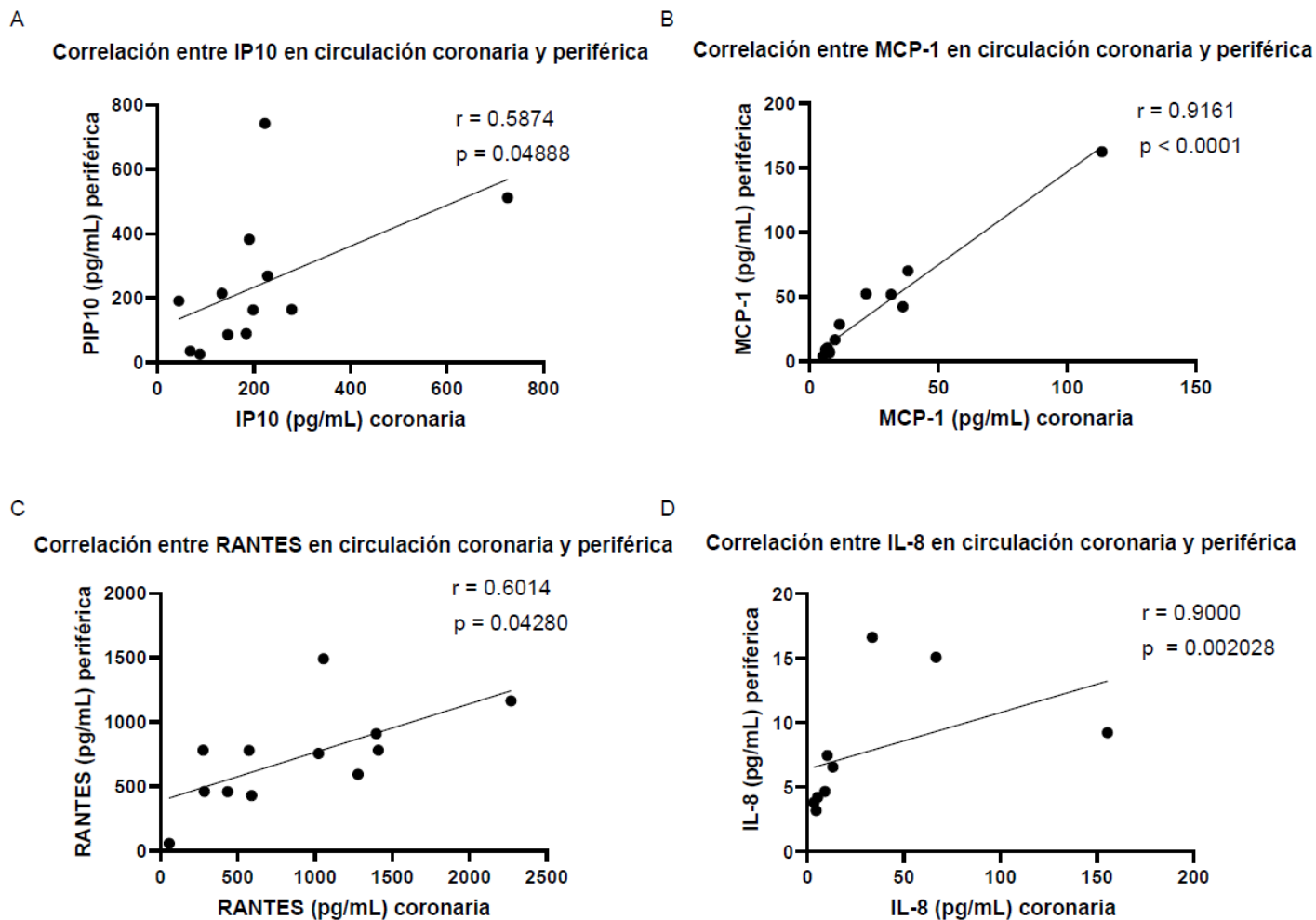


FIGURA 6: CORRELACIÓN ENTRE NIVELES DE QUIMIOQUINAS EN SANGRE CORONARIA Y SANGRE PERIFÉRICA.

Gráficos de correlación de la concentración de quimioquinas en sangre periférica versus sangre coronaria de pacientes infartados y análisis de regresión lineal. (A) IP10/CXCL10, (B) MCP-1/CCL2, (C) RANTES/CCL5 y (D) IL-8/CXCL8. Análisis estadístico se realizó mediante la prueba de coeficiente de Spearman tomando un valor $p < 0.05$ como significativo.

Además de establecer una correlación entre las concentraciones de estas quimioquinas, para ver como influyen unas sobre las otras, se aplicó una prueba de rangos de Wilcoxon para saber si existen diferencias significativas en las concentraciones de estas quimioquinas entre sangre periférica y en sangre coronaria. La aplicación de esta prueba mostro que existen diferencias significativas en tres de las cinco quimioquinas estudiadas. En el caso de la IL-8/CXCL8 se observa que hay un aumento significativo de esta quimioquina en circulación coronaria de pacientes que han sufrido infarto ($p < 0.05$) (**Figura 7.A**).

La segunda quimioquina que mostro un valor significativo fue MCP-1, a diferencia de las otras quimioquinas que mostraron diferencias significativas, aquí se observó un aumento significativo de MCP-1/CCL2 en circulación periférica ($p < 0.05$) (**Figura 7.B**).

Y por último MIG/CXCL9 mostro también una diferencia significativa entre su concentración en sangre periférica y en sangre coronaria. Observándose una mayor concentración de esta quimioquina en circulación coronaria de estos pacientes (**Figura 7.C**).

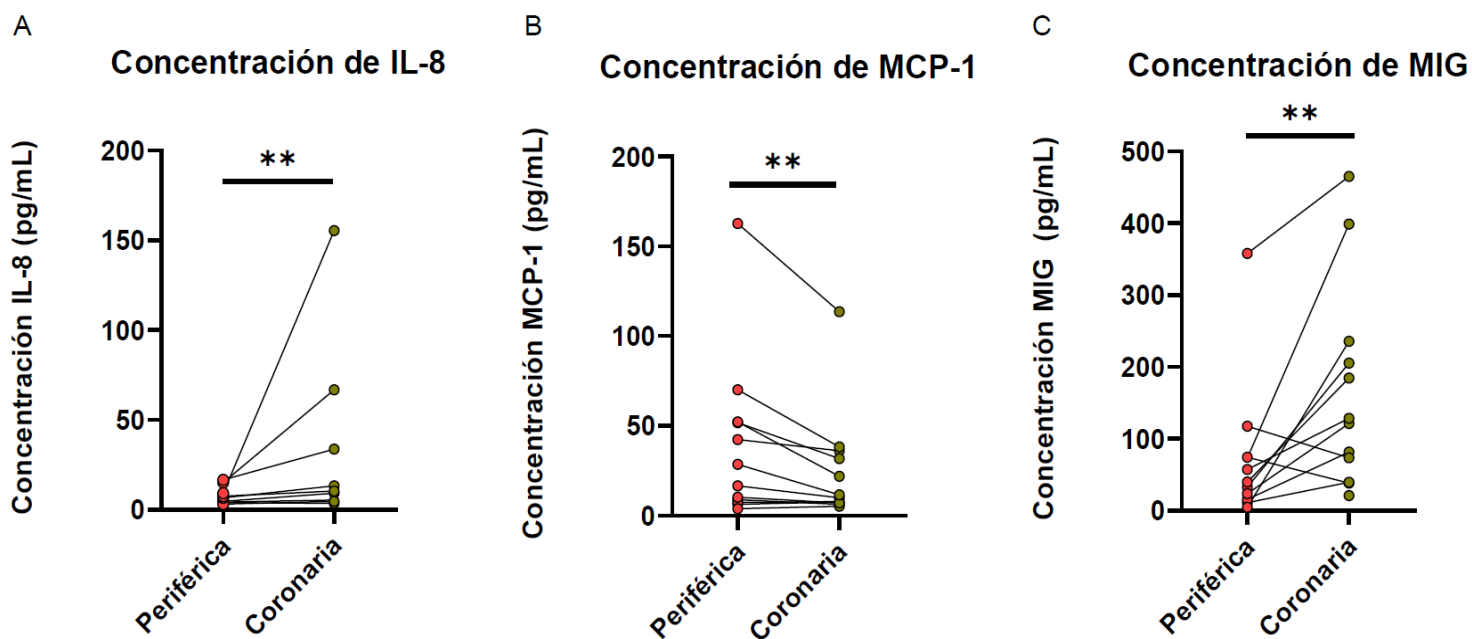


FIGURA 7: COMPARACIÓN ENTRE CONCENTRACIÓN DE QUIMIOQUINAS EN CIRCULACIÓN CORONARIA Y PERIFÉRICA.

Medición de concentración de (A) IL-8/CXCL8, (B) MCP-1/CCL2 y (C) MIG/CXCL9 en sangre periférica y sangre coronaria de pacientes (n=11) mediante Cytokine bead Array. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Wilcoxon considerando un $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) y $p < 0.0001$ (****).

9.3.Objetivo 2

9.3.1.Migración de monocitos hacia sangre coronaria de pacientes infartados

Uno de los principales roles de las quimioquinas es la quimiotaxis o migración de células del sistema inmune como monocitos y linfocitos, principalmente hacia sitios de inflamación (Proost et al., 1996). Al observar los resultados anteriores y evidenciando que existe una diferencia entre sus concentraciones en sangre periférica y en sangre coronaria, se decidió evaluar si el plasma de pacientes infartados podría tener un efecto sobre la migración de monocitos. Para evaluar la migración de monocitos primero se aislaron por selección positiva. Una vez aislados los monocitos se utilizó una cámara transwell para evaluar la migración de estos monocitos hacia plasma obtenido de sangre coronaria de pacientes con infarto agudo al miocardio, como control se utilizó plasma obtenido de individuos sanos. La medición de migración de monocitos hacia el plasma se obtuvo por citometría de flujo, para esto se utilizó la estrategia de análisis propuesta a continuación: Primero se seleccionaron todas las células presentes en la muestra, esto según tamaño y granularidad dispuestas por el *side scatter* (SSC) y el *forward scatter* (FSC). Como segundo paso, del total de células

que se seleccionaron, se identificaron solo las CD14⁺. Aparte de seleccionar las células CD14⁺, se seleccionaron los *beads* de conteo, con el objetivo de normalizar y conocer con precisión cuantos fueron los monocitos que migraron hacia el plasma de los pacientes infartados y de los controles (**Figura 8**)

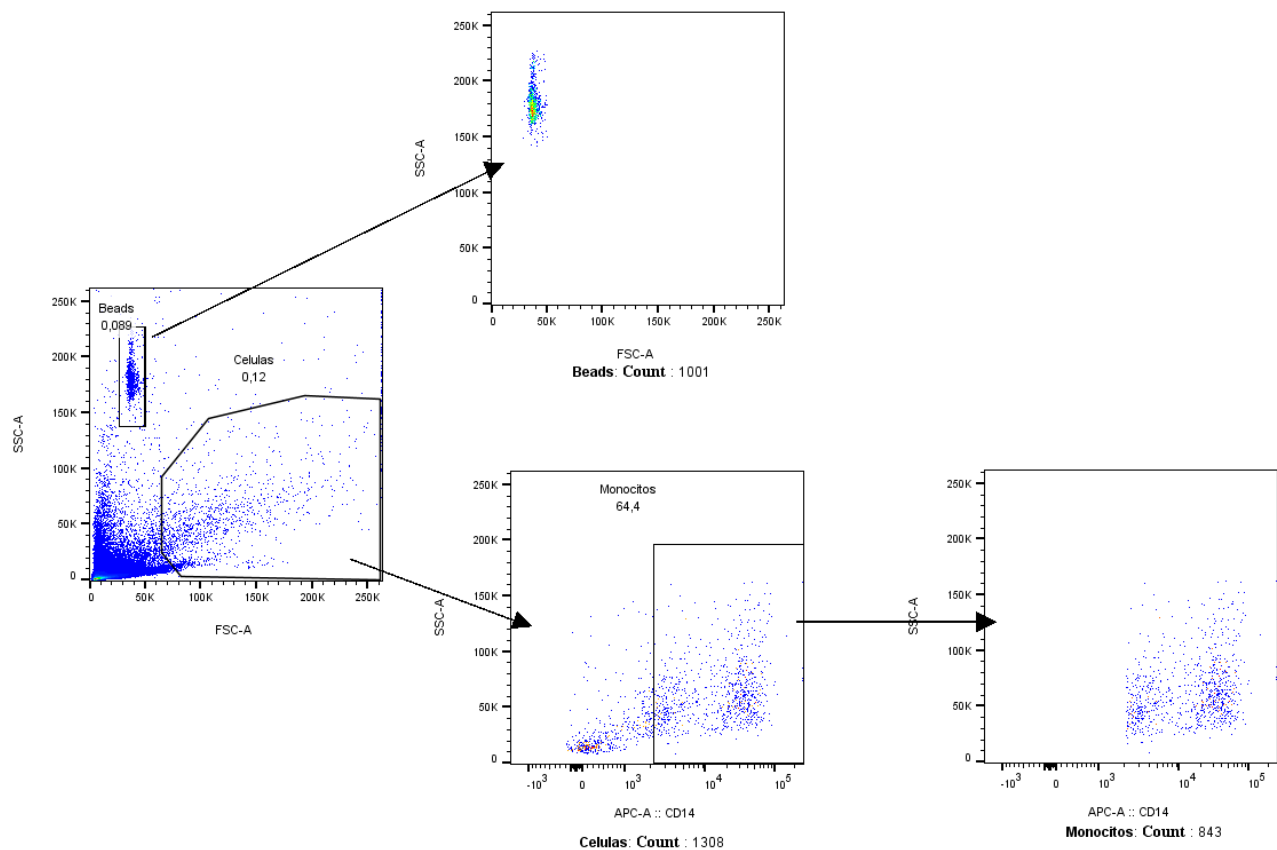


FIGURA 8: ESTRATEGIA DE GATING UTILIZADA PARA ANALIZAR MIGRACIÓN DE MONOCITOS HACIA PLASMA DE PACIENTES Y CONTROLES.

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica de individuos sanos por gradiente de densidad (ficoll-paque), se marcaron las células CD14⁺ que luego fueron sometidas a un ensayo de migración. La migración de los monocitos se analizó por citometría de flujo, en el programa FlowJo, utilizando la estrategia de gating que se muestra.

La estrategia de *gating* utilizada para analizar los datos obtenidos por citometría de flujo, nos permitió obtener datos precisos de cuantos monocitos migraron tanto hacia el plasma obtenido de sangre coronaria de pacientes infartados como para el plasma obtenido de los controles. Para el análisis se contó con el plasma de 12 pacientes con infarto y con 10 controles, se aplicó un test de normalidad para conocer la distribución del set de datos, se determinó que éstos no presentaban una distribución normal por lo que aplicó un test no paramétrico. Se observó una diferencia significativa entre la migración de los monocitos hacia los distintos plasmas, observándose una mayor migración de los monocitos CD14⁺ hacia el plasma obtenido desde la sangre coronaria de los pacientes infartados (**Figura 9**). Esto evidencia que existe algún componente en el plasma de estos pacientes que tiene un efecto sobre la migración de monocitos CD14⁺.

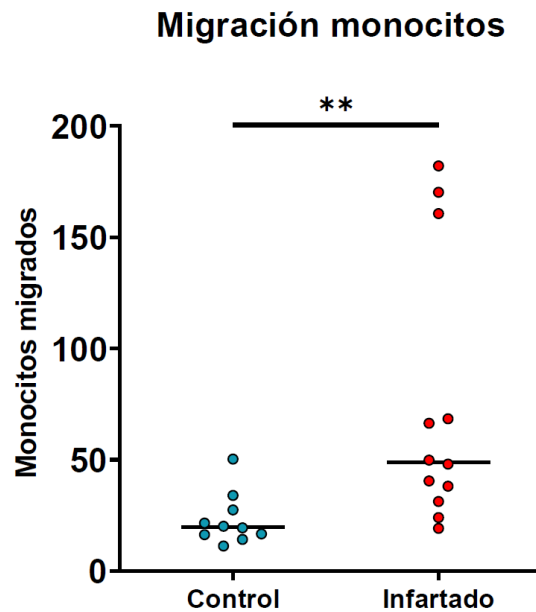


FIGURA 9: MIGRACIÓN DE MONOCITOS HACIA PLASMAS OBTENIDOS DE PACIENTES Y CONTROLES.

Comparación de la migración de monocitos hacia plasma obtenido de controles (n=10) y hacia plasma obtenido de pacientes (n=12). El análisis estadístico se realizó por el test no paramétrico de Mann-Whitney con un valor significativo $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) y $p < 0.0001$ (****).

Luego de observar que los monocitos presentaron una mayor migración hacia el plasma obtenido de sangre coronaria de los pacientes, quisimos ver si existía alguna correlación entre la migración de estos monocitos y las quimioquinas analizadas en estos mismos plasmas. Para esto se parearon los datos de las concentraciones de las quimioquinas en los distintos plasmas analizados y la migración de los monocitos hacia esos mismos plasmas y se encontró que solo existió una correlación significativa para IL-8/CXCL8 (**Figura 10**).

Correlación entre monocitos migrados e IL-8

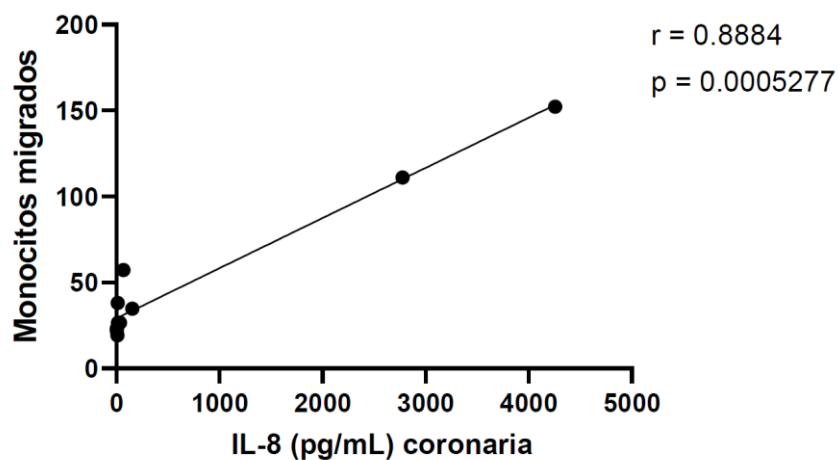


FIGURA 10: CORRELACIÓN ENTRE MIGRACIÓN DE MONOCITOS E IL-8.

Gráfico de correlación entre monocitos migrados y concentración de IL-8/CXCL8 en plasma obtenido de sangre coronaria de pacientes (n=12). La correlación se consideró como significativa cuando existió un valor $p < 0,005$.

9.4.Objetivo 3

9.4.1.Ensayos de funcionalidad de monocitos CD14⁺

Al observar que el plasma obtenido de sangre coronaria de pacientes que han sufrido un infarto afectó la migración de los monocitos, surgió la pregunta si el plasma de pacientes podría inducir cambios fenotípicos y funcionales sobre monocitos. Para probar esto, se decidió ver estos cambios, midiendo la expresión de moléculas coestimuladoras en superficie de monocitos previamente aislados.

Se aislaron los monocitos por el mismo método anunciado anteriormente, los monocitos luego fueron incubados durante tres días en plasma obtenido tanto de sangre periférica como coronaria de pacientes infartados, posterior a los tres días se midieron los cambios en la expresión de 4 moléculas en la superficie de los monocitos, estas fueron: los receptores de quimioquinas CXCR3 y CCR6, y además las moléculas coestimuladoras CD86 y HLA-DR que nos mostrarían como cambia la activación de los monocitos cultivados con los distintos plasmas.

Para analizar los datos obtenidos por citometría de flujo, posterior a los tres días de incubación, se desarrolló una estrategia de *gating* que permitiera conocer qué porcentaje de monocitos expresaron las distintas moléculas que se midieron

(**Figura 11**), para esto, los monocitos fueron marcados con anticuerpos anti-CXCR3, anti-CCR6, anti-CD86 y anti-HLA-DR.

Una vez obtenidos los datos de citometría de flujo, primero se seleccionaron las células individuales, que en este caso correspondían a monocitos y se seleccionó en el *dot plot* cada uno de los marcadores utilizados. Se midió el porcentaje de monocitos que expresaron cada una de las moléculas seleccionadas para el estudio, en cada uno de los distintos plasmas donde se incubaron estos monocitos.

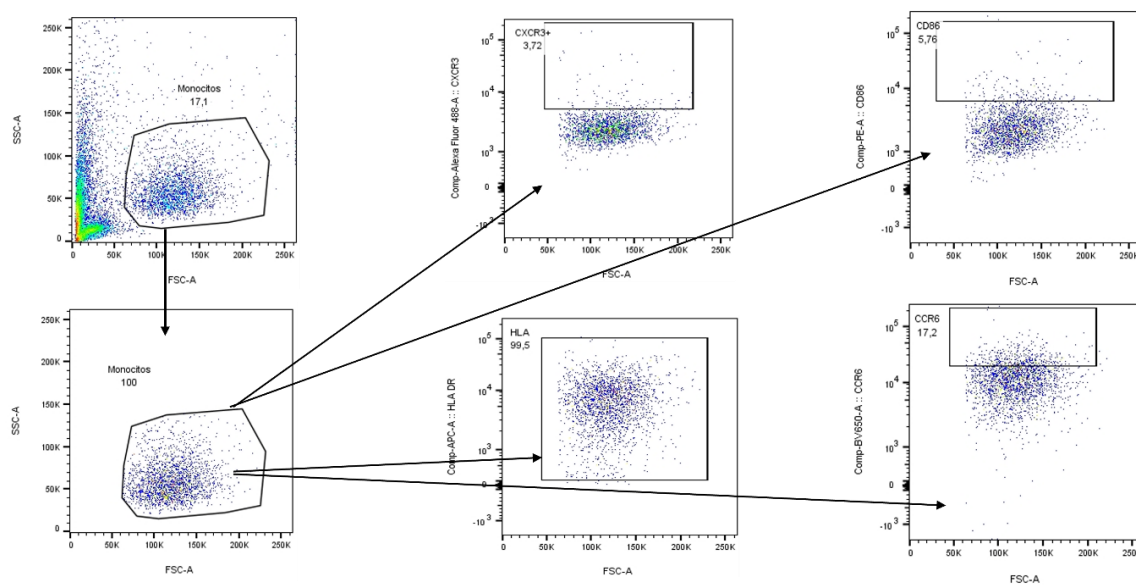


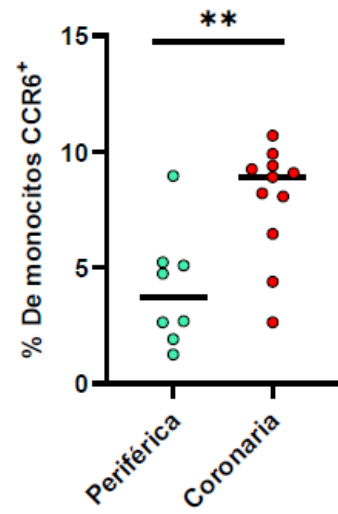
FIGURA 11: ESTRATEGIA DE GATING UTILIZADA PARA EL ANÁLISIS DE ENSAYOS DE FUNCIONALIDAD.

Representación de la estrategia de *gating* que se estableció para análisis del *dot plot* obtenido desde los datos entregados por citometría de flujo. Primero se seleccionaron los monocitos y de los monocitos se seleccionaron los que fueron marcados por cada uno de los anticuerpos específicos para cada molécula a estudiar. El análisis se realizó con el programa FlowJo.

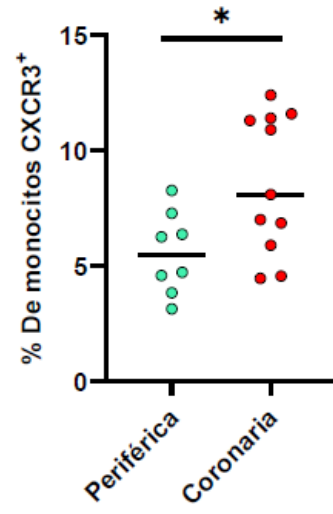
Después de obtener los datos de los porcentajes de monocitos que expresaron cada molécula, se analizaron las diferencias en la expresión de las moléculas coestimuladoras entre los monocitos cultivados en plasma obtenido de sangre coronaria y los monocitos cultivados en plasma obtenido de sangre periférica.

El análisis realizado mostró que los monocitos sufrieron diferencias al ser cultivados con los distintos plasmas obtenidos de los pacientes infartados. El receptor de quimioquina CCR6 (**Figura 12.A**) y CXCR3 (**Figura 12.B**) se vieron aumentados significativamente en monocitos que fueron cultivados en sangre coronaria en comparación a sangre periférica. Por otra parte, si bien la expresión del CD86 no mostró una diferencia significativa en su expresión en monocitos, se observó una tendencia similar a la descrita para CXCR3 y CCR6 (**Figura 12.C**). En el caso de la medición de HLA-DR, al ser una molécula constitutivamente en monocitos, se evaluaron las diferencias en su nivel de intensidad utilizando intensidad media de fluorescencia (MFI); en este caso no se observó una diferencia entre el MFI de monocitos cultivados en distintos plasmas, arrojando valores positivos de este dato en ambos monocitos (**Figura 12.D**).

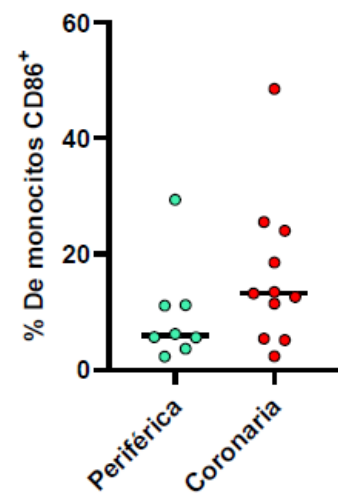
A Monocitos CCR6⁺



B Monocitos CXCR3⁺



C Monocitos CD86⁺



D HLA-DR mfi

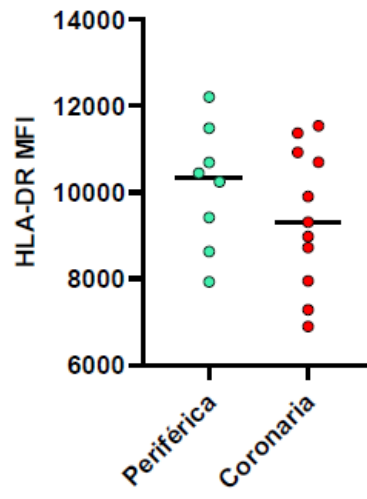


FIGURA 12: EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS COESTIMULADORAS EN MONOCITOS.

Diferencias en la expresión de moléculas coestimuladoras en monocitos cultivados en plasma obtenido desde sangre periférica y sangre coronaria de pacientes infartados (n=11). (A) Expresión del receptor CCR6, (B) Expresión del receptor CXCR3, (C) Expresión del receptor CD86 y (D) MFI de HLA-DR. El análisis estadístico se realizó con la prueba t student considerando significativo $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) y $p < 0.0001$ (****).

El análisis mencionado anteriormente sugiere que existe alguna molécula presente en la sangre coronaria de pacientes infartados que afecta de manera positiva en la expresión de algunos receptores de quimioquinas, como fue el caso de CCR6 y CXCR3; por esta razón decidimos evaluar si alguna de las quimioquinas que se estudiaron anteriormente podían ser las causantes de este aumento en la expresión de estos receptores en los monocitos. Para esto evaluamos si existe una correlación entre la expresión de estas moléculas en monocitos y la concentración de las quimioquinas evaluadas anteriormente tanto en sangre coronaria como en sangre periférica de pacientes infartados. Se parearon los datos de las concentraciones de quimioquinas en los distintos plasmas que se analizaron, con los datos de la expresión de moléculas en monocitos que fueron cultivados en estos mismos plasmas. Se observó una correlación solo en la expresión de CXCR3 y la quimioquina MIG (CXCL9) en sangre periférica (**Figura 13**).

XY data: Correlation of MIG per vs CXCR3 per

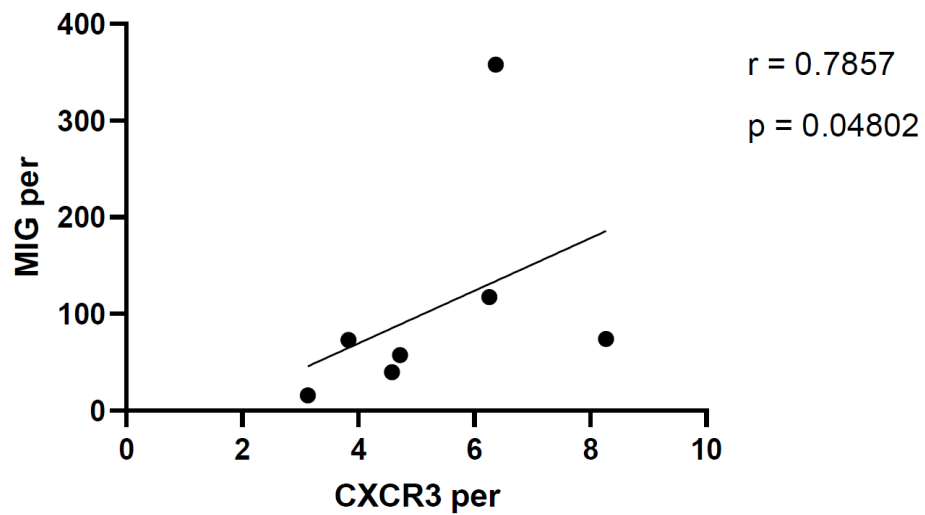


FIGURA 13: CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE CXCR3 Y LA CONCENTRACIÓN DE MIG.

Correlación entre la expresión de CXCR3 en monocitos cultivados en plasma obtenido de sangre periférica con la concentración de MIG en el mismo plasma. La correlación se consideró como significativa cuando existió un valor $p < 0,005$

10. Discusión

Las enfermedades cardiovasculares son, hasta el día de hoy, la causa de muerte más común en el mundo, reportándose 17.9 millones de muertes anualmente (World Health Organization, 2020). Es por esta razón, que se hace necesario estudiar y entender este tipo de enfermedades.

Dentro de estas enfermedades, una de las más frecuentes es el infarto agudo al miocardio (IAM). Estudios previos han demostrado que esta patología trae consigo un mayor riesgo de tener eventos recurrentes de este tipo, lo que se traduciría en un aumento en el riesgo de muerte de pacientes con historial previo de IAM (Goldstein et al., 2000).

En este estudio, se quiere comprender, de mejor manera, los mecanismos asociados a la aterosclerosis y en específico, el rol que juegan los monocitos circulantes y cómo la placa ateromatosa es capaz de regular los efectos de estos monocitos en la progresión de la enfermedad.

Para realizar el estudio se reclutaron pacientes que fueron admitidos en el Hospital Guillermo Grant Benavente de Concepción con diagnóstico de infarto agudo al miocardio. A estos pacientes se les extrajo sangre en circulación coronaria, así como también, sangre en circulación periférica y, además,

muestras de biopsias de las placas ateromatosas, en algunos casos. Como control, se usó sangre periférica extraída desde personas sanas. El objetivo de la extracción de sangre desde ambas circulaciones fue poder comparar las concentraciones de quimioquinas en estos dos ambientes, ya que, no existen muchos estudios que observen como puede relacionarse e influir una quimioquina en sangre coronaria sobre la misma quimioquina en sangre periférica y viceversa. Para poder caracterizar y cuantificar quimioquinas en ambas circulaciones, se utilizó un kit que nos permitió analizar cinco quimioquinas consideradas importantes para el estudio (IL-8/CXCL8, IP10/CXCL10, MCP-1/CCL2, MIG/CXCL9 y RANTES/CCL5), esto, basado en literatura previa (Gencer et al., 2021) y, en resultados previos de nuestro laboratorio.

En la **Tabla N°2**, podemos observar los resultados que se encontraron al cuantificar las quimioquinas esperadas. Es importante mencionar que, del total de pacientes reclutados, solo se analizó plasma de sangre coronaria y periférica del 52% de estos, ya que, para el porcentaje restante de casos, las muestras no eran suficientes o no se encontraban en buen estado para su análisis. Al obtener los resultados, se comparó si había diferencias entre las concentraciones de estas quimioquinas en los pacientes infartados y en los controles.

En la **Figura 5**, podemos observar que para cuatro de las cinco quimioquinas hubo una mayor concentración en pacientes infartados. Estos resultados se condicen con la literatura existente donde Parissis et al. (2002) demuestra que

RANTES/CCL5 está aumentada en pacientes que sufrieron un IAM (infarto agudo al miocardio) categorizado como grave y acompañado por manifestaciones de falla cardíaca respecto a controles sanos. Esta misma tendencia está descrita para MIG/CXCL9, IP10/CXCL10 e IL-8/CXCL8 donde Liang et al. (2017); Safa et al. (2016); Zhou et al. (2001) describen que hay una mayor concentración de estas quimioquinas en pacientes con síndromes isquémicos graves. Este no fue el caso con MCP-1/CCL2, donde los datos mostraron que no había una diferencia significativa entre ambos grupos. Este resultado es contrario a lo que dice la literatura previa, donde se demuestra que los niveles plasmáticos de esta quimioquina son más altas en personas que sufrieron IAM y a su vez son más altos en pacientes con mal pronóstico versus pacientes con buen pronóstico post IAM (Ding et al., 2021). Este último resultado puede deberse a la dispersión respecto al promedio, que presentan los datos de la presente investigación y n total utilizado en el estudio, donde en el caso de la investigación de Ding et al. (2021) el n utilizado era mucho mayor.

Para observar si estas quimioquinas se relacionaban cuando estaban en sangre coronaria y periférica, se correlacionó la concentración de las quimioquinas en ambas circulaciones. IL-8/CXCL8, IP10/CXCL10, MCP-1/CCL2 y RANTES/CCL5 se correlacionaron de forma positiva con distintas magnitudes, esto quiere decir que, al elevarse en una circulación, también lo harán en la otra. En el caso de MIG, no se evidenció una correlación entre ambas concentraciones. Además, se

estudió si existía alguna diferencia entre la concentración de estas quimioquinas en sangre periférica y coronaria; el análisis reveló que la IL-8/CXCL8 estaba elevada en sangre coronaria. Estudios han demostrado que IL-8 se eleva en el plasma a las pocas horas de ocurrido un infarto y se mantiene elevada hasta treinta días post IAM (Zarrouk-Mahjoub et al., 2016). Este mismo estudio habla del reclutamiento y posterior acumulación de neutrófilos en el sitio de la lesión, esto mediado por IL-8/CXCL8, cuando empieza el remodelamiento cardíaco. Esto es respaldado por Liehn et al. (2011) que observó que las primeras células reclutadas después de un IAM son los neutrófilos, también observa que los neutrófilos liberan factores quimiotácticos que inducen la llegada de monocitos del bazo hacia el miocardio. Considerando, que en el presente estudio las muestras extraídas de los pacientes fueron entre 30 minutos y 13 horas post infarto, se explicaría que se observe una mayor concentración en sangre coronaria post IAM. Si consideramos que se encontró una correlación positiva entre la concentración de esta quimioquina en sangre coronaria y periférica, con distintos tipos de lesiones cardiovasculares, esta elevación en el sitio de la lesión explicaría que esta quimioquina se encuentre elevada en el plasma sanguíneo de dichos pacientes. El mismo resultado se vio para MIG/CXCL9, donde su concentración coronaria está elevada respecto a su concentración en sangre periférica. Este resultado se condice con literatura previa, donde se sugiere que existe una alta tasa de liberación de esta quimioquina en el sitio de inflamación y

además una alta tasa de interacción de esta molécula con células que migran al sitio de infarto observándose una baja concentración de MIG/CXCL9 en sangre periférica. Fernandes et al. (2004) y Lin et al. (2019) demostraron que PBMCs activadas con TNF- α y TGF- β expresaron de manera elevada MIG/CXCL9, también observaron por estudios *in vitro* que MIG aumentaban el crecimiento y la migración de fibroblastos cardiacos humanos. El mismo sugiere que el nivel elevado de MIG/CXCL9 en suero es una consecuencia de la activación de PBMCs, esto ofrece una explicación a lo observado en nuestro estudio. También en el estudio realizado por Prabhu and Frangogiannis (2016) se describe que TNF- α y otras citoquinas proinflamatorias se elevan rápidamente post infarto sobre todo en el sitio de la lesión, esto llevaría a que células del sistema inmune residentes en el miocardio y células que posteriormente son reclutadas y acumuladas en este lugar liberen de manera exacerbada MIG/CXCL9, dando una respuesta coherente a que esta quimioquina esté elevada en sangre coronaria. Hay que considerar que en estos estudios la concentración de MIG/CXCL9 fue medida en sangre periférica y si bien, no se demostró que exista una correlación entre su concentración en sangre periférica y coronaria en el caso de la presente investigación la tendencia mostrada al hacer este análisis es de una correlación positiva. A diferencia de los resultados expuestos anteriormente, MCP-1/CCL2 se observó elevada significativamente en sangre periférica, se hipotetizó que esto podría deberse a que en las primeras horas post IAM MCP-1/CCL2 estaría

elevada en sangre periférica porque mediaría el reclutamiento de monocitos desde el bazo, que provee un flujo constante de monocitos hacia el sitio de inflamación, pero como explica Potteaux et al. (2015) la producción y reclutamiento de monocitos desde el bazo hacia la placa aterosclerótica y sitio de infarto, está mediada por angiotensina II. MCP-1/CCL2 mediaría la movilización de monocitos desde la médula ósea y Jordan et al. (2019) muestra que una reducción sistémica de MCP-1/CCL2 reduce la cantidad de monocitos circulantes mediante una disminución de la salida de estos monocitos desde la médula ósea, sin embargo, esto no explicaría, de manera determinante, la razón de que esta quimioquina está elevada en sangre periférica, ya que, como lo demuestra Swirski et al. (2009) la mayor parte de los monocitos que son reclutados hacia el miocardio infartado provienen del bazo. Swirski et al. (2009) usando ratones CCR2^{-/-} demostró un aumento en la circulación de monocitos y una disminución de monocitos en el bazo después de inducir el Infarto al miocardio (IM), aun así, observó que estos monocitos no se acumulaban en el miocardio isquémico, ya que, la infiltración es mediada por CCR2/CCL2. Esta información es corroborada por van der Laan et al. (2014) que también observó que la mayor parte de los monocitos que son reclutados hacia el miocardio infartado provienen del bazo siendo una porción menor de estos monocitos los provenientes desde la médula ósea. Para la presente investigación, es importante considerar que las muestras de sangre fueron tomadas pocas horas después de ocurrido el evento isquémico,

esto podría ser un factor que influya en que se observe una mayor concentración de MCP-1/CCL2 en sangre periférica, ya que, como menciona Peet et al. (2020) los monocitos son la población dominante en el miocardio durante la fase inflamatoria post IAM, alcanzan su peak en el día 3 a 5 post evento isquémico. Esta información podría dar un indicio de que la concentración de MCP-1/CCL2 sería mayor en sangre coronaria en este punto del remodelamiento cardiaco, ya que es la que modula la infiltración de los monocitos al miocardio, aun así, es necesario seguir investigando para esclarecer la razón de lo observado en nuestro estudio.

Como vimos que existían diferencias en la concentración de quimioquinas entre personas diagnosticadas con IAM y controles sanos, y a su vez había diferencias entre las concentraciones entre la sangre coronaria y periférica de estos pacientes, sumado a los resultados previos encontrados por el laboratorio, se quiso corroborar que existía una mayor migración de monocitos CD14⁺ hacia plasma obtenido de sangre coronaria de los pacientes participantes del estudio versus controles sanos. Para comprender de mejor manera la razón de este experimento, es importante destacar que como menciona Goldstein et al. (2000) el riesgo de un segundo evento aterotrombótico es una de las principales complicaciones del IAM, por lo que quisimos determinar cómo se ve afectada la migración de monocitos en estos pacientes.

Como podemos observar en la **Figura 9** hay una mayor migración de monocitos hacia el plasma obtenido de sangre coronaria de los pacientes, esto se condice con estudios anteriores que mencionan que existe una mayor movilización de monocitos hacia el miocardio posterior a un evento isquémico. Esta mayor movilización de monocitos hacia circulación coronaria implica, no solo implica una mayor llegada de estos hacia el sitio donde ocurrió el infarto, sino también, implica una mayor movilización de monocitos por arterias que podrían tener en formación placas ateromatosas.

El infarto agudo al miocardio implica un proceso inflamatorio localizado y sistémico (Wang et al., 2018) que puede acelerar el proceso de formación y posterior ruptura de placas ateroscleróticas. Dutta et al. (2012) demostró en ratones que efectivamente el IAM acelera la aterosclerosis, esto mediado por una mayor infiltración de monocitos en placas, también observó un aumento en la actividad proteolítica de estas mismas arterias lo que se traduciría en una mayor inestabilidad de la placa. Estos resultados son respaldados por las observaciones realizadas por Mihailovic et al. (2019) donde vio que la infiltración de monocitos/macrófagos en placas ateromatosas esta incrementada posterior a un infarto. Lo demostrado por literatura previa, complementado con los resultados encontrados en este estudio, indicarían que este proceso de migración de monocitos hacia arterias coronarias post IAM y su subsecuente aceleración en la

progresión de otras placas ateroscleróticas podría iniciar a las pocas horas de ocurrido el evento isquémico.

Otra observación importante en los datos presentados en este experimento es que existen tres plasmas que indujeron una migración exacerbada de monocitos, se analizaron los parámetros clínicos de los pacientes de los cuales se extrajo este plasma para ver si se encontraba un patrón que explicara esta respuesta exacerbada pero no se observó un patrón entre estos puntos que pudiera explicar este fenómeno.

Teniendo esto en cuenta, nos propusimos ver si las quimioquinas estudiadas podrían estar teniendo un efecto sobre la migración de los monocitos, para esto buscamos si había una correlación entre las concentraciones de estas y la movilización de monocitos. Este análisis arrojó que la IL-8/CXCL8 y la migración de monocitos se correlacionaron positivamente y con una alta magnitud. Si bien la IL-8/CXCL8 modula principalmente la llegada de neutrófilos hacia sitios de inflamación, estudios recientes demuestran que esta quimioquina es capaz de afectar la migración de monocitos y puede modular la actividad proinflamatoria de monocitos/macrófagos (Meniailo et al., 2018)

Los resultados expuestos anteriormente demuestran que el plasma de estos pacientes es capaz de modular la movilización de monocitos hacia sitios de inflamación, por lo tanto, quisimos analizar si este mismo plasma puede modular

la funcionalidad de monocitos a través de cambios en la expresión de moléculas en la superficie de estas células.

Los marcadores elegidos para evaluar los cambios en los monocitos nos permitieron observar cambios fenotípicos en los monocitos (expresión de CXCR3 y CCR6) y cambios funcionales en estos (expresión de CD86 y HLA-DR).

Se cultivaron monocitos en plasma obtenido de sangre periférica y coronaria de pacientes durante tres días con el objetivo de comparar la expresión de las moléculas antes mencionadas. Para CXCR3, CCR6 y CD86 se analizaron las diferencias en los porcentajes de monocitos que las expresaron, pero para el caso de HLA-DR se analizó el MFI, teniendo en cuenta que esta molécula se expresa constitutivamente, resultaba más adecuado evaluar la cantidad de moléculas expresada por cada monocito.

Como podemos ver en la **Figura 12** tanto CCR6 como CXCR3 se expresaron en un mayor porcentaje de monocitos cuando estos fueron cultivados en plasma obtenido de sangre coronaria. Si bien el mecanismo de acción que promueve la expresión de CCR6 no está totalmente dilucidado, estudios anteriores han demostrado el papel que juega este receptor y su único ligando (CCL20) en la progresión de la aterosclerosis. Rolin and Maghazachi (2014) observan que una delección de CCR6 en ratones knockout significó una reducción en el área de la lesión en un 33 – 40% y a su vez en una disminución de un 44% en la infiltración

de macrófagos, que fue atribuido a una disminución de monocitos circulantes. Manthey et al. (2013) confirmaron esto al observar que una delección de CCR6 disminuye los monocitos circulantes, en un contexto de hipercolesterolemia o de inflamación crónica, y el contenido de macrófagos en las placas, además de observar que las células endoteliales que expresan y presentan CCL20 contribuyen a una mayor adhesión de monocitos a la pared endotelial. Lo descrito en la literatura junto con lo presentado por nuestro estudio, podrían indicar una posible explicación a lo observado en el ensayo de migración, la expresión de CCR6 inducida por la sangre coronaria de los pacientes, puede ser un factor contribuyente a la mayor migración de monocitos hacia esta sangre. Con motivos de poder entender mejor si CCR6 está implicado en la mayor migración observada, sería interesante ver si CCL20 está aumentada en el contexto inflamatorio presente en la sangre coronaria de los pacientes, ya que como lo demuestra Kadomoto et al. (2020) el incremento en la producción de CCL20 significó un aumento en la migración de células cancerosas de ovario mediante una activación de CCR6 en estas células, es esperable entonces que en monocitos tenga un efecto similar.

Con respecto a CXCR3 se observó un aumento significativo en la expresión de este receptor en monocitos que fueron cultivados en plasma de sangre coronaria. Este receptor tiene tres ligandos principales, CXCL9/MIG, CXCL10/IP10 y CXCL11/I-TAC y está asociado principalmente a la mediación del tráfico de

linfocitos T (Maithania et al., 2019). No existe hasta el día de hoy mucha información respecto a este receptor en torno a los monocitos, pero si existen estudios que muestran el funcionamiento de esta molécula en otras células del sistema inmune. Como reporta Nakajima et al. (2002), la expresión de CXCR3 en linfocitos T es inducida por IFN-gamma, que se sabe que es una de las principales citoquinas proinflamatorias implicadas en la formación y progresión de la aterosclerosis, además, Jinquan et al. (2000) demostraron que las quimioquinas MIG/CXCL9 e IP10/CXCL10 son capaces de inducir la quimiotaxis de eosinófilos a través de la expresión del receptor CXCR3. Literatura previa indica también que IP10/CXCL10 es altamente expresado y liberado por todas las células asociadas a los ateromas como son los monocitos y las células T, esta quimioquina además facilita la retención de estos linfocitos T produciéndose una acumulación local de estas quimioquinas (Szentes et al., 2018). La información conocida con anterioridad respecto a este receptor y los resultados entregados por nuestro estudio, nos permiten hipotetizar que son estas mismas quimioquinas las que inducen la expresión de CXCR3 que observamos en los monocitos y que la expresión de este receptor podría facilitar la llegada de los monocitos hacia el ambiente inflamatorio asociado a la placa.

Si bien, dentro de este experimento solo la expresión de estas dos moléculas de superficie tuvo una diferencia significativa cuando fueron cultivadas en los distintos plasmas, podemos ver que CD86 presenta una tendencia similar a la

observada en la expresión de las moléculas mencionadas anteriormente, viéndose una mayor cantidad de monocitos que expresaron CD86 cuando fueron cultivados en plasma obtenido de sangre coronaria de los pacientes. Zirlik and Lutgens (2015) expresan que en pacientes que sufren enfermedades cardiovasculares, se ve un incremento en la expresión de CD86 en células dendríticas derivadas de monocitos. Este marcador también se usa para ver la razón entre macrófagos M1 y M2. Literatura previa muestra que esta razón está aumentada en pacientes con enfermedades cardiovasculares, mostrándose un aumento en macrófagos M1, que están asociados al marcador CD86, y una disminución en macrófagos M2, asociados al marcador CD163, este aumento se vio asociado a un aumento de quimioquinas relacionadas con macrófagos M1 (Williams et al., 2017). Todo lo expuesto anteriormente indica una concordancia entre la tendencia mostrada en nuestros resultados respecto a la expresión de CD86 y lo encontrado en literatura previa.

En el caso de HLA-DR, nuestros datos no son concordantes con lo conocido con anterioridad, literatura previa muestra que la expresión de HLA-DR es inducida por IFN-gamma (Shaw et al., 1985) que es la principal quimioquina proinflamatoria presente en aterosclerosis. Se hipotetiza que esta discrepancia entre la literatura previa y nuestros resultados se debe al n bajo y la alta dispersión que presenta nuestra data.

Por último, al correlacionar los porcentajes de monocitos que expresaron las distintas moléculas en superficie, con las concentraciones de quimioquinas encontradas en los mismos plasmas en que fueron cultivados los monocitos, se parearon los datos y se aplicó Test de Spearman para observar si había alguna correlación. Se observó una correlación positiva entre los monocitos cultivados en sangre periférica que expresaron CXCR3 en su superficie y la concentración de MIG/CXCL9 en esta misma sangre. Este resultado refuerza la hipótesis de que, al igual que en eosinófilos (Jinquan et al., 2000), esta quimioquina es capaz de modular la expresión de CXCR3 en monocitos.

11.Conclusiones

Algunas de las conclusiones que se pueden obtener de este trabajo son las siguientes:

Los pacientes con diagnóstico de infarto agudo al miocardio presentan una mayor concentración de quimioquinas en circulación comparados a controles sanos. Esto es válido para cuatro de las cinco quimioquinas estudiadas (IL-8, IP10, MIG y RANTES)

Además de presentar una elevación en su concentración de quimioquinas, los pacientes presentan diferencias en las concentraciones de IL-8, MCP-1 y MIG entre su circulación periférica y coronaria.

La concentración de quimioquinas en sangre coronaria y periférica demostró tener una correlación positiva para IL-8, IP10, MCP-1 y RANTES, es decir la concentración en una de sus circulaciones, tendrá efectos sobre la concentración en la otra circulación.

El ambiente inflamatorio inducido por la placa ateromatosa, presente en sangre coronaria de pacientes con IAM, es capaz de inducir una migración preferencial de monocitos en comparación a controles y la interleuquina 8 juega un papel en esto.

Además de inducir una mayor migración, este ambiente inflamatorio es capaz de inducir cambios fenotípicos en los monocitos cuando están expuestos a él, en este caso el plasma obtenido de sangre coronaria indujo un aumento en la expresión de CCR6 y de CXCR3.

12. Proyecciones

Este estudio permitió esclarecer y confirmar que el ambiente inflamatorio inducido por la placa posterior a un infarto agudo al miocardio es capaz de afectar de distintas formas a los monocitos circulantes.

Como proyecciones futuras para lograr dilucidar aún mejor el papel que juegan los distintos estímulos que induce la placa sobre estos monocitos, las investigaciones podrían enfocarse en intentar entender los componentes claves presentes en este ambiente que están afectando a los monocitos. Podría evaluarse si la migración de monocitos es modulada por alguna de las quimioquinas estudiadas. Esto podría realizarse observando cuantos monocitos migran cuando son expuestos a las distintas quimioquinas, así mismo podría evaluarse los cambios fenotípicos y funcionales que inducen estas quimioquinas en los monocitos, esto midiendo la expresión de moléculas de superficie cuando son cultivados en distintas quimioquinas o citoquinas presentes en el plasma de estos pacientes.

Así mismo investigaciones futuras deberían enfocarse en esclarecer que otros componentes pro inflamatorios existen y son persistentes en el ambiente coronario de pacientes que han sufrido un infarto, para esto se podría evaluar la concentración de un pool más grande de quimioquinas en sangre coronaria y

periférica de estos pacientes y – si es posible considerando limitaciones y riesgos asociados a la toma de muestras de este tipo – observar estas concentraciones en distintos tiempos posterior a ocurrido el infarto agudo al miocardio.

13.Referencias

- Anderson, J. L., & Morrow, D. A. (2017). Acute Myocardial Infarction. *N Engl J Med*, 376(21), 2053-2064. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1606915>
- Apostolakis, S., & Spandidos, D. (2013). Chemokines and atherosclerosis: focus on the CX3CL1/CX3CR1 pathway. *Acta Pharmacol Sin*, 34(10), 1251-1256. <https://doi.org/10.1038/aps.2013.92>
- Chang, T. T., & Chen, J. W. (2016). Emerging role of chemokine CC motif ligand 4 related mechanisms in diabetes mellitus and cardiovascular disease: friends or foes? *Cardiovasc Diabetol*, 15(1), 117. <https://doi.org/10.1186/s12933-016-0439-9>
- Chistiakov, D. A., Bobryshev, Y. V., & Orekhov, A. N. (2016). Macrophage-mediated cholesterol handling in atherosclerosis. *J Cell Mol Med*, 20(1), 17-28. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12689>
- Deshmane, S. L., Kremlev, S., Amini, S., & Sawaya, B. E. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res*, 29(6), 313-326. <https://doi.org/10.1089/jir.2008.0027>
- Ding, M., Li, M., & Yang, H. (2021). Clinical diagnostic value of combined detection of IMA, D-D and MCP-1 in acute myocardial infarction. *Exp Ther Med*, 21(5), 457. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.9888>
- Dutta, P., Courties, G., Wei, Y., Leuschner, F., Gorbатов, R., Robbins, C. S., Iwamoto, Y., Thompson, B., Carlson, A. L., Heidt, T., Majmudar, M. D., Lasitschka, F., Etzrodt, M., Waterman, P., Waring, M. T., Chicoine, A. T., van der Laan, A. M., Niessen, H. W., Piek, J. J., Rubin, B. B., Butany, J., Stone, J. R., Katus, H. A., Murphy, S. A., Morrow, D. A., Sabatine, M. S., Vinegoni, C., Moskowitz, M. A., Pittet, M. J., Libby, P., Lin, C. P., Swirski, F. K., Weissleder, R., & Nahrendorf, M. (2012). Myocardial infarction accelerates atherosclerosis. *Nature*, 487(7407), 325-329. <https://doi.org/10.1038/nature11260>
- El Ayadi, A., Herndon, D. N., & Finnerty, C. C. (2018). Biomarkers in Burn Patient Care. In *Total Burn Care* (pp. 232-235.e232). <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-47661-4.00021-6>
- Fernandes, J. L., Mamoni, R. L., Orford, J. L., Garcia, C., Selwyn, A. P., Coelho, O. R., & Blotta, M. H. (2004). Increased Th1 activity in patients with coronary artery disease. *Cytokine*, 26(3), 131-137. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2004.01.007>
- Gencer, S., Evans, B. R., van der Vorst, E. P. C., Doring, Y., & Weber, C. (2021). Inflammatory Chemokines in Atherosclerosis. *Cells*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/cells10020226>

- Gistera, A., & Hansson, G. K. (2017). The immunology of atherosclerosis. *Nat Rev Nephrol*, 13(6), 368-380. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2017.51>
- Gobierno de Chile. (2016). *Enfermedades cardiovasculares*.
- Goldstein, J. A., Demetriou, D., Grines, C. L., Pica, M., Shoukfeh, M., & O'Neill, W. W. (2000). Multiple complex coronary plaques in patients with acute myocardial infarction. *N Engl J Med*, 343(13), 915-922. <https://doi.org/10.1056/NEJM200009283431303>
- Jinquan, T., Jing, C., Jacobi, H. H., Reimert, C. M., Millner, A., Quan, S., Hansen, J. B., Dissing, S., Malling, H. J., Skov, P. S., & Poulsen, L. K. (2000). CXCR3 expression and activation of eosinophils: role of IFN-gamma-inducible protein-10 and monokine induced by IFN-gamma. *J Immunol*, 165(3), 1548-1556. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.3.1548>
- Jordan, S., Tung, N., Casanova-Acebes, M., Chang, C., Cantoni, C., Zhang, D., Wirtz, T. H., Naik, S., Rose, S. A., Brocker, C. N., Gainullina, A., Hornburg, D., Horng, S., Maier, B. B., Cravedi, P., LeRoith, D., Gonzalez, F. J., Meissner, F., Ochando, J., Rahman, A., Chipuk, J. E., Artyomov, M. N., Frenette, P. S., Piccio, L., Berres, M. L., Gallagher, E. J., & Merad, M. (2019). Dietary Intake Regulates the Circulating Inflammatory Monocyte Pool. *Cell*, 178(5), 1102-1114 e1117. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.07.050>
- Kadl, A., Meher, A. K., Sharma, P. R., Lee, M. Y., Doran, A. C., Johnstone, S. R., Elliott, M. R., Gruber, F., Han, J., Chen, W., Kensler, T., Ravichandran, K. S., Isakson, B. E., Wamhoff, B. R., & Leitinger, N. (2010). Identification of a novel macrophage phenotype that develops in response to atherogenic phospholipids via Nrf2. *Circ Res*, 107(6), 737-746. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.215715>
- Kadomoto, S., Izumi, K., & Mizokami, A. (2020). The CCL20-CCR6 Axis in Cancer Progression. *Int J Mol Sci*, 21(15). <https://doi.org/10.3390/ijms21155186>
- Kattoor, A. J., Goel, A., & Mehta, J. L. (2019). LOX-1: Regulation, Signaling and Its Role in Atherosclerosis. *Antioxidants (Basel)*, 8(7). <https://doi.org/10.3390/antiox8070218>
- Li, D., & Mehta, J. L. (2000). Antisense to LOX-1 inhibits oxidized LDL-mediated upregulation of monocyte chemoattractant protein-1 and monocyte adhesion to human coronary artery endothelial cells. *Circulation*, 101(25), 2889-2895. <https://doi.org/10.1161/01.cir.101.25.2889>
- Liang, Y., Yang, , C., Z., Q., , Pan, W., Zhong, W., Ding, R., & , & Wang, A. (2017). Serum Monokine Induced by Gamma Interferon Is Associated With Severity of Coronary Artery Disease. *International Heart Journal*
- Libby, P. (2013). Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy. *N Engl J Med*, 368(21), 2004-2013. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1216063>

- Libby, P., Ridker, P. M., & Hansson, G. K. (2011). Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*, 473(7347), 317-325. <https://doi.org/10.1038/nature10146>
- Liehn, E. A., Postea, O., Curaj, A., & Marx, N. (2011). Repair after myocardial infarction, between fantasy and reality: the role of chemokines. *J Am Coll Cardiol*, 58(23), 2357-2362. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.08.034>
- Lin, C. F., Su, C. J., Liu, J. H., Chen, S. T., Huang, H. L., & Pan, S. L. (2019). Potential Effects of CXCL9 and CCL20 on Cardiac Fibrosis in Patients with Myocardial Infarction and Isoproterenol-Treated Rats. *J Clin Med*, 8(5). <https://doi.org/10.3390/jcm8050659>
- Lin, J., Kakkar, V., & Lu, X. (2014). Impact of MCP-1 in atherosclerosis. *Curr Pharm Des*, 20(28), 4580-4588. <https://doi.org/10.2174/1381612820666140522115801>
- Maguire, E. M., Pearce, S. W. A., & Xiao, Q. (2019). Foam cell formation: A new target for fighting atherosclerosis and cardiovascular disease. *Vascul Pharmacol*, 112, 54-71. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2018.08.002>
- Maithania, H. V., D'Souza, A. A., Dandekar, P., & Devarajan, P. V. (2019). Role of Chemokines and Chemokine Receptors in Infectious Diseases and Targeting Strategies. In P. V. Devarajan, P. Dandekar, & A. A. D'Souza (Eds.), *Targeted Intracellular Drug Delivery by Receptor Mediated Endocytosis* (pp. 271-296). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-29168-6_9
- Manthey, H. D., Cochain, C., Barnsteiner, S., Karshovska, E., Pelisek, J., Koch, M., Chaudhari, S. M., Busch, M., Eckstein, H. H., Weber, C., Koenen, R. R., & Zernecke, A. (2013). CCR6 selectively promotes monocyte mediated inflammation and atherogenesis in mice. *Thromb Haemost*, 110(6), 1267-1277. <https://doi.org/10.1160/TH13-01-0017>
- Maynard, J. P., Ertunc, O., Kulac, I., Baena-Del Valle, J. A., De Marzo, A. M., & Sfanos, K. S. (2020). IL8 Expression Is Associated with Prostate Cancer Aggressiveness and Androgen Receptor Loss in Primary and Metastatic Prostate Cancer. *Mol Cancer Res*, 18(1), 153-165. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-19-0595>
- Meniailo, M. E., Malashchenko, V. V., Shmarov, V. A., Gazatova, N. D., Melashchenko, O. B., Goncharov, A. G., Seledtsova, G. V., & Seledtsov, V. I. (2018). Interleukin-8 favors pro-inflammatory activity of human monocytes/macrophages. *Int Immunopharmacol*, 56, 217-221. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.01.036>
- Mihailovic, P. M., Lio, W. M., Yano, J., Zhou, J., Zhao, X., Chyu, K. Y., Shah, P. K., Cercek, B., & Dimayuga, P. C. (2019). IL-7R blockade reduces post-myocardial infarction-induced atherosclerotic plaque inflammation in ApoE(-/-) mice. *Biochem Biophys Rep*, 19, 100647. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2019.100647>

- Murphy, P. M., Baggiolini, M., Charo, I. F., Hébert, C. A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L. H., Oppenheim, J. J., & Power, C. A. (2000). International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev*, 52(1), 145-176.
- Nakajima, C., Mukai, T., Yamaguchi, N., Morimoto, Y., Park, W. R., Iwasaki, M., Gao, P., Ono, S., Fujiwara, H., & Hamaoka, T. (2002). Induction of the chemokine receptor CXCR3 on TCR-stimulated T cells: dependence on the release from persistent TCR-triggering and requirement for IFN-gamma stimulation. *Eur J Immunol*, 32(6), 1792-1801. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200206\)32:6<1792::AID-IMMU1792>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200206)32:6<1792::AID-IMMU1792>3.0.CO;2-0)
- Parissis, J. T., Adamopoulos, S., Venetsanou, K. F., Mentzikof, D. G., Karas, S. M., & Kremastinos, D. T. (2002). Serum profiles of C-C chemokines in acute myocardial infarction: possible implication in postinfarction left ventricular remodeling. *J Interferon Cytokine Res*, 22(2), 223-229. <https://doi.org/10.1089/107999002753536194>
- Peet, C., Ivetic, A., Bromage, D. I., & Shah, A. M. (2020). Cardiac monocytes and macrophages after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*, 116(6), 1101-1112. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz336>
- Potteaux, S., Ait-Oufella, H., & Mallat, Z. (2015). Role of splenic monocytes in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, 26(5), 457-463. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000223>
- Prabhu, S. D., & Frangogiannis, N. G. (2016). The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circ Res*, 119(1), 91-112. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303577>
- PrabhuDas, M. R., Baldwin, C. L., Bollyky, P. L., Bowdish, D. M. E., Drickamer, K., Febbraio, M., Herz, J., Kobzik, L., Krieger, M., Loike, J., McVicker, B., Means, T. K., Moestrup, S. K., Post, S. R., Sawamura, T., Silverstein, S., Speth, R. C., Telfer, J. C., Thiele, G. M., Wang, X. Y., Wright, S. D., & El Khoury, J. (2017). A Consensus Definitive Classification of Scavenger Receptors and Their Roles in Health and Disease. *J Immunol*, 198(10), 3775-3789. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700373>
- Proost, P., Wuyts, A., & van Damme, J. (1996). The role of chemokines in inflammation. *Int J Clin Lab Res*, 26(4), 211-223. <https://doi.org/10.1007/BF02602952>
- Puthothu, B., Krueger, M., Heinze, J., Forster, J., & Heinzmann, A. (2006). Impact of IL8 and IL8-receptor alpha polymorphisms on the genetics of bronchial asthma and severe RSV infections. *Clin Mol Allergy*, 4, 2. <https://doi.org/10.1186/1476-7961-4-2>
- Raniolo, S., Vindigni, G., & Biocca, S. (2016). Cholesterol level regulates lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 function. *Biomedical*

- Spectroscopy and Imaging*, 5(s1), S87-S99. <https://doi.org/10.3233/bsi-160156>
- Rolin, J., & Maghazachi, A. A. (2014). Implications of chemokines, chemokine receptors, and inflammatory lipids in atherosclerosis. *J Leukoc Biol*, 95(4), 575-585. <https://doi.org/10.1189/jlb.1113571>
- Safa, A., Rashidinejad, H. R., Khalili, M., Dabiri, S., Nemati, M., Mohammadi, M. M., & Jafarzadeh, A. (2016). Higher circulating levels of chemokines CXCL10, CCL20 and CCL22 in patients with ischemic heart disease. *Cytokine*, 83, 147-157. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.04.006>
- Schaller, T. H., Batich, K. A., Suryadevara, C. M., Desai, R., & Sampson, J. H. (2017). Chemokines as adjuvants for immunotherapy: implications for immune activation with CCL3. *Expert Rev Clin Immunol*, 13(11), 1049-1060. <https://doi.org/10.1080/1744666X.2017.1384313>
- Shaw, A. R., Chan, J. K., Reid, S., & Seehafer, J. (1985). HLA-DR synthesis induction and expression in HLA-DR-negative carcinoma cell lines of diverse origins by interferon-gamma but not by interferon-beta. *J Natl Cancer Inst*, 74(6), 1261-1268.
- Swirski, F. K., Nahrendorf, M., Etzrodt, M., Wildgruber, M., Cortez-Retamozo, V., Panizzi, P., Figueiredo, J. L., Kohler, R. H., Chudnovskiy, A., Waterman, P., Aikawa, E., Mempel, T. R., Libby, P., Weissleder, R., & Pittet, M. J. (2009). Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science*, 325(5940), 612-616. <https://doi.org/10.1126/science.1175202>
- Szentes, V., Gazdag, M., Szokodi, I., & Dezs, C. A. (2018). The Role of CXCR3 and Associated Chemokines in the Development of Atherosclerosis and During Myocardial Infarction. *Front Immunol*, 9, 1932. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01932>
- Thygesen, K., Alpert, J. S., Jaffe, A. S., Simoons, M. L., Chaitman, B. R., White, H. D., Joint, E. S. C. A. A. H. A. W. H. F. T. F. f. U. D. o. M. I., Authors/Task Force Members, C., Thygesen, K., Alpert, J. S., White, H. D., Biomarker, S., Jaffe, A. S., Katus, H. A., Apple, F. S., Lindahl, B., Morrow, D. A., Subcommittee, E. C. G., Chaitman, B. R., Clemmensen, P. M., Johanson, P., Hod, H., Imaging, S., Underwood, R., Bax, J. J., Bonow, J. J., Pinto, F., Gibbons, R. J., Classification, S., Fox, K. A., Atar, D., Newby, L. K., Galvani, M., Hamm, C. W., Intervention, S., Uretsky, B. F., Steg, P. G., Wijns, W., Bassand, J. P., Menasche, P., Ravkilde, J., Trials, Registries, S., Ohman, E. M., Antman, E. M., Wallentin, L. C., Armstrong, P. W., Simoons, M. L., Trials, Registries, S., Januzzi, J. L., Nieminen, M. S., Gheorghiade, M., Filippatos, G., Trials, Registries, S., Luepker, R. V., Fortmann, S. P., Rosamond, W. D., Levy, D., Wood, D., Trials, Registries, S., Smith, S. C., Hu, D., Lopez-Sendon, J. L., Robertson, R. M., Weaver, D., Tendera, M., Bove, A. A., Parkhomenko, A. N., Vasilieva, E. J., Mendis,

- S., Guidelines, E. S. C. C. f. P., Bax, J. J., Baumgartner, H., Ceconi, C., Dean, V., Deaton, C., Fagard, R., Funck-Brentano, C., Hasdai, D., Hoes, A., Kirchhof, P., Knuuti, J., Kolh, P., McDonagh, T., Moulin, C., Popescu, B. A., Reiner, Z., Sechtem, U., Sirnes, P. A., Tendera, M., Torbicki, A., Vahanian, A., Windecker, S., Document, R., Morais, J., Aguiar, C., Almahmeed, W., Arnar, D. O., Barili, F., Bloch, K. D., Bolger, A. F., Botker, H. E., Bozkurt, B., Bugiardini, R., Cannon, C., de Lemos, J., Eberli, F. R., Escobar, E., Hlatky, M., James, S., Kern, K. B., Moliterno, D. J., Mueller, C., Neskovic, A. N., Pieske, B. M., Schulman, S. P., Storey, R. F., Taubert, K. A., Vranckx, P., & Wagner, D. R. (2012). Third universal definition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 60(16), 1581-1598. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2012.08.001>
- van den Borne, P., Quax, P. H., Hoefer, I. E., & Pasterkamp, G. (2014). The multifaceted functions of CXCL10 in cardiovascular disease. *Biomed Res Int*, 2014, 893106. <https://doi.org/10.1155/2014/893106>
- van der Laan, A. M., Ter Horst, E. N., Delewi, R., Begieneman, M. P., Krijnen, P. A., Hirsch, A., Lavaei, M., Nahrendorf, M., Horrevoets, A. J., Niessen, H. W., & Piek, J. J. (2014). Monocyte subset accumulation in the human heart following acute myocardial infarction and the role of the spleen as monocyte reservoir. *Eur Heart J*, 35(6), 376-385. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/eh331>
- van Furth, R., & Beekhuizen, H. (1998). Monocytes. In P. J. Delves (Ed.), *Encyclopedia of Immunology (Second Edition)* (pp. 1750-1754). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/rwei.1999.0443>
- Wang, X., Guo, Z., Ding, Z., & Mehta, J. L. (2018). Inflammation, Autophagy, and Apoptosis After Myocardial Infarction. *J Am Heart Assoc*, 7(9). <https://doi.org/10.1161/JAHA.117.008024>
- Williams, H., Cassorla, G., Pertsoulis, N., Patel, V., Vicaretti, M., Marmash, N., Hitos, K., Fletcher, J. P., & Medbury, H. J. (2017). Human classical monocytes display unbalanced M1/M2 phenotype with increased atherosclerotic risk and presence of disease. *Int Angiol*, 36(2), 145-155. <https://doi.org/10.23736/S0392-9590.16.03661-0>
- World Health Organization. (2020). *Cardiovascular diseases (CVDs)*
- Xia, J. B., Liu, G. H., Chen, Z. Y., Mao, C. Z., Zhou, D. C., Wu, H. Y., Park, K. S., Zhao, H., Kim, S. K., Cai, D. Q., & Qi, X. F. (2016). Hypoxia/ischemia promotes CXCL10 expression in cardiac microvascular endothelial cells by NFkB activation. *Cytokine*, 81, 63-70. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.02.007>
- Yao, M., Brummer, G., Acevedo, D., & Cheng, N. (2016). Cytokine Regulation of Metastasis and Tumorigenicity. *Adv Cancer Res*, 132, 265-367. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2016.05.005>

- Yu, X. H., Fu, Y. C., Zhang, D. W., Yin, K., & Tang, C. K. (2013). Foam cells in atherosclerosis. *Clin Chim Acta*, 424, 245-252. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2013.06.006>
- Zani, I. A., Stephen, S. L., Mughal, N. A., Russell, D., Homer-Vanniasinkam, S., Wheatcroft, S. B., & Ponnambalam, S. (2015). Scavenger receptor structure and function in health and disease. *Cells*, 4(2), 178-201. <https://doi.org/10.3390/cells4020178>
- Zarrouk-Mahjoub, S., Zaghdoudi, M., Amira, Z., Chebi, H., Khabouchi, N., Finsterer, J., Mechmeche, R., & Ghazouani, E. (2016). Pro- and anti-inflammatory cytokines in post-infarction left ventricular remodeling. *Int J Cardiol*, 221, 632-636. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.07.073>
- Zhou, R. H., Shi, Q., Gao, H. Q., & Shen, B. J. (2001). Changes in serum interleukin-8 and interleukin-12 levels in patients with ischemic heart disease in a Chinese population. *J Atheroscler Thromb*, 8(1), 30-32. <https://doi.org/10.5551/jat1994.8.30>
- Zirlik, A., & Lutgens, E. (2015). An inflammatory link in atherosclerosis and obesity. Co-stimulatory molecules. *Hamostaseologie*, 35(3), 272-278. <https://doi.org/10.5482/HAMO-14-12-0079>

14.Anexo-1

14.1.Consentimiento informado



INFORMACION AL PARTICIPANTE

GRUPO DE ESTUDIO: PACIENTES

TITULO DEL ESTUDIO

**VARIANTES DEL GEN *LOX-1* EN EL INFARTO AGUDO DEL MIOCARDIO
CON SUPRADESNIVEL DEL SEGMENTO ST**

Investigador Responsable: Dra. Liliana Lamperti Fernández (Bioquímico)

Investigador Alterno: Dr. MSc. Claudio Aguayo Tapia (Tecnólogo Médico)

Investigador Clínico: Dr. Luis Jorge Gajardo Navarrete (Especialista en Cardiología
Intervencionista del Hospital Guillermo Grant Benavente)

Investigador Colaborador: Dra Estefanía Nova (Bioquímico)

Investigador Colaborador: Paola Lagos Muñoz (Nutricionista, candidata a Magister)

Centro de Investigación: Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología. Facultad
de Farmacia de la Universidad de Concepción.

Teléfono de contacto Investigador Responsable: 9-76343016

INTRODUCCIÓN

Estimado(a) señor(a), deseamos invitarlo a participar en este estudio, el cual medirá la presencia de variaciones de un gen que afectan la aparición de una molécula que participa en el daño de sus arterias y puede aumentar el riesgo de presentar un Infarto Agudo del Miocardio (IAM).

Luego de explicar a Ud. en qué consiste el trabajo y aclarar cualquier duda que tenga respecto a ello, será invitado a participar libre y voluntariamente en esta investigación.

FUNDAMENTO

El objetivo del estudio es determinar si las variaciones del gen que aumentan el riesgo de IAM, están presentes en pacientes chilenos.

La Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción realiza el patrocinio académico para el desarrollo de la tesis de Magíster en Bioquímica Clínica e Inmunología de la Srta. Paola Lagos Muñoz. También participa de este estudio, el Cardiólogo Dr. Luis Jorge Gajardo Navarrete del Centro de Responsabilidad Cardioquirúrgica del Hospital Guillermo Grant Benavente de Concepción.

RAZÓN POR LA QUE SE INVITA A LA PERSONA A PARTICIPAR.

Este estudio busca comprender de mejor manera por qué algunos pacientes con y sin riesgo cardiovascular sufren de IAM.

Al participar, nos ayudará a comprender el cuadro clínico de IAM y así poder entregar información de utilidad para el médico tratante de su enfermedad.

PARTICIPACIÓN Y RETIRO VOLUNTARIO

Su participación en esta investigación es totalmente libre y voluntaria. Usted puede elegir participar o no hacerlo. También, puede cambiar de idea más tarde y dejar de participar

Versión y fecha de Protocolo: Versión 2, 27/12/2018.

Centro investigación: Dpto. Bioquímica Clínica e Inmunología. Facultad Farmacia,
Universidad de Concepción. Investigador responsable: Dra. Liliana Lamperti F.

Iniciales del participante.....



aun cuando haya aceptado antes. No participarán menores de edad, ni pacientes en riesgo de vulnerabilidad según ley 20.584, artículo 28.

Los datos personales, datos de ficha clínica y consentimiento informado serán mantenidos bajo custodia en manos del investigador responsable. En el caso de la muestra de sangre, será almacenada por un período de 3 años y luego serán eliminadas según las normas establecidas por MATPEL y las muestras que contienen los genes, serán conservadas por un período de 5 años en el Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología de la Universidad de Concepción, para la posible evaluación de otras variaciones relacionadas. Aunque usted haya participado una primera vez, usted será libre de poder decidir si quiere volver a contribuir con el uso de su muestra de sangre que contiene sus genes para otro estudio. En el caso de que vuelva a aceptar, se le solicitará firmar un nuevo consentimiento informado.

DISEÑO DEL ESTUDIO

Corresponde a un estudio descriptivo analítico y de corte en donde participarán un grupo de personas diagnosticadas con IAM que recibirán atención de urgencia en el laboratorio de hemodinamia, hospitalización en unidad coronaria y seguimiento y control en el Policlínico de Cardiología del Hospital Guillermo Grant Benavente.

DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO

Se invitará a participar a pacientes con confirmación de IAM dentro de las primeras 24 horas de evolución. Se recolectará una muestra sanguínea de 6 cc (2 cucharadas de té) de la arteria coronaria culpable y de trombo coronario en el caso de ser sometido a una Intervención Coronaria Percutánea (ICP) primaria. Simultáneamente se tomará una muestra de 6 cc (2 cucharadas de té) de sangre periférica.

Además, se recopilarán datos clínicos de su ficha médica, que sólo tengan relación con su enfermedad.

La muestra de sangre y trombo obtenida será trasladada al Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción, lo cual será responsabilidad del equipo investigador. A partir de la muestra de sangre se obtendrá el gen que tiene las variaciones y del trombo coronario se analizará la expresión de *Lox-1* (niveles plasmáticos y celulares) que buscaremos relacionar con su enfermedad.

NÚMERO DE PARTICIPANTES

Se invitará a participar en este estudio de forma libre y voluntaria, a 74 pacientes adultos del Hospital Guillermo Grant Benavente diagnosticados con IAM mayores de edad, sin riesgo de vulnerabilidad. Se excluirán i) Individuos con antecedentes de un infarto del miocardio en los últimos 2 años. ii) Insuficiencia renal y hepática. iii) Desórdenes de coagulación. iv) Insuficiencia cardíaca severa en capacidad funcional III – IV. v) Procesos infecciosos o inflamatorios activos. vi) Enfermedad inflamatoria crónica. vii) Cáncer viii) Traumas o intervenciones quirúrgicas recientes ix) Transfusiones sanguíneas y x) pacientes operados de cirugía cardíaca.

Dichos pacientes serán evaluados por el cardiólogo investigador Dr. Luis Jorge Gajardo Navarrete, quién le explicará e invitará a participar.

Versión y fecha de Protocolo: Versión 2, 27/12/2018.

Centro investigación: Dpto. Bioquímica Clínica e Inmunología. Facultad Farmacia, Universidad de Concepción. Investigador responsable: Dra. Liliana Lamperti F.

Iniciales del participante.....



DURACIÓN ESPERADA

La investigación tendrá una duración aproximada de 12 meses en total. El reclutamiento será desde los meses de enero de 2019 hasta 31 diciembre de 2019 y sus resultados se entregarán en marzo de 2020.

BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACION

Si usted decide participar voluntariamente, no tendrá ningún cambio en su tratamiento ni en la atención que recibe durante su hospitalización. Ud. conocerá los resultados de esta investigación a través de su médico tratante y podrá consultar todas las dudas que tenga las veces que sea necesario con su médico o el investigador responsable.

No existe ningún riesgo para la salud, ya que en este estudio se realizará la toma de muestra durante los procedimientos clínicos propios de la atención del cuadro de IAM.

La toma de muestra de sangre se realizará por una enfermera con sistema de tubos llenados al vacío y aguja estéril, por punción en la vena de su brazo. El trombo se recolectará del procedimiento de angioplastia como parte de material biológico de desecho.

RESPONSABILIDADES DEL SUJETO

Usted no tendrá ningún tipo de responsabilidad con el estudio. Su única responsabilidad será informar si es que decide dejar de participar en la investigación informando al investigador principal, Liliana Lamperti a su correo electrónico o teléfono celular.

TERMINO ANTICIPADO

Usted no está obligado a ser parte de esta investigación si no desea hacerlo. Puede suspender su participación en el estudio en cualquier momento que quiera y eso no le afectará en ningún aspecto. Es su elección y todos sus derechos serán respetados.

COMPENSACIÓN

La utilización de la muestra analizada no será causal de compensación económica. Así mismo, siendo voluntaria su participación, los pacientes no recibirán pago por participar en este estudio.

CONFIDENCIALIDAD

Este estudio es totalmente confidencial, es decir, no se utilizarán sus datos personales, sólo se accederá a datos de la ficha clínica relacionados sólo con el IAM y esto lo realizará su médico tratante. El investigador responsable velará por la confidencialidad, manteniendo los datos clínicos, los resultados de las variaciones del gen LOX-1 y los análisis del trombo, en un lugar privado, en una planilla Excel en el computador de la investigadora principal en Facultad de Farmacia, donde su identificación personal será reemplazada por un código numérico interno que sólo conocerá el investigador responsable. Todas las muestras serán procesadas con este código y nunca aparecerá su nombre mencionado en presentaciones de estos resultados en congresos o en publicaciones. Este estudio tendrá la aprobación del Comité Ético Científico del Servicio de Salud Concepción.

Versión y fecha de Protocolo: Versión 2, 27/12/2018.

Centro investigación: Dpto. Bioquímica Clínica e Inmunología. Facultad Farmacia, Universidad de Concepción. Investigador responsable: Dra. Liliana Lamperti F.

Iniciales del participante.....



UNIVERSIDAD ACREDITADA
6 AÑOS | HASTA NOVIEMBRE 2022
DOCENCIA PREGRADO - DOCENCIA POSTGRADO
INVESTIGACIÓN - VINCULACIÓN CON EL MEDIO
GESTIÓN INSTITUCIONAL



COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

Una vez terminado el plazo completo de la investigación, para el caso de los pacientes, se ingresará a su ficha clínica un informe con los resultados de la evaluación genética. Los datos obtenidos se utilizarán sólo para efectos del estudio y además de difusión científica de los resultados, ya sea en congresos o publicaciones.

SEGUROS

No se considerará ningún tipo de seguro asociado al estudio.

PATOLOGIAS GES

En esta investigación no se administrará ningún fármaco ni se modificará la terapia para IAM. Tampoco se verán afectadas las prestaciones GES/AUGE a las que usted tiene derecho. Su atención y controles en el Policlínico de Cardiología del Hospital Guillermo Grant Benavente no se verán afectados de ninguna manera por la participación en el estudio.

CONTACTO PARA EMERGENCIAS/CONTACTO CON CEC

Si Ud. desea tener más información o aclarar sus dudas con los responsables de esta Investigación, los datos son los siguientes:

- Dra. Liliana Lamperti, Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción. Teléfono 41-2203858, celular 76343016, e-mail: llampert@udec.cl
- Dr. Jorge Gajardo Navarrete, Departamento de Medicina Interna, Facultad de Medicina, Universidad de Concepción. Teléfono 968469192, e-mail: jgncardio@gmail.com
- Lic. Paola Lagos Muñoz., Nut., candidata a Magister en Bioquímica Clínica e Inmunología, Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción. Teléfono 41-2207196, celular 931341078, e-mail: paolalagos@udec.cl

Para las preguntas relacionadas con los derechos como sujeto de investigación, o quejas relacionadas con el estudio de investigación, incluir datos de contacto del CEC: Dra. María Antonia Bidegain S., Presidente del Comité Ético Científico del Servicio de Salud Concepción, ubicado en San Martín 1436, Concepción, al teléfono 41 - 2722745.

Versión y fecha de Protocolo: Versión 2, 27/12/2018.

Centro investigación: Dpto. Bioquímica Clínica e Inmunología. Facultad Farmacia,
Universidad de Concepción. Investigador responsable: Dra. Liliana Lamperti F.

Iniciales del participante.....

**HOJA DE FIRMAS CONSENTIMIENTO INFORMADO
PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE INFARTO AGUDO AL MIOCARDIO**

**TITULO DEL ESTUDIO: "VARIANTES DEL GEN *LOX-1* EN EL INFARTO
AGUDO DEL MIOCARDIO CON SUPRADESIVEL DEL SEGMENTO ST"**

He leído la información proporcionada anteriormente por escrito en este documento. He tenido la oportunidad de preguntar sobre ella y se me ha contestado satisfactoriamente las preguntas que he realizado. Consiento libre y voluntariamente ser parte de esta investigación como participante y entiendo que tengo el derecho de retirarme de la investigación en cualquier momento, sin que me afecte en ninguna manera mi calidad de persona natural. Declaro que se me ha entregado una copia firmada y fechada de este documento.

Procedimiento a realizar: Toma de muestra sanguínea y trombo

Nombre del participante (en letra imprenta)	Firma del participante	Fecha de la firma (DD/MM/AAAA)
---	------------------------	--------------------------------

Yo, el que suscribe, Dr Jorge Gajardo Navarrete, confirmo que he entregado verbalmente la información necesaria acerca del estudio, que he contestado toda duda adicional y que no ejercí presión alguna para que el participante ingrese al estudio.

Declaro que procedí en completo acuerdo con los principios éticos descritos en las Directrices de GCP (Buenas Prácticas Clínicas) y otras leyes nacionales e internacionales vigentes.

Se le proporcionará al voluntario una copia de esta información escrita y de la hoja de firmas del consentimiento firmado.

Nombre de la persona que solicita el consentimiento (en letra imprenta)	Firma del solicitante	Fecha de la firma (DD/MM/AAAA)
---	-----------------------	--------------------------------

Nombre del encargado de la institución	Firma del encargado de la institución	Fecha de la firma (DD/MM/AAAA)
--	---------------------------------------	--------------------------------

Versión y fecha de Protocolo: Versión 2, 27/12/2018.
Centro investigación: Dpto. Bioquímica Clínica e Inmunología. Facultad Farmacia,
Universidad de Concepción. Investigador responsable: Dra. Liliana Lamperti F.
Iniciales del participante.....

15.Anexo-2

15.1.Manejo de residuos biológicos.

Los residuos generados por esta investigación pueden ser clasificados según MATPEL en:

- Residuo biológico (tipo 1): corresponden solo a tejidos humanos, restos de tejidos humanos, materiales contaminados con fluidos humanos (sangre, orina) y restos de animales contaminados con bacterias o virus patógenos.
- Residuo cortopunzante biológico (tipo 2): corresponden a materiales cortopunzantes (agujas, lancetas, hojas de bisturí, escalpelos) que se han utilizado con fluidos y tejidos humanos o en disecciones de animales contaminados con bacterias o virus patógenos.
- Residuo inerte: corresponde a material de vidrio de laboratorio, como probetas, matraces, vasos de precipitado, papel absorbente, guantes, puntas de pipetas u otros materiales plásticos, todo utilizados en forma exclusiva en los laboratorios.

Y según indica MATPEL estos deben ser almacenados en una zona de almacenamiento temporal de residuos peligrosos, en un lugar de fácil acceso y que no afecte a la seguridad del laboratorio. Serán almacenados en envases proporcionados por RESPEL, se deberán etiquetar correctamente. Los residuos tipo 1 deberán ser almacenados en bolsas amarillas a temperaturas inferiores a 4°C y los residuos tipo 2 en cajas amarillas también a temperaturas inferiores a 4°C, de acuerdo al decreto N°6 /2009 del “Reglamento sobre Manejo de Residuos de Establecimientos de Atención de Salud (REAS)”.

Los residuos inertes correspondientes a vidrios deben almacenarse en contenedores de 4, 8 o 25 kg de capacidad, sin bolsa. Deben ser entregados con sus tapas originales de manera de evitar riesgos por dispersión del residuo. Se debe gestionar el retiro mensual con la unidad RESPEL por medio del llenado de formulario presente en la página web.