

# Expresión diferencial de proteínas de monocitos circulantes en el síndrome coronario agudo mediante análisis proteómico

## *Protein expression of circulating monocytes in acute coronary syndrome: a proteomic analysis*

Barderas M. G., Durán M. C., Dardé V. M., Lázaro A., Gallego-Delgado J., de la Cuesta F., Martín-Ventura J. L., Jiménez-Nacher J. J., Tuñón J., López Bescós L., Egido J., Vivanco F.

---

### RESUMEN

Los síndromes coronarios agudos (SCA) se deben a la trombosis de una lesión aterosclerótica. En los últimos años han existido avances en el conocimiento de su fisiopatología, involucrándose en ella a diversos fenómenos biológicos, como la inflamación y la apoptosis. En este trabajo estudiamos los mapas de expresión de proteínas totales de monocitos circulantes de pacientes con SCA, en los que se observa la expresión diferencial de algunas proteínas en comparación con controles sanos. La identificación de proteínas de monocitos que ven alterada su expresión en pacientes con SCA abre un amplio campo de investigación a la hora de establecer nuevas dianas diagnósticas y terapéuticas.

**Palabras clave:** Síndrome coronario agudo, monocitos, análisis proteómico.

Expresión diferencial de proteínas de monocitos circulantes en el síndrome coronario agudo mediante análisis proteómico  
Barderas M. G., Durán M. C., Dardé V. M., Lázaro A., Gallego-Delgado J., de la Cuesta F., Martín-Ventura J. L., Jiménez-Nacher J. J., Tuñón J., López Bescós L., Egido J., Vivanco F.

*Investigación Cardiovascular*, 2005; 8: 43-56

### Correspondencia / correspondence:

Dr. Fernando Vivanco  
Departamento de Inmunología.  
Fundación Jiménez Díaz.  
Avda Reyes Católicos 2.  
28040 Madrid  
e-mail: fvivanco@fjd.es

---

### ABSTRACT

Acute coronary syndromes (ACS) are attributable to coronary artery occlusion secondary to thrombus formation over an atherosclerotic lesion. Recent studies have contributed to understand the physiopathology of ACS, including several biological processes such as inflammation and apoptosis.

The present study investigates the protein expression maps of mononuclear cells from patients with ACS, and aims to identify proteins whose expression is altered in monocytes in comparison to healthy controls. This technique for the identification of monocyte proteins with altered expression in patients with ACS opens new perspectives for research, with the definition of new potential diagnostic markers and therapeutic targets.

**Key words:** Acute coronary syndromes, monocytes, proteomic analysis.

Protein expression of circulating monocytes in acute coronary syndrome: a proteomic analysis

Barderas M. G., Durán M. C., Dardé V. M., Lázaro A., Gallego-Delgado J., de la Cuesta F., Martín-Ventura J. L., Jiménez-Nacher J. J., Tuñón J., López Bescós L., Egido J., Vivanco F.

*Investigación Cardiovascular*, 2005; 8: 43-56

---

## INTRODUCCIÓN

Los síndromes coronarios agudos (SCA), como el infarto de miocardio y la angina inestable, son los principales responsables de mortalidad por cardiopatía isquémica. (1). Estos síndromes se deben a la oclusión de una arteria coronaria al formarse el trombo sobre la lesión aterosclerótica (2). La causa más frecuente de esta trombosis es la formación de una fisura en la cápsula fibrosa de las lesiones ateroscleróticas facilitando que la sangre entre en contacto con su núcleo lipídico, de contenido altamente trombogénico (3).

En los últimos años, el estudio de los mecanismos que llevan a la trombosis de la placa ha sido uno de los temas claves en la investigación cardiovascular. Se han invocado varios procesos biológicos como causantes de este fenómeno. Un ejemplo sería la apoptosis (muerte celular programada), que podría favorecer la rotura de la placa, y ulterior trombosis, reduciendo el número de células musculares lisas que componen la cápsula fibrosa (4). Sin embargo, el mecanismo al que se atribuye en mayor medida la complicación de placa es la inflamación. La hipótesis aceptada es que los monocitos circulantes penetran en las lesiones, en un proceso mediado por moléculas de adhesión (VCAM-1, ICAM-1 y P-selectina principalmente) y quimioattractantes, sobre todo MCP-1. Ya en el interior, se diferencian a macrófagos y degradan la matriz extracelular de la cápsula por secreción de enzimas proteolíticas, como las metaloproteinasas, debilitándola y facilitando su rotura por las fuerzas hemodinámicas a las que está sometida (5,6). Así, se ha establecido una clara relación entre la presencia de la actividad inflamatoria en las placas y la aparición de SCA (7,8), y nuestro grupo ha demostrado recientemente que las zonas de la placa más propensas a la rotura, esto es, la unión de la misma con la pared vascular normal, son las que tienen mayor actividad inflamatoria (9).

Es de interés que, de los diversos tipos de leucocitos, el monocito es el que más frecuentemente se infiltra en la pared vascular, y por tanto al que mayor papel se le atribuye en estos procesos. Es más, hay estudios que han mostrado que el análisis de diversos marcadores de inflamación en sangre es capaz de predecir en alguna medida el riesgo de eventos vasculares trombóticos agudos (10), o que los pacientes

## INTRODUCTION

*Acute coronary syndromes (ACS), such as myocardial infarction and unstable angina, are the main cause of death in patients with ischemic heart disease (1). These syndromes are the result of coronary artery occlusion secondary to thrombus formation over an atherosclerotic lesion or plaque (2). The most common cause of such thrombosis is the formation of a fissure within the fibrous capsule of the atherosclerotic lesion - thereby allowing blood to come into contact with the highly thrombogenic lipid core of the plaque (3).*

*In recent years, the mechanisms underlying atheroma plaque thrombosis have been a key subject in cardiovascular research. Different biological processes have been cited as causes of the phenomenon. An example is represented by apoptosis (i.e., programmed cell death), which could favor plaque rupture, and ulterior thrombosis - reducing the number of smooth muscle cells conforming the fibrous capsule (4). However, inflammation is the phenomenon most associated to atheroma plaque complication. The accepted hypothesis is that circulating monocytes penetrate these lesions in a process mediated by adhesion molecules (mainly VCAM-1, ICAM-1 and P-selectin) and chemoattractants - particularly MCP-1. Once within the atheroma lesion, the monocytes differentiate into macrophages and degrade the extracellular matrix of the capsule as a result of the secretion of proteolytic enzymes such as metalloproteinases - thereby weakening the capsule and facilitating its rupture by the existing hemodynamic forces (5,6). In this way, a clear relationship has been established between the presence of inflammatory activity within the atheroma plaque and the appearance of ACS (7,8). In this context, our group recently has demonstrated that the plaque area most vulnerable to rupture, i.e., its junction with the normal vascular wall, is where maximum inflammatory activity is found (9).*

*An interesting consideration is that monocytes are the leukocytic cells that most frequently infiltrate the vascular wall; consequently, they are considered to play a preponderant role in these processes. Furthermore, a number of studies have shown that the analysis of different inflammatory*

con SCA muestran una mayor actividad inflamatoria en células circulantes (11). Esto nos lleva a la hipótesis de que los monocitos circulantes podrían tener ya un grado de activación inflamatoria, protrombótica o de otro tipo antes de entrar en la pared vascular, y que éste vaya a determinar su comportamiento una vez dentro de ella.

Sin embargo, estos avances no son aún suficientes y seguimos sin conocer en profundidad la fisiopatología del SCA. Prueba de ello es que, a pesar de los modernos tratamientos, no hemos sido capaces de diseñar fármacos que eviten la mayor parte de estos cuadros. Uno de los problemas con los que se han encontrado las investigaciones realizadas hasta ahora en los SCA, radica en el hecho que se estudian las alteraciones de una ó un reducido número de proteína de cada vez. Sin embargo, los mecanismos de trombosis de la placa no forman una simple cadena de acontecimientos que se pueda interrumpir a un determinado nivel, sino que constituyen un entramado de moléculas con múltiples interacciones entre sí. Es decir, una proteína puede participar en el reclutamiento celular hacia la pared vascular, y al mismo tiempo regular la expresión de otras proteínas involucradas en este proceso que a su vez pueden tener efectos similares u opuestos a ella. Nuestro conocimiento del papel de los monocitos en el proceso aterosclerótico podría, por tanto, ser mejorado sustancialmente si averiguamos cuales son las proteínas totales que expresa (proteoma) e identificamos los cambios cuantitativos y cualitativos (modificaciones postraduccionales) que sufren.

En la actualidad el estudio de proteínas individuales, aún siendo esencial, ha sido desplazado por las estrategias proteómicas que permiten el estudio global de las proteínas utilizando la electroforesis bidimensional (2-DE) para su separación y la espectrometría de masas (EM) para su identificación (12-20). Además, la comparación con una base de datos informática de proteínas permite identificar aquellas que sean conocidas y analizar si su expresión está aumentada o disminuida en la patología que estemos estudiando, mientras que se obtiene información estructural de las no conocidas (12). El estudio de las proteínas aporta una gran ventaja frente al de genes (genómica), siendo ambos complementarios. Mientras que el genoma es comparativamente estático, su producto, el proteoma, es un con-

*markers in blood is able to estimate the risk of acute vascular thrombotic events (10) and of increased inflammatory activity in circulating cells among patients with ACS (11). These observations in turn have led to the hypothesis that circulating monocytes may already exhibit a degree of prothrombotic or other inflammatory activity before actual penetration into the vascular wall, and that such activity may determine the behavior of these cells once located within the wall.*

*However, these advances are still insufficient to ensure in-depth understanding of the physiopathology of ACS. Proof of this is afforded by the fact that despite the introduction of modern treatments, we are still unable to develop drugs capable of avoiding most of these clinical conditions. One of the problems facing research in the field of ACS is that alterations of only one or a few proteins are examined simultaneously. In this context, the mechanisms underlying plaque thrombosis do not constitute a simple chain of events that can be interrupted at a given point; rather, the phenomenon involves a whole set of molecules with multiple interactions among them. In other words, a given protein may contribute to cell recruitment towards the vascular wall, and at the same time may regulate the expression of other agonistic or antagonistic proteins implicated in this same process. Thus, our knowledge of the role of monocytes in atherosclerosis could be improved substantially by identifying the total proteins they express (i.e., their proteome), with determination of their quantitative and qualitative changes (post-translational modifications).*

*While still essential, the study of individual proteins has been displaced by proteomic strategies allowing global protein analysis based on two-dimensional electrophoresis (2-DE) to separate the proteins, and mass spectrometry (MS) to identify them (12-20). In addition, comparison with a computed protein database makes it possible to identify known proteins of the monocyte proteome and to determine whether their expression is increased or decreased within the context of the pathology being studied, while at the same time obtaining structural information on the unknown proteins (12). Protein studies offer an important advantage over gene*

junto muy dinámico, puesto que las proteínas de una célula dada, varían en función de los cambios en el entorno, su estado fisiológico, estrés, estímulos, etc. Así pues es fácil entender que para conocer a fondo una enfermedad, hay que averiguar que está ocurriendo con las proteínas.

Dado que disponemos de la tecnología adecuada, en el presente trabajo nuestro objetivo se centra en el estudio del proteoma del monocito circulante, para identificar el perfil de las proteínas que podría tener alterada su expresión en estas células, en pacientes con SCA. Dada la gran importancia que tiene esta célula en la progresión y la complicación de la placa de aterosclerosis, es de esperar que el estudio de su proteoma aporte importantes claves a la fisiopatología de los SCA.

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

### Selección de pacientes, toma de muestras y aislamiento de monocitos

La selección de pacientes, con sus datos clínicos y demográficos del estudio, así como el aislamiento de monocitos fue descrita en detalle por González-Barderas *et al.* (21, 33).

A los pacientes con Síndrome coronario agudo (SCA) sin ascenso de segmento ST en el electrocardiograma sin onda Q y que ingresaban en la Fundación Hospital de Alcorcón se les propuso su inclusión en el estudio a su llegada a Urgencias. En caso de aceptar, se les extraía 30 ml de sangre para el análisis de monocitos y plasma en ese momento y al 4º día del ingreso. El tiempo transcurrido desde el comienzo de la sintomatología que motivó el ingreso y la extracción fue de  $14 \pm 5,5$  horas.

Además se extrajo sangre a diez sujetos sanos con edades similares que sirvieron como controles.

Estas muestras fueron analizadas mediante proteómica y sus resultados se compararon con un grupo de individuos sanos sin diferencias significativas de edad y sexo.

### Electroforesis bidimensional (2-DE).

Todos los reactivos y aparatos utilizados para el desarrollo de estas técnicas se describieron en

*analysis (genomic studies), though both approaches are complementary. Thus, while the genome is comparatively static, its product (i.e., the proteome) is highly dynamic – since the proteins of a given cell vary according to the existing environmental conditions, physiological conditions, stress, stimuli, etc. It is therefore easy to understand that in-depth knowledge of a disease requires detailed information on events occurring at protein level.*

*Since the required technology is available, the present study focuses on the analysis of the circulating monocyte proteome, with the aim of identifying the characteristics of proteins that may show altered expression in these cells, in patients with ACS. In view of the great importance of monocytes in atherosclerosis plaque progression and complication, the study of the proteome of this cell type may be expected to yield important information on the pathophysiology of ACS.*

## MATERIALS AND METHODS

---

### *Patient selection, sample collection and monocyte isolation*

*The selection of patients, with their clinical and demographic characteristics, as well as the isolation of monocytes, has been described in detail by González-Barderas *et al.* (21,33).*

*Patients presenting non-Q wave ACS without ST-segment elevation on the electrocardiographic tracing, and who were admitted to the Fundación Hospital de Alcorcón, were invited to participate in the study upon arrival in the Emergency Department. Thirty millilitres of blood for monocyte and plasma analysis was collected from the patients who agreed to participate, upon admission and again four days later. The time elapsed between onset of the symptoms giving rise to admission and initial blood sampling was  $14 \pm 5.5$  hours.*

*Blood was also collected from 10 age-matched healthy subjects that were used as controls.*

*These samples were subjected to proteomic analysis, and the results were compared with those of a group of healthy individuals without significant differences in terms of age and sex distribution.*

detalle en publicaciones anteriores (21,22). Los monocitos aislados y solubilizados se resuspendieron en tampón de rehidratación (21) y se añadió el agente reductor TBP (BIORAD) y anfólitos (BIORAD) (21), para llevar a cabo la primera dimensión se utilizaron tiras de poliacrilamida en gradiente inmovilizado a pH 4-7 y 17 cm de longitud (BIORAD). El isoelectroenfoque (IEF) se desarrolló horizontalmente y a una temperatura constante de 20°C siguiendo el programa descrito por M. González-Barderas et al. (21).

Una vez finalizado el IEF se realiza el equilibrado de las tiras (21) y la reducción y alquilación de las proteínas, para favorecer el paso de las proteínas de dichas tiras a los geles SDS-PAGE (segunda dimensión) que separarán las proteínas por su masa molecular (Mr).

Finalizada la segunda dimensión los geles se tiñeron con plata utilizando el KIT Silver staining protein with Ampholine PAGplate de Pharmacia Biotech, o con Azul Coomassie de BIORAD, siguiendo en ambos casos las indicaciones descritas por las casas comerciales.

### Análisis informático

Una vez teñidos los geles se digitalizaron utilizando el escáner DuoScan (AGFA) a una resolución de 150 dpi (píxeles por pulgada). Los patrones o perfiles proteicos obtenidos de los geles bidimensionales, se analizaron cuantitativamente usando el programa PDQuest 2-D software V 6.2.1 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Se crearon imágenes consenso de los geles comparando las manchas de cuatro geles distintos (n=4) por cada uno de los grupos analizados, y tomando las manchas comunes a todos ellos. Para compensar los posibles errores introducidos durante la carga proteica y en el desarrollo de la tinción de plata entre los geles, los niveles de intensidad de cada proteína (mancha) se normalizaron expresando la intensidad de cada proteína como la proporción respecto a la intensidad total de todas las proteínas presentes en el gel. Los valores medios y los coeficientes de variación de los puntos de diferencia (en expresión o presencia/ausencia) fueron calculados con el mismo programa. Las coordenadas fueron expresadas en relación a un punto de referencia en cada gel de dos dimensiones. Mediante la utilización del mismo programa se llevó a cabo la caracterización y posición de los puntos respecto a su pl y Mr.

### Two-dimensional electrophoresis (2-DE)

*All reagents and equipment used for the study techniques have been described in detail elsewhere (21,22). The isolated and solubilized monocytes were resuspended in rehydration buffer (21), followed by the addition of TBP reducing agent (BIORAD) and ampholytes (BIORAD) (21). The first dimension was run using polyacrylamide strips in immobilized gradient at pH 4-7 and measuring 17 cm in length (BIORAD). The isoelectric focusing point (IEF) was developed horizontally at a constant temperature of 20°C, based on the program described by González-Barderas et al. (21).*

*Following IEF completion, strip equilibration was carried out (21), together with protein reduction and alkylation to favor protein transfer from the strips to SDS-PAGE gels (second dimension) for protein separation according to molecular mass (MW).*

*Following the second dimension run, the gels were silver-stained using the Silver Staining Protein with Ampholine PAGplate kit (Pharmacia Biotech), or the Coomassie Blue spot from BIORAD – in both cases following the instructions of the manufacturer.*

### Computed analysis

*Digitalization was carried out following gel staining, using a DuoScan scanner (AGFA) with a resolution of 150 dpi (dots per inch). The 2-DE protein profiles or standards obtained were subjected to quantitative analysis using PDQuest 2-D version 6.2.1 software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Consensus images of the gels were developed comparing the spots of four different gels (n = 4) for each of the groups analyzed, and using the spots common to all of them. As compensation for the possible errors introduced during protein loading and silver staining between gels, the intensity levels of each protein (spot) were normalized with respect to the total intensity of all proteins present in the gel. The mean values and coefficients of variation (CV) of the points of difference (in expression or presence/absence) were calculated using the same software. The coordinates were expressed in relation to a reference point in each two-dimensional gel. The same software was used to characterize and position the points with respect to isoelectric point (pl) and MW.*

## Huella peptídica

Las manchas de interés se cortaron de los geles y se digirieron siguiendo el protocolo descrito por Durán *et al.* (22). La enzima utilizada fue tripsina porcina modificada (Promega, Southampton, UK) (20 mL a 12 ng mL<sup>-1</sup> en hidrógeno carbonato amónico 25 mM). Terminada la digestión se recuperaron los péptidos resultantes y se liofilizaron para después reconstituirlos en 10 µL de 0.1% TFA/ 33% acetonitrilo. El extracto reconstituido (0.5 µL) se mezcló con 0.5 mL de matriz (10 mg/µL de ácido hidroxicinámico-4-ciano en 0.1% TFA/ 50% acetonitrilo), se depositó en la placa del espectrómetro y se secó a temperatura ambiente. La espectrometría de masas de cada una de las muestras se llevó a cabo utilizando un espectrómetro de masas Voyager DE-STR (MALDI-TOF) (PerSeptive Biosystems) (MALDI: matrix assisted laser desorption ionization; TOF: time of flight) (23,24). La ionización se logra mezclando los péptidos con compuestos orgánicos (denominado matriz), que cristalizan fácilmente atrapando a los péptidos en el cristal. Al someter los cristales a un pulso (de nanosegundos) de un laser, se vaporizan los péptidos y se ionizan (adquieren una carga positiva) (25). Estos se aceleran, mediante un fuerte campo eléctrico (20-25 kV) y son dirigidos entonces a un tubo de vuelo (el analizador de masas; de unos 3 m), en cuyo extremo se sitúa el detector de iones. Los péptidos más pequeños vuelan más rápido que los de mayor masa, y se detectan en orden creciente de sus masas. El resultado es la representación de la intensidad frente a la masa (en realidad *m/z*) de cada péptido, o espectro de masas. El conjunto de las masas de los péptidos procedentes de una proteína dada (su espectro), proporciona una huella dactilar peptídica ("fingerprinting"). Una vez procesados los espectros, se extrajo la lista de péptidos propios de cada mancha, para posteriormente obtener las identificaciones en las bases de datos Mascot y Profound (26,27) ambas disponibles vía WWW. El resto de los parámetros se estudiaron con la utilización de los programas SWISS-PROT y el NCBI. La acetilación del extremo N-terminal, alquilación de cisteínas por carbamidación, metilación, oxidación de metioninas etc., se consideran como modificaciones posibles.

## Peptide mapping

*The spots of interest were excised from the gels and subjected to digestion according to the protocol described by Durán et al. (22). Modified porcine trypsin (Promega, Southampton, UK) was the enzyme used (20 ml at a concentration of 12 ng ml<sup>-1</sup> in ammonium bicarbonate 25 mM). Following digestion, the resulting peptides were recovered and lyophilized for subsequent reconstitution in 10 ml of 0.1% TFA/33% acetonitrile. The reconstituted extract (0.5 ml) was mixed with 0.5 ml of matrix (10 mg/ml of 4-a-cyano hydroxycinnamic acid in 0.1% TFA/50% acetonitrile), placed in the spectrometer plate and dried at room temperature. Mass spectrometry of each sample was carried out using a Voyager DE-STR (MALDI-TOF) mass spectrometer (PerSeptive Biosystems (MALDI: matrix-assisted laser desorption ionization; TOF: time of flight) (23,24). Ionization is achieved mixing the peptides with organic compounds (matrix) that easily crystallize, entrapping the peptides within the crystal structure. Upon subjecting the latter to a laser pulse with a duration in the nanoseconds range, the peptides are vaporized and ionized (acquiring a positive charge) (25). These ions are then accelerated by a potent electric field (20-25 kV) into a flight tube (the mass analyzer, measuring some 3 m in length), with an ion detector located at the end of the latter. Smaller ions exhibit a shorter time of flight than larger ions, and are detected in increasing order of mass. The result is a representation of the intensity versus mass (in fact *m/z*) of each peptide, or its mass spectrum. The set of masses of the peptides from a given protein (i.e., the spectrum of the latter) provides a peptide "finger print". Following processing of the spectra, the list of peptides intrinsic to each electrophoretic spot was extracted – after which identification was carried out based on the Mascot and Profound databases (26,27) (both available on the internet). The rest of parameters were studied using SWISS-PROT and NCBI software. Acetylation of the N-terminal end, cysteine alkylation via carbamidation, methylation, oxidation of methionine, etc., were regarded as possible modifications.*

## RESULTADOS

En anteriores trabajos (21,22), nuestro laboratorio puso a punto la obtención de monocitos circulantes a partir de sangre periférica con una pureza aproximada del 98%, teniendo en cuenta la eliminación de algunos factores críticos para el análisis proteómico, como por ejemplo la presencia de albúmina y de ácidos nucleicos. También se llevó a cabo la realización de geles bidimensionales a diferentes intervalos de pH (4-7, 3-10, 6-9, 6-11).

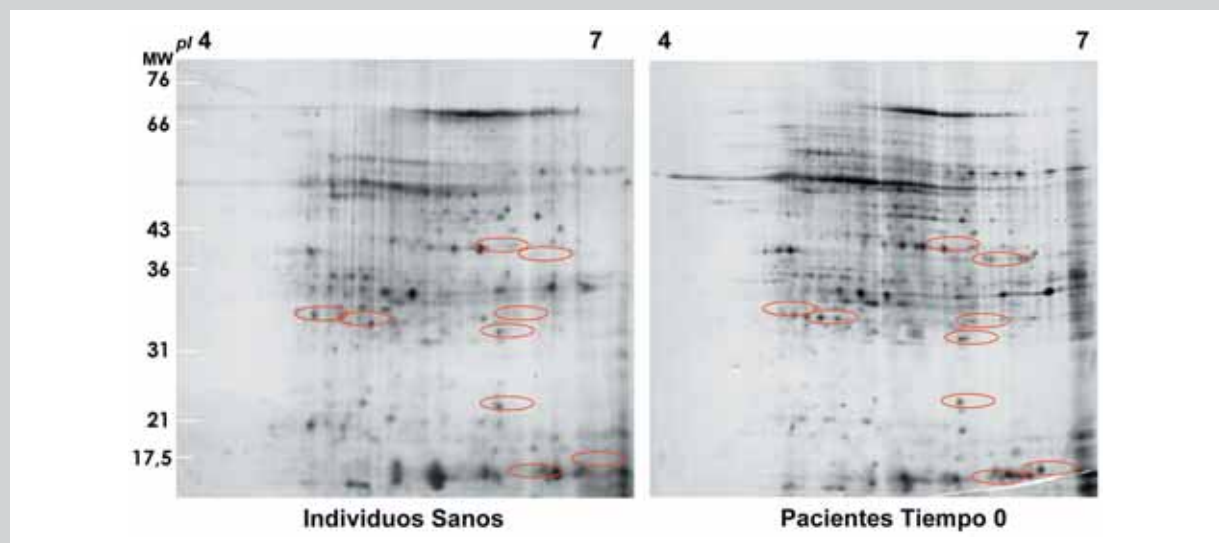
La expansión de una región del gradiente de pH, por ejemplo 4-7, produce un incremento de la resolución notable en los geles 2-D. Sin embargo, las proteínas con un *pI* fuera de ese intervalo de pH no son detectadas y se acumulan en los extremos del gel. Por este motivo, y tras realizar los geles bidimensionales en los diferentes rangos de pH (21), comprobamos en cual de ellos se detectaban más manchas proteicas. En nuestro caso se seleccionó el intervalo de pH 4-7 para llevar a cabo el estudio comparativo (paciente/sano) de las muestras de monocitos circulantes obtenidas (figura 1), dado que consigue

## RESULTS

In earlier studies (21,22), our laboratory developed a procedure for obtaining monocytes from peripheral blood with a purity of approximately 98% - taking into account the elimination of certain factors critical to proteomic analysis, such as for example the presence of albumin and nucleic acids. Two-dimensional electrophoresis was also carried out at different pH intervals (4-7, 3-10, 6-9, 6-11).

The expansion of a region of the pH gradient, for example 4-7, results in a marked increase in 2-DE resolution. However, the proteins with a *pI* outside this pH range are not detected, and accumulate at the ends of the gel. For this reason, and after performing 2-DE in the different pH ranges (21), we investigated which range could determine most protein spots. In our case the selected pH range was 4-7 for the comparative study (patient/control) of the circulating monocyte samples obtained (Figure 1), since about 1000 spots were obtained with great resolution and reproducibility. Some of the differential spots

**Figura 1.** Geles bidimensionales de proteínas de monocitos obtenidos a partir de paciente con SCA tiempo cero (derecha de la imagen) y de individuo sano utilizado como control (izquierda de la imagen). Se usaron IPGs de 17cm y pH 4-7. Las segundas dimensiones se realizaron en geles SDS-PGE al 12%, los valores de la masa molecular están expresados en kDa (MW). Se cargaron 200mg de proteína total en cada gel. Los puntos de proteínas rodeados por un círculo muestran las diferencias de expresión de dichas proteínas.



**Figure 1.** Two-dimensional gel electrophoresis of monocytes collected at time zero from a patient with acute coronary syndrome (right of figure) and from a healthy control (left of figure). Immobilized pH gradients (IPG) measuring 17 cm were used in the pH range 4-7. The second dimensions were run in 12% SDS-PGE; molecular weight (MW) is expressed in kDa. An amount equivalent to 200 mg of total protein was loaded in each gel. The protein points contained within a circle correspond to differences in expression of these molecules.

detectar, con gran resolución y reproducibilidad, unas 1000 manchas. En dicha figura se marcan alguna de las manchas de diferencia resultantes del análisis de imagen de los geles (paciente tiempo cero/sano). Puede observarse como algunas proteínas están ausentes o se expresan con diferente intensidad (aumenta o disminuye su expresión en pacientes) en uno de los geles. Se obtuvieron geles similares de pacientes tiempo 4/sanos (no se presentan), presentando el mismo patrón de expresión de proteínas, con variación de intensidad de expresión en algunas de ellas y con la presencia o ausencia de otras.

El análisis informático de los geles detectó 746 manchas en el caso del estudio comparativo de monocitos de pacientes con SCA extraídos al ingreso (tiempo 0) frente a los sujetos sanos, con una alteración en 26 manchas. Los datos correspondientes a los monocitos de SCA extraídos el 4º día (tiempo 4) frente a sujetos sanos, mostraron 749 manchas, de las que 18 presentaban alteraciones (Tabla 1).

La Figura 2 nos muestra los mismos resultados obtenidos con el programa informático PDQuest, con relación a las variaciones de expresión de las proteínas en los diferentes estudios comparativos realizados (paciente tiempo 0/sano, paciente tiempo 4/sano). Las manchas con diferencias de expresión significativas presentaban diferentes comportamientos (presencia/ausencia, aumento/disminución de la expresión) comparando siempre individuos sanos con pacientes.

Tras realizar el análisis informático se procedió al digerido de las muestras que presentaban variaciones significativas entre los individuos sanos y los pacientes, y a su posterior identificación (Tabla 2). Algunas de las proteínas identificadas están implicadas en procesos de estrés oxidativo (Hsp 70) en eliminación de radicales

*resulting from the gel imaging analysis (patient time zero/control) appear marked in the figure. It is seen that some proteins are absent or are expressed with different intensity (increased or decreased expression in patients) in one of the gels. Similar patient time 4/control gels were obtained (data not shown), exhibiting the same protein expression patterns, with variation in the intensity of expression in some cases, and with the presence or absence of expression of other proteins.*

*Computed analysis of the gels detected 746 spots in the case of the comparative monocyte study of patients with ACS involving blood sampling upon admission (time zero) versus the healthy controls, with an alteration in 26 spots. The comparative data corresponding to the monocytes from patients with ACS extracted on day 4 after hospital admission (time 4) versus the controls yielded 749 spots – of which 18 presented alterations (Table 1).*

*Figure 2 shows the same results obtained with PDQuest software, in relation to the variations in protein expression in the different comparative studies made (patient time 0/control, patient time 4/control). The spots with significant expression differences showed different behaviors (presence/absence, increase/decrease in expression) – in all cases contrasting patients with ACS and healthy controls.*

*Following the computed analysis, the samples showing significant variations between patients and controls were digested and subjected to identification (Table 2). Some of the proteins identified are implicated in oxidative stress phenomena (Hsp 70), or in the elimination of toxic radicals, while others*

**TABLA I. Variaciones significativas y no significativas del estudio comparativo realizado entre pacientes tiempo 0/sanos y pacientes tiempo 4/sanos, obtenidas a partir del análisis informático mediante la utilización del programa PDQuest 2-D software V 6.2.1 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).**

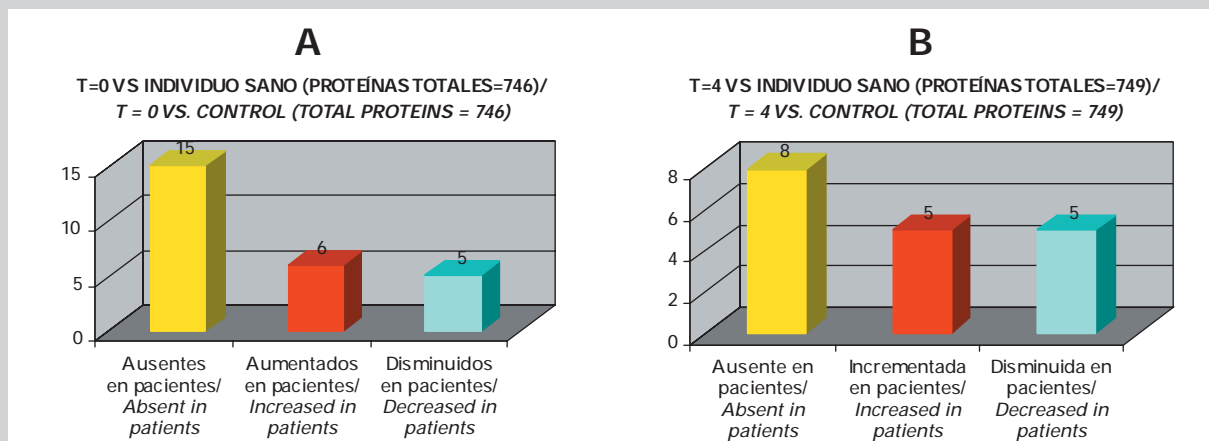
**TABLE I. Significant and nonsignificant variations in the comparative study between patients and controls at time zero and four days after admission, based on computed analysis using PDQuest 2-D version 6.2.1 software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).**

	Variación de las manchas (proteínas)/ <i>Variation in spots (proteins)</i>	Manchas (proteínas) significativas/ <i>Significant spots (proteins)</i>	
T=0 vs individuo sano	253	26	T=0 vs control
T=4 vs individuo sano	118	18	T=4 vs control



**Figura 2.** Variaciones de expresión de las proteínas de monocitos circulantes humanos.

El análisis se realizó utilizando el programa informático PDQuest 2-D software V 6.2.1 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). **A.**- Al comparar pacientes tiempo 0 con sanos se observa que 15 manchas proteicas no están presentes en los pacientes, 6 presentan aumento en la expresión y 5 están disminuidas con respecto a los sanos. **B.**- En la comparación de paciente tiempo 4 con sanos desaparecen 8 manchas en pacientes, 5 están aumentadas y 5 disminuidas en sus niveles de expresión.



**Figure 2.** Variations in protein expression of human circulating monocytes. The analysis was carried out using PDQuest 2-D version 6.2.1 software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). **A.**- On contrasting patients and controls at time zero, 15 protein spots were found to be missing in the patients, while 6 showed an increase in expression and 5 a decrease versus the controls. **B.**- On contrasting patients and controls four days after admission, 8 spots were seen to have disappeared among the former, while 5 showed an increase in expression and 5 a decrease versus the controls.

tóxicos, proteínas transportadoras como la albúmina etc., lo que parece indicar que estas rutas, fundamentales en el metabolismo de los macrófagos, están afectadas en los monocitos de pacientes con SCA. Sin embargo, hemos identificado también otras proteínas como la ubiquitina, que está implicada en mecanismos de degradación proteica, cuyo papel global parece más difícil de interpretar.

Para aclarar los mecanismos en los que participan esta y otras proteínas cuya expresión está alterada, y que aún no se han identificado, será necesaria la realización de otro tipo de ensayos de tipo funcional, con los que conoceremos aquellos procesos que pueden estar desregulados en los monocitos de pacientes con SCA.

La identificación del total de proteínas en cuya expresión hemos detectado alteraciones es una línea de investigación en marcha que nos dará una visión más integrada de los mecanismos implicados en la producción de los SCA.

## DISCUSIÓN

Diversos estudios han demostrado que los monocitos participan a lo largo de los procesos

constitute transporter proteins such as albumin, etc. This appears to indicate that these routes, which are fundamental to macrophage metabolism, are affected in monocytes of patients diagnosed with ACS. However, we also identified other proteins such as ubiquitin, which is implicated in protein degradation mechanisms, and whose global role appears more difficult to interpret.

To clarify the mechanisms in which this and other still unidentified proteins with altered expression are involved, other functional type assay techniques would be required. Such studies could serve to define the processes that may be deregulated in monocytes of patients with ACS.

Identification of the total proteins showing alterations in expression constitutes an ongoing line of research that will afford a more integrated perspective of the mechanisms giving rise to acute coronary syndromes.

## DISCUSSION

Different studies have shown monocytes to participate in the initiation, formation,

**TABLA II.** Proteínas identificadas mediante espectrometría de masas utilizando un espectrómetro de masas Voyager DE-STR (MALDI-TOF), para obtener la huella peptídica. A continuación se extrajo la lista de péptidos propios de cada mancha, para posteriormente obtener las identificaciones en las bases de datos Mascot y Profound, ambas disponibles vía WWW. En la tabla aparecen señalados el SSP- "spot number" que es el número que el programa informático PDQuest 2-D software adjudica a esa mancha proteica en concreto por su fácil localización en el gel en caso de interés. En la tabla también se indica el comportamiento que presenta cada mancha. El término "ausente en pacientes" indica que esa mancha proteica en cuestión no se expresa en pacientes a tiempo 0 o en pacientes a tiempo 4. Con el término "no diferencias" se indica que no hay diferencias de expresión en esa mancha proteica entre los pacientes y los individuos sanos. "S>P" hace referencia a la mayor expresión de la mancha proteica en individuos sano comparado con los pacientes.

**TABLE I.** Proteins identified by mass spectroscopy, using a Voyager DE-STR mass spectrometer (MALDI-TOF) for peptide mapping. The list of peptides corresponding to each spot was then determined, followed by identification of the molecules using the Mascot and Profound databases (available on the internet). The table shows the spot number (SSP), i.e., the number assigned by the PDQuest 2-D program to the protein spot in question, to facilitate its location in the gel. The table also reports the behavior of each spot. The term "absent in patients" means that the protein in question is not expressed in patients at either time zero or four days after admission. The term "no differences" means that there are no differences in expression between patients and controls for that spot. "Control>P" in turn implies increased spot protein expression versus the patients with acute coronary syndrome.

Proteína/ Protein	SSP/ SSP	T=0 vs sanos/ T=0 vs controls	T=4 vs sanos/ T=4 vs controls
Hsp 70/ Hsp 70	2402 2403	Ausente en pacientes/ Absent in patients	No diferencias/ No differences
RNA binding regulatory subunit oncogen DJ1/ RNA binding regulatory subunit oncogene DJ1	3104 7208	Ausente en pacientes/ Absent in patients	Ausente en pacientes/ Absent in patients
Albumina/ Albumin	3916	Ausente en pacientes/ Absent in patients	Ausente en pacientes/ Absent in patients
Ubiquitin/ Ubiquitin	5206	Ausente en pacientes/ Absent in patients	Sano>P/ Control>P
S100 Calcium binding protein A8/ S100 Calcium binding protein A8	8006	Ausente en pacientes/ Absent in patients	No diferencias/ No differences
Chain a endonuclease/ Chain a endonuclease	7405	Ausente en pacientes/ Absent in patients	Ausente en pacientes/ Absent in patients

de iniciación, formación, desarrollo y rotura de la placa de ateroma (28). El reciente desarrollo de técnicas proteómicas permite el estudio global del conjunto de las proteínas de una célula, tejido o fluido biológico pudiéndose aplicar estas técnicas al estudio de diversos componentes de los monocitos (moléculas de superficie, rutas de señalización, factores de transcripción, etc.). El proteoma de los diferentes elementos celulares de las arterias normales o patológicas es aún bastante desconocido aunque recientemente McGregor y colaboradores (29) ya han descrito

*development and rupture of atheroma plaques (28). The recent development of proteomic techniques has made it possible to study the global proteins of a cell, tissue or biological fluid, and these techniques can be applied to analyze different monocyte components (surface molecules, signaling pathways, transcription factors, etc.). The proteome of the different cell elements of normal or diseased arteries largely remains to be defined, though recently McGregor et al. (29) have published the protein map of*

el mapa proteico de células del músculo liso de la vena safena humana.

Nuestro grupo viene trabajando en el estudio proteómico de los monocitos durante el proceso aterosclerótico con el fin de identificar las alteraciones proteicas que puedan caracterizar a dichas células de los pacientes con SCA. En el presente trabajo mostramos, por primera vez, que el patrón de proteínas expresadas por monocitos circulantes humanos de pacientes con SCA presentan algunas proteínas diferencialmente expresadas. Aunque es posible que muchas de estas proteínas sean una mera consecuencia de un proceso trombótico, otras pueden estar implicadas en otro tipo de situaciones. La variación en la expresión de proteínas de un individuo sano con respecto a un paciente, puede ser debida a ausencia a aumento o disminución de la expresión de dicha proteína. Estas proteínas podrían servirnos como posibles dianas terapéuticas siempre y cuando desempeñen funciones de interés o estén implicadas en procesos importantes. Así pues, hemos observado que al comparar geles 2DE de pacientes SCA a tiempo cero con individuos sanos, de 746 manchas estudiadas, 26 presentan alterada su expresión. Cuando la comparación se realiza entre pacientes con SCA 4 días después del evento con individuos sanos, de 749 manchas analizadas, 18 presentan diferencias en la expresión. Estas proteínas alteradas pueden presentar un incremento o disminución en los niveles de expresión y en algunas ocasiones pueden llegar incluso a desaparecer (no se expresan) en pacientes con SCA. Dada la dificultad del análisis de los geles de pH 3-10 por la gran cantidad de manchas que aparecen, y tal y como se ha explicado en el apartado anterior, centramos el estudio en el rango de pH 4-7 donde se detectaban alrededor de 1000 manchas proteicas.

El conocimiento de los mecanismos por los cuales se produce el SCA se verá muy favorecido por la identificación de las proteínas mediante espectrometría de masas, ya que una vez que conozcamos cuales son será más fácil establecer nuevas dianas potenciales, y tendremos un mejor conocimiento de dicha enfermedad.

Entre las manchas identificadas hasta el momento destaca una proteína de la familia de las S100, de unión a calcio, presente en cerebro, músculo estriado, corazón y riñón. Esta proteína está presente en monocitos de individuos sanos, y no aparece en monocitos de individuos que han sufrido un SCA, pudiendo utili-

*human saphenous vein smooth muscle cells.*

*Our group has been working on the proteome of monocytes in the context of atherosclerosis with the aim of identifying the protein alterations that may characterize these cells in patients with ACS. The present study for the first time shows that the proteome of circulating monocytes in patients with ACS comprises the differential expression of certain proteins. Although it is possible that many of these proteins are simply a consequence of the thrombotic process, others may be implicated in other types of situations. Variation in protein expression in a healthy individual versus an ill patient may be due to the absence, increase or decrease in the expression of specific proteins. The latter could in turn serve as potential therapeutic targets, provided they are implicated in functions or processes of importance. Thus, on comparing the 2-DE gels of patients with ACS versus healthy controls at time zero (i.e., upon admission to hospital), it was seen that of the 746 electrophoretic spots studied, 26 showed alterations in expression. On establishing the comparison between patients and controls four days after the cardiovascular event, we found that of the 749 spots analyzed, 18 exhibited differences in expression. These protein alterations may comprise an increase or decrease in expression, and in some cases the expression of specific proteins may disappear entirely in patients with ACS. Considering the difficulty of gel analysis in the pH range 3-10, because of the many spots produced, we centered our study on the pH range 4-7 (as explained above) – in which some 1000 protein spots were identified.*

*Knowledge of the mechanisms underlying the development of ACS will be greatly improved by mass spectrometric identification of the proteins, since this will allow us to define new potential targets.*

*Among the spots identified to date, mention should be made of a protein belonging to the family of protein S-100, which binds to calcium and is found in brain, skeletal muscle, the heart and kidneys. This protein is present in monocytes of healthy individuals but not in monocytes of patients who have suffered ACS. As a result, it could be used as a possible marker of myocardial damage produced by hypoxia. We are*

zarse, debido a este motivo, como un posible marcador del daño miocárdico producido por hipoxia, actualmente estamos verificando estas hipótesis, pero con anterioridad, se ha publicado que es un marcador potencial del daño cerebral, durante los periodos de hipoxia (30,31).

También hemos identificado la Hsp70, que se ha detectado en células eucariotas y procariotas. Su síntesis está aumentada en procesos de estrés y de infección. Se sabe que está implicada en procesos de protección, probablemente debido a su función como molécula chaperona (32). Actualmente estamos verificando estos resultados mediante otras técnicas (inmunodetección, ELISA etc.) y evaluando la presencia de algunas de estas proteínas en plasma y en placas de aterosclerosis.

Un aspecto del presente trabajo que invita a la especulación es si la expresión diferencial de algunas proteínas, como la S100 o la HSP 70, en los monocitos circulantes de los pacientes con SCA en comparación con los controles, implica o supone que los monocitos circulantes de los pacientes están de alguna manera "activados". Es obvio que el patrón diferencial de las proteínas expresadas indica que el estado de los monocitos de los pacientes es distinto del de los controles. Cuando se hayan identificado todas o un mayor número, las proteínas alteradas podrían definir un perfil característico y ver su posible relación con la patología. Por ejemplo, podrían ser células que expresan un mayor número de proteínas de manera que faciliten su entrada en zonas lesionadas del endotelio. O que estuviesen secretando algunas de las proteínas sobreexpresadas en plasma o en la placa de aterosclerosis (enzimas, por ejemplo que afectan a la estabilidad de la placa, como las MMP). Es bien conocido que la diferenciación del monocito a células dendríticas implica la expresión de una serie de proteínas características del proceso. Es razonable que existan también un conjunto de proteínas que "específicamente" caractericen a los monocitos circulantes de estos pacientes. Por otro lado la identificación de un perfil o patrón característico de proteínas expresadas en los monocitos de los pacientes con SCA apoyaría en el concepto de "paciente vulnerable" y no solo de placa vulnerable, si los monocitos que expresen ese perfil realmente suponen un mayor riesgo de sufrir un SCA. Algunas estrategias experimentales para

*presently examining this hypothesis, though earlier studies have reported the molecule to be a potential marker of brain damage during periods of hypoxia (30,31).*

*We have also identified Hsp 70, which has been detected in eukaryotic and prokaryotic cells, and is known to be increased in stress and infection. This molecule has been implicated in protection processes – probably as a result of its function as a chaperone (32). At present we are verifying these results by means of other techniques (immunodetection, ELISA, etc.), and are examining the presence of some of these proteins in plasma and atherosclerosis plaques.*

*A question raised by the present study and that provides room for speculation is whether the differential expression of certain proteins (e.g., S-100 or Hsp 70) in the circulating monocytes of patients with ACS versus healthy controls implies that the monocytes among the former subjects are "activated" in some way. It is clear that the differential pattern of expressed proteins reflects differences in monocyte status between patients and controls. Once all or at least a larger number of these molecules have been identified, the altered proteins could define characteristic profiles; research could then focus on their possible relation to the existing background pathology. For example, such cells could increase the expression of certain proteins that facilitate monocyte penetration into damaged regions of the vascular endothelium. Alternatively, the cells may secrete certain over-expressed proteins into the surrounding plasma or atherosclerosis plaque (including enzymes such as those that affect plaque stability, e.g., matrix metalloproteinases, MMP). It is well known that monocyte differentiation into dendritic cells implies the expression of a series of proteins. It seems reasonable to assume that a set of proteins also "specifically" characterizes the circulating monocytes of these patients. On the other hand, the identification of a characteristic profile or pattern of proteins expressed by the monocytes of individuals with ACS would support the concept of "vulnerable patients" – not only the idea of "vulnerable plaques" – if the identified profile effectively implies an increased risk of suffering ACS. Some experimental strategies designed to clarify these possibilities are*

aclarar estas posibilidades se están estudiando actualmente en nuestro laboratorio.

Por último, reseñar que la identificación de las proteínas cuyos niveles están alterados, aportará una nueva visión de los mecanismos moleculares del SCA. Además, es de esperar que alguna de las proteínas identificadas pudiera utilizarse como marcador de riesgo en la enfermedad cardiovascular.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado en parte por una beca de la Fundación Mapfre Medicina. Sociedad Española de Cardiología. Pfizer España.

currently being implemented in our laboratory.

Lastly, it should be pointed out that the identification of proteins with altered levels of expression will provide further insight to the molecular mechanisms underlying ACS. Moreover, it is to be expected that some of the identified proteins could be used as risk markers for cardiovascular disease.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been supported in part by a grant from the Fundación Mapfre Medicina. Sociedad Española de Cardiología. Pfizer España.

## BIBLIOGRAFÍA/REFERENCES

1. FUSTER V., BADIMON L., BADIMON J.J., CHESEBRO J.H., The pathogenesis of coronary disease and the acute coronary syndromes. *N. Engl. J. Med.* 1992; 326:242-250.
2. FALK E., SHAH P.K., FUSTER V., Pathogenesis of plaque disruption. En: Fuster V, Ross R and Topol E.J., editors. *Atherosclerosis and coronary disease*. Philadelphia, Lippincott-Raven, 1996: 491-507.
3. VAN DER WALL A.C., BECKER A.E., VAN DER LOSS C.M. *et al.* Site of initial rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation*, 1994; 89: 36-44.
4. LIBBY P, EGAN D, SKARLATOS S. Roles of infectious agents in atherosclerosis and restenosis. An assessment of the evidence and need for future research. *Circulation* 1997; 96: 4095-4103.
5. BAURIEDEL G., HUNTTTER R., WELSCH U, BACH R. *et al.*, Role of smooth muscle cell death in advanced coronary primary lesions: implications for plaque instability. *Cardiovasc Res.*, 1999; 41: 480-488.
6. MALLAT Z., BENEDICTE H., OHAN J., *et al.*, Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques. A role for apoptosis in the plaque thrombogenicity. *Circulation*, 1999; 99: 348-353.
7. MORENO P. R., FALK E., PALACIOS I. F., *et al.*, Macrophage infiltration in acute coronary syndromes: implication for plaque rupture. *Circulation*, 1994; 90: 775-778.
8. MATRISISAN L. M., The matrix degrading metalloproteinases. *BioEssays*, 1992; 14: 455-463.
9. MARTÍN-VENTURA J. L., BLANCO-COLIO L. M., MUNOZ-GARCÍA B., *et al.* NF-kappaB activation and Fas ligand overexpression in blood and plaques of patients with carotid atherosclerosis: potential implication in plaque instability. *Stroke* 2004; 35: 458-63.
10. LIBBY P, RIDKER P. M. Inflammation and atherosclerosis: role of C-reactive protein in risk assessment. *Am J Med* 2004; 116 (Suppl 6A): 9S-16S.
11. RITCHIE M. E. Nuclear factor-kappaB is selectively and markedly activated in humans with unstable angina pectoris. *Circulation* 1998; 98: 1707-13.
12. ANDERSON L., MATHESON A., STEINER S. Proteomics: applications in basic and applied biology. *Curr Opin in Biotechnol*; 2000, 11: 408-412.
13. LÓPEZ M. F. Better approaches to finding the needle in haystack: optimising proteome analysis through automation. *Electrophoresis* 2000; 21: 1082-1093.
14. RABILLOUD T. Proteome research: two dimensional gel electrophoresis and identification methods. *Springer Verlag*, Berlin 2000; 248.
15. FENYÓ D. Identifying the proteome: software tools. *Curr Opin Biotechnol* 2000; 11: 391-395.
16. PATTERSON S. D. Proteomics: The industrialization of protein chemistry. *Curr. Opin Biotechnol.* 2000; 11: 413-418.
17. CHEVALIER S., MACDONALD N., TONGE R., RAYNER S., ROWLINSON R., SHAW J., DAVIDSON M., ROBERTS R. A. Proteomic analysis of differential protein expression in primary hepatocytes induced EGF, tumor necrosis factor alpha or the peroxisome proliferator nafenopin. *Eur J Biochem.* 2000; 267: 4624-34
18. LÓPEZ M. F., Proteomic databases: roadmaps for drug discovery. *Am J Clin Lab* 1998; 17: 16-18.
19. RABILLOUD T. Detecting proteins separated by 2-D gel electrophoresis. *Anal Chem.* 2000 Jan 1; 72 (1): 48A-55A.

20. BLACKSOTOCK W. P., WEIR M. P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol* 1999; 17: 121-127.
21. GONZÁLEZ-BARDERAS M, GALLEGO-DELGADO J.; MAS S., DURÁN M. C; LÁZARO A.; HERNÁNDEZ-MÉRIDA S.; EGIDO J.; VIVANCO F. Isolation of circulating human monocytes with high purity for proteomic análisis. *Proteomics* 2004, 4, 432-437.
22. DURÁN M. C., MAS S., MARTÍN-VENTURA J. L., MEILHAC O., BAPTISTE MICHEL J., LÁZARO A., TUÑÓN J., EGIDO J., VIVANCO F. Proteomic análisis of human vessels: application to atherosclerotic plaques. *Proteomics* 2003, 3, 973-978.
23. HOFFMAN E, STROOBANT V. (eds.). Time of flight analyzers. Mass spectrometry. *Principles and applications*. Second Edition, 2003, p. 89-100, Wiley, N. York, USA.
24. COTTER R. Time of flight mass spectrometry for the structural analysis of biological molecules. *Anal Chem*. 1992; 64: 1027-1039.
25. KARAS M, GLÜCKMANN M, SCHAFFER J. Ionization in matrix assisted laser desorption/ionisation: singly charged molecular ions are the lucky survivors. *J Mass Spectrom* 2000; 35: 1-12.
26. ZHANG W. CHAIT B. T. ProFound: an expert system for protein identification using mass spectrometric peptide mapping information. *Anal. Chem*. 2000, 72, 2482-2489.
27. PERKINS D. N., PAPPIN D. J., CREASSY D. M., COTRELL J. S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 1999, 20, 3551-3567.
28. OSTERUD B., and BOJORKLID E. Role of monocytes in Atherogenesis. *Physiol Rev*. 2003. vol 83, 1069-1112.
29. MCGREGOR E., KEMPSTER L, WAIT R., WELSON S. Identification and mapping of human saphenous vein medial smooth muscle proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Proteomics*, 2001, 1, 1405-1414.
30. FAGNART O. C., SINDIC C. J. M., LATERRE C. Particle counting immunoassay of S100 protein in serum. Possible relevance in tumors and ischemic disorders of the central nervous system. *Clin Chem*. 1988, 1387-1391.
31. INGEBRIGSTENT. and ROMER B. Serial S100 protein serum measurements related to early magnetic resonance imaging after minor head injury. *J Neurosurg* 1996, 61, 88-92.
32. JULIAN G. G. KIANG and GEORGE C. TOSCOS. Heat Shock Protein 70 kDa: Molecular Biology Biochemistry and Phisyology. *Pharmacol Ther*. 1998. 80, 183-201.
33. M. G. BARDERAS, J. GALLEGO-DELGADO, M. C. DURÁN, A. LÁZARO, S. HERNÁNDEZ-MÉRIDA, S. MAS, J. J. JIMÉNEZ-NACHER, J. TUÑÓN, L. LÓPEZ-BESCÓS; J. EGIDO, F. VIVANCO. Análisis proteómico de monocitos circulantes humanos. *Aplicación a pacientes con síndrome coronario agudo- Investigación cardiovascular*. 2004. 7, 1-18