



TESIS DOCTORAL

Estudio de viabilidad y eficacia de diferentes vías de inoculación de células madre multipotenciales en la regeneración del infarto agudo en un modelo experimental porcino

Belén Moreno Naranjo

Departamento de Medicina Animal, Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura

Conformidad de los Directores:

Fdo. Dr. Francisco Miguel Sánchez
Margallo

Fdo. Dra. Idoia Díaz-Güemes
Martín-Portugués

Fdo. Dra. Verónica Crisóstomo
Ayala

2015

“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad”.

Albert Einstein

A mis padres, GRACIAS por vuestro apoyo, vuestra ayuda y vuestra paciencia. Pero sobre todo GRACIAS por enseñarme que con la constancia y el trabajo se puede llegar allí donde uno quiere, sois un ejemplo a seguir.

A mi hermana, por su ayuda durante estos años (tu ya sabes con qué) y a mis sobrinos por enseñarme a apreciar las pequeñas cosas que hacen la vida más fácil.

Agradecimientos

Al Dr. Francisco Miguel Sánchez Margallo, por la confianza depositada en mí, por su ayuda en la realización de la tesis y por sus consejos.

A la Dra. Idoia Díaz-Güemes Martín-Portugués, por su confianza y por su ayuda en la elaboración de esta tesis.

A la Dra. Verónica Crisóstomo Ayala, por su ayuda a la hora de realizar la tesis y por escucharme y animarme cuando la luz al final del túnel se alejaba.

Al Prof. Jesús Usón Gargallo, por la confianza y el cariño que me ha demostrado todos estos años.

Al Dr. Jesús Usón Casás, por todo lo que me ha enseñado y por la confianza demostrada.

A la unidad de laparoscopia, por su ayuda todos estos años, especialmente a Silvia, Fran y a Miguel, no solo por ser los mejores compañeros de trabajo sino también por su amistad.

A los técnicos de anestesia (Sara, Patri, Irene y David), por todas las horas de trabajo y por el esfuerzo que dedicaron durante la fase experimental de este estudio. Fueron muchas horas de trabajo pero el esfuerzo desembocó en una bonita amistad.

A los técnicos de quirófano, por su trabajo en la fase experimental de este trabajo. Especialmente a Helena (H) por su tesón y gran profesionalidad.

A Claudia Báez, por todas las horas de trabajo que dedicó durante la creación de los modelos.

A Juan Maestre, por su gran aportación y ayuda a este trabajo y por todos los buenos ratos que hemos compartido en la resonancia magnética que lo hicieron más llevadero.

A la unidad de terapia celular, por su ayuda y por todo lo que me enseñaron durante mi periodo de trabajo en el laboratorio.

Al servicio de animalario, por su trabajo y su ayuda durante el desarrollo de la fase clínica del estudio.

A la unidad de análisis clínicos, por su trabajo en la determinación de las muestras de sangre que realizamos durante el estudio.

A la unidad de informática, imagen y comunicaciones, por su paciencia y su ayuda durante la elaboración del documento. Especialmente a Nuria González y María Pérez, por su trabajo en la portada de esta Tesis.

Al servicio de mantenimiento, por su dedicación durante la realización de este trabajo.

A Anabel, por escucharme y servirme de apoyo estos años.

A Javier Sánchez, por su ayuda y sus ánimos mientras escribía el documento.

A Fernanda Carrizosa, por su ayuda a la hora de obtener la bibliografía.

A mis amigas, gracias por estar siempre ahí, gracias por todos esos buenos ratos que hemos pasado juntas y que me han servido para recargar las pilas.

A Sara, Irene y Helena por esos pequeños ratos en el CCMIJU que hicieron más llevaderas tantas horas de trabajo y, sobre todo, por todos los momentos que hemos compartido fuera. Especialmente

VIII

a Sara, gracias por tu amistad y por compartir conmigo tantos ratos, unos mejores y otros peores, pero cada uno de ellos ha sido especial.

A mis chicos de Cáceres por aprovechar conmigo cada ratito de descanso durante estos años descubriendo nuevos sitios y disfrutando del aire libre.

Y, en general, a todo el personal del Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón porque de alguna u otra manera este trabajo tiene un poquito de todos ellos.

MUCHAS GRACIAS A TODOS

Abreviaturas

| | |
|--|--|
| (ACD) arteria coronaria derecha | (IAMSEST) infarto agudo de miocardio sin elevación del segmento ST |
| (ACC) American College of Cardiology | (IM) infarto de miocardio |
| (ACI) arteria coronaria izquierda | (Kg) kilogramos |
| (ACx) arteria circunfleja | (L) litros |
| (AD) aurícula derecha | (LAD) arteria descendente anterior |
| (AI) aurícula izquierda | (mg) miligramos |
| (B.O.E.) Boletín Oficial del Estado | (ml) mililitros |
| (cm) centímetros | (mmol) milimoles |
| (BSA) body surface area | (MSC) células madre mesenquimales |
| (CCMIJU) Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón | (n) número de animales |
| (CKMB) porción MB de la creatinina quinasa | (n/a) no aplicable |
| (CMI) cirugía de mínima invasión | (OMS) Organización Mundial de la Salud |
| (cTn) troponina cardiaca | (OTW) over the wire |
| (DMEM) Dulbecco's modified Eagle's Medium | (PLVI) pared libre del ventrículo izquierdo |
| (ECG) electrocardiograma | (RCP) reanimación cardiopulmonar |
| (ECV) enfermedades cardiovasculares | (R.D.) Real Decreto |
| (FE) fracción de eyección | (RM) resonancia magnética |
| (ESC) European Society of Cardiology | (s) segundo |
| (<i>et al.</i>) et alii | (SC) stem cells |
| (etc.) etcétera | (SD) desviación típica de la media |
| (F) French | (Sig.) nivel de significación estadística |
| (FBS) suero fetal bovino | (SIV) septo interventricular |
| (FV) fibrilación ventricular | (SSF) suero salino fisiológico |
| (g) gramos | (TC) terapia celular |
| (h) hora | (TnI) isoenzima troponina I |
| (H-E) Hematoxilina-Eoxina | (TnT) isoenzima troponina T |
| (IAM) infarto agudo de miocardio | (TCM) Tricrómico de Masson |
| (IAMCEST) infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST | (UI) Unidades Internacionales |
| | (UEx) Universidad de Extremadura |

x

(VD) ventrículo derecho
(VI) ventrículo izquierdo

(VFD) volumen final diastólico
(VFS) volumen final sistólico

Índice

| | |
|---|----|
| INTRODUCCIÓN | |
| Hipótesis y objetivos | 2 |
| REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA | |
| Sistema Cardiovascular | 3 |
| Anatomía cardiaca humana | 3 |
| Sistema de conducción | 3 |
| Riego del corazón | 4 |
| Ciclo cardiaco | 4 |
| Infarto de miocardio | 5 |
| Definición y fisiopatología | 6 |
| Criterios diagnósticos | 6 |
| Biomarcadores | 7 |
| Electrocardiografía | 8 |
| Técnicas de imagen | 8 |
| Tratamiento | 8 |
| Terapia celular | 10 |
| Vías de administración | 11 |
| Modelos experimentales | 13 |
| Especie porcina. Diferencias y similitudes con el ser humano | 14 |
| Modelos de infarto de miocardio | 16 |
| Modelos endovasculares | 16 |
| Modelos quirúrgicos | 16 |
| MATERIAL Y MÉTODO | |
| Material | 19 |
| Material anestésico, quirúrgico, de diagnóstico por imagen y de laboratorio | 19 |
| Sujetos de estudio | 20 |
| Método | 20 |
| Justificación del método | 20 |
| Planteamiento experimental | 21 |
| Grupos de estudio | 21 |

| | |
|---|-----|
| Fases de estudio | 21 |
| Metodología | 22 |
| Cultivo celular | 22 |
| Procedimiento quirúrgico | 23 |
| Diagnóstico por imagen | 28 |
| Técnicas de laboratorio | 29 |
| Parámetros evaluados | 29 |
| Fin de estudio | 32 |
| Análisis estadístico | 32 |
| RESULTADOS | |
| Caracterización del modelo | 33 |
| Electrocardiograma | 33 |
| Enzimas cardíacas | 34 |
| Funcionalidad cardíaca | 34 |
| Evaluación de seguridad | 36 |
| Complicaciones perioperatorias | 36 |
| Complicaciones postoperatorias | 36 |
| Periodo de recuperación | 37 |
| Estado general de los sujetos de estudio | 37 |
| Tiempos quirúrgicos | 37 |
| Evaluación de la eficacia | 38 |
| Estudio comparativo entre fases | 38 |
| Administración intracoronaria | 38 |
| Administración intrapericárdica | 40 |
| Administración intramiocárdica | 42 |
| Estudio comparativo de los grupos tratados con células | 45 |
| DISCUSIÓN | 55 |
| CONCLUSIONES | 73 |
| RESUMEN | 75 |
| SUMMARY | 77 |
| BIBLIOGRAFÍA | 79 |
| ANEXOS | |
| Resultados del estudio de funcionalidad por resonancia magnética | 89 |
| Resultados del estudio de funcionalidad por ecocardiografía | 95 |
| Trabajos más relevantes del doctorando relacionados con la temática de la tesis | 101 |

Introducción

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) constituyen, en la actualidad, el factor de riesgo más importante para la salud. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la isquemia cardiaca es la causa predominante de morbilidad y mortalidad en esta patología, y se estima que en el año 2030 será la principal causa de muerte en la sociedad occidental (OMS, 2015).

El desarrollo de marcadores bioquímicos y de técnicas de diagnóstico por imagen más sensibles y específicas, unido a una mejora en el manejo de los pacientes que han sufrido un infarto, ha repercutido favorablemente en el tratamiento de la isquemia cardiaca, reduciendo la lesión y necrosis del miocardio (Thygesen K, 2012). A pesar de ello, la presencia y el grado de cicatrización miocárdica predisponen a la remodelación desfavorable y progresiva del ventrículo izquierdo, a la insuficiencia cardiaca y a la muerte súbita (Lee ST, 2011; Makkar RR, 2012).

En los últimos años, las estrategias en el manejo de esta patología van dirigidas a evitar el remodelado ventricular tratando de reducir la cicatriz mediante la estimulación del crecimiento del músculo cardiaco sano con la ayuda de la terapia celular (TC). Así, los resultados iniciales derivados del uso de células madre han supuesto un cierto optimismo, lo cual ha desembocado en un aumento exponencial de las investigaciones desarrolladas en torno a la terapia celular (Ostadal B, 2009; Lee ST, 2011).

Sin embargo, a pesar de llevar más de una década ejecutando ensayos clínicos encaminados a la terapia regenerativa cardiaca, este ambicioso objetivo sigue siendo difícil de alcanzar debido al gran número de factores que llegan a intervenir (Makkar RR, 2012).

El éxito de la terapia celular depende, en gran medida, de una correcta entrega de las células en el área afectada por la isquemia, del número de células administradas y de la supervivencia de éstas a largo plazo (Quang TB, 2010). No obstante, mientras que la dosis y el tipo celular a emplear son unos factores ampliamente estudiados otros, como la vía de administración más adecuada, siguen generando dudas (Quang TB, 2010).

En este sentido, el uso de modelos experimentales ha contribuido enormemente en el desarrollo de estos estudios y, aunque no reproducen exactamente la patología que se encuentra en la clínica, permiten el desarrollo de ensayos terapéuticos preclínicos cuyo fin es evaluar novedosas terapias (Chorro FJ, 2009).

Respecto a los ensayos con animales, la mayor limitación que presentan son las diferencias anatómicas y fisiológicas existentes con respecto al ser humano. Por motivos económicos y por la elevada disponibilidad de cepas con deficiencias naturales o con mutación genética, muchas de estas investigaciones se han llevado a cabo en pequeños mamíferos (ratas, ratones y conejos). Sin embargo, la dificultad a la hora de extrapolar los resultados obtenidos al ser humano, debido principalmente a la diferencia de tamaño de la masa miocárdica, ha favorecido la utilización de especies animales de mayor tamaño (perro, oveja y cerdo). Entre estas últimas, las similitudes anatómicas y fisiológicas presentes en la especie porcina han hecho de ésta una de las más utilizadas en el ámbito de la investigación cardiovascular (Hughes HC, 1986, Suzuki Y, 2010; Cuellas-Ramón C, 2013).

Aunque se han descrito numerosos métodos para desarrollar el modelo de infarto de miocardio, el uso de técnicas de mínima invasión ha ido

reemplazando a los modelos quirúrgicos. Entre los primeros, destaca el modelo de isquemia-reperusión con balón de angioplastia que presenta una menor tasa de complicaciones postoperatorias y que permite controlar el tiempo de isquemia (Krombach GA, 2005; Cuellas-Ramón C, 2013).

A su vez, la toracoscopia ha adquirido importancia como abordaje mínimamente invasivo debido, principalmente, a los beneficios que aporta al paciente (incisiones más pequeñas, tiempo de recuperación menor, reducción del dolor postoperatorio, etc.). Tal ha sido su importancia, que no solo se ha utilizado en el ámbito de la patología cardiovascular para crear los modelos animales sino que se ha utilizado, en varias ocasiones, como método para la administración de las células en el área afectada por el infarto (Thompson RB, 2004; Williams AR, 2013).

Hipótesis y objetivos

Nuestra hipótesis de trabajo parte del hecho de que el uso de células madre en el tratamiento del infarto de miocardio puede ayudar a reducir el tamaño de la cicatriz y puede estimular el crecimiento de músculo cardiaco sano y funcional. Sin embargo, consideramos que el éxito es dependiente, en gran medida, de una

correcta entrega de las células en el área afectada por la isquemia.

En este sentido, creemos que el abordaje toracoscópico puede resultar útil para realizar una administración precisa de las células madre, además de ofrecer al paciente los beneficios propios de la cirugía mínimamente invasiva.

Con la finalidad de confirmar nuestra hipótesis, el presente trabajo tiene como objetivo principal comparar tres vías de inoculación de células madre heterólogas y comprobar qué método aporta mayores beneficios. Con este fin se evalúan la seguridad, la efectividad y la precisión a la hora de inocular las células.

Derivados del objetivo principal, se pueden distinguir los siguientes objetivos específicos:

- Determinar seguridad del abordaje toracoscópico como método de administración de células madre en las vías intrapericárdica e intramiocárdica.

- Estudio comparativo de la eficacia de diferentes vías de administración en el tratamiento del infarto de miocardio con células madre.

- Estudio comparativo de la seguridad en la implantación de células madre por diferentes vías de administración.

Revisión Bibliográfica

SISTEMA CARDIOVASCULAR

Anatomía cardiaca humana

El corazón es un órgano musculoso y hueco. Internamente está dividido en cuatro cavidades, dos receptoras de sangre, las aurículas, derecha e izquierda y dos eyectoras de sangre, los ventrículos, derecho e izquierdo (Figura 1).

Cada aurícula comunica con el ventrículo a través de un sistema valvular. Las válvulas cardiacas se sitúan en los orificios auriculoventriculares y arteriales; y solo permiten el flujo de sangre en una dirección. Se distinguen dos válvulas auriculoventriculares: la izquierda, válvula mitral o bicúspide, y la derecha o válvula tricúspide. Y dos válvulas semilunares: válvulas aórtica y del tronco pulmonar (Guyton AC, 1995; Lahera Juliá V y Garrido Astray C, 2009).

Las paredes del corazón están formadas por tres capas: interna o endocardio, media o miocardio y externa o epicardio (Guyton AC, 1995; Lahera Juliá V y Garrido Astray C, 2009).

- El *endocardio* tapiza las cavidades cardiacas y está en contacto directo con la sangre.

- El *miocardio* es la capa principal de la pared cardiaca, está formado por células musculares cardiacas y por tejido conjuntivo. A su vez, las células musculares se diferencian en tres tipos: 1. Los *cardiomiocitos* que son células cardiacas contráctiles. 2. Las *mioendocrinas* que son cardiomiocitos pobres en miofibrillas que segregan péptido natriurético auricular o cardionatrina (hormona que disminuye la presión arterial). 3. Las *cardionectrices* que forman el sistema de conducción del corazón.

El tejido conjuntivo del corazón se compone de dos formaciones: la red de tejido conjuntivo laxo, que rodea a las células musculares cardiacas y que contiene una red linfática y capilar, además

de fibras nerviosas vegetativas. Y el “esqueleto fibroso del corazón” que sirve de inserción al miocardio y a los velos valvulares.

- El *epicardio* es la capa visceral del pericardio seroso. Tapiza el exterior del corazón.

Sistema de conducción

El sistema de conducción está formado por células musculares cardiacas especializadas que inician y propagan el impulso nervioso. Estas células se encuentran agrupadas en las siguientes formaciones:

- *Nódulo sinoauricular o sinusal* (Keith y Flack). Se localiza en la desembocadura de la vena cava superior. Es el marcapasos del corazón. Desde aquí, el impulso cardiaco se extiende por las aurículas hacia el nódulo auriculoventricular.

- *Nódulo auriculoventricular* (Aschoff-Tawara). También localizado en la aurícula derecha, transmite el impulso hacia el fascículo auriculoventricular.

- *Fascículo auriculoventricular*. Se extiende desde el nódulo auriculoventricular hasta los músculos papilares. El Haz de His da lugar a las ramas derecha e izquierda que se extienden hacia los músculos papilares derechos e izquierdos, respectivamente. La red subendocárdica (ramificaciones de Purkinje) son numerosas ramificaciones procedentes de las ramas derecha e izquierda localizadas en las paredes de los ventrículos (Guyton AC, 1995; Lahera Juliá V y Garrido Astray C, 2009).

Riego del corazón

La irrigación procede de las arterias coronarias (Figura 1B), derecha e izquierda, y su drenaje se efectúa a través de las venas cardiacas (Guyton AC, 1995; Lahera Juliá V y Garrido Astray C, 2009).

La arteria coronaria izquierda (ACI) tiene su origen en el seno izquierdo de la aorta ascendente y se dirige entre el tronco pulmonar y la aurícula izquierda hasta alcanzar el surco coronario. Tras un corto trayecto se divide en dos ramas, la arteria descendente anterior (LAD) y la arteria circunfleja (ACx). La ACI irriga gran parte de la aurícula y el ventrículo izquierdos, la porción anterior del tabique interventricular, las dos ramas del fascículo de His y la red subendocárdica izquierda (Guyton AC, 1995; Lahera Juliá V y Garrido Astray C, 2009).

La arteria coronaria derecha (ACD) nace en el seno derecho de la aorta ascendente. Discurre por el surco coronario, donde emite ramas hacia la aurícula y el ventrículo. La rama ventricular de mayor calibre se denomina arteria marginal derecha que finaliza en la superficie diafragmática como arteria interventricular posterior. La ACD riega la aurícula derecha, el ventrículo derecho, la porción posterior del tabique interventricular, el nódulo sinusal, el nódulo auriculoventricular, el tronco del fascículo de His y la red subendocárdica derecha (Guyton AC, 1995; Lahera Juliá V y Garrido Astray C, 2009).

En el drenaje venoso del corazón participan el *seno coronario* que se sitúa en la porción posterior del surco coronario, las *venas cardiacas anteriores* que proceden de la parte anterior del VD y se abren directamente a la AD, y las *venas cardiacas mínimas* que drenan directamente en las cavidades cardiacas y están localizadas en las paredes de las aurículas.

Ciclo cardiaco

El ciclo cardiaco está formado por un periodo de relajación o diástole seguido de un periodo de contracción o sístole. La sístole y la diástole ocurren de forma alterna, lo que permite al corazón funcionar como bomba impulsora de sangre (Guyton AC, 1995; Lahera Juliá V y Garrido Astray C, 2009).

Desde el punto de vista ventricular, podemos dividir el ciclo cardiaco en cuatro fases: contracción isovolumétrica, eyección, relajación isovolumétrica y fase de llenado ventricular.

La contracción isovolumétrica se inicia con el ventrículo lleno y las válvulas mitral y aórtica cerradas, la cantidad de sangre que se halla en este momento en el interior del ventrículo

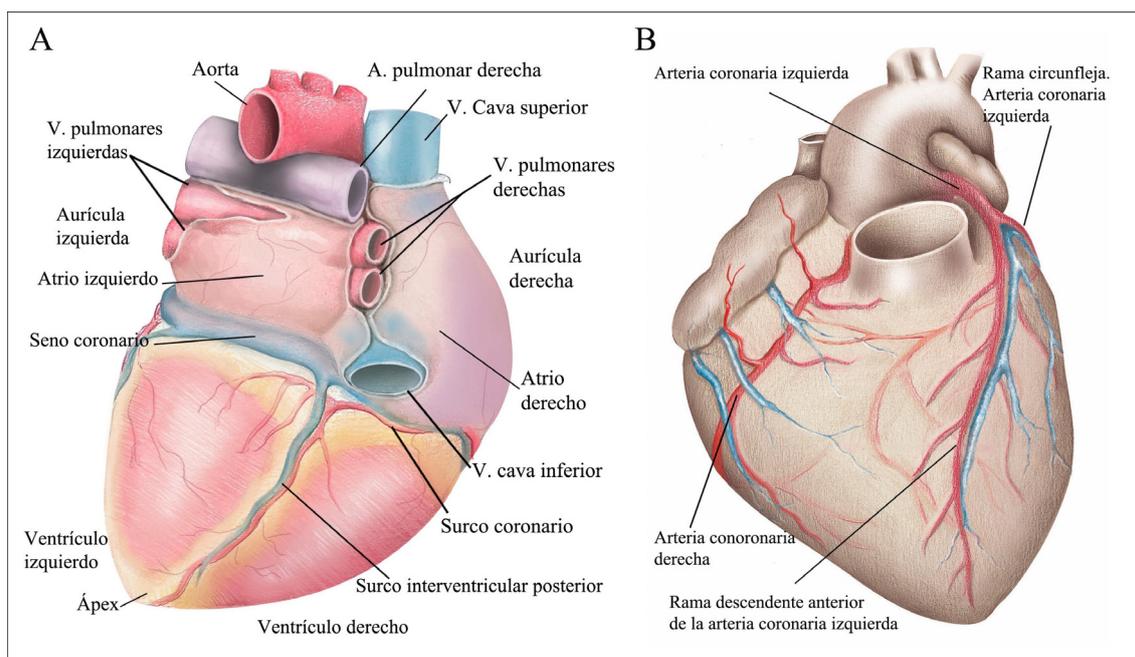


Figura 1. Anatomía del corazón humano. A. Vista posterior del corazón con las principales estructuras cardiacas. B. Vista anterior del corazón donde se observan las arterias coronarias derecha e izquierda y sus ramas.

corresponde al *volumen final diastólico* (VFD) que suele oscilar entre 110-130 ml.

A medida que se va acumulando sangre en el interior del ventrículo, la presión intraventricular va aumentando hasta ser superior a la de la aorta, en este momento la válvula aórtica se abre finalizando así la contracción isovolumétrica y comienza la fase de eyección. Por el contrario, cuando la sangre es expulsada del ventrículo la presión disminuye y cuando ésta es inferior a la presión en la aorta, la válvula se cierra (fin de la fase de eyección). En este momento, el ventrículo alberga una pequeña cantidad de sangre (unos 50 ml) que se corresponde con el *volumen final sistólico* (VFS). A continuación, se inicia la relajación isovolumétrica que da comienzo a la diástole ventricular. Durante esta fase la presión en el ventrículo izquierdo disminuye y, cuando ésta es inferior a la de la aurícula izquierda, se abre la válvula mitral y comienza el llenado ventricular.

La duración total del ciclo cardiaco está inversamente relacionada con la frecuencia cardiaca. Esto es, cuando ésta última aumenta la duración de cada ciclo disminuye.

Existen algunas diferencias entre el ciclo cardiaco en el corazón izquierdo y el derecho. Así, las presiones que se alcanzan en el ventrículo derecho (VD) son menores debido a que la resistencia del circuito arterial pulmonar es menor que la del sistémico. Además, las fases de relajación y contracción isovolumétricas son más cortas en el VD como consecuencia de un asincronismo en la apertura y el cierre de las válvulas del corazón derecho e izquierdo.

El corazón debe adaptar su rendimiento a los requisitos cambiantes de los órganos periféricos. Esto se lleva a cabo mediante la acción combinada de diferentes factores, los intrínsecos que afectan principalmente a la contractilidad y los extrínsecos que son factores de tipo nervioso o humoral.

En general, la activación del sistema nervioso simpático aumenta la frecuencia cardiaca y la contractilidad. Mientras que el sistema nervioso parasimpático reduce la frecuencia cardiaca y la fuerza de contracción.

La *frecuencia cardiaca* es el número de veces que se contrae el corazón en un minuto y el *volumen sistólico* se define como el volumen de sangre impulsado por el ventrículo izquierdo en cada latido.

La regulación humoral depende de la concentración sanguínea de iones calcio y potasio, entre otros, y de las catecolaminas circulantes (adrenalina, principalmente) y hormonas como la angiotensina II, la vasopresina o el péptido natriurético auricular.

Entre los parámetros indicadores de un correcto funcionamiento del ciclo cardiaco destacan: el gasto cardiaco, el volumen de eyección y la fracción de eyección.

La capacidad del corazón para bombear a los tejidos periféricos la cantidad de sangre necesaria viene indicada por el *gasto cardiaco*. Se define como el volumen de sangre expulsado por cada ventrículo en un minuto y resulta del producto del volumen sistólico por la frecuencia cardiaca.

El volumen de eyección es igual a la diferencia entre el volumen final diastólico (VFD) y el volumen final sistólico (VFS). El VFD depende del tiempo y de la presión de llenado ventricular, la distensibilidad del miocardio y la contracción auricular. Y, a su vez, el tiempo de llenado depende de la frecuencia. El VFS se ve afectado por la fuerza de la contracción miocárdica y la poscarga.

La *fracción de eyección* (FE) es el parámetro con mayor valor pronóstico a corto y largo plazo para los pacientes con cardiopatía. No depende sólo de la contractilidad miocárdica, sino también de la precarga y la poscarga, así como de la frecuencia cardiaca y la sincronía de la contracción. Este índice se define como el cociente entre el volumen sistólico y el VFD, expresado en tanto por ciento (Guyton AC, 1995; Lahera Juliá V y Garrido Astray C, 2009).

INFARTO DE MIOCARDIO

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de defunción en todo el mundo, afectando por igual a hombres y mujeres

(Organización Mundial de la Salud -OMS-, 2015; Ferreira-González I, 2014; Marin F, 2014).

En el año 2008, el 30% de las muertes registradas en todo el mundo fueron debidas a ECV. De ellas, se estima que 7,3 millones fueron consecuencia de una patología coronaria y 6,2 millones debido a accidentes cerebrovasculares.

La OMS calcula que en el año 2030 el número de personas afectadas por este tipo de patologías ascenderá por encima de los 23,3 millones, por lo que se prevé que siga siendo la principal causa de muerte (OMS, 2015).

Concretamente en España, a pesar de que su incidencia se ha reducido en los últimos años, más de 3 de cada 10 fallecimientos se deben a las ECV. En particular, en el año 2009 las patologías isquémicas del corazón (infarto, angina de pecho, etc.) constituyeron la principal causa de fallecimiento con un total de 35.607 muertes (Informe de la Sociedad Española de Cardiología, 2009; Ferreira-González I, 2014; Marin F, 2014).

En las próximas décadas, el envejecimiento progresivo de la población occidental, unido a una dieta rica en grasas, al tabaco y al estilo de vida sedentario amenazan con elevar la prevalencia del infarto de miocardio (IM) a una verdadera epidemia en los países desarrollados (OMS, 2015).

El conjunto de estas enfermedades supone una pesada carga para la economía de los países derivada de los gastos de asistencia sanitaria y hospitalización (OMS, 2015). Sólo en Europa, el coste global de las ECV asciende a 196 billones de euros de los cuales, 60 billones están asociados a la cardiopatía isquémica (European Cardiovascular Disease Statistics, 2012; Ferreira-González I, 2014; Marin F, 2014).

Definición y fisiopatología

La cardiopatía isquémica se produce como consecuencia de una disminución brusca o progresiva, total o parcial del aporte de oxígeno al miocardio. Bajo esta definición se engloban un amplio abanico de patologías que comprenden desde su forma más leve y asintomática (angina

de pecho e isquemia silente), hasta las más severas y graves (infarto de miocardio y la muerte súbita) (Fuster V y Braunwald E, 2010).

La presentación más frecuente de la cardiopatía isquémica es el IM que consiste en la muerte de células miocárdicas como consecuencia de una isquemia prolongada que provoca un desajuste entre el aporte y la demanda de sangre al corazón (Galvani M, 2002; Thygesen K, 2012).

Existen numerosas patologías capaces de producir trastornos en la circulación coronaria. Una de las causas más frecuente es la obstrucción completa de una arteria coronaria como consecuencia de la rotura con trombosis de una placa aterosclerótica (Bueno H, 2004). Una reducción del flujo sanguíneo dilatada en el tiempo inicia la cascada isquémica, en la que las células del corazón mueren principalmente por necrosis. En ese punto se forma una cicatriz de colágeno permanente, que daña la arquitectura cardiaca (Krijnen PA, 2002). En aquellos casos en los que no se produce la muerte del paciente, el resultado final es el desarrollo de una insuficiencia cardiaca.

Microscópicamente, el IM consiste en la muerte de células miocárdicas como consecuencia de una isquemia prolongada. La muerte celular no ocurriría de forma inmediata: la necrosis celular se produce entre las 2-4 horas después de producirse la isquemia y el proceso completo sucede entre 5 y 6 semanas después, con la cicatrización del miocardio (Thygesen K, 2012).

En la actualidad, el desarrollo de biomarcadores y los estudios por imagen más sensibles y específicos, unidos a una mejora en el manejo de los pacientes que han sufrido un infarto, han repercutido favorablemente reduciendo la lesión y necrosis del miocardio (Thygesen K, 2012).

Criterios diagnósticos

Un diagnóstico a tiempo es la clave del éxito en el manejo del IM. El diagnóstico se suele basar en la historia clínica de dolor torácico de 20 minutos o más de duración y que no responde a la nitroglicerina. Son frecuentes la irradiación del dolor hacia el cuello, la mandíbula o el brazo

izquierdo. En ocasiones el dolor no es de tipo agudo y los pacientes se presentan con síntomas menos típicos, como náuseas/vómitos, disnea, fatiga, palpitaciones o síncope (Steg G, 2013).

La última actualización en la definición de IM establecida en el año 2012 por el grupo de trabajo de la *European Society of Cardiology* (ESC), la *American College of Cardiology Foundation* (ACCF), la *American Heart Association* (AHA) y la *World Heart Federation* (WHF) se fundamenta en su diagnóstico según criterios electrocardiográficos, de laboratorio y de técnicas de imagen no invasivas. Esta actualización establece que pequeñas zonas de necrosis pueden detectarse mediante la determinación de marcadores bioquímicos o mediante estudios de imagen cada vez más sensibles y específicos (Thygesen K, 2012).

Biomarcadores

La necrosis miocárdica da lugar a la aparición en la circulación periférica de proteínas relacionadas con el daño en los miocitos (troponina y CKMB). Aunque un aumento de estos biomarcadores en sangre refleja una lesión que conlleva a la necrosis de las células miocárdicas, este aumento no indica la causa subyacente (Thygesen K, 2012).

La troponina es más específica y sensible que las enzimas cardíacas tradicionales, como la creatincinasa (CK), su isoenzima MB (CKMB) y la mioglobina. Además, de las tres subunidades que forman la troponina, las isoenzimas troponina I (TnI) y T (TnT) son casi exclusivas del miocardio.

La elevación de la troponina cardíaca refleja la existencia de daño celular miocárdico (Bardají A, 2005; Thygesen K, 2012; Hamm CW, 2012). En el contexto de la isquemia miocárdica (dolor torácico, cambios del ECG o anomalías nuevas de la contractilidad de la pared), la elevación de troponina indica IM (Hamm CW, 2012).

El aumento de la concentración plasmática de este biomarcador es detectable dentro de las 4 horas desde el inicio de los síntomas, pudiéndose mantener aumentado hasta 7 y 14 días después

(Hamm CW, 2012; Welch TD, 2012). Por lo tanto, cTn debe medirse tras la recepción del paciente y, de nuevo, dentro de las 6-9 horas posteriores, si no antes. En caso de que exista una sospecha clínica elevada y que las muestras anteriores fueran negativas, es recomendable una medida adicional entre las 12-24 horas (Welch TD, 2012).

La recomendación de los expertos establece como límite para la decisión de infarto superar el valor del percentil 99 que se instaura según una población de referencia. La determinación de un aumento y posterior caída es fundamental a la hora de diagnosticar el IM (Thygesen K, 2012; Bardají A, 2005; Jaffe AS, 2013).

En la actualidad, algunos inmunoanálisis nos permiten detectar valores de Troponina cardíaca (cTn) ligeramente superiores al percentil 99 que pueden aparecer en etapas iniciales del IM sin elevación del segmento ST o en infartos de pequeño tamaño. De ahí la necesidad de desarrollar un método de detección de alta sensibilidad que permita detectar concentraciones de cTn entre 5-10 veces menores que las detectadas por métodos anteriores (Jaffe AS, 2013).

En caso de no disponer de un análisis de cTn, la mejor alternativa es la CKMB. Al igual que ocurría con la cTn, se recomienda superar el valor del percentil 99 como límite para la decisión de infarto que se instaura según la población de referencia (Thygesen K, 2012; Bardají A, 2005). Su detección se puede realizar desde las 3 horas hasta los 3 días de haberse producido el infarto. La concentración máxima en sangre tiene lugar entre las 12-24 horas posteriores al IM. Y tiene una duración media de entre 1 y 3 días (Welch TD, 2012).

Los tiempos recomendados para la medición de la CKMB, en caso de sospecha de IM, son similares a los comentados anteriormente para la cTn.

El inconveniente de esta última es que no es exclusiva del tejido miocárdico, pudiéndose encontrar, también, en el músculo esquelético, la lengua, el intestino delgado y el diafragma (Thygesen K, 2012).

Electrocardiografía

El electrocardiograma (ECG) forma parte del proceso de diagnóstico de los pacientes con sospecha de infarto de miocardio. Debería realizarse dentro de los 10 minutos siguientes a la presentación clínica (Thygesen K, 2012; Welch TD, 2012).

Algunos patrones que se asocian a una isquemia miocárdica aguda son las arritmias cardiacas, la pérdida de amplitud de la onda R precordial y los trastornos en la conducción. Los cambios agudos o en evolución de las ondas ST-T y Q permiten al clínico localizar el episodio en el tiempo, identificar la arteria relacionada con el infarto, estimar la cantidad de miocardio en riesgo, valorar el pronóstico y determinar una estrategia terapéutica (Thygesen K, 2012).

El ECG a menudo resulta insuficiente por sí solo para realizar un diagnóstico de isquemia aguda o infarto. Sin embargo, se trata de una herramienta diagnóstica útil en caso de sospecha de síndrome coronario agudo y facilita la distribución de los pacientes en IAMCEST (pacientes con elevación del segmento ST) y IAMSEST (pacientes sin elevación del segmento ST) (Thygesen K, 2012; Welch TD, 2012). Las manifestaciones más tempranas observadas en pacientes con IAMCEST son variaciones del segmento ST y de la onda T. La presencia de ondas Q puede observarse durante un episodio agudo de isquemia o durante un infarto agudo con una reperfusión satisfactoria (Thygesen K, 2012; Welch, 2012).

Técnicas de imagen

Las limitaciones que presentan en la práctica clínica la determinación enzimática y el ECG en el diagnóstico del IM han convertido a las técnicas de imagen no invasivas en una herramienta fundamental para establecer un diagnóstico definitivo. Éstas juegan un papel importante en pacientes con cardiopatía isquémica conocida o en los que existe sospecha clínica (Thygesen K, 2012).

Las técnicas de imagen más utilizadas en el diagnóstico del IM están resumidas en la Tabla 1 (San Román JA, 2009). A continuación

desarrollamos la ecocardiografía y la resonancia magnética por ser las técnicas utilizadas para evaluar la función cardiaca en el presente trabajo.

La ecocardiografía se presenta como la modalidad más importante en el contexto agudo debido a su rapidez y su disponibilidad. Permite determinar la función sistólica ventricular fácilmente y con precisión y si la realiza personal experimentado, es posible detectar una hipocinesia transitoria localizada o acinesia. Además, permite realizar un diagnóstico diferencial con otras patologías como la disección aórtica, la embolia pulmonar, la estenosis aórtica, la miocardiopatía hipertrófica o el derrame pleural (Hamm CW, 2012; Cheitlin MD, 2003). Asimismo, la utilización de medios de contraste mejora la visualización del borde endocárdico y permite evaluar la perfusión miocárdica y la obstrucción microvascular. Finalmente, la combinación con la ecografía Doppler permite cuantificar la función global y regional (Thygesen, 2012).

La resonancia magnética (RM) tiene la ventaja de poder integrar en un mismo estudio la evaluación de la función, la perfusión y la detección de tejido cicatricial (Hundley WG, 2010; Hamm CW, 2012). Estudios como el de Kwong RY *et al.* demostraron la utilidad de la RM para excluir o detectar los síndromes coronarios agudos (Kwong RY, 2003). Además, esta técnica resulta útil para evaluar la viabilidad miocárdica y detectar la presencia de miocarditis (Hamm CW, 2012).

Tratamiento

En una primera etapa, los objetivos del tratamiento son limitar la necrosis miocárdica mediante reperfusión mecánica (intervención coronaria percutánea) o farmacológica (tratamiento fibrinolítico) tempranas, prevenir las arritmias y tratar las complicaciones agudas. Se debe iniciar la monitorización con ECG a la mayor brevedad posible en aquellos pacientes con sospecha de IAMCEST, para detectar arritmias que pongan en riesgo la vida y permitir la desfibrilación inmediata cuando esté indicada (Steg G, 2013).

El alivio del dolor resulta de suma importancia al asociarse a la activación simpática, la cual causa vasoconstricción y aumenta la carga de trabajo del corazón (Steg G, 2013). Se debe administrar oxígeno a los pacientes que presenten disnea o hipoxia.

A pesar de que el número de defunciones se ha reducido debido al uso de las terapias de revascularización, muchos pacientes desarrollan

un fallo cardíaco crónico que resulta incurable debido a la pérdida de tejido contráctil y a la reducción de la función ventricular. Aunque la primera línea de tratamiento es la farmacoterapia, ésta resulta insuficiente en la mayoría de los casos. En este punto, el tratamiento más efectivo es el trasplante de corazón. Sin embargo, el problema radica en las complicaciones perioperatorias que conllevan este tipo de

Tabla 1. Principales ventajas e inconvenientes de las técnicas de imagen cardíaca.

| | <i>VENTAJAS</i> | <i>INCONVENIENTES</i> |
|--|--|--|
| Ecocardiografía | <ul style="list-style-type: none"> • Amplia disponibilidad, portabilidad y bajo coste • Ausencia de irradiación | <ul style="list-style-type: none"> • Moderada exactitud y reproducibilidad en el cálculo de la FEVI y volúmenes ventriculares • Cálculo de la FEVI muy dependiente del operador • Alta variabilidad en un observador y entre observadores |
| Resonancia magnética | <ul style="list-style-type: none"> • Ampliamente validada. Ausencia de radiación • Gran exactitud y reproducibilidad en el cálculo de la FE y los volúmenes • Alta resolución espacial • Evaluación muy exacta del tamaño del infarto • Baja variabilidad en un observador y entre observadores | <ul style="list-style-type: none"> • Nula portabilidad • Elevado coste • Contraindicada en implantes ferromagnéticos |
| Tomografía computerizada multicorte | <ul style="list-style-type: none"> • Gran exactitud y reproducibilidad en el cálculo de la FEVI y los volúmenes • Valoración de la carga de calcio y de la anatomía coronaria • Baja variabilidad en un observador y entre observadores | <ul style="list-style-type: none"> • Irradiación • Contrastes iodados (nefrotóxicos) • Nula portabilidad • Elevado coste • Necesidad de ritmo sinusal estable y frecuencia lenta • Limitada resolución temporal • Poco validada en ensayos clínicos |
| Ventriculografía isotópica y gated-spect miocárdico | <ul style="list-style-type: none"> • Gran exactitud y reproducibilidad en el cálculo de la FE y los volúmenes • Ampliamente validada • Evaluación exacta de viabilidad • Baja variabilidad en un observador y entre observadores | <ul style="list-style-type: none"> • Irradiación • Medición de volúmenes ventriculares mediante ventriculografía isotópica no extendida y compleja |

FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo (de San Román JA. Rev Esp Cardiol 2009).

intervenciones, la necesidad de usar una terapia de inmunosupresión y la dificultad para acceder a un donante (Rodrigues M, 2005; Uitterdijk A, 2009).

Terapia celular

Uno de los campos de la medicina que más expectativas ha levantado en las últimas décadas en el tratamiento del IM ha sido la Terapia Celular (TC) con células madre (Prosper F, 2004). Ésta se refiere al conjunto de estrategias que emplean células vivas como elementos terapéuticos y cuyo objetivo principal es el de reparar, reemplazar o recuperar la función biológica de un tejido u órgano dañado.

Las patologías a las que se ha dirigido la TC han sido muy variadas: disfunciones hormonales como la diabetes o el déficit de hormona del crecimiento; enfermedades neurodegenerativas como el Párkinson, el Alzheimer o el Huntington; lesiones cardiovasculares como el IM o la isquemia vascular periférica; lesiones músculo-esqueléticas, articulares u óseas, etc.

En particular, el aumento de la mortalidad y la morbilidad de las ECV en una población cuya media de edad se ha elevado en las últimas décadas, ha obligado al desarrollo de nuevas terapias para ayudar a reducir el impacto que éstas tienen en la sociedad (Choi SH, 2012).

En general, las células madre (*Stem Cells*, SC) o troncales se definen como aquellas células con capacidad de dividirse (autorreplicarse) por periodos indefinidos durante toda la vida de un individuo y que, bajo condiciones apropiadas o señales correctas del microambiente, son capaces de diferenciarse a diferentes linajes con características y funciones especializadas (Ema H, 2000; Watt FM, 2000; Donovan PJ, 2001; Ivanova NB, 2002).

Existen varios criterios para clasificar las SC. La clasificación más comúnmente utilizada las divide en dos grupos principales: embrionarias y adultas.

Las embrionarias proceden del blastocisto y tienen capacidad totipotencial, es decir, pueden diferenciarse a todos los tipos celulares incluidos cardiomiocitos (Choi SH, 2012; Fuchu

XY, 2000, Thomson, 1998). Diversos estudios han demostrado el efecto positivo que estas células presentan en la regeneración miocárdica tras ser inyectadas, sin embargo solo una pequeña cantidad de las células diferenciadas a cardiomiocitos poseen actividad contráctil (Mignone JL, 2010).

Los dos inconvenientes principales de este tipo de células son, primero, que al tratarse de células muy indiferenciadas pueden inducir la formación de ciertas neoplasias (teratomas) y, segundo, las implicaciones éticas que genera su uso que está relacionado principalmente por la forma en que son obtenidas (embriones humanos) (Choi SH, 2012; Pera, 2000).

Las células madre adultas se pueden encontrar en la mayoría de los tejidos de un individuo adulto (médula ósea, sistema gastrointestinal, músculo-esquelético, músculo cardiaco, hígado, páncreas, pulmón, tejido adiposo, etc.). En un principio se pensó que estas células estaban predeterminadas a diferenciarse a un tipo celular de su mismo tejido de origen o, al menos, de su capa embrionaria pero han sido varios los grupos que han demostrado su capacidad para diferenciarse funcionalmente a células especializadas procedentes de capas embrionarias diferentes a las propias (Jiang Y, 2002). Esta habilidad biológica se denomina “*fenómeno de plasticidad*” y se fundamenta en la capacidad que poseen dichas células para alterar drásticamente su fenotipo en respuesta a los cambios del microambiente donde se desarrollan. (Wagers AJ y Weissman IL 2004, Rutenberg MS, 2004; Sánchez-Ramos J, 2000).

En el año 2007, Yamanaka S *et al.* obtuvieron un nuevo tipo celular denominado iPSCs (Induced Pluripotent Stem Cells), similares a las embrionarias pero derivadas de tejidos adultos. Estas células se caracterizan por estar reprogramadas genéticamente y presentar la capacidad de diferenciarse a varios tipos celulares. Este hecho culminó con la concesión del Premio Nobel de Medicina y Fisiología a Yamanaka S y Gurdon JB, en el año 2012.

Dentro de las células madre adultas, las células madre mesenquimales (*Mesenchymal Stem Cells*, MSC) han sido una de las más estudiadas

y ubicuas, encontrándose células del mismo tipo en una gran variedad de tejidos, incluido médula ósea, tejido adiposo, pulpa dental, tejidos fetales y placentarios, líquido amniótico, sangre del cordón umbilical, etc. Éstas fueron descritas por primera vez por Friedenstein (1968) a partir de extractos de médula ósea adulta de cobayas.

Dentro de las MSC, las derivadas de tejido adiposo, presentan la ventaja de obtenerse de forma sencilla mediante lipoaspirados y poderse aislar en grandes cantidades mediante procedimientos poco agresivos.

Diversos estudios han demostrado su capacidad para diferenciarse a otras poblaciones celulares como cardiomiocitos, mioblastos, condrocitos y adipocitos (Valina C, 2007; Choi SH, 2012).

Sin embargo, su importancia no radica en la capacidad de diferenciación a cardiomiocitos, sino en los motivos que a continuación se describen (Amado LC, 2005):

- Muestran un efecto paracrino mediante la secreción de varias citoquinas y factores del crecimiento de soporte que favorecen la supervivencia, el crecimiento o la diferenciación de otras células en el área afectada por la isquemia (Choi SH, 2012).

- Poseen capacidad inherente de migrar a aquellas zonas del organismo donde se está produciendo un proceso inflamatorio consecuencia de una lesión, fenómeno conocido como “*homing*” (Pittenger M, 2004; Bittira B 2003; Wu GD 2003).

- Y, por último, a su efecto antiinflamatorio y propiedades inmunomoduladoras (Puissant, 2005).

Como se ha manifestado anteriormente, hasta la fecha, el tratamiento de primera línea en la patología isquémica ha sido el tratamiento médico cuya finalidad es ayudar a aliviar la carga de trabajo del corazón permitiendo mejorar la contractilidad miocárdica (Zeicher A, 2012).

En este sentido, a pesar de que desde principios de los años 2000, muchas investigaciones se han centrado en el uso de la TC para procurar una regeneración miocárdica, a día de hoy

aún existen muchas preguntas sin respuesta como la eficacia de este tipo de terapias en el tratamiento de enfermedades como el infarto de miocardio, qué tipo celular es el idóneo, cuál es la dosis mínima necesaria para obtener un efecto terapéutico, la eficacia y la seguridad de las vías de administración empleadas, etc.

Vías de administración

Se ha descrito que el éxito de la terapia celular está relacionado con una correcta entrega de las células en el área afectada, el tipo celular administrado, el número de células o la supervivencia de éstas a largo plazo (Quang TB, 2010). Mientras que el tipo celular a emplear o el número de células han sido ampliamente estudiados otras cuestiones, como qué vía de administración es más adecuada, sigue aún sin resolverse.

Así, poco se conoce sobre qué ruta de inoculación es la más idónea para la aplicación de esta terapia, en términos de seguridad para el paciente y de la eficacia del tratamiento. Pudiendo ser su elección crucial para una satisfactoria recuperación cardiaca (Moscoso I, 2009).

Se han evaluado varios accesos tanto en ensayos clínicos como en estudios preclínicos (Figura 3). La mayoría de estudios realizados han descrito su experiencia con uno de estos métodos de administración: infusión intravenosa, intracoronaria, inyectando directamente en el corazón bien vía transendocárdica o bien transepicárdica o vía pericárdica (Heldman AW, 2008; Perin EC, 2008). El objetivo final de los mismos ha sido hacer un balance riesgos-beneficios (Heldman AW, 2008). Sin embargo, aún sigue existiendo controversia sobre cuál es la vía más adecuada, la concentración de células a administrar y el momento más adecuado para su administración. La respuesta a estas preguntas se ve generalmente limitada por la duración de los estudios que en muchos casos es limitada e insuficiente.

La vía intravenosa es la más sencilla de aplicar ya que, bien a través de un catéter periférico o bien mediante una vía central, evita el riesgo de

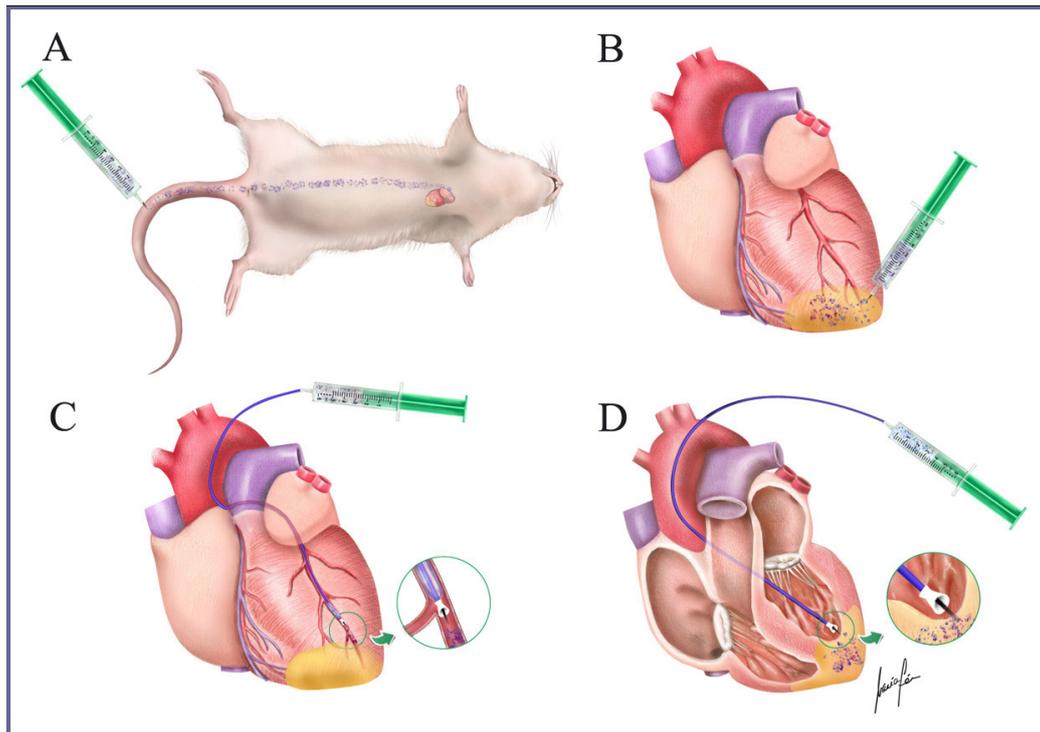


Figura 3. Representación de las principales rutas de administración descritas en la bibliografía: A. Intravenosa. B. Intramiocárdica. C. Intracoronaria. D. Transendocárdica.

un procedimiento invasivo. Sin embargo es la vía menos eficaz debido a una elevada migración celular a otros órganos (hígado, pulmón, riñón o bazo). Solo una pequeña proporción de estas células alcanza la circulación coronaria (Heldman AW, 2008; Bui QT, 2010).

La vía intracoronaria es una de las más utilizadas. El acceso al corazón se realiza mediante la técnica de angioplastia coronaria percutánea. Algunos autores realizan la inyección de las células sin la oclusión de la arteria durante la administración (Amado LC, 2005), mientras que otros realizan la inyección con el vaso ocluido mediante un balón de angioplastia (Freyman T, 2006). La ventaja de esta vía es que permite la administración de las células en el área afectada por el infarto, sin embargo, es necesario asegurarse de la permeabilidad de las arterias coronarias o de que exista circulación colateral que permita la distribución de las células. Además, hay que tener en cuenta que las células deben poder atravesar la pared del vaso (Bui QT, 2010). A esta vía se le atribuyen varios efectos no deseados tras la administración de las células: la oclusión de la circulación coronaria

y la aparición de microinfartos. Además, se han descrito estudios en los que se han producido elevaciones del segmento ST en la derivación II del ECG durante y después del procedimiento (Vulliet PR, 2004; Matsubara H, 2010).

Otra vía es la intramiocárdica (transepicárdica o transendocárdica) que permite la inyección de las células en la zona afectada por el infarto. En el primer caso el acceso al corazón requiere de cirugía con el consiguiente riesgo que ello supone, más si tenemos en cuenta que suele tratarse de pacientes en estado crítico. La mayor ventaja que presenta este abordaje es que se realiza bajo visión directa. En el segundo caso, la falta de visualización a la hora de realizar la administración ha llevado al desarrollo de catéteres específicos que utilizan sistemas de mapeo electromecánico que identifican el área de interés. En ambos abordajes existe el riesgo de perforación (Heldman AW, 2008; Perin EC, 2008; Freyman T, 2006; Bui QT, 2010).

La administración percutánea por vía retrógrada a través del seno coronario es una de las formas de administración más recientes. Consiste en situar un catéter balón a la altura del

seno coronario, inflar el balón y, posteriormente, administrar las células a una presión mayor de la existente en el seno coronario permitiendo así, la perfusión retrógrada de las células. Del mismo modo que ocurría con la vía intracoronaria, las células también deben atravesar la pared del vaso (George JC, 2008; Bui QT, 2010; Tuma J, 2011).

La vía intrapericárdica consiste en la administración de las células dentro del saco pericárdico. Como ventajas caben destacar el gran volumen de células que se pueden administrar, que el saco pericárdico puede actuar como reservorio y que permite procedimientos repetidos. Sin embargo, requiere que las células migren a la zona infartada (Branco E, 2009).

MODELOS EXPERIMENTALES

Desde finales del siglo XIX, disponemos de modelos *ex vivo* que han permitido analizar la fisiología cardíaca y los cambios patológicos que se producen como consecuencia de la isquemia cardíaca. En 1866, Cyon describió el modelo en un corazón aislado de rana que posteriormente, en el año 1895, fue perfeccionado por Langendorff. Su mayor limitación era la imposibilidad de medir el gasto cardíaco. Así, Neely JR, en 1967, desarrolló un modelo de corazón aislado funcionando ayudado de una bomba peristáltica (Cuellas-Ramón C, 2013).

En las últimas décadas, la utilización de modelos animales en el estudio de las ECV ha contribuido activamente al avance del conocimiento de la fisiología, bioquímica y genética molecular de este conjunto de enfermedades, permitiendo el desarrollo de técnicas diagnósticas y la validación de procedimientos preventivos y terapéuticos (farmacológicos e intervencionistas) (Ytrehus K, 2000; Suzuki Y, 2008; Chorro FJ, 2009).

Los modelos experimentales han contribuido considerablemente en estos estudios y, aunque no se asemejan completamente a la realidad que se encuentra en la clínica, sí permiten obtener información directa sobre este conjunto de enfermedades (Chorro FJ, 2009). Así, el hecho de poder reproducir la patología cardiovascular

ha generado gran cantidad de información en cuanto a la patogénesis, evolución y mecanismos esenciales tanto a nivel celular como molecular (Suzuki Y, 2008; Ou L, 2010). Además, todo ello ha supuesto el desarrollo de ensayos terapéuticos preclínicos que han permitido evaluar novedosas terapias antes de ser extrapoladas a la clínica (Chorro FJ, 2009).

El aumento del número de investigaciones en el ámbito de la regeneración cardiovascular ha hecho necesaria una apresurada transferencia de los hallazgos obtenidos en la investigación básica hacia la práctica clínica (Cuellas-Ramón C, 2013).

La mayor limitación que presentan los ensayos clínicos con modelos animales son las diferencias anatómicas y fisiológicas existentes con el ser humano.

Las similitudes genéticas y anatómicas que presentan los primates no humanos con los seres humanos los convierten en los candidatos ideales para llevar a cabo pruebas de seguridad de fármacos nuevos, así como para estudiar enfermedades infecciosas o cerebrovasculares. Sin embargo, dichas semejanzas también plantean cuestiones éticas sobre su utilización en experimentos científicos. Además, su elevado coste económico, la necesidad de unas instalaciones adecuadas y su difícil manejo han limitado enormemente su uso.

Por motivos económicos y por la elevada disponibilidad de cepas con deficiencias naturales o con mutaciones genéticas, muchas de estas investigaciones se han llevado a cabo en pequeños mamíferos (ratas, ratones y conejos). Sin embargo, la dificultad de extrapolar los resultados obtenidos al ser humano debido, principalmente, a la diferencia de tamaño de la masa miocárdica (menos de 100 mg en el ratón frente a 500 g en el ser humano) ha resultado ser un inconveniente a la hora de emplear estas especies (Cuellas-Ramón C, 2013).

Otra limitación importante es la elevada circulación colateral que presentan algunas especies animales como las ovejas, los perros y las cobayas. Además, la especie canina presenta una menor tasa de supervivencia comparada

con las ratas debido a que desarrollan arritmias letales hasta en un 30% de los casos. Otro inconveniente que presenta la especie canina es la diferencia entre la relación del tamaño del corazón y el cuerpo, siendo en el ser humano de 5 g/kg mientras que en el perro es más del doble (Cuellas-Ramón C, 2013).

Así, en los últimos años el uso de la especie porcina en el estudio de la cardiopatía isquémica y sus potenciales tratamientos se ha extendido exponencialmente debido a las similitudes anatómicas, fisiológicas y patológicas (Cuellas-Ramón C, 2013).

Especie porcina. Diferencias y similitudes con el ser humano

En los cerdos con un rango de peso entre los 25-30 kg, que son los que comúnmente se utilizan en estas investigaciones, el tamaño del corazón presenta una relación similar a la del ser humano. No ocurre así en cerdos de mayor tamaño que muestran relaciones inferiores a la mitad (Hughes HC, 1986; Cuellas-Ramón C, 2013). En esta especie el corazón es ancho, corto, romo y está comprimido dorso-ventralmente (Hughes HC, 1986; Vilahur G, 2010).

El patrón arterial es similar al del ser humano, siendo la circulación colateral prácticamente inexistente. En ambas especies, aproximadamente el 80% del aporte sanguíneo del corazón proviene de la LAD y la ACD (Hughes H, 1986; Rodrigues M, 2005).

La ACD es bastante larga y riega la cara posterior del corazón. Nace del seno derecho de la aorta y describe una curva por el surco coronario, dando ramas a la pared lateral del VD (Figura 3A). Alcanza el surco interventricular subsinusal y se curva en ángulo recto para descender por él como rama interventricular subsinusal que, además de irrigar las paredes de ambos ventrículos, emite algunas ramas septales que se distribuyen por la parte muscular del septo interventricular.

La ACI emite una rama circunfleja (ACx) que discurre por el surco coronario, y una rama interventricular paraconal que se corresponde en el ser humano con la arteria descendente anterior (LAD) que desciende por el surco del mismo nombre y emite ramas a las paredes de ambos ventrículos, así como algunas ramas septales para la parte muscular del septo interventricular (Figura 3B). La más voluminosa de estas últimas es la primera, la cual se emite antes de alcanzar el

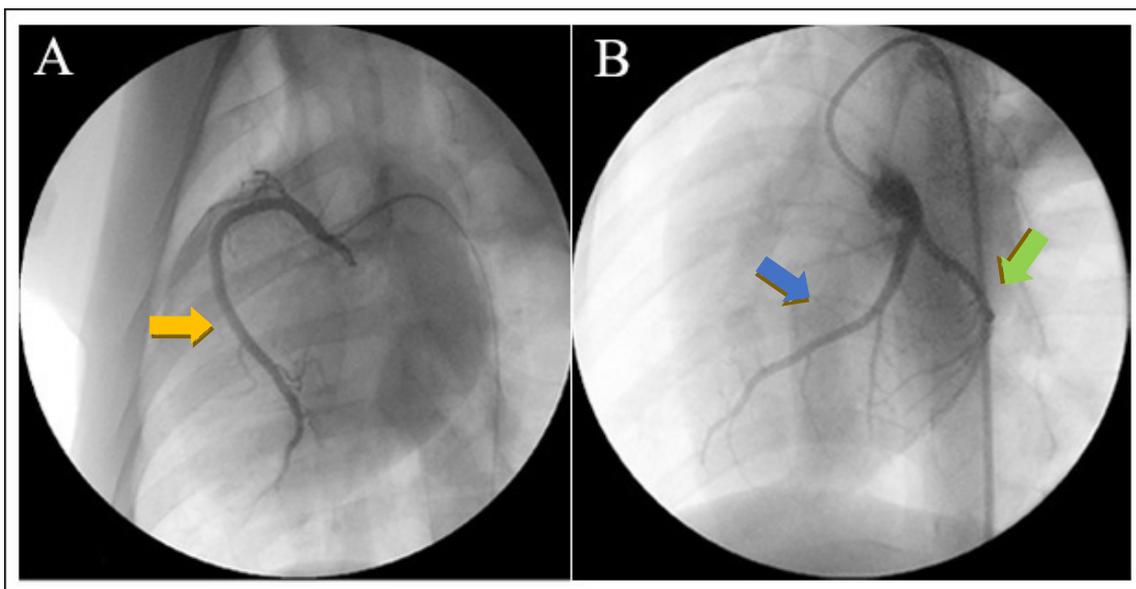


Figura 3. Coronariografía selectiva de las arterias coronarias en la especie porcina. Proyección 45° oblicua izquierda. A. Arteria coronaria derecha (flecha naranja). B. Arteria coronaria izquierda. La flecha azul señala la arteria descendente anterior y la flecha verde muestra la arteria circunfleja.

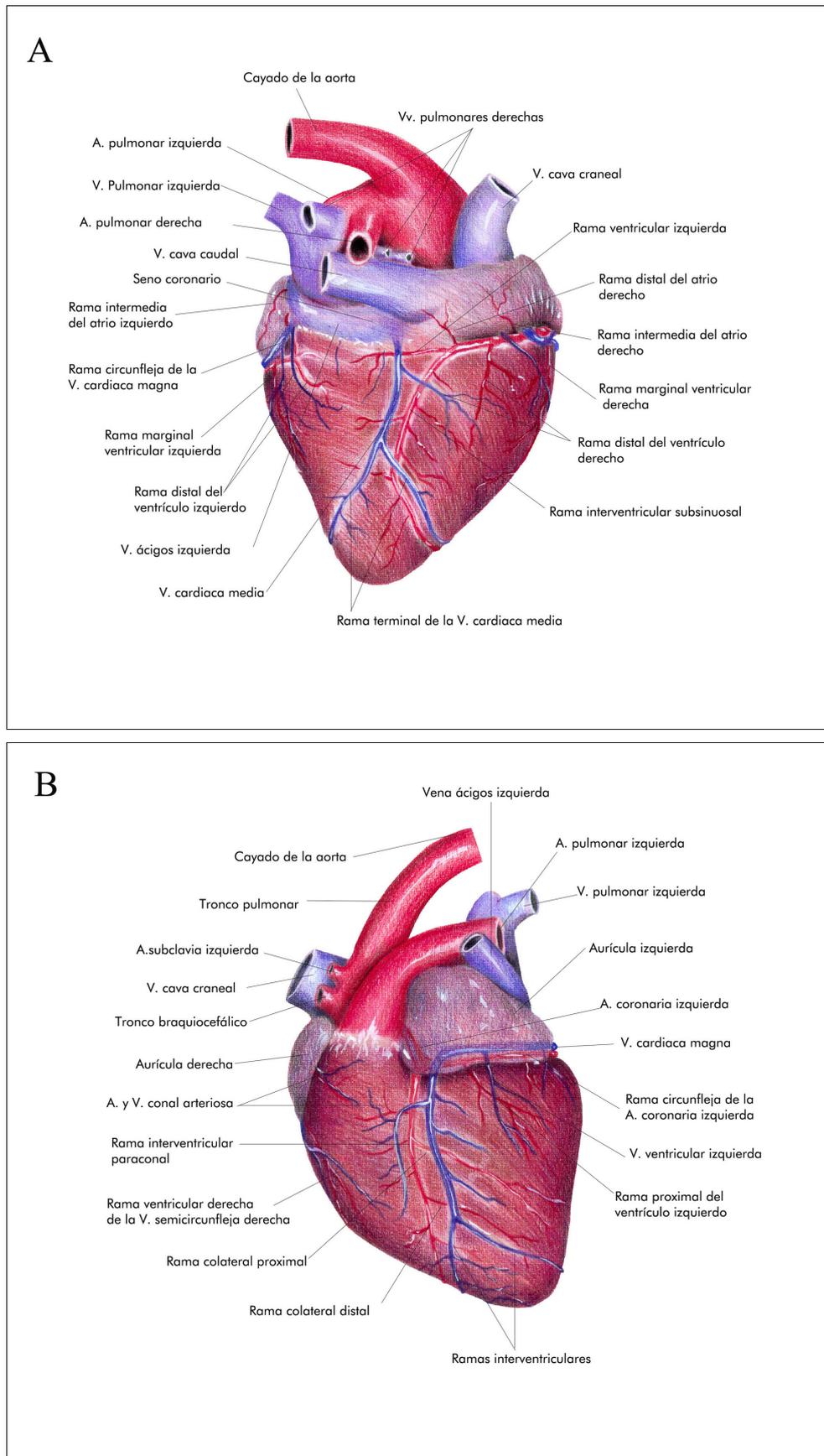


Figura 4. Anatomía cardiaca de la especie porcina. A. Visión dorsal. B. Visión ventral.

surco paraconal. La ACx, margina caudalmente el corazón y a nivel del borde ventricular intermedio emite una rama, que normalmente no alcanza el vértice del corazón (Figura 4) (Climent S, 2005).

El patrón venoso difiere respecto al del ser humano, debido a la presencia, en la especie porcina, de la vena áigios izquierda (Vilahur G, 2010). El seno coronario del cerdo es largo y resulta de la unión de tres vasos: la gran vena cardiaca, la vena cardiaca media y la vena áigios izquierda. La vena áigios derecha resulta de la confluencia de las venas intercostales dorsales y desemboca en la vena cava craneal entre el atrio derecho y la vena subclavia derecha (Hughes H, 1986).

Los vasos sanguíneos en la especie porcina son más frágiles y más propensos al vasoespasmó durante la manipulación por lo que requieren que ésta sea cuidadosa. Los cambios hemodinámicos y funcionales que aparecen como consecuencia del infarto, y la consecuente actividad arritmogénica durante la reperfusión, es similar en ambas especies (Vilahur G, 2010).

Por último, reseñar que también se encuentran diferencias en la distribución y la morfología de las fibras de Purkinje y de las células nerviosas del nódulo atrioventricular en la especie porcina con respecto a los humanos (Hughes H, 1986).

A modo de conclusión, destacan tres diferencias principales entre la especie porcina y el ser humano: en primer lugar el tamaño del corazón, siendo el corazón porcino ligeramente más pequeño; en segundo lugar, la presencia de una vena áigios izquierda, que recibe la sangre de los vasos intercostales y que desemboca en el seno coronario; y, en tercer lugar, la diferente distribución y morfología de las fibras de Purkinje y de las células nerviosas del nódulo atrioventricular

Modelos de infarto de miocardio

En la bibliografía se han descrito numerosos modelos de infarto de miocardio con o sin reperfusión (Hassenfuss G, 1998; Ytrehus K, 2000; Klocke R, 2007; Chorro FL, 2009; Ou L, 2010; Cuellas-Ramón C, 2013).

Modelos endovasculares

Las técnicas de mínima invasión han permitido reproducir por diferentes medios los fenómenos derivados del infarto de miocardio y de la posterior reperfusión (Cuellas-Ramón C, 2013).

Se han utilizado diferentes métodos para crear la isquemia. Así, Sabbah HN, en 1991, y Kawaguchi O, en 1998, refirieron un modelo de isquemia sin reperfusión mediante embolización arterial con microesferas de poliestireno (Sabbah HN, 1991; Kawaguchi O, 1998). Otro ejemplo es el modelo creado mediante oclusión con coil (Figura 5A) descrito por Charles CJ o la inducción de trombosis coronaria mediante corriente eléctrica continua en perros definido por Salazah AE (Charles CJ, 2000; Salazah AE, 1961).

Otros ejemplos, son el referido por Kim W *et al.* o el descrito por Crisóstomo V *et al.* quienes describieron un modelo de infarto inducido mediante la administración de etanol (Kim W, 2010; Crisóstomo V, 2013).

Sin embargo, la mayoría de los modelos se basan en el empleo de balones de angioplastia que permiten llevar a cabo una oclusión controlada y temporal de la arteria que puede oscilar entre los 45 y 180 minutos seguida de reperfusión (Figura 5) (Pérez de Prado A, 2009; Kraitichman DL, 2003).

Modelos quirúrgicos

La mayoría de estos modelos se han realizado mediante la colocación de una ligadura permanente o temporal alrededor de una o varias ramas de la arteria coronaria (Figura 6) (Litwin SH, 1994; Llaneras MR, 1994; Zhang H, 1996; Gálvez-Montón C, 2014). En otras ocasiones, el modelo se ha creado mediante el uso de un Goldblatt clamp (Kloner, 1974) o cauterizando el vaso (Pfeffer, 1979).

El acceso al corazón se realiza por cirugía abierta, bien por toracotomía lateral izquierda, la más extendida, o mediante esternotomía media. Este abordaje permite un rápido acceso al corazón, sin embargo no permite regular el tiempo de isquemia y existe una mayor tasa

de infecciones y de complicaciones derivadas del cierre de la herida que puede influir en

la supervivencia de los animales durante la investigación (Cuellas-Ramón C, 2013).

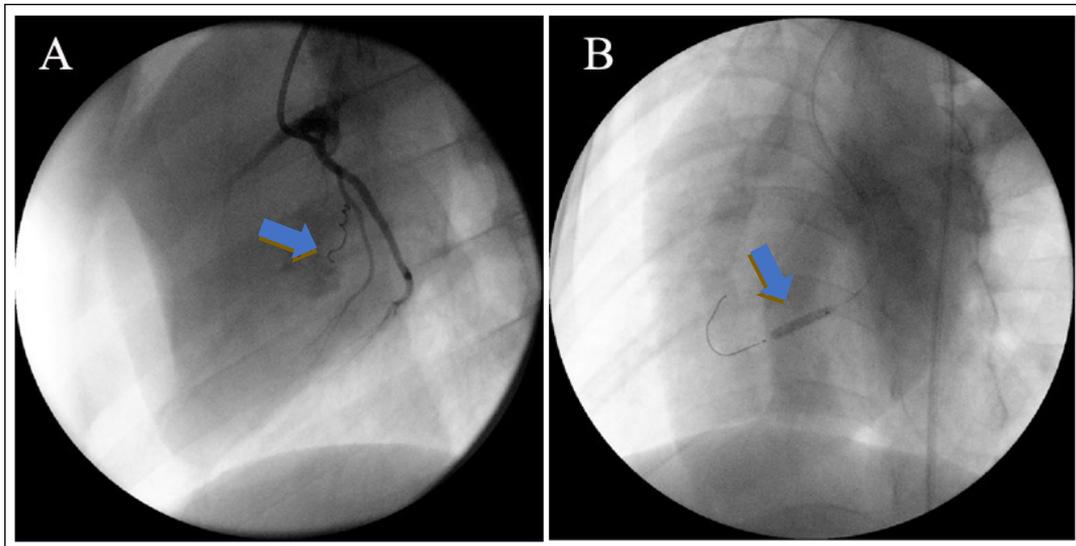


Figura 5. Diferentes métodos de inducción de modelos de infarto de miocardio mediante abordaje endovascular. Especie porcina. A. Oclusión permanente del vaso con coil (flecha). B. Modelo de isquemia-reperusión creado mediante la colocación de un balón de angioplastia (flecha).

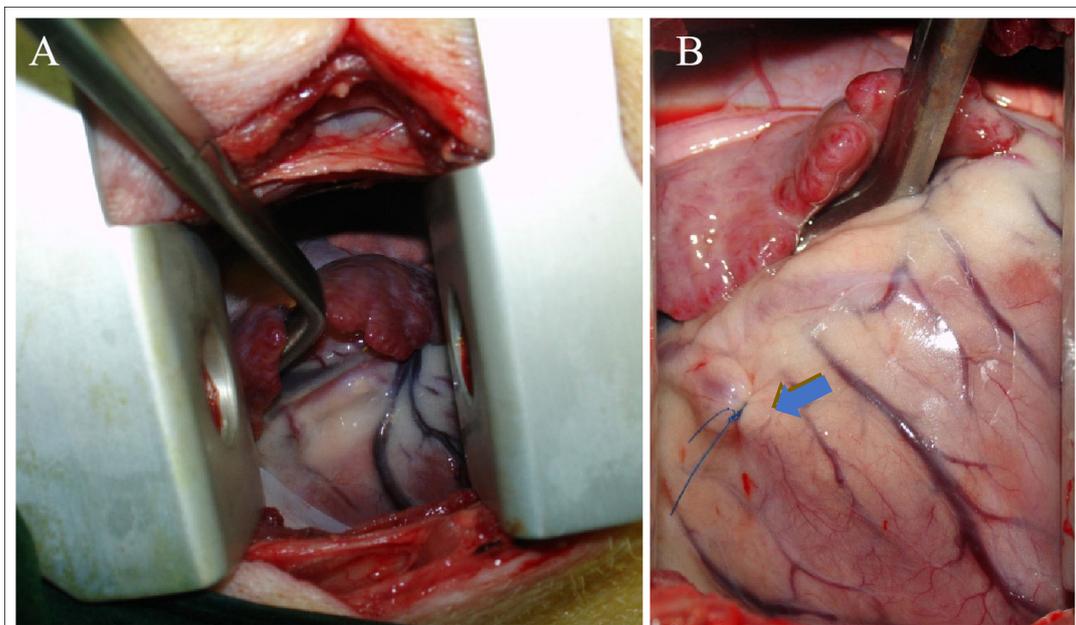


Figura 6. Modelo quirúrgico de infarto de miocardio en la especie porcina. A. Toracotomía en hemitórax izquierdo. Localización de la arteria circunfleja debajo de la orejuela izquierda (desplazada por el disector). B. Ligadura situada en la primera rama diagonal de la arteria descendente anterior (flecha).

Material y Método

MATERIAL

La fase experimental de este trabajo se llevó a cabo en las instalaciones y quirófanos del Centro de Cirugía de Mínima Invasión *Jesús Usón* (CCMIJU) de Cáceres, acreditado como Centro Usuario y de Cría de Animales de Experimentación (ES 100370001499) por la Consejería de Agricultura y Desarrollo Rural de la Junta de Extremadura.

El protocolo experimental fue revisado y aprobado por el Comité Ético de Bienestar Animal (CEBA) del CCMIJU y de la Universidad de Extremadura (UEX). El estudio se realizó de acuerdo con la Directiva 86/609/CEE del Consejo de 24 de noviembre de 1986 relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados Miembros respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (DOL 358; 18-12-1986).

Material anestésico, quirúrgico, de diagnóstico por imagen y de laboratorio

Para llevar a cabo este trabajo se utilizó el material anestésico necesario para premedicar, inducir y mantener la anestesia de los animales, formado por un sistema de anestesia (Heinen and Löwenstein modelo Leon Plus) y un monitor General Electric (modelo Dash 4000) para controlar valores respiratorios y hemodinámicos.

En el diagnóstico por imagen se empleó un equipo de RM Philips (modelo "Intera 1.5 T") con bobina sense de cuerpo / angio periférico tipo *phase array* de 4 elementos (Philips, Eindhoven, Holanda), un Ecógrafo Philips / ATL, (modelo HDI® 5000) con sonda convexa de 2-4 Hz (Philips, Eindhoven, Holanda) y un sistema de fluoroscopia digital BV pulsera (Philips, Eindhoven, Holanda).

En la determinación enzimática se utilizó un dispositivo AQT 90 Flex (Radiometer, Brønshøj, Dinamarca).

La cateterización de la arteria se llevó a cabo con el siguiente material: vaina introductora TERUMO® de 7F, catéter guía 6F (Hockey Stick [HS] Boston Scientific, USA), guía hidrofílica TERUMO® de 0,035 pulgadas y extremo curvo (Terumo Medical Corporation, United Kingdom), microguía Spartacore 14 de 0,014 pulgadas y 300 cm de longitud (Abbot Vascular, USA), balón OTW (over the wire) MAVERICK™ con tamaños variables de entre 2 y 4 mm de diámetro (Boston Scientific, USA) y contraste UROGRAFIN® 76% (amidotriozato de sodio y meglumina) (Química Farmacéutica Bayer S.L., Barcelona).

El material de laboratorio de biología molecular que se utilizó para el cultivo, conservación y recuentos celulares fue el siguiente: campana (Thermo Scientific, Alemania), centrífuga (Thermo Scientific, Alemania), microscopio *Nikon Eclipse TS100* (Técnica en Laboratorios, S.A. México D.F), incubador *HERAcell® 150* (MidAtlantic Diagnostic, Inc. USA), contador celular automático -*Countess™*- (Invitrogen™ Life Technologies, USA), *Eppendorf Daslab* (Cat. N°175508, Nirco SL, España), *Tissue Cultive Flask 25, 75 y 175 cm²* (Sarstedt, USA), *Cryotube™ Vials* (Nunc™, Dinamarca). Como medio de cultivo se utilizó *Dulbecco's modified Eagle's Medium* (DMEM) (Sigma-Aldrich, USA) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS) desactivado (Lonza, Suiza), 1% de Penicilina-Estreptomicina (Lonza Biowhittaker B-4800 Verviers, Belgium) y 1% L-Glutamina (Lonza Biowhittaker B-4800 Verviers, Belgium); para despegar las células de los frascos de cultivo se usó Tripsina (Lonza Biowhittaker B-4800 Verviers, Belgium); Trypan Blue Stain

0,4% (Invitrogen, USA) como colorante para realizar el recuento celular; PBS como solución isotónica; Endorem® (Endorem®, Guerbet, París, Francia) y Poli-L-Lisina (Sigma, St. Louis, MO, USA) para hacer el medio de marcaje de las células; y Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, USA) como medio de congelación.

Sujetos de estudio

Se emplearon 39 hembras de la especie porcina (*Sus Scrofa Domestica*), raza *Large White* con un peso medio inicial de $30,69 \pm 2,78$ Kg.

Tras su llegada al CCMIJU, los animales se identificaron con un crotal auricular dotado de un código alfa-numérico. Tuvieron un periodo de adaptación de dos semanas, tiempo que permanecieron bajo vigilancia veterinaria. Además, en este periodo, se desparasitaron mediante la administración de Fenbendazol (Flubenol®, Esteve Veterinaria). Una vez superado el periodo de aclimatación, aquellos individuos que no presentaron patología se incluyeron en el estudio.

Antes de iniciar el estudio se decidió sustituir a todos aquellos animales que murieran durante la inducción del modelo, antes de ser incluidos en alguno de los grupos de estudio.

MÉTODO

Justificación del método

Los avances que se han logrado en el conocimiento de las ECV están íntimamente ligados al desarrollo de modelos experimentales de la enfermedad. Aunque no existe un modelo que reproduzca la patología tal y como ocurre en el ser humano, el uso de modelos experimentales ha permitido evaluar los mecanismos que provocan la enfermedad, las diferentes técnicas diagnósticas así como los diversos tratamientos que han ido surgiendo y evolucionando en los últimos años. Además, ofrece la posibilidad de utilizar grupos controles y modificar los resultados cambiando uno o varios factores utilizados en el estudio (Chorro, 2009).

Disímiles especies animales se han utilizado con dicho fin, encontrándose como mayor inconveniente la dificultad de trasladar los resultados obtenidos a la práctica clínica (Suzuki Y, 2010). En este sentido es importante seleccionar una especie cuyas características sean similares al ser humano en los que la patología sea fácilmente reproducible y que, además, permitan la aplicación de terapias del mismo modo que se realizarían en el ser humano (Suzuki Y, 2010; Chorro FJ, 2009). En nuestro estudio se optó por la especie porcina por las similitudes que presenta con el ser humano. Ya en 1986, Hughes resaltó la importancia de esta especie en la investigación cardiovascular debido a las analogías encontradas entre el sistema cardiovascular de ambas especies (Hughes H, 1986; Suzuki Y, 2010). Además, la anatomía porcina permite la oclusión de la arteria descendente anterior, y esto es comúnmente usado como un modelo de la ECV humana. Al igual que ocurre en el ser humano, la LAD en la especie porcina proporciona aproximadamente la mitad del suministro de sangre al ventrículo izquierdo y su oclusión crea un infarto de las paredes anteroapical, lateral y septal del ventrículo izquierdo que es similar en tamaño y distribución a la que se produce en el ser humano tras un infarto (McCall FC, 2012). Además, se ha hecho referencia al menor coste y la menor presión social derivada del uso de esta especie con respecto a otras utilizadas previamente (primates o cánidos) (Hughes H, 1986).

De entre todos los métodos descritos en la bibliografía para crear un modelo experimental de infarto de miocardio, creemos que el modelo de isquemia-reperfusión, creado mediante la oclusión con balón, es el más interesante para simular un infarto agudo de miocardio ya que permite controlar el tamaño del infarto mediante la localización de la oclusión y el control del tiempo de isquemia (Krombach GA, 2005; van der Spoel TIG, 2011). Además, se trata de un abordaje mínimamente invasivo que limita la posibilidad de que los resultados del estudio se vean influenciados por una intervención quirúrgica.

En las últimas décadas se ha producido un incremento del número de investigaciones en el ámbito de la terapia celular, especialmente en el campo de la cardiología. Sin embargo, antes de aplicar estas nuevas terapias en la práctica clínica es necesario realizar investigaciones previas para demostrar su seguridad y eficacia. De ahí la importancia de ensayos preclínicos donde se pueda reproducir la patología cardiovascular, probar diferentes tratamientos y obtener unos resultados trasladables al ser humano.

Respecto a las células mesenquimales derivadas de tejido adiposo, empleadas en nuestro estudio, se trata de un grupo celular ampliamente utilizado en las investigaciones cardiovasculares, su aislamiento resulta sencillo por medio de lipoaspirados y se pueden obtener grandes cantidades mediante procedimientos poco agresivos. Se ha demostrado que presentan la capacidad de mejorar la funcionalidad cardíaca y que son capaces de reducir los cambios morfológicos que acontecen en el miocardio tras el infarto (Pittenger MF, 2004, Toma C, 2002), al provocar una disminución del tamaño del mismo, reducir la formación de cicatriz (Schuleri KH, 2009) y favorecer la angiogénesis (Hashemi, 2008).

A la hora de elegir las vías de inoculación, tuvimos en cuenta diversos estudios donde los autores expusieron su experiencia (Wang D, 2011; Halkos ME, 2008). De entre todas ellas seleccionamos las vías intracoronaria, la intramiocárdica transepicárdica y la intrapericárdica por ser aquellas que más expectativas han despertado en estudios previos, con el fin de compararlas y de establecer los beneficios de cada uno de los abordajes.

Planteamiento experimental

Grupos de estudio

Los animales incluidos en el estudio se dividieron aleatoriamente en tres grupos (Figura 7). Éstos se crearon teniendo en cuenta la vía empleada para la administración del tratamiento:

Grupo I: vía intracoronaria

Grupo II: vía intrapericárdica

Grupo III: vía intramiocárdica

Fases de estudio

El estudio se dividió en seis fases:

FASE I: *aislamiento y cultivo celular*. En este periodo se aislaron las células madre mesenquimales a partir de una muestra heteróloga de tejido graso de la especie porcina.

FASE II: *periodo de aclimatación*. En esta fase se incluyó la cuarentena y el precondicionamiento de los animales para su inclusión en el estudio.

FASE III: *estudio basal y creación del modelo de infarto de miocardio*.

Hito I: estudio basal (RM, ecocardiografía, ECG, coronariografía, hematología, bioquímica y determinación enzimática).

Hito II: creación del modelo de infarto mediante un método de isquemia-reperfusión con balón de angioplastia.

FASE IV: *evaluación del infarto y administración del tratamiento*. Se realizó dos días tras la creación del modelo.

Hito III: estudio funcional del corazón (RM, ecocardiografía).

Hito IV: administración de las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo.

Hito VI: inmediatamente después de la administración de las MSC se realizó una secuencia T2* de RM para localizar la posición de las células.

FASE V: *seguimientos*. Estudio funcional del corazón mediante RM y ecocardiografía.

Hito VII: 1 mes tras la creación del modelo.

Hito VIII: 2 meses tras la creación del modelo.

FASE VI: *fin de estudio*. Tres meses después de la creación del modelo.

Hito IX: estudio funcional del corazón.

Hito X: sacrificio, toma de muestras y estudio anatomopatológico.

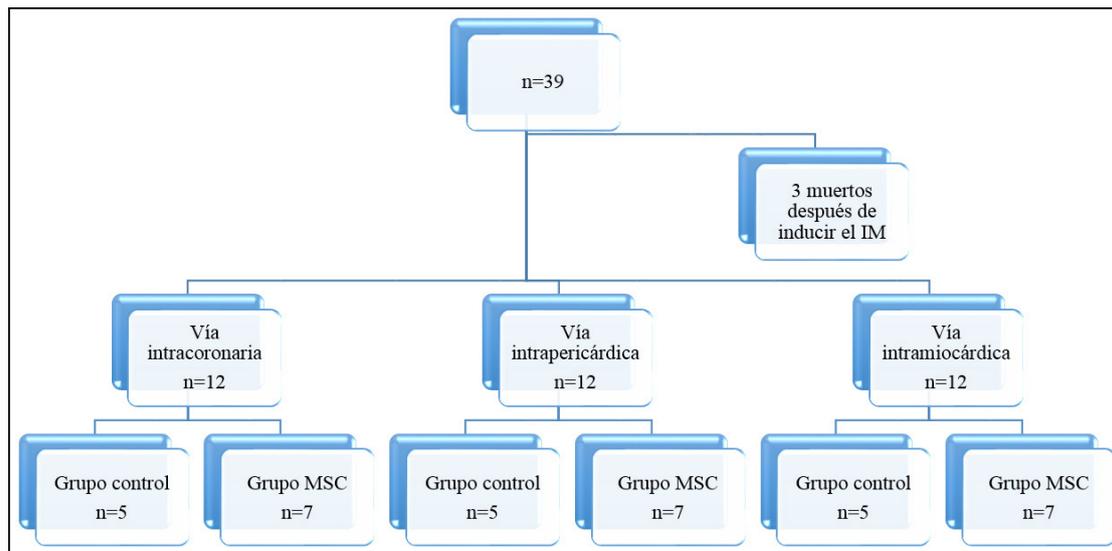


Figura 7. Distribución de los grupos de estudio. Grupo control tratado con suero salino fisiológico. Grupo MSC tratado con células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo.

Metodología

Cultivo celular

Aislamiento

El aislamiento de las células madre fue realizado por los miembros de la Unidad de Terapia Celular del CCMIJU.

El proceso se llevó a cabo a partir de una muestra alogénica de tejido adiposo de la especie porcina, obtenida en el quirófano en condiciones de esterilidad y siguiendo protocolos de aislamiento de células madre en cerdos, previamente descritos (Casado JG, 2012).

Cultivo y expansión

Una vez aisladas, las células se incubaron en un frasco de cultivo de 25 cm². El medio de cultivo utilizado fue DMEM bajo en glucosa suplementado con un 10% de FBS, 1% de L-Glutamina y un 1% de penicilina-estreptomomicina. El mantenimiento del frasco de cultivo se realizó en una incubadora a 37°C con un 5% de CO₂ y un 20% de O₂.

Transcurridas 48 horas desde la siembra, se cambió el medio de cultivo de tal manera que todas aquellas células que no se hubieran adherido a la base del frasco de cultivo se eliminaran.

A partir de aquí, se realizaron dos cambios de medio por semana. Las células adheridas se expandieron hasta alcanzar una confluencia de aproximadamente el 80%, momento en el que se realizó un pase (Figura 8). Para despegar las células, éstas se incubaron con tripsina al 1% a 37°C durante 5 minutos, transcurrido ese tiempo se añadió DMEM para inactivar la tripsina. A continuación la mezcla se centrifugó a 1500 revoluciones por minuto durante cinco minutos.

Tras finalizar el centrifugado, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en medio de cultivo nuevo. Las células se sembraron en un frasco de cultivo de 175 cm² con una densidad de siembra de 875.000 células por Flask a razón de 5.000 células por cm².

Una vez establecidas las condiciones de siembra se inició el proceso de expansión hasta obtener el número total de células necesario para desarrollar la fase experimental del estudio.

Marcaje con hierro (Endorem®)

Las nanopartículas de óxido de hierro superparamagnético ofrecen una óptima señal en la secuencia T2* de la resonancia magnética. Con el fin de realizar el seguimiento *in vivo* de las MSC tras la administración intracoronaria, intrapericárdica e intramiocárdica éstas se marcaron con hierro.

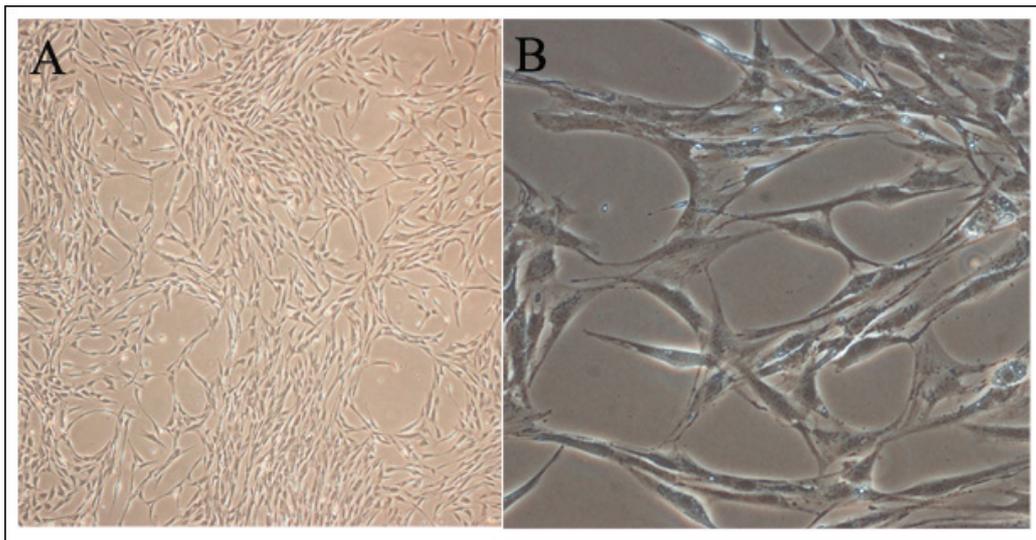


Figura 8. Cultivo de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo de especie porcina. A. Aumento x4. B. Aumento x20.

La solución de hierro fue previamente recubierta con poli-L-lisina a 0,02 mg/mL (MW=389.000 Daltons) como un agente facilitador. Ambos (hierro y poli-L-lisina) se agitaron suavemente durante 30 minutos a temperatura ambiente y se añadió a los cultivos celulares adherentes en una proporción de 1:1 en DMEM conteniendo FBS al 10%. La concentración final en todos los grupos fue de 25 mg/ml de hierro.

La eficiencia del etiquetado *in vitro* fue determinada por tinción azul de Prusia de tal manera que las células marcadas con hierro se teñían de azul (Gómez-Mauricio RG, 2013).

Congelación y descongelación

Una vez las células alcanzaron un 80% de confluencia se congelaron hasta el día previsto para su inoculación. El medio de congelación utilizado se constituyó con un 90% de FBS y un 10% de DMSO.

Recuentos celulares. Estudio de viabilidad

El día previsto para la administración de las células se descongelaron y se realizó un recuento y un estudio de viabilidad de forma automática con el Countess™. Éste nos proporcionó el número total de células, el número de células vivas y muertas y la viabilidad en tanto por ciento.

Procedimiento quirúrgico

Tratamiento farmacológico

Se administró un tratamiento preventivo para disminuir el riesgo de arritmias, evitar infecciones y prevenir la formación de trombos. Este tratamiento se detalla en la Tabla 2.

Protocolo anestésico

Todos los procedimientos se realizaron bajo anestesia general. Para ello, los animales se premedicaron con ketamina (20 mg/kg) (Ketolar®, Parke Davis) por vía intramuscular profunda. Antes de la inducción anestésica, se preoxigenó mediante una mascarilla facial (máscara de Hall) durante cinco minutos con oxígeno al 100% y un flujo de gas fresco de 3-5 l/min. La inducción de la anestesia se llevó a cabo con propofol 2% (4 mg/kg) (Recofol®, Bayer), por vía intravenosa, a través de la vena marginal de la oreja.

La ventilación se realizó con oxígeno al 100% con un volumen tidal de 15 ml/kg a una tasa ajustada (10-12 ventilaciones/minuto) para obtener valores de normocapnia. El mantenimiento anestésico se llevó a cabo mediante infusión continua de propofol 2% (4 mg/kg/h) (Recofol®, Bayer).

Durante toda la intervención se administró una infusión continua de Apiroserum Ringer Lactato® (5-10 ml/kg/h) a través de la vena marginal de la oreja.

Intubación selectiva y colapso pulmonar

En aquellos animales en los que se administró el tratamiento mediante abordaje toracoscópico se realizó la intubación selectiva del pulmón derecho para conseguir el colapso del pulmón izquierdo facilitando, así, el acceso al corazón y aumentando el espacio de trabajo.

Para realizar el colapso se utilizaron tubos endobronquiales de doble luz tipo Robert-Shaw (Carrasco Jiménez MS, 1998; Huerta Millán C, 2001; Wilson WC, 2009).

Algoritmo de reanimación cardiopulmonar

Previamente al inicio del estudio, se definió un protocolo de reanimación cardiopulmonar (RCP) basado en las Guías para la Resucitación 2010 del Consejo Europeo de Resucitación (ERC). Este protocolo se aplicó a todos aquellos animales que manifestaron FV durante la inducción del modelo de IM o durante la administración del tratamiento.

Creación del modelo

Una vez anestesiados, los animales se colocaron en posición de decúbito supino. El acceso vascular se llevó a cabo a través de las arterias femorales (derecha o izquierda) mediante la técnica de Seldinger modificada utilizando una vaina introductora de 7F.

Tabla 2. Protocolo médico administrado a los animales durante el estudio

| NOMBRE COMERCIAL | PRINCIPIO ACTIVO | POSOLOGÍA |
|--|-------------------------|--|
| TRANGOREX | Amiodarona | 400 mg/24h vía oral. Desde 7 días antes y hasta 3 días después de la creación del modelo |
| ASPIRINA | Ácido Acetil Salicílico | Desde 1 día antes y hasta el sacrificio 500 mg/24h vía oral |
| PLAVIX | Clopidogrel | El día anterior a la creación del modelo 300 mg vía oral. Posteriormente, 75 mg/24h hasta el sacrificio |
| LIDOCAÍNA 2% | Lidocaína | Un bolo (1 mg/kg) inmediatamente antes de la oclusión del vaso. Infusión continua durante la reperfusión (1 mg/kg/hora) |
| DRAXXIN® | Tulatromicina | El día previo a la creación del modelo. Dosis única de 2,5 mg/kg |
| EXCENEL® RTU 50 mg/ml | Ceftiofur Clorhidrato | 3 mg/kg/24h vía intramuscular. Durante 5 días desde la administración del tratamiento |
| ULTIVA 2 mg | Remifentanilo | Analgesia intraoperatoria. Infusión continua a razón de 0,3 µg/kg/minuto |
| BUPREX® solución inyectable 0,3 mg/ml | Buprenorfina | 1 ampolla intramuscular la tarde de la inducción del infarto a la mañana siguiente |
| METACAM® 1,5 mg/ml | Meloxicam | Dosis única 0,2 mg/kg la tarde de la inducción |
| DUROGESIC® MATRIX 2,5 mg/5 parches | Fentanilo | Se colocó un parche el día de la inducción del modelo de infarto. Cada parche contiene 4,2 mg de fentanilo en una superficie de 10,5 cm ² y libera 25 µg de fentanilo por hora. |
| URBAL suspensión oral 1 g | Sucralfato | 1 sobre 20 minutos previo a la administración de la aspirina |

Tras colocar la vaina femoral se administró heparina por vía intravenosa a razón de 150 UI/kg para prevenir la agregación plaquetaria durante la intervención. Su administración se repitió cada hora hasta la retirada de la vaina femoral.

Bajo guía fluoroscópica, se introdujo a través de la vaina femoral un catéter guía de 6F sobre una guía hidrofílica de 0,035 pulgadas y extremo curvo avanzándolo en sentido craneal vía aorta ascendente hasta el origen de la arteria coronaria izquierda.

En primer lugar, se realizaron dos coronariografías de contraste para valorar la distribución de las diferentes ramas diagonales de la LAD, una en posición anteroposterior y otra oblicua anterior izquierda de 45°.

Una vez conocido el patrón arterial se decidió la localización del balón y se realizó la medida del diámetro del vaso con el fin de escoger el balón que mejor se adecuase al mismo. El tamaño del balón varió, entre los 2 y los 4 mm.

A continuación, se introdujo una microguía Spartacore 14 de 0,014 pulgadas y 300 cm de longitud, sobre la que se avanzó el balón hasta colocarlo inmediatamente por debajo del origen de la primera rama diagonal. Posteriormente, se infló con una solución de SSF y contraste. Tras comprobar la correcta interrupción del flujo sanguíneo se mantuvo la oclusión de la arteria durante 90 minutos.

Transcurrido este tiempo se desinfló el balón permitiendo la reperfusión de la arteria. Para comprobar la permeabilidad del vaso se repitió la coronariografía.

Durante los primeros 60 minutos de reperfusión los animales se mantuvieron bajo vigilancia con una infusión continua de lidocaína (1 mg/kg/h). Transcurrido este tiempo los animales se recuperaron de la anestesia y se devolvieron al animalario.

Administración del tratamiento

El tratamiento administrado en el grupo control consistió en 5 ml de SSF estéril. En el

grupo tratado con células se inyectaron un total de 30 millones de células diluidas en 5 ml de SSF (6×10^6 células/ml de SSF).

Vía intracoronaria

El acceso se realizó de la forma descrita anteriormente para la creación del modelo. Se situó el balón OTW inmediatamente distal al origen de la primera rama diagonal. Se infló a la presión indicada según fabricante y se procedió a administrar el tratamiento. La velocidad de administración del tratamiento fue de 1 ml/minuto durante 5 minutos hasta completar los 5 ml de solución (Figura 10). Finalizada la administración del tratamiento se comprobó la permeabilidad del vaso mediante coronariografía.

Vías intrapericárdica e intramiocárdica

En ambos grupos, la administración del tratamiento se llevó a cabo utilizando el abordaje toracoscópico. En la Figura 9 está representada la colocación del equipo quirúrgico durante la toracoscopia.

Los animales se situaron en decúbito lateral derecho con una inclinación ventral de 45°. El acceso al hemitórax izquierdo se realizó a través de tres puertas de entrada. El primer trocar (11 mm) se situó en el 6° espacio intercostal, en la línea axilar media. A través de este trocar se introdujo una óptica (30°, 5 mm) y se realizó una exploración del hemitórax.

A continuación, bajo visión directa, se colocaron los otros dos trocates a través de los cuales se introdujo el instrumental. Uno de 5 mm para la mano derecha y el otro de 11 mm para la mano izquierda, en el 7° y 5° espacio intercostal, respectivamente.

Una vez dentro de la cavidad, el lóbulo pulmonar se desplazó en sentido dorsal para obtener una mayor visibilidad de la silueta cardiaca. Como puntos de referencia se localizaron la orejuela izquierda y el nervio frénico.

Vía intrapericárdica

Con la pinza de agarre fenestrada (Richard Wolf, Germany) se traccionó del saco pericárdico

por debajo del nervio frénico. La inyección se realizó con una palomilla de 23G (0,6x19 mm) modificada y conectada a una jeringa de 5 ml. Se introdujo la aguja en el espacio pericárdico evitando lesionar el miocardio y, a continuación, se inoculó el tratamiento (Figura 11).

Vía intramiocárdica

Una vez dentro de la cavidad torácica se realizó una ventana pericárdica en sentido longitudinal por debajo del nervio frénico hasta el ápex, dejando expuesta la pared del ventrículo izquierdo.

Para ello se emplearon unas tijeras de 5 mm (Covidien, USA) y una pinza de agarre fenestrada de 5 mm (Richard Wolf, Germany).

Del mismo modo que en grupo anterior, la inyección se realizó utilizando una palomilla conectada a una jeringa de 5 ml. En este caso, se realizaron 10 inyecciones alrededor de la zona infartada con la ayuda de un portaagujas recto

de 5 mm (Karl Storz, Germany). La inyección se realizó introduciendo la aguja en el miocardio procurando no llegar hasta la cámara cardiaca. A medida que se iba retirando la aguja se inyectaba el tratamiento favoreciendo, así, la infusión del mismo en todo el grosor de la pared del ventrículo (Figura 12).

Finalizada la administración del tratamiento, se ventilaron los dos pulmones y se procedió al cierre de las puertas de entrada. Antes de cerrar el último punto, el anestesista realizó el reclutamiento pulmonar mediante una inspiración forzada.

En ambos grupos el material de sutura que se utilizó fue una sutura sintética absorbible trenzada (Poysorb™ 2/0, Covidien, USA), para el cierre del tejido muscular y subcutáneo, y una sutura multifilamento de ácido poliglicólico (Safil 2/0, Braun, Alemania), para el cierre de la piel.

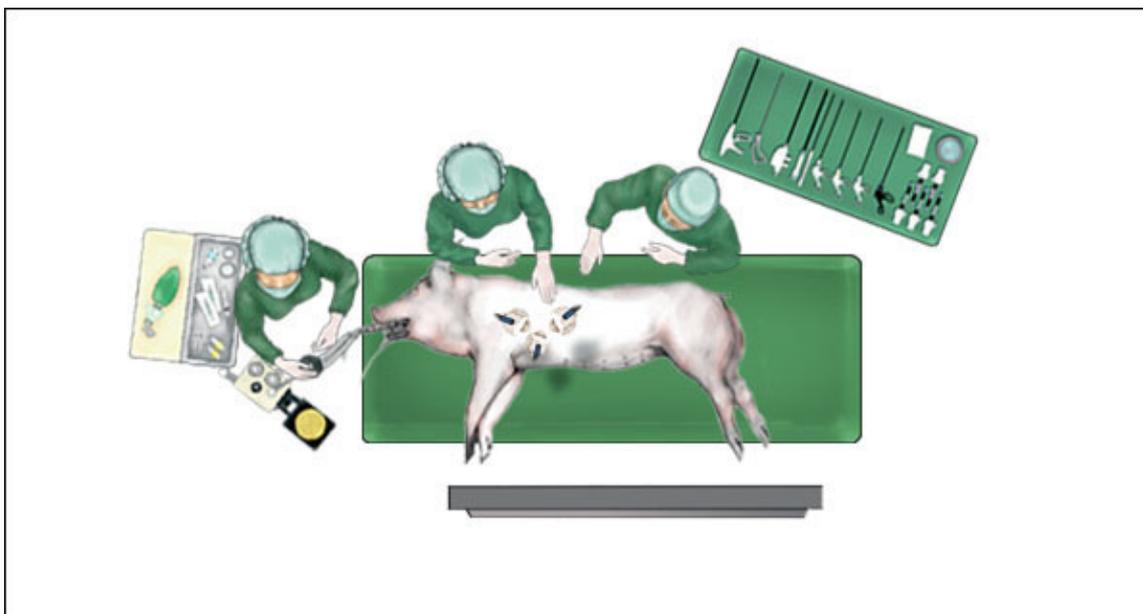


Figura 9. Esquema de la posición del equipo quirúrgico durante el abordaje toracoscópico. Vista general del quirófano.

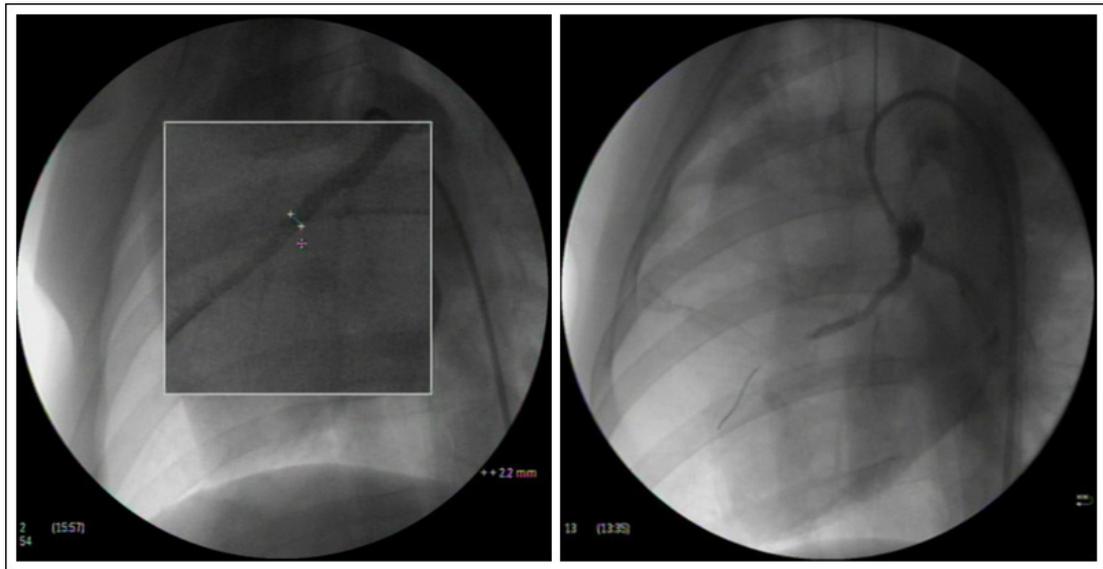


Figura 10. Coronariografía. Administración de células madre vía intracoronaria. A. Medición del calibre del vaso para la elección del balón (P10). B.- Balón inflado para la administración de las células (P8).

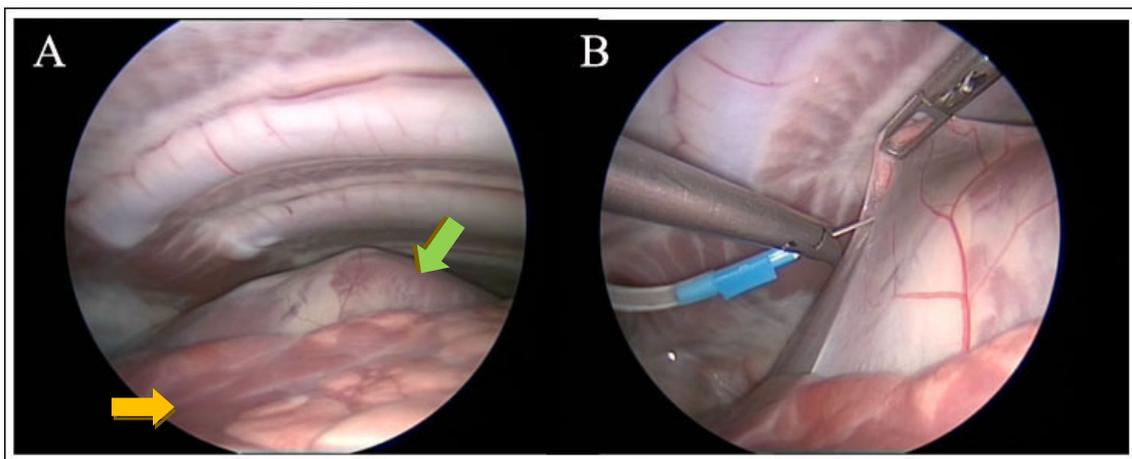


Figura 11. Toracoscopia. A. Hemitórax izquierdo tras el colapso pulmonar. Se aprecian el corazón (flecha verde) y el lóbulo craneal del pulmón izquierdo (flecha naranja). B. Administración de las células madre mesenquimales vía intrapericárdica.

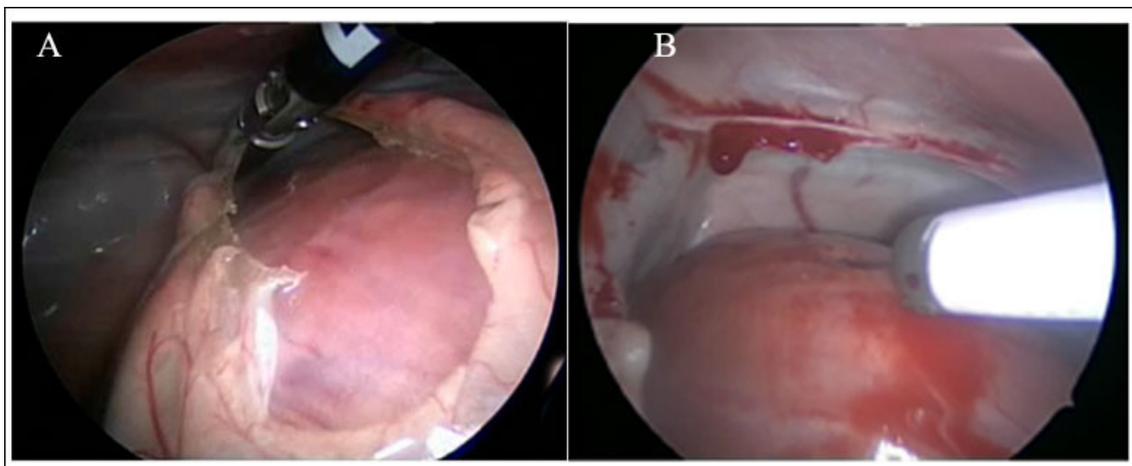


Figura 12. Toracoscopia. A. Apertura de la ventana pericárdica subfrénica. B. Administración de las células madre mesenquimales vía intramiocárdica.

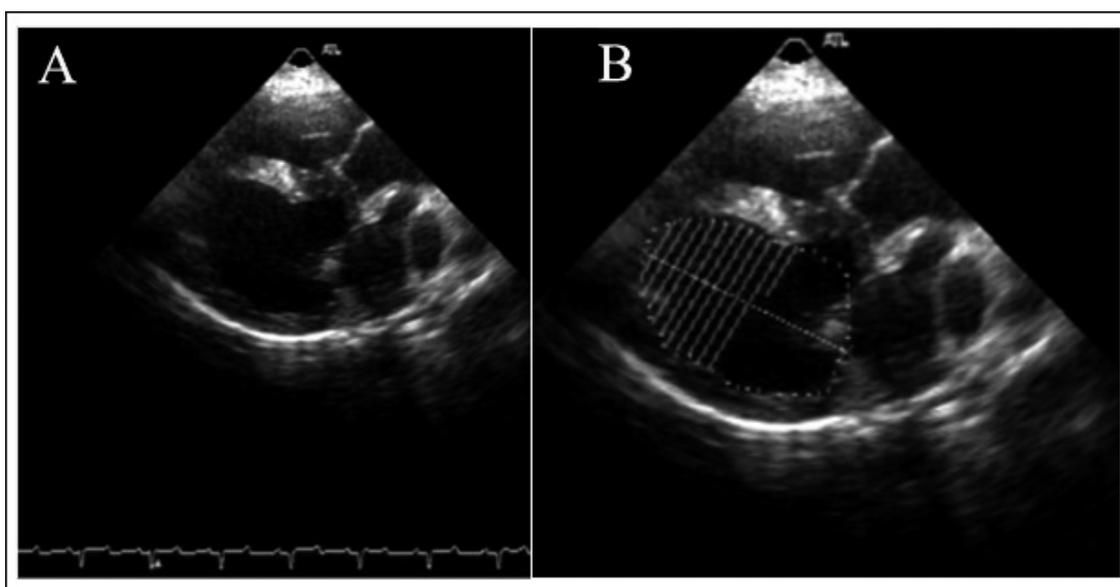


Figura 13. Estudio ecocardiográfico. A. Estudio bidimensional: imagen 4 cámaras. Estudio morfológico del corazón. B. Método Simpson: cálculo de la fracción de eyección y de los volúmenes diastólico y sistólico.

Diagnóstico por imagen

Ecocardiografía

El corazón se evaluó a través de tres ventanas acústicas: paraesternal derecha, situada entre el tercer y sexto espacio intercostal derecho; paraesternal izquierda caudal, entre el quinto y séptimo espacio intercostal izquierdo; y paraesternal izquierda craneal, entre el tercer y el cuarto espacio intercostal izquierdo.

Con esta técnica se valoraron la morfología y funcionalidad de las diferentes estructuras cardíacas (cámaras del corazón, válvulas cardíacas y grandes vasos). Se llevó a cabo un estudio bidimensional del corazón (Figura 13A), útil para valorar la anatomía cardíaca y la contractilidad miocárdica. Y, mediante el método de Simpson, se calcularon los volúmenes finales sistólico y diastólico, así como la fracción de eyección (Figura 13B).

Resonancia magnética

Todas las secuencias de imágenes se obtuvieron con sincronismo cardíaco y en apnea. Los animales se colocaron en decúbito esternal y se les ajustó alrededor del tórax una bobina sense tipo *phase array* de cuatro elementos. Las imágenes fueron adquiridas en tres planos

cardíacos: eje corto, eje largo y cuatro cámaras (Figura 14).

En el estudio basal la medición de la función ventricular se realizó en la secuencia de cine. Esta secuencia aportó información esencial y básica sobre la dimensión de las cámaras cardíacas, el grosor de las paredes, la masa del VI y la funcionalidad de ambos ventrículos. Con esta secuencia también se pudo constatar que no hubo presencia de estenosis valvulares ni regurgitación.

Además de la secuencia de cine, en los estudios realizados a los 2 días (previamente a la administración del tratamiento), al mes, a los 2 meses y a los 3 meses se llevó a cabo una secuencia de realce tardío. Ésta se obtuvo tras la administración de contraste para la detección y cuantificación del infarto de miocardio, así como para la detección del tejido disfuncional pero viable (Figura 15A). La secuencia de imágenes se obtuvo trascurridos 5 minutos de la administración de gadobutrol (Gadovist®, Bayer, Berlín, Alemania) a una dosis de 0,2 mmol/kg.

Una vez administrado el tratamiento, en los animales tratados con MSC, se realizó una secuencia T2* que se utilizó para localizar las células tras su administración y así poder valorar la vía de administración utilizada (Figura 15B).

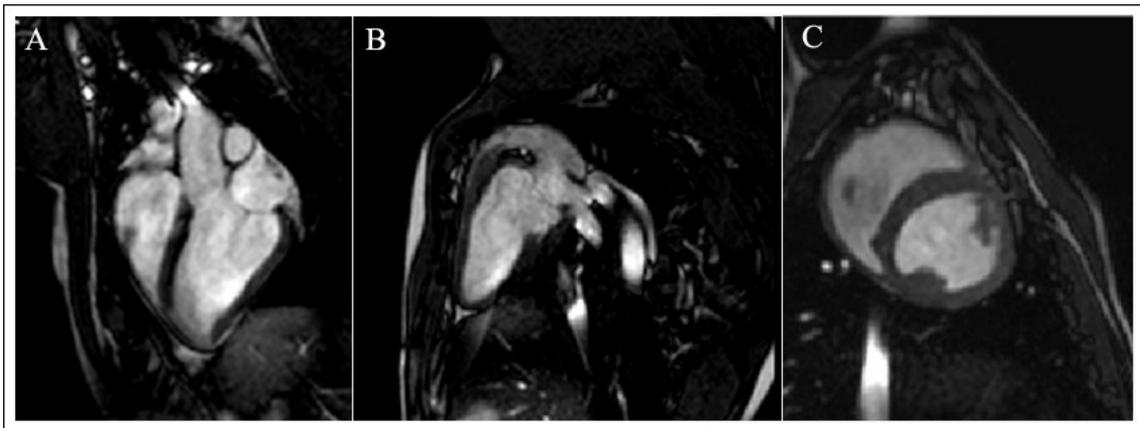


Figura 14. Planos de resonancia magnética. A. Plano coronal del corazón en el que se aprecian las cuatro cámaras cardíacas. B. Plano sagital del corazón o eje largo. Se observan dos cámaras cardíacas, la aurícula y ventrículo izquierdos. C. Corte axial. Corresponde con el eje corto donde son visibles los ventrículos derecho e izquierdo.

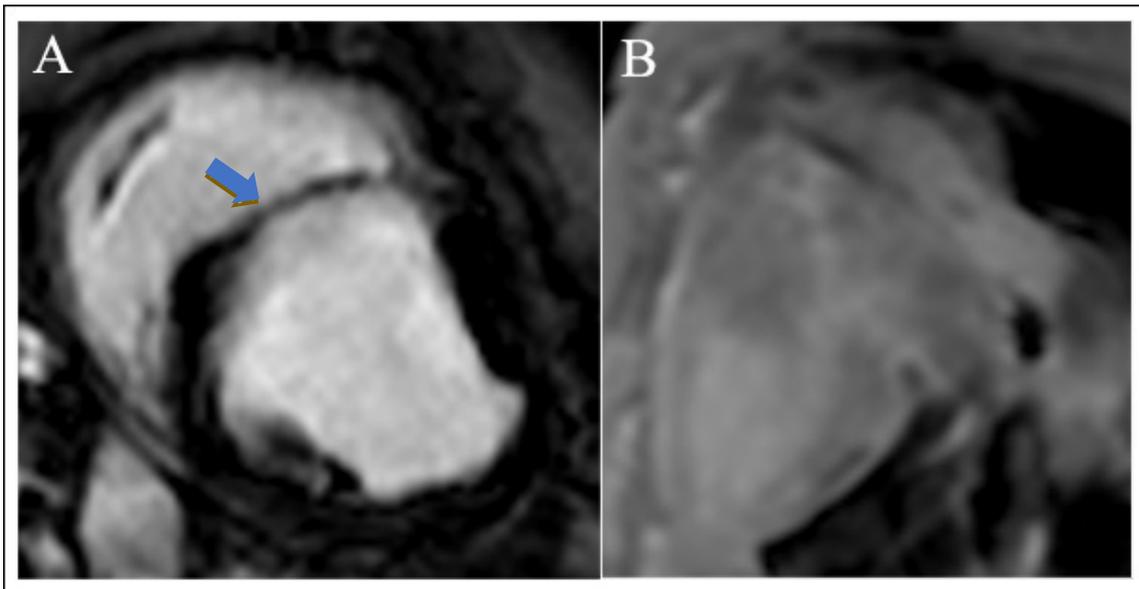


Figura 15. Secuencias de resonancia magnética. A. Secuencia de viabilidad empleada para medir el porcentaje de miocardio afectado por el infarto (flecha). B. Secuencia T2* empleada para localizar las MSC tras su inyección.

Técnicas de laboratorio

En todos los seguimientos se extrajo una muestra de sangre para comprobar el estado general de los animales mediante hematología y bioquímica sanguíneas.

Además, se realizó una determinación de la concentración plasmática de Troponina I y de CKMB en las fases: basal, tras la creación del modelo y tras la administración del tratamiento.

Parámetros evaluados

La monitorización de los animales, durante la creación del modelo y durante la administración del tratamiento, permitió valorar el estado de los mismos mediante la recogida de parámetros como la frecuencia cardíaca, la saturación de oxígeno y ECG. Especial importancia se prestó a los cambios que se produjeron en el segmento ST del ECG así como la aparición de arritmias y la presencia de fibrilación ventricular.

La determinación enzimática (TnI y CKMB) permitió valorar el daño miocárdico tras la oclusión de la arteria descendente anterior.

La permeabilidad de la arteria tras la inducción del modelo y tras la administración de las células se comprobó mediante coronariografía.

La funcionalidad cardíaca se determinó mediante ecocardiografía (Figura 16) y RM. Para ello se tuvieron en cuenta la fracción de eyección (FE) y los volúmenes finales sistólico (VFS) y diastólico (VFD). Además, con ambas técnicas se valoraron, de forma subjetiva, los cambios en la contractilidad del miocardio. Estos cambios fueron evaluados tanto por el evaluador habitual como por una persona ajena al estudio pero con experiencia en técnicas de imagen.

El procesado de las imágenes obtenidas por resonancia magnética se realizó en la estación de trabajo independiente mediante el sistema informático View-Forum versión 6.3 (Philips Medical System, Best, Países Bajos). Con este programa se calcularon los parámetros de funcionalidad cardíaca mediante la delineación en las imágenes de eje corto de los bordes endocárdicos durante la sístole y la diástole (Figura 17). También se evaluó el porcentaje de miocardio afectado por el infarto mediante la

secuencia de viabilidad. Todo ello fue calculado por un mismo operador experimentado.

Para determinar la seguridad de la vía de administración se valoraron la alteración del flujo coronario tras su administración, cambios acontecidos en el ECG durante la misma y la presencia de arritmias (taquicardia o fibrilación ventricular).

Paralelamente, se registraron la variación del peso, los tiempos quirúrgicos y la presencia de complicaciones durante y después de la intervención. Los parámetros monitorizados diariamente, durante la primera semana del postoperatorio fueron: estado y dolor de la herida quirúrgica, actitud y comportamiento, ingesta hídrica y de alimento, eliminación de heces y orina y constantes vitales (temperatura, frecuencia cardíaca y respiratoria, estado de las mucosas).

Por último, para determinar la eficacia se comparó la funcionalidad cardíaca entre las fases 2 días y 3 meses, así como las variaciones que se produjeron en el porcentaje de infarto.

Con respecto al examen histológico los parámetros que se evaluaron fueron: la fibrosis, la necrosis, el infiltrado inflamatorio y la formación

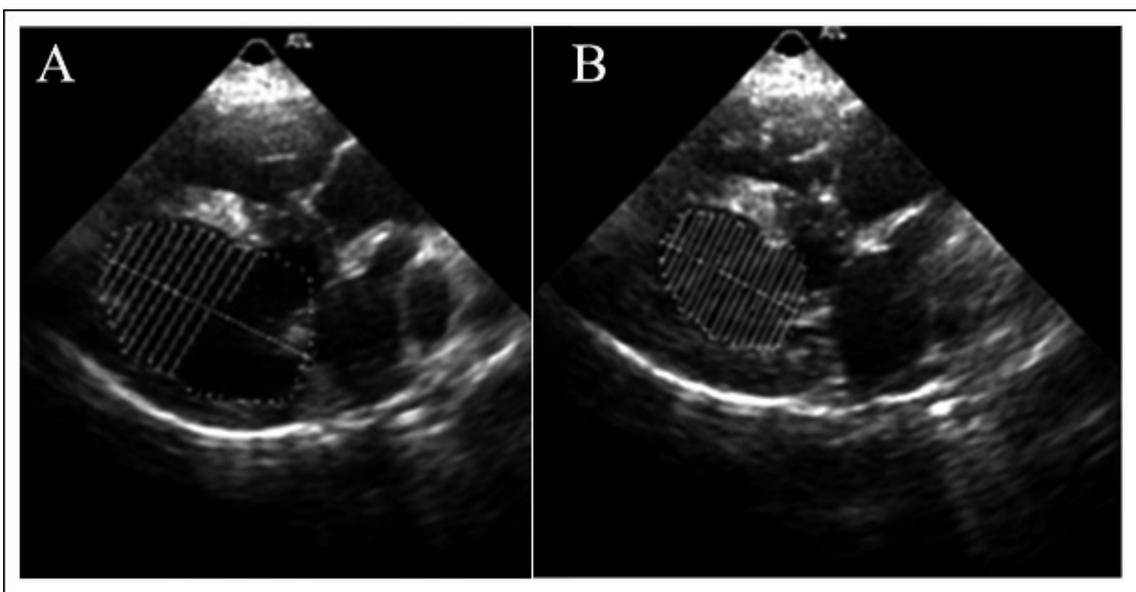


Figura 16. Estudio ecocardiográfico basal. Animal P1. Estudio de funcionalidad cardíaca: método Simpson. A. Volumen final diastólico. B. Volumen final sistólico.

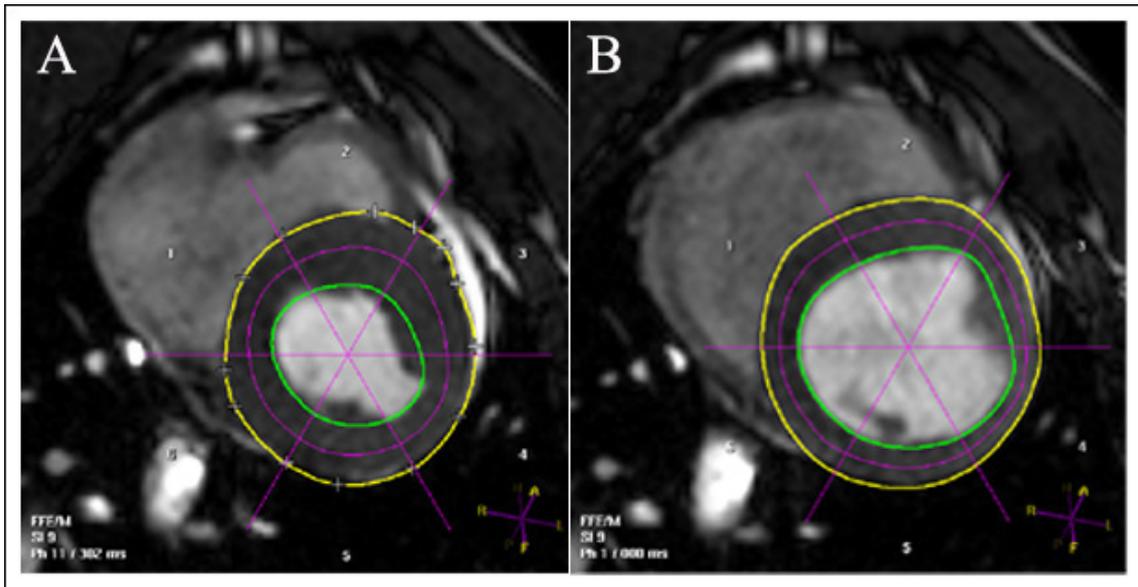


Figura 17. Procesado de imágenes por resonancia magnética. Estudio basal. Animal P27. Las imágenes A y B corresponden al eje corto del corazón en sístole y diástole, respectivamente, durante el procesado en la estación de trabajo.

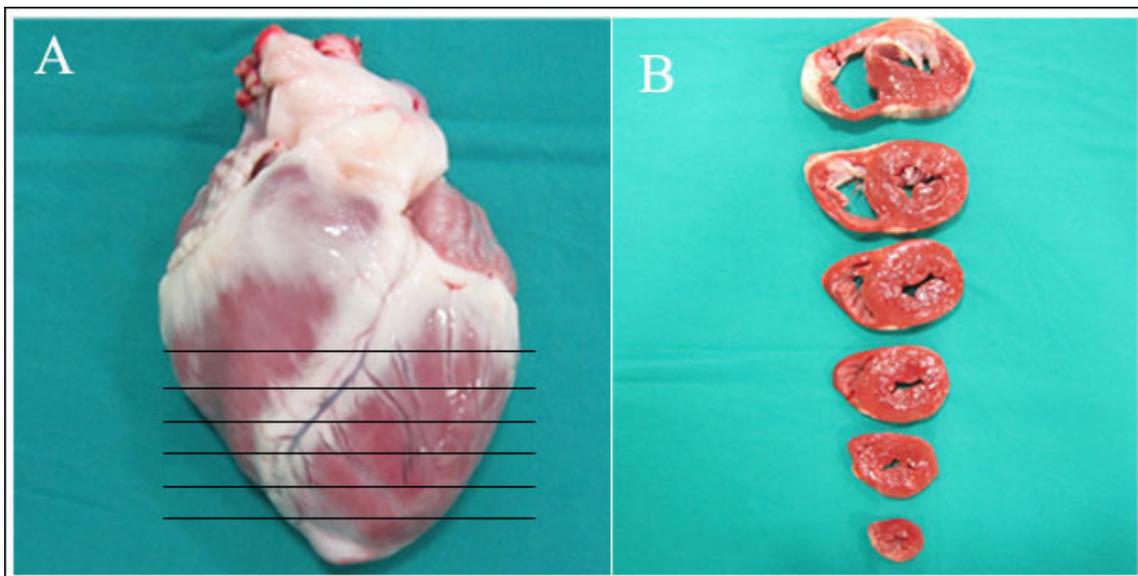


Figura 18. Recogida de las muestras de corazón. Animal P16. Grupo intrapericárdica. A. Corazón una vez extraído de la cavidad torácica. Se encuentran marcadas las líneas de corte transversales desde el ápex hasta el origen de la primera rama diagonal de la LAD: B. Cortes correspondientes a las secciones representadas en la figura A.

de neovasos. La ausencia de lesiones o cambios que entraban dentro de la normalidad recibieron el valor 0. A la presencia de pequeños cambios que, aunque escasos, superaban lo considerado como normal se les asignó el valor 1. Por último, a los valores 2, 3 y 4 se asignaron en función de la severidad de la lesión considerándose estas leve, moderada o grave, respectivamente.

Fin de estudio

Siguiendo las recomendaciones de la *American Veterinary Medical Association Guidelines for the Euthanasia on Animals* (Leary, 2013), bajo un plano profundo de anestesia, se aplicó una sobredosis de cloruro potásico provocando la muerte del animal.

Inmediatamente tras el sacrificio se realizó una necropsia sistemática tras la que se extrajo el corazón. Posteriormente, éste se dividió en secciones transversales desde el ápex hasta el origen de la primera rama diagonal de la LAD similar a los obtenidos en el estudio de RM (Figura 18).

Para el examen histológico, se tomaron muestras del VI con el objetivo de medir el grado de severidad de la lesión a nivel miocárdico comparando las diferencias existentes entre los 3 grupos de estudio. Para ello se recogieron muestras de la zona del VI donde era visible macroscópicamente el infarto y se enviaron a un laboratorio para su estudio. Se emplearon dos técnicas de tinción: Hematoxilina-Eoxina (HE) para determinar la presencia de lesiones histológicas en el tejido. Y Tricrómico de Masson (TCM) para comprobar la presencia de fibrosis en el miocardio.

Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó con el programa estadístico IBM SPSS Statistic 19. Cada una de las variables se describió como media \pm desviación estándar (SD).

Los datos de los volúmenes finales diastólicos y sistólicos, obtenidos por resonancia magnética y ecocardiografía se indexaron en función del peso para su procesado. Para ello se utilizó la fórmula descrita por Kelley KW (1973):

$$BSA=0.0734*PV^{0.656}$$

BSA: *Body Surface Area*. PV: kilogramos de peso vivo.

En primer lugar se tomaron los resultados de todos los animales, sin hacer distinción por grupos, para caracterizar el modelo de infarto. Se realizó un test de Kolmogorov-Smirnov para comprobar la hipótesis de que los datos seguían una distribución normal. Al cumplirse la hipótesis se realizó una t-student para medidas repetidas con el fin de evaluar las diferencias estadísticamente significativas entre el periodo basal y 2 días tras el infarto.

A continuación, se consideró cada grupo por separado (grupo I: vía intracoronaria, grupo II: vía intrapericárdica y grupo III: vía intramiocárdica) realizándose un estudio comparativo entre los grupos control y tratamiento (MSC). Tras comprobar que los datos no cumplían la hipótesis de una distribución normal, se utilizó una prueba no paramétrica, concretamente el test de Kruskal-Wallis con prueba *Post hoc* de U de Mann-Whitney.

Por último, se llevó a cabo una comparación entre los grupos tratados con células madre para evaluar qué método era más efectivo. Al igual que ocurrió en el caso anterior, los datos no siguieron una distribución normal por lo que se realizó el test de Kruskal-Wallis con prueba *Post hoc* de U de Mann-Whitney.

En todos los casos, se consideró un nivel de significación $p < 0,05$.

Resultados

Los resultados obtenidos en la hematología y bioquímica basales mostraron valores dentro de los rangos normales propios de la especie porcina.

CARACTERIZACIÓN DEL MODELO

En este apartado se describen los resultados en conjunto de todos los animales en las fases *basal* y *2 días* con el fin de caracterizar el modelo de infarto de miocardio.

Durante la inducción del modelo fallecieron tres animales como consecuencia de la fibrilación ventricular secundaria a la obstrucción de la LAD. Siguiendo el protocolo, estos animales fueron sustituidos por otros tres para completar los grupos de estudio. En el resto de los animales, el infarto se indujo satisfactoriamente.

La oclusión de la arteria LAD se mantuvo durante 90 minutos excepto en el animal P10. En

éste la oclusión fue tan solo de 80 minutos debido a repetidos episodios de FV que comenzaron una hora después de haberse inflado el balón. Una vez se desinfló el balón el animal se recuperó con normalidad.

El 36% de los animales presentaron episodios de FV durante el periodo de isquemia. Todos ellos respondieron satisfactoriamente a la aplicación del protocolo de RCP.

En dos animales, P22 y P28, la porción distal de la arteria LAD permaneció ocluida después de desinflar el balón (Figura 19). En ambos casos, el vasoespasmo se revirtió con la administración de nitroglicerina.

Electrocardiograma

En todos los individuos se observó la elevación del segmento ST tras la oclusión de la arteria (Figura 20).

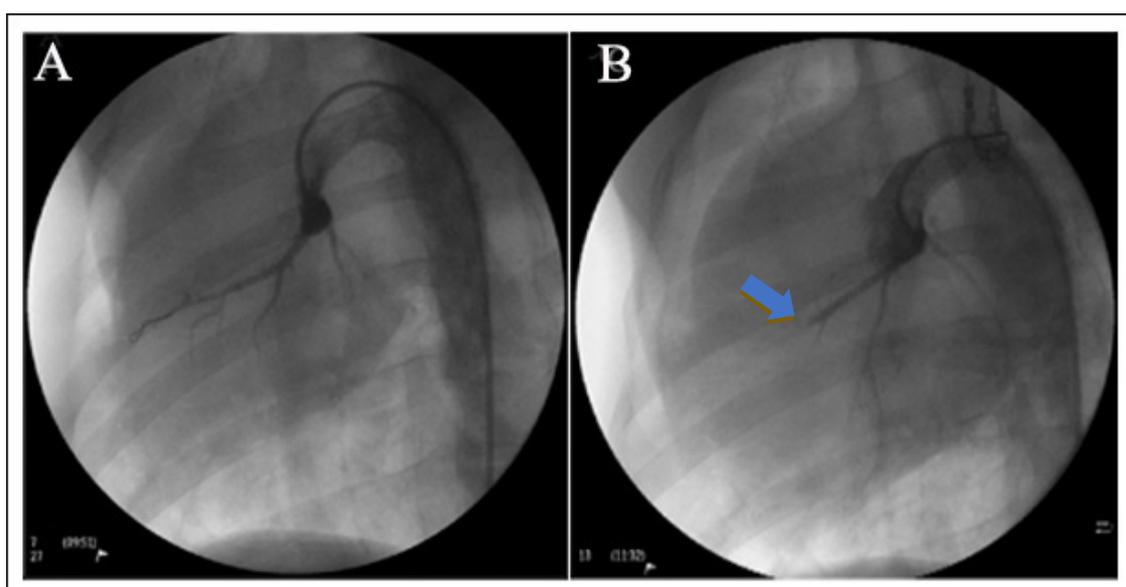


Figura 19. Coronariografía 45° oblicua izquierda correspondiente al animal P22. A. Coronariografía basal. B. Comprobación de la permeabilidad de la arteria tras desinflar el balón. Se aprecia la ausencia de flujo en la porción distal de la LAD (flecha) como consecuencia del vasoespasmo.



Figura 20. Electrocardiograma A. ECG basal B. ECG tras reperfusion. Se observa la elevación del segmento ST tras la inducción del modelo de infarto de miocardio.

Enzimas cardiacas

En la muestra de sangre obtenida inmediatamente tras la inducción del modelo de IAM se observó un aumento estadísticamente significativo de la concentración de TnI ($p=0,0001$) y CK-MB ($p=0,029$), respecto a muestra basal (Figura 21).

Funcionalidad cardiaca

Los datos correspondientes a la funcionalidad cardiaca están agrupados en las Tablas 3 (RM) y 4 (ecocardiografía).

Resonancia magnética

En la RM se observó un aumento significativo de los volúmenes finales indexados diastólico ($p=0,0001$) y sistólico ($p=0,003$) respecto a la fase basal. El descenso observado en la fracción de eyección (FE), entre las fases basal y 2 días, también resultó estadísticamente significativo ($p=0,0001$).

En la secuencia de viabilidad (Figura 22), realizada en la fase 2 días se observó una zona hiperintensa en el septo interventricular correspondiente a un retraso en la eliminación del contraste como consecuencia de la isquemia. En esta secuencia se determinó que el porcentaje de miocardio afectado por el infarto fue de $11,41\pm 6,42\%$.

Ecocardiografía

Los resultados de funcionalidad cardiaca obtenidos mediante ecocardiografía fueron similares a los obtenidos por RM.

En el estudio realizado en la fase 2 días se observó un aumento significativo de los volúmenes finales indexados sistólico ($p=0,011$) y diastólico ($p=0,005$) respecto al estudio basal. Asimismo, se produjo una reducción estadísticamente significativa de la FE entre las fases ($p=0,030$).

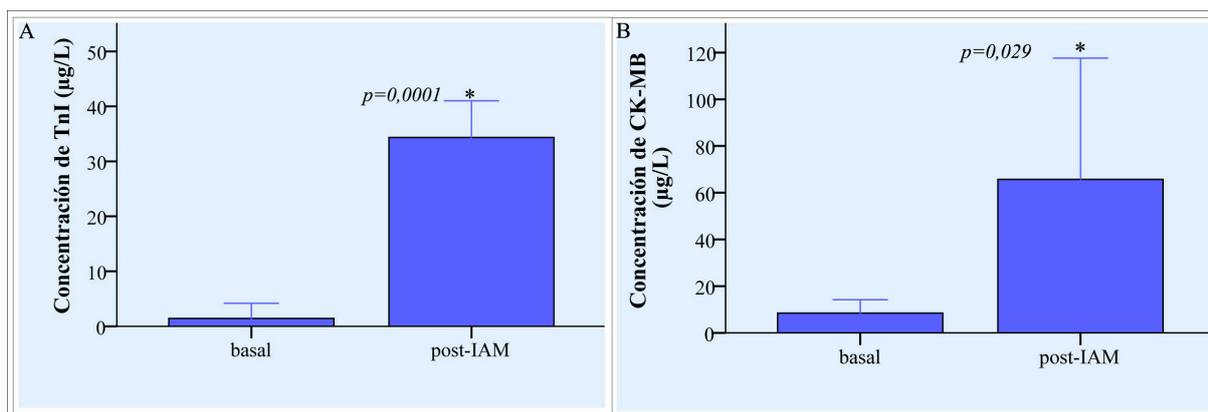


Figura 21. Media de la concentración en sangre de las enzimas cardíacas. A. Concentración en sangre de TnI. B. Concentración en sangre de CK-MB.

*Diferencias estadísticamente significativas respecto al valor basal.

Tabla 3.- Estudio de funcionalidad cardíaca. Resonancia magnética

| | <i>fases de estudio</i> | | <i>nivel de significación</i> |
|---|-------------------------|---------------|-------------------------------|
| | Basal | 2 días | |
| <i>FE (%)</i> | 50,62±8,51 | 40,60±7,58 | 0,0001 |
| <i>VFD_i (ml/m²)</i> | 75,39±10,52 | 87,88±16,73 | 0,003 |
| <i>VFS_i (ml/m²)</i> | 37,17±10,16 | 52,59±14,15 | 0,0001 |
| <i>% IAM</i> | n/a | 11,41±6,41 | n/a |

FE: fracción de eyección. VFD_i: volumen final diastólico indexado. VFS_i: volumen final sistólico indexado. %IAM: porcentaje de miocardio afectado por el infarto. n/a: no aplicable.

Tabla 4.- Estudio de funcionalidad cardíaca. Ecocardiografía

| | <i>fases de estudio</i> | | <i>nivel de significación</i> |
|---|-------------------------|---------------|-------------------------------|
| | Basal | 2 días | |
| <i>FE (%)</i> | 67,94±10,23 | 60,67±12,83 | 0,030 |
| <i>VFD_i (ml/m²)</i> | 52,57±19,16 | 63,70±22,78 | 0,005 |
| <i>VFS_i (ml/m²)</i> | 17,47±9,49 | 25,98±12,83 | 0,011 |

FE: fracción de eyección. VFD_i: volumen final diastólico indexado. VFS_i: volumen final sistólico indexado.

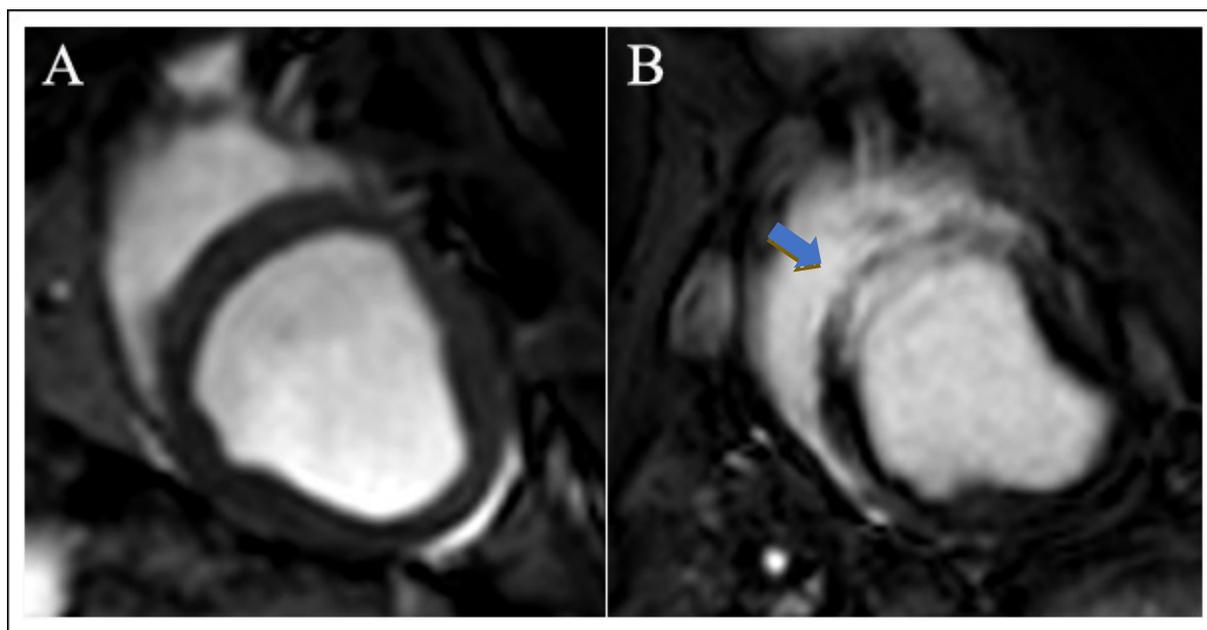


Figura 22. Imágenes de resonancia magnética correspondientes al animal P22. A. Estudio basal. Secuencia de cine, eje corto. B. Estudio 2 días. Secuencia de viabilidad, eje corto. En esta Figura se observa una zona hiperintensa (flecha) debido al retraso en la eliminación del contraste en la zona del miocardio afectada por el infarto.

EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD DE LAS VÍAS DE ADMINISTRACIÓN

Complicaciones perioperatorias

Grupo I. Administración intracoronaria

En los animales P2 y P7, tras la administración intracoronaria de las células, se observaron extrasístoles ventriculares en el ECG.

Una vez administrado el tratamiento se realizó una coronariografía para comprobar la permeabilidad del vaso. En todos los sujetos, excepto en el animal P7, la arteria era permeable. En este animal, se produjo una obstrucción completa de la mitad distal de la arteria descendente anterior asociada a 2 episodios de fibrilación ventricular siendo necesario aplicar el protocolo de RCP (Figura 23). Además, se administró nitroglicerina intracoronaria (200 µg diluidos en 2 ml de SSF), a través del catéter balón. Cinco minutos después de administrar la nitroglicerina se comprobó que el vaso era permeable mediante coronariografía.

Grupo II. Administración intrapericárdica

El abordaje toracoscópico permitió un acceso rápido a la cara anterior del corazón. Durante la administración del tratamiento, no se produjo ningún episodio de fibrilación ventricular. Sin embargo, en tres animales se observaron salvas de extrasístoles en el ECG asociadas a la tracción del pericardio.

Grupo III. Administración intramiocárdica

En este grupo también se observó salvas de extrasístoles al traccionar del pericardio para abrir la ventana pericárdica, en cuatro animales. Además, el animal P31 sufrió un episodio de fibrilación ventricular durante la apertura de la ventana, lo que hizo necesario aplicar el protocolo de RCP. En este animal la inyección de las células se pudo completar satisfactoriamente transcurridos 10 minutos desde la RCP.

Complicaciones postoperatorias

En ningún animal se observaron reacciones de hipersensibilidad o toxicidad asociadas a la administración de las células.

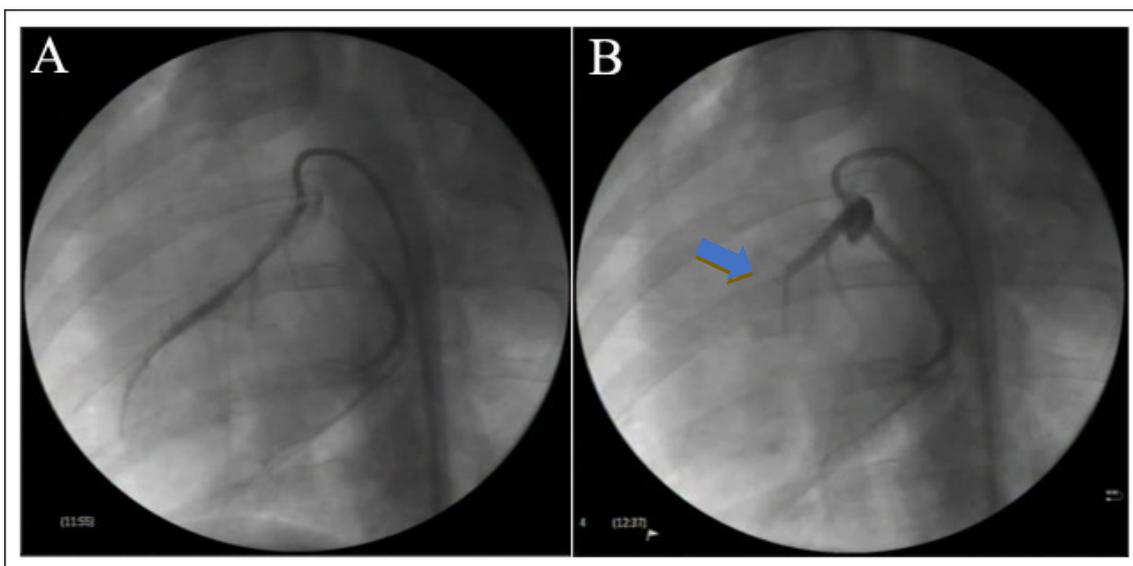


Figura 23. Coronariografía 45° oblicua izquierda. Animal P7. Grupo tratado con células madre vía intracoronaria. A. Coronariografía control, previa a la administración del tratamiento. B. Coronariografía realizada inmediatamente después de la administración de las MSC. Se aprecia la ausencia de flujo en el tercio distal de la arteria descendente anterior.

Respecto a las complicaciones asociadas a la vía de abordaje (hemorragia, dehiscencia de puntos, inflamación o dolor), tan solo en uno de los animales del grupo III (P26) se observó la dehiscencia de puntos en uno de los puertos de entrada. En este caso, el cierre de la incisión se realizó por segunda intención no siendo necesaria la administración adicional de antibioterapia o analgesia.

Periodo de recuperación

Los animales se recuperaron con normalidad de la anestesia en las dos horas siguientes al cierre del vaporizador.

Una vez en estación, los animales tuvieron acceso al agua y el mismo día de la intervención, por la tarde, se les ofreció dieta blanda volviendo a su dieta habitual de pienso compuesto el día siguiente a la administración del tratamiento. En este sentido, no se encontraron alteraciones de la ingesta hídrica o de sólidos, a lo largo del estudio.

Estado general de los sujetos de estudio

Durante el estudio, no se observaron cambios en el estado general de los animales. Además, en ningún caso se documentaron alteraciones en la

actitud ni en el comportamiento de los sujetos de estudio.

Las constantes vitales, así como los parámetros medidos en la hematología y la bioquímica sanguíneas se mantuvieron dentro de los rangos establecidos como normales para la especie.

A lo largo del estudio se registró la muerte de un animal (P6), cuyo tratamiento con MSC fue aplicado vía intracoronaria (grupo I). Dicho animal murió a los tres meses, antes de realizar el seguimiento fin de estudio, por lo que no se pudieron realizar las pruebas de funcionalidad cardíaca, aunque sí se realizaron el estudio *post mórtem* y la toma de muestras. En ningún caso esta muerte se asoció al tratamiento recibido o a la vía de administración utilizada para aplicar el mismo.

Tiempos quirúrgicos

En este punto nos referimos al tiempo empleado en la administración del tratamiento. Así, el tiempo empleado en administrar el tratamiento vía intracoronaria (Grupo I), desde la punción femoral hasta la retirada de la vaina introductora, fue de $59,50 \pm 19,13$ minutos.

En este grupo, en el animal (P6), no fue posible cateterizar la arteria femoral derecha para administrar el tratamiento. Esto hizo necesario realizar el acceso a través de la arteria femoral izquierda lo que resultó en un aumento del tiempo quirúrgico (103 minutos).

En los grupos en los que se utilizó el abordaje toracoscópico, el tiempo quirúrgico se contabilizó desde el inicio de la primera incisión hasta el cierre de todas las incisiones siendo en el grupo tratado vía intrapericárdica (Grupo II) de $42,33 \pm 8,76$ minutos y en el grupo III (intramiocárdica) de $69,75 \pm 23,60$ minutos.

En tres animales del grupo intramiocárdica el tiempo quirúrgico fue mayor debido, en uno de ellos, a la presencia de FV (P26) durante la inoculación del tratamiento (110 minutos). Y, en los otros dos, P31 (110 minutos) y P35 (85 minutos), debido a la necesidad de cambiar la posición inicial del trocar de la óptica puesto que no nos permitía una visión adecuada de la cara anterior del corazón. Así, se modificó la posición inicial del paciente hasta colocarlo en decúbito supino. Y, posteriormente, las puertas de entrada se situaron en posición más ventral (más cercana al esternón).

La vía de administración que invierte menor tiempo en la inoculación del tratamiento es la vía intrapericárdica, aunque solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo tratado vía intramiocárdica ($p=0,002$).

EVALUACIÓN DE EFICACIA

Estudio comparativo entre fases

Administración intracoronaria

Funcionalidad cardiaca

Tanto la RM como la ecocardiografía revelaron una alteración de la funcionalidad cardiaca.

Resonancia magnética

Los datos de funcionalidad cardiaca obtenidos mediante RM están recogidos en la Tabla 5. Estos datos están representados en los gráficos 1, 2 y 3 del Anexo 1.

En ambos grupos (control y MSC) la FE se mantuvo constante durante los tres meses, no encontrándose variaciones estadísticamente significativas entre fases. En el caso del grupo control, los volúmenes finales indexados, diastólico y sistólico, se produjo un aumento no significativo mientras que en el grupo tratado con células se produjo un aumento que sí resultó significativo entre las fases 2 días y 3 meses ($VFD_i: p=0,022$ y $VFS_i: p=0,022$).

Respecto al porcentaje de miocardio afectado por el infarto, aunque no se encontraron diferencias significativas entre los grupos, sí se observó que el porcentaje de infarto fue ligeramente mayor en el grupo control que en el grupo tratado con MSC.

Por último, en ambos grupos, en la secuencia de viabilidad del estudio de RM se observó una zona hiperintensa como consecuencia de una demora en la eliminación del contraste en la zona afectada por la isquemia (Figura 24).

Ecocardiografía

Los datos correspondientes a la ecocardiografía aparecen en la Tabla 6 y están representados por los gráficos 1, 2 y 3 del Anexo 2.

En este caso, se observó que la fracción de eyección se redujo entre las fases 2 días- 3 meses aunque no de forma significativa, en ambos grupos.

En el caso de los volúmenes indexados, en el grupo control se observó un aumento significativo entre las fases 2 días y 3 meses, tanto en el VFD_i ($p=0,008$) como en el VFS_i ($p=0,008$). Sin embargo, en el grupo tratado con células, aunque se observó un aumento progresivo de ambos volúmenes (VFD_i y VFS_i) éste no fue significativo.

Tabla 5.- Grupo I. Vía intracoronaria. Estudio de funcionalidad cardiaca por resonancia magnética

| | grupo | fases de estudio | | | | nivel de significación |
|--|---------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|------------------------|
| | | 2 días | 1 mes | 2 meses | 3 meses | 2días-3meses |
| FE (%) | control | 37,16±8,82 ^a | 39,68±9,68 ^a | 36,10±5,60 ^a | 38,48±8,15 ^a | NS |
| | MSC | 40,15±7,01 ^a | 36,00±11,55 ^a | 39,50±7,20 ^a | 37,18±5,41 ^a | NS |
| VFD _i (ml/m ²) | control | 93,98±23,67 ^a | 94,12±15,50 ^a | 101,50±10,43 ^a | 103,08±12,42 ^a | NS |
| | MSC | 91,30±18,43 ^a | 99,65±35,16 ^{ab} | 113,16±36,69 ^{ab} | 136,37±38,10 ^b | 0,022 |
| VFS _i (ml/m ²) | control | 59,95±18,21 ^a | 58,34±14,69 ^a | 65,45±10,70 ^a | 64,59±12,99 ^a | NS |
| | MSC | 55,39±18,43 ^a | 62,17±28,04 ^{ab} | 75,81±36,87 ^{ab} | 86,54±31,24 ^b | 0,022 |
| IAM (%) | control | 15,40±8,82 ^a | 20,0±10,95 ^a | 20,40±10,85 ^a | 13,80±14,72 ^a | NS |
| | MSC | 11,14±7,03 ^a | 11,70±5,0 ^a | 10,71±3,40 ^a | 9,17±3,00 ^a | NS |

MSC: grupo tratado con células mesenquimales. FE: fracción de eyección. VFD_i: volumen final diastólico indexado. VFS_i: volumen final sistólico indexado. %IAM: porcentaje de miocardio afectado por el infarto. Anexo 1: gráficos 1, 2 y 3.

Letras disímiles indican diferencias estadísticamente significativas dentro de cada grupo por fases.

NS: no existen diferencias estadísticamente significativas.

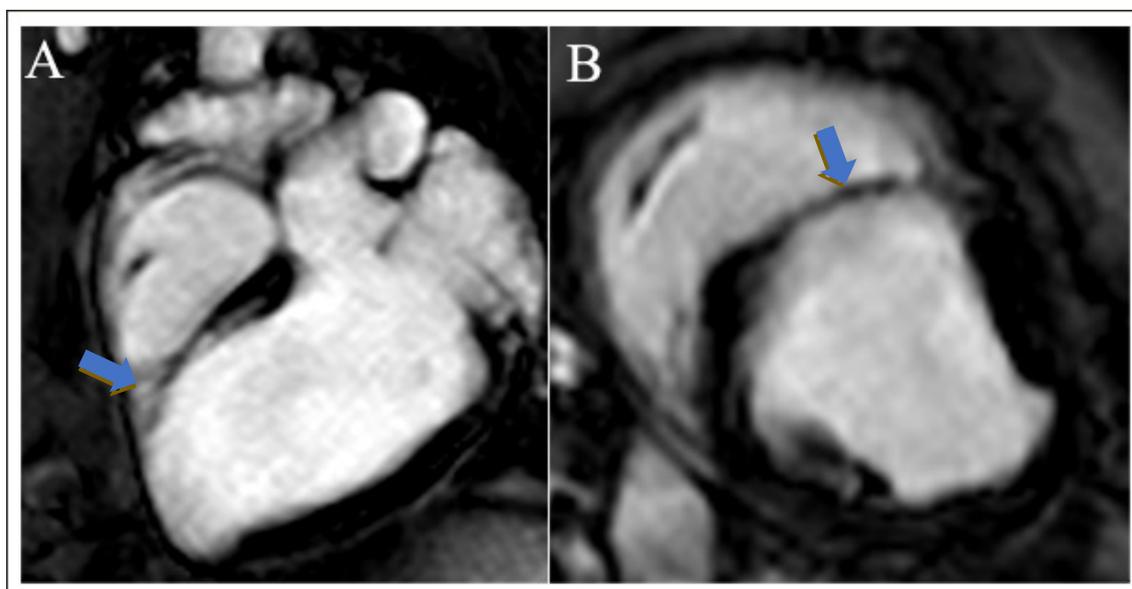


Figura 24. Secuencia de viabilidad. Resonancia magnética. Grupo I (administración intracoronaria). Fase 1 mes. Animal P10. Grupo tratado con MSC. A. Cuatro cámaras. B. Eje corto. Las flechas señalan la zona de infarto.

Tabla 6.- Grupo I. Vía intracoronaria. Estudio de funcionalidad cardiaca por ecocardiografía

| | grupo | fases de estudio | | | | nivel de significación |
|--|---------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------|
| | | 2 días | 1 mes | 2 meses | 3 meses | 2días-3meses |
| FE (%) | control | 67,60±10,15 ^a | 65,13±12,75 ^a | 63,60±13,62 ^a | 56,06±8,11 ^a | NS |
| | MSC | 67,66±16,58 ^a | 52,38±20,78 ^a | 65,33±12,57 ^a | 55,52±3,64 ^a | NS |
| VFD _i (ml/m ²) | control | 53,12±19,24 ^a | 65,45±26,82 ^{abc} | 89,80±22,68 ^{bc} | 103,83±8,58 ^c | 0,008 |
| | MSC | 49,61±26,46 ^a | 73,70±32,34 ^a | 88,72±32,48 ^a | 108,01±48,01 ^a | NS |
| VFS _i (ml/m ²) | control | 16,49±8,14 ^a | 26,95±16,85 ^{ab} | 33,36±15,68 ^{ab} | 44,76±7,97 ^b | 0,008 |
| | MSC | 18,83±3,74 ^a | 42,98±31,70 ^a | 43,09±32,97 ^a | 48,43±22,22 ^a | NS |

MSC: grupo tratado con células mesenquimales. FE: fracción de eyección. VFD_i: volumen final diastólico indexado. VFS_i: volumen final sistólico indexado. Anexo 2: gráficos 1, 2 y 3.

Letras disímiles indican diferencias estadísticamente significativas dentro de cada grupo por fases.

NS: no existen diferencias estadísticamente significativas.

Administración intrapericárdica

Funcionalidad cardiaca

Aunque en ningún caso se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de estudio, sí se ha podido observar una modificación de la funcionalidad cardiaca por ecocardiografía y RM.

Resonancia magnética

Los datos obtenidos mediante RM están representados en la Tabla 7 y en los gráficos 4, 5 y 6 del Anexo I.

Respecto a la fracción de eyección, en el grupo control y en el tratado con MSC se produjo un descenso de la misma a lo largo del estudio. Sin embargo, en ninguno de ellos se encontraron diferencias significativas entre las fases.

En el grupo control, el VFD_i aumentó de forma significativa entre las fases 2 días-3 meses ($p=0,016$) mientras que en el grupo tratado con células, aunque también se observó un aumento, éste no resultó significativo. En el caso del VFS_i apenas se apreciaron cambios entre fases, en ambos grupos.

En la secuencia de viabilidad, se observó la zona afectada por el infarto hiperintensa como

consecuencia del retraso de la eliminación del contraste (Figura 25).

En cuanto al porcentaje de miocardio afectado por el infarto, en el grupo control se produjo un aumento no significativo entre las fases 2 días y 3 meses. Sin embargo, en el grupo tratado con células se produjo una reducción del porcentaje de infarto, siendo significativa entre las fases 1 mes y 3 meses ($p=0,038$).

Ecocardiografía

Los datos de ecocardiografía están recogidos en la Tabla 8 y representados en los gráficos 4, 5 y 6 del Anexo II.

Los datos obtenidos mediante ecocardiografía fueron similares a los obtenidos por RM.

La FE sufrió un ligero aumento entre las fases 2 días y 3 meses aunque no resultó significativo en ninguno de los grupos (control, MSC).

En ambos grupos se produjo un aumento no significativo del VFD_i. Éste resultó ser mayor en el grupo control entre las fases 2 días y 3 meses.

Respecto al VFS_i, en el grupo control se produjo un incremento no significativo entre fases mientras que en el grupo tratado con células permaneció constante a lo largo del estudio.

Tabla 7.- Grupo II. Vía intrapericárdica. Estudio de funcionalidad cardiaca por resonancia magnética

| | grupo | fases de estudio | | | | nivel de significación |
|--|---------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|------------------------|
| | | 2 días | 1 mes | 2 meses | 3 meses | 2 días-3 meses |
| FE (%) | control | 41,1±8,0 ^a | 42,12±21,15 ^a | 50,50±18,50 ^a | 52,0±20,20 ^a | NS |
| | MSC | 42,0±9,5 ^a | 38,0±10,40 ^a | 41,82±9,45 ^a | 46,0±9,00 ^a | NS |
| VFD _i (ml/m ²) | control | 83,8±7,7 ^a | 90,21±20,64 ^{ab} | 100,2±20,73 ^{ab} | 100,37±9,00 ^b | 0,016 |
| | MSC | 82,3±19,2 ^a | 94,5±21,12 ^a | 94,1±16,27 ^a | 93,25±15,24 ^a | NS |
| VFS _i (ml/m ²) | control | 49,6±9,6 ^a | 61,3±33,51 ^a | 47,56±25,80 ^a | 49,80±24,60 ^a | NS |
| | MSC | 48,6±17,5 ^a | 58,71±16,91 ^a | 55,70±16,75 ^a | 51,36±14,81 ^a | NS |
| IAM (%) | control | 7,4±6,87 ^a | 9,80±6,38 ^a | 8,20±5,63 ^a | 7,75±5,50 ^a | NS |
| | MSC | 9,67±4,17 ^{ab} | 8,71±2,05 ^a | 8,14±2,79 ^{ab} | 6,43±1,51 ^b | NS |

MSC: grupo tratado con células mesenquimales. FE: fracción de eyección. VFD_i: volumen final diastólico indexado. VFS_i: volumen final sistólico indexado. %IAM: porcentaje de miocardio afectado por el infarto. Anexo 1: gráficos 4, 5 y 6.

Letras disímiles indican diferencias estadísticamente significativas dentro de cada grupo por fases.

NS: no existen diferencias estadísticamente significativas.

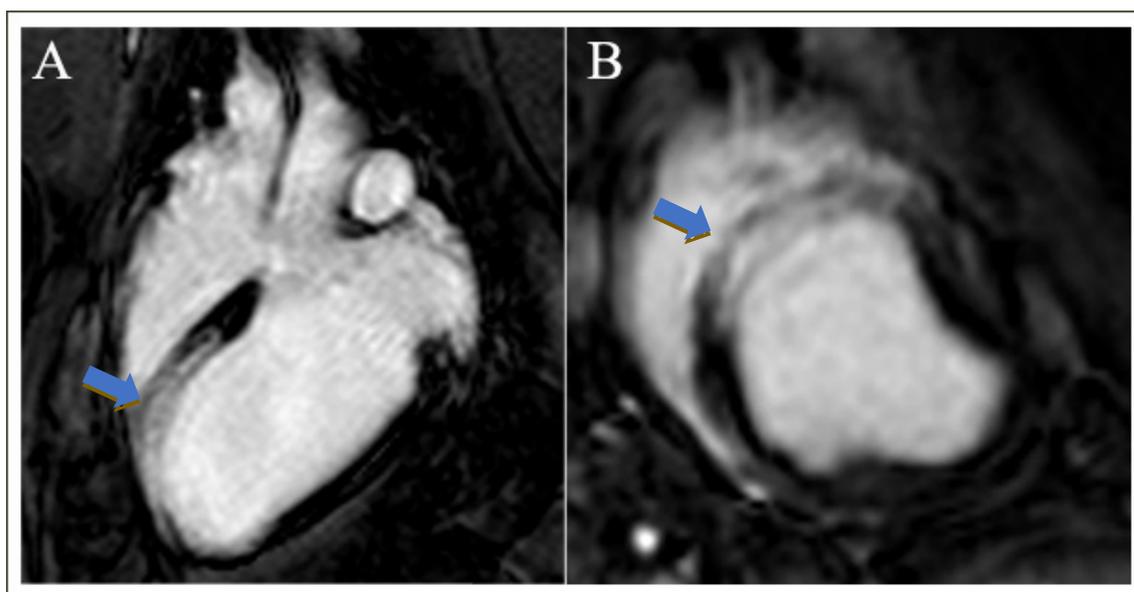


Figura 25. Secuencia de viabilidad de resonancia magnética. Grupo II (administración intrapericárdica). Fase 2 días. Animal P22. Grupo tratado con células. A. Cuatro cámaras. B. Eje corto. Zona hiperintensa (flechas) debido al retraso de la eliminación del contraste en el área afectada por la isquemia.

Tabla 8.- Grupo II. Vía intrapericárdica. Estudio de funcionalidad cardiaca por ecocardiografía

| | grupo | fases de estudio | | | | nivel de significación |
|---|----------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------|
| | | 2 días | 1 mes | 2 meses | 3 meses | 2días-3meses |
| FE (%) | control | 61,83±13,80 ^a | 57,00±16,08 ^a | 61,46±25,60 ^a | 62,86±16,77 ^a | NS |
| | MSC | 54,28±9,37 ^a | 59,78±5,66 ^a | 58,66±17,25 ^a | 57,90±10,28 ^a | NS |
| VFD_i (ml/m²) | control | 68,91±11,55 ^a | 72,32±18,89 ^a | 83,37±23,59 ^a | 92,15±27,03 ^a | NS |
| | MSC | 81,20±22,44 ^a | 81,69±18,51 ^a | 80,72±25,58 ^a | 92,62±16,16 ^a | NS |
| VFS_i (ml/m²) | control | 27,16±13,88 ^a | 30,22±13,37 ^a | 46,44±35,88 ^a | 37,73±25,44 ^a | NS |
| | MSC | 39,16±18,77 ^a | 35,36±14,85 ^a | 33,32±18,15 ^a | 39,57±13,29 ^a | NS |

MSC: grupo tratado con células mesenquimales. FE: fracción de eyección. VFD_i: volumen final diastólico indexado. VFS_i: volumen final sistólico indexado. Anexo 2: gráficos 4, 5 y 6.

Administración intramiocárdica

Funcionalidad cardiaca

Durante el estudio no se observaron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo tratado con células.

Los datos de funcionalidad cardiaca obtenidos mediante RM están recogidos en la Tabla 9 y los gráficos 7, 8 y 9 del Anexo I. Los resultados correspondientes a la ecocardiografía se resumen en la Tabla 10 y están representados por los gráficos 7, 8 y 9 del Anexo II.

Resonancia magnética

En el grupo control no se hallaron cambios significativos en la FE mientras que en el grupo MSC se apreció una tendencia de la FE a la recuperación entre las fases 2 días y 3 meses que no resultó significativa.

En el grupo control, inicialmente (fase 1 mes) se observó un aumento no significativo del VFD_i. A partir de la fase 2 meses fue descendiendo hasta el final del estudio, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre las fases 2 días y 3 meses. Sin embargo, en el grupo tratado con MSC, el VFD_i aumentó de forma no significativa entre las fases 2 días y 3 meses.

En ambos grupos el VFS_i sufrió un descenso no significativo a lo largo del estudio.

Por último, respecto al porcentaje de infarto de miocardio, en el grupo control se observó un aumento no significativo del mismo, entre las fases 2 días y 3 meses. Sin embargo, en el grupo tratado con células éste se redujo entre las fases 2 días y 3 meses aunque no de forma significativa (2 días: 13,83±5,80; 3 meses: 11,28±4,57).

En la secuencia de viabilidad, realizada tras la inoculación del tratamiento, se apreció una zona hiperintensa en la porción de miocardio afectada por el infarto tanto en el grupo control como en el grupo tratado con células (Figura 26). Además, en este mismo estudio, en la secuencia de cine se observó un cambio de densidad que afectaba tanto al septo interventricular como al ápex (Figura 27).

Ecocardiografía

En los dos grupos (control y MSC) la FE permaneció constante a lo largo del estudio.

El VFD_i aumentó en ambos grupos entre las fases 2 días y 3 meses, resultando significativo en el grupo tratado con células ($p=0,004$).

Por otro lado, el VFS_i aumentó en los dos grupos entre las fases 2 días y 3 meses. Este aumento solo fue significativo en el grupo tratado con MSC entre la fase 2 días y 1 mes ($p=0,026$).

Tabla 9.- Grupo III. Vía intramiocárdica. Estudio de funcionalidad cardíaca por resonancia magnética

| | grupo | fases de estudio | | | | nivel de significación |
|---------------------------------------|---------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------|
| | | 2 días | 1 mes | 2 meses | 3 meses | 2 días-3 meses |
| FE (%) | control | 42,34±10,01 ^a | 47,78±9,73 ^a | 46,02±8,91 ^a | 42,14±6,99 ^a | NS |
| | MSC | 40,74±5,25 ^a | 43,12±6,96 ^a | 44,34±9,07 ^a | 47,42±8,34 ^a | NS |
| VFD _i (ml/m ²) | control | 96,64±21,86 ^a | 100,1±21,93 ^a | 97,21±14,06 ^a | 86,14±20,16 ^a | NS |
| | MSC | 89,08±11,28 ^a | 106,42±17,08 ^a | 97,71±11,67 ^a | 98,61±20,25 ^a | NS |
| VFS _i (ml/m ²) | control | 57,17±20,36 ^a | 53,82±21,89 ^a | 52,83±13,87 ^a | 49,57±12,72 ^a | NS |
| | MSC | 52,65±7,23 ^a | 61,27±16,12 ^a | 55,06±12,10 ^a | 51,89±17,69 ^a | NS |
| IAM (%) | control | 11,0±4,79 ^a | 12,80±5,80 ^a | 11,40±3,64 ^a | 13,40±5,12 ^a | NS |
| | MSC | 13,83±5,77 ^a | 12,42±2,76 ^a | 11,00±4,16 ^a | 11,28±4,57 ^a | NS |

MSC: grupo tratado con células mesenquimales. FE: fracción de eyección. VFD_i: volumen final diastólico indexado. VFS_i: volumen final sistólico indexado. %IAM: porcentaje de miocardio afectado por el infarto. Anexo 1: gráficos 7, 8 y 9.

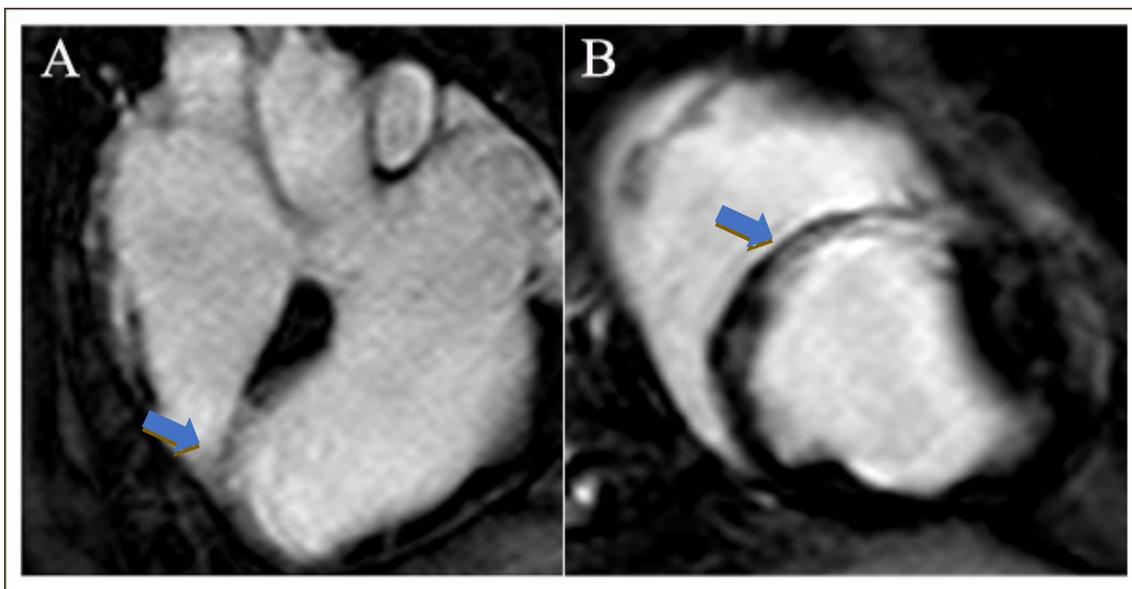


Figura 26. Secuencia de viabilidad de resonancia magnética. Grupo III (administración intramiocárdica). Fase 2 días. Animal P33. Grupo tratado con células madre. Las flechas señalan la zona hiperintensa en el septo interventricular correspondiente a la zona afectada por la isquemia. A. Cuatro cámaras. B. Eje corto.

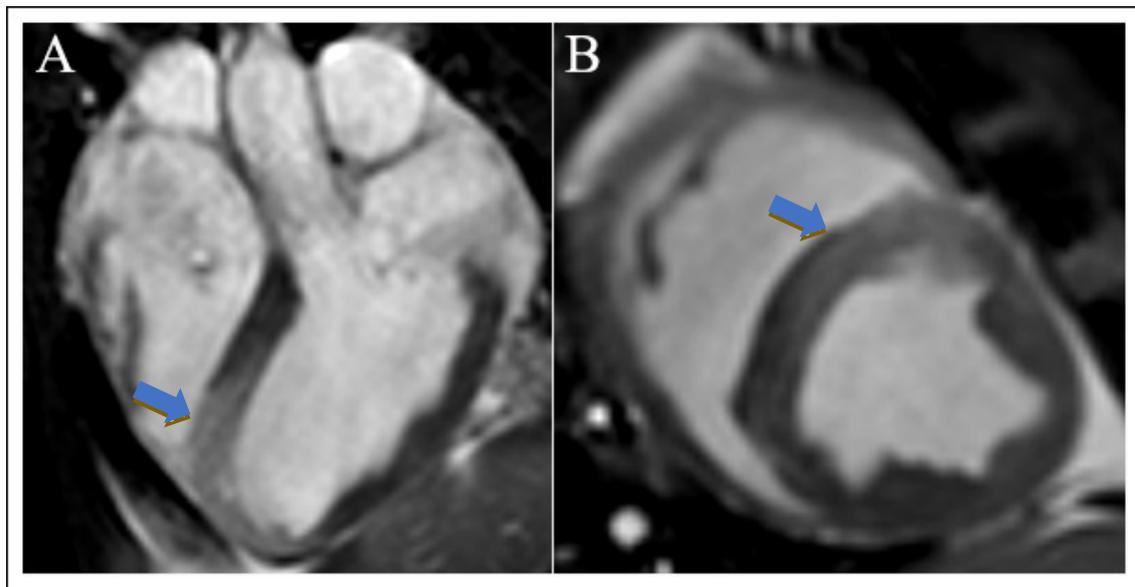


Figura 27. Secuencia de cine de resonancia magnética. Grupo III (administración intramiocárdica). Fase 2 días. Estudio realizado tras la administración del tratamiento. Animal P33. Grupo tratado con células. Las flechas señalan un cambio de densidad en el septo interventricular y en el ápex después de inocular las MSC. A. Cuatro cámaras. B. Eje corto.

Tabla 10.- Grupo III. Vía intramiocárdica. Estudio de funcionalidad cardíaca por ecocardiografía

| | grupos | fases de estudio | | | | nivel de significación |
|--|---------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------|
| | | 2 días | 1 mes | 2 meses | 3 meses | 2días-3meses |
| FE (%) | control | 57,93±15,19 ^a | 59,53±15,67 ^a | 63,13±6,37 ^a | 56,13±9,53 ^a | NS |
| | MSC | 56,38±8,90 ^a | 57,80±11,84 ^a | 58,59±10,47 ^a | 54,38±11,88 ^a | NS |
| VFD _i (ml/m ²) | control | 72,15±7,02 ^a | 75,54±16,14 ^a | 85,89±29,44 ^a | 82,15±9,51 ^a | NS |
| | MSC | 68,88±9,21 ^a | 98,47±13,99 ^b | 93,86±25,56 ^b | 92,42±12,70 ^b | 0,004 |
| VFS _i (ml/m ²) | control | 31,20±9,47 ^a | 32,27±14,21 ^a | 39,22±20,65 ^a | 35,47±7,75 ^a | NS |
| | MSC | 29,47±5,26 ^a | 44,45±13,22 ^b | 41,26±19,74 ^{ab} | 43,37±14,48 ^{ab} | NS |

MSC: grupo tratado con células mesenquimales. FE: fracción de eyección. VFD_i: volumen final diastólico indexado. VFS_i: volumen final sistólico indexado. %IAM: porcentaje de miocardio afectado por el infarto. Anexo 2: gráficos 7, 8 y 9.

Letras disímiles indican diferencias estadísticamente significativas dentro de cada grupo por fases.

NS: no existen diferencias estadísticamente significativas.

Estudio comparativo entre los grupos tratados con células madre

*Secuencia T2**

Con la secuencia T2* se comprobó la correcta inoculación de las células tras su administración. Así, en el grupo I (administración intracoronaria) no se observó ninguna imagen compatible con las células inyectadas tras el tratamiento (Figura 28). Sin embargo, en los grupos II (administración intrapericárdica) y III (administración intramiocárdica) sí se observaron unos depósitos compatibles con las células administradas. En el caso del grupo II, la localización de estos depósitos varió en los diferentes animales debido a que estas quedaban libres en el saco pericárdico en el momento de la inoculación (Figura 29), mientras que en el grupo III la imagen compatible con las células se localizó en el grosor del miocardio a nivel de la pared libre del ventrículo izquierdo (Figura 30).

Contractilidad miocárdica

Durante el estudio se realizó una valoración subjetiva de la contractilidad miocárdica. Tanto en la RM como en la ecocardiografía se observó hipocinesia en la porción más apical de la pared libre del ventrículo izquierdo a partir del estudio 2 días. Ésta, aparentemente, se redujo a lo largo del estudio, siendo más evidente en los grupos II (administración vía intrapericárdica) y III (administración vía intramiocárdica).

Estudio de funcionalidad

Resonancia magnética

Los datos obtenidos por RM están recogidos en la Tabla 11 y están representados por los gráficos 10, 11 y 12 del Anexo I.

Fracción de eyección

En el grupo tratado vía intracoronaria (Grupo I) la FE tendió a reducirse a lo largo del estudio y no hubo signos de recuperación entre las

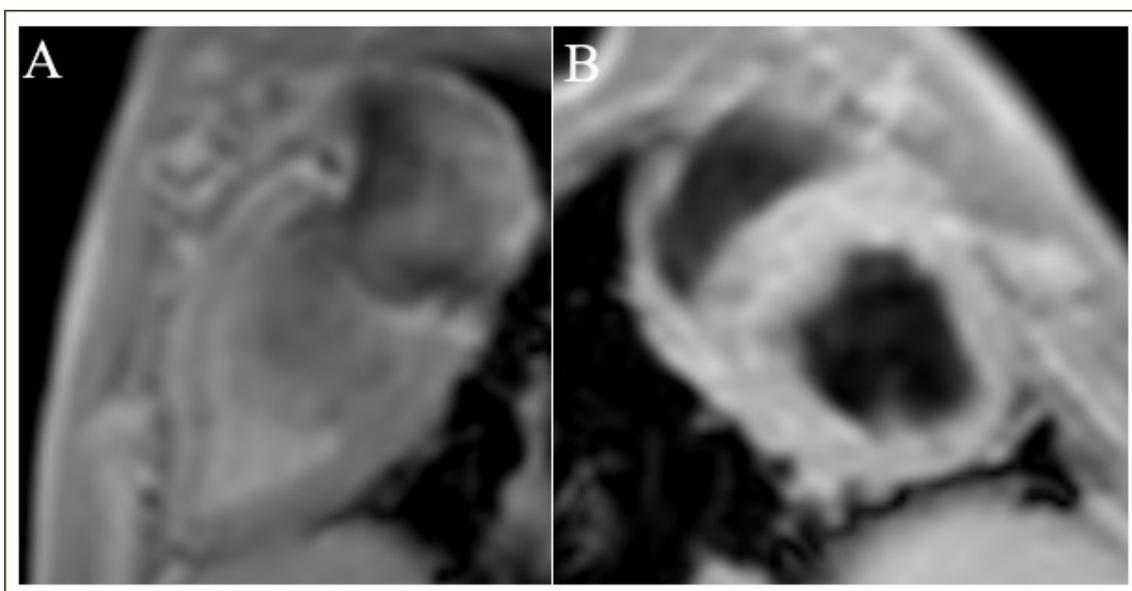


Figura 28. Imagen de la secuencia T2*. Resonancia magnética. Grupo I (administración intracoronaria). Animal 10. No se observa ninguna imagen compatible con la presencia de células. A. Eje largo. B. Eje corto.

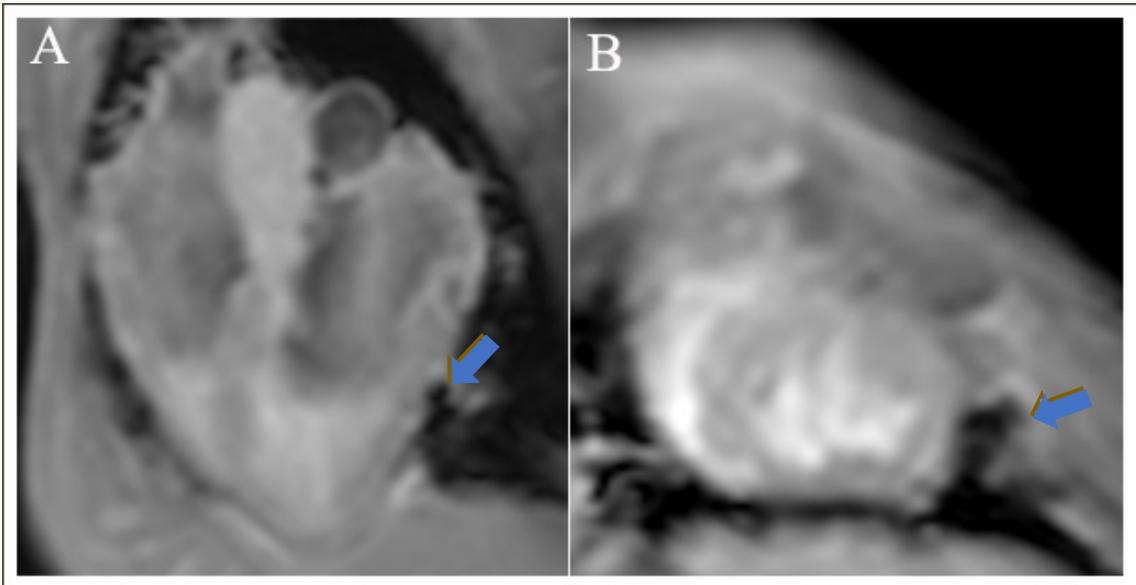


Figura 29. Imagen de la secuencia T2*. Resonancia magnética. Grupo II (administración intrapericárdica). Animal P21. Se observan unos depósitos compatibles con las células administradas (flechas). A. Cuatro cámaras. B. Eje corto.

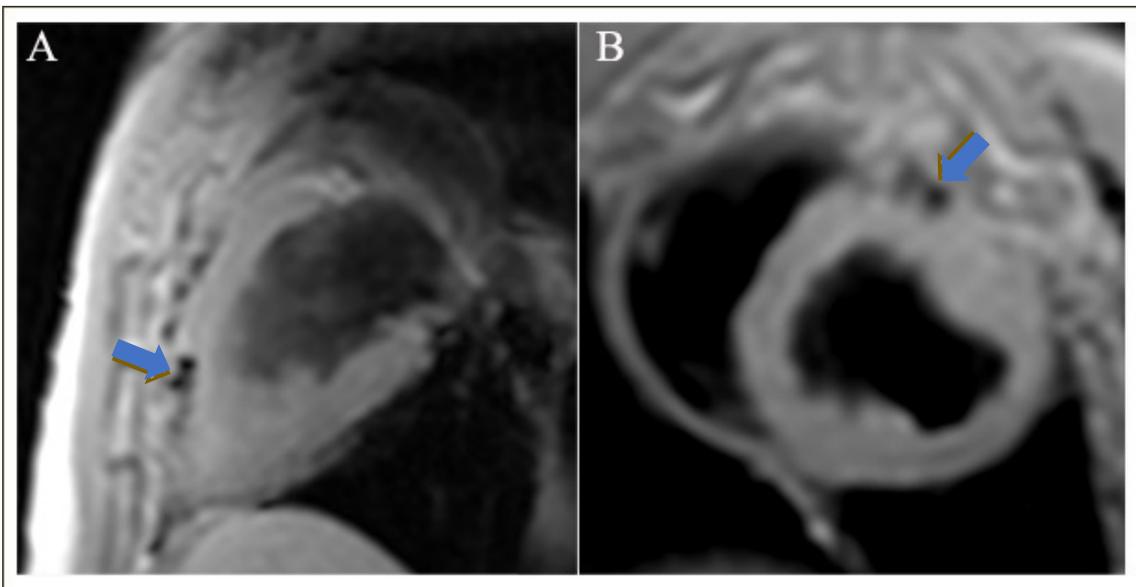


Figura 30. Imagen de la secuencia T2*. Resonancia magnética. Grupo III (administración intramiocárdica). Animal 36. A. Eje largo. B. Eje corto. Las flechas señalan una imagen compatible con los depósitos de células madre en la pared libre del ventrículo izquierdo tras su inyección.

fases 2 días y 3 meses. Sin embargo, en los grupos tratados vía intrapericárdica (grupo II) e intramiocárdica (grupo III) sí se observó una recuperación de la FE entre las fases 2 días y 3 meses. A pesar de que en el grupo III la recuperación de la FE fue mayor, en ningún caso se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Volumen final diastólico indexado

En los tres grupos el VFD_i aumentó entre las fases 2 días y 3 meses. El mayor incremento del VFD_i se produjo en el grupo tratado vía intracoronaria, mientras que el grupo tratado vía intrapericárdica fue el que mostró un menor aumento entre fases. Así, en el grupo intracoronaria, el aumento del VFD_i fue significativamente mayor respecto al grupo intrapericárdica ($p=0,008$). Sin embargo, el aumento no resultó significativo respecto al grupo intramiocárdica. Entre los grupos intrapericárdica e intramiocárdica no se hallaron diferencias significativas (Tabla 12).

Volumen final sistólico indexado

En este caso, en las fases 2 días y 3 meses, solo se produjo un aumento en el grupo tratado vía intracoronaria. En particular, a los 3 meses este aumento resultó significativo con respecto al grupo II (tratado vía intrapericárdica, $p=0,005$) y al grupo III (tratado vía intramiocárdica, $p=0,041$). Respecto a los grupos intrapericárdica e intramiocárdica no se encontraron diferencias significativas en la fase 3 meses.

Porcentaje de infarto

En los tres grupos el porcentaje de infarto se redujo entre las fases 2 días y 3 meses. El mayor descenso se observó en el grupo II donde se redujo hasta $6,42 \pm 1,51$ en la fase 3 meses.

El porcentaje de miocardio afectado por el infarto resultó significativamente menor en el grupo tratado vía intrapericárdica que en el tratado vía intracoronaria en las fases 2 meses ($p=0,022$) y 3 meses ($p=0,035$). Asimismo, fue significativamente menor respecto al grupo intramiocárdica en las fases 1 mes ($p=0,017$) y 3 meses ($p=0,026$).

Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas entre las vías intramiocárdica e intracoronaria.

Ecocardiografía

Los datos obtenidos por ecocardiografía están recogidos en la Tabla 12 y están representados en los gráficos 10, 11 y 12 del Anexo II.

Fracción de eyección

En el grupo III (intramiocárdica) la FE aumentó ligeramente entre las fases 2 días y 3 meses mientras que en los grupos I (intracoronaria) y II (intrapericárdica) la fracción de eyección se redujo. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Volumen final diastólico indexado

En los tres grupos existió un aumento entre las fases 2 días y 3 meses, pero en ningún caso se encontraron diferencias significativas entre grupos.

Volumen final sistólico indexado

En este caso, se observó un aumento no significativo del volumen final sistólico indexado en los grupos tratados vía intracoronaria e intrapericárdica, entre las fases 2 días y 3 meses. Pero en el caso del grupo tratado vía intramiocárdica éste se mantuvo constante durante el estudio.

En ningún caso se observaron diferencias significativas entre los grupos.

Estudio post mórtem

Grupo intracoronaria

Como hallazgo reseñable cabe destacar la ausencia de adherencias en todos los animales excepto en el animal P6, en el que se observaron gran cantidad de adherencias pulmonares, especialmente en el hemitórax derecho. En el corazón se observó una zona blanquecina en el tercio apical de la pared del VI correspondiente a la cicatriz producida por la isquemia, asimismo se observó un adelgazamiento de la pared libre del VI (Figura 31).

Grupo intrapericárdica

En el hemitórax izquierdo se observaron adherencias entre el pulmón y la pared, especialmente marcadas en el lóbulo craneal. Cabe destacar la ausencia de alteraciones en el saco pericárdico en todos los animales. Una vez extraído el corazón, se comprobó que la cicatriz afectaba al septo interventricular, el ápex y la porción distal de la pared libre del VI (Figura 32).

Grupo intramiocárdica

En este grupo fue donde se encontraron mayor cantidad de adherencias entre las diferentes estructuras. Además, éstas fueron más abundantes en el grupo tratado por células que en los animales tratados con placebo. Las adherencias afectaban al corazón, al pulmón, la pared de la cavidad torácica y mediastino (Figura 33).

Tabla 11.- Estudio de funcionalidad cardiaca por resonancia magnética

| | <i>fases de estudio</i> | <i>grupos de estudio</i> | | |
|---|-------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | | intracoronaria | intrapericárdica | intramiocárdica |
| <i>FE (%)</i> | 2 días | 40,15±7,01 ^a | 41,94±9,46 ^a | 40,74±5,26 ^a |
| | 1 mes | 35,94±11,55 ^a | 37,88±10,37 ^a | 43,13±7,00 ^a |
| | 2 meses | 39,46±7,18 ^a | 41,82±9,45 ^a | 44,34±9,08 ^a |
| | 3 meses | 37,18±5,41 ^a | 45,74±8,95 ^a | 47,43±8,34 ^a |
| <i>VFD_i (ml/m²)</i> | 2 días | 91,30±23,55 ^a | 82,27±19,29 ^a | 89,08±11,28 ^a |
| | 1 mes | 99,65±35,16 ^a | 94,48±21,12 ^a | 106,42±17,08 ^a |
| | 2 meses | 113,16±36,69 ^a | 94,06±16,27 ^a | 97,71±11,69 ^a |
| | 3 meses | 136,37±38,10 ^a | 93,25±15,24 ^b | 98,61±20,25 ^{ab} |
| <i>VFS_i (ml/m²)</i> | 2 días | 55,39±18,43 ^a | 48,59±17,52 ^a | 52,65±7,23 ^a |
| | 1 mes | 62,17±28,04 ^a | 58,71±16,91 ^a | 61,27±16,12 ^a |
| | 2 meses | 75,81±36,87 ^a | 55,70±16,75 ^a | 55,06±12,10 ^a |
| | 3 meses | 86,54±31,24 ^a | 51,36±14,81 ^b | 51,89±17,69 ^b |
| <i>IAM (%)</i> | 2 días | 11,14±7,03 ^a | 9,66±4,17 ^a | 13,83±5,77 ^a |
| | 1 mes | 10,71±4,99 ^a | 8,71±2,05 ^b | 12,42±2,76 ^a |
| | 2 meses | 11,66±3,38 ^a | 8,14±2,79 ^b | 11,00±4,16 ^a |
| | 3 meses | 9,16±2,99 ^a | 6,42±1,51 ^b | 11,28±4,57 ^a |

FE: fracción de eyección. VFD_i: volumen final diastólico indexado. VFS_i: volumen final sistólico indexado. %IAM: porcentaje de miocardio afectado por el infarto. Anexo 1: gráficos 10, 11 y 12.

Letras disímiles indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

Tabla 12.- Estudio de funcionalidad cardiaca por ecocardiografía

| | fases de estudio | grupos de estudio | | |
|--|------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | intracoronaria | intrapericárdica | intramiocárdica |
| FE (%) | 2 días | 65,60±19,84 ^a | 56,38±8,90 ^a | 54,28±9,37 ^a |
| | 1 mes | 52,38±20,78 ^a | 57,80±11,84 ^a | 59,78±5,66 ^a |
| | 2 meses | 65,33±12,57 ^a | 58,59±10,47 ^a | 58,66±17,25 ^a |
| | 3 meses | 55,52±3,64 ^a | 54,38±11,88 ^a | 57,90±10,28 ^a |
| VFD _i (ml/m ²) | 2 días | 49,61±26,46 ^a | 68,88±9,21 ^a | 81,20±22,44 ^a |
| | 1 mes | 73,70±32,34 ^a | 98,47±13,99 ^a | 81,69±18,51 ^a |
| | 2 meses | 88,72±32,48 ^a | 93,86±25,56 ^a | 80,72±25,58 ^a |
| | 3 meses | 108,01±48,01 ^a | 92,42±12,70 ^a | 92,62±16,16 ^a |
| VFS _i (ml/m ²) | 2 días | 18,83±3,74 ^a | 29,47±5,26 ^{ab} | 39,16±18,77 ^b |
| | 1 mes | 42,98±31,70 ^a | 44,45±13,22 ^a | 35,36±14,85 ^a |
| | 2 meses | 43,09±32,97 ^a | 41,26±19,74 ^a | 33,32±18,15 ^a |
| | 3 meses | 48,43±22,22 ^a | 43,37±14,48 ^a | 39,57±13,29 ^a |

FE: fracción de eyección. VFD_i: volumen final diastólico indexado. VFS_i: volumen final sistólico indexado. Anexo 2: gráficos 10, 11 y 12.

Letras disímiles indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

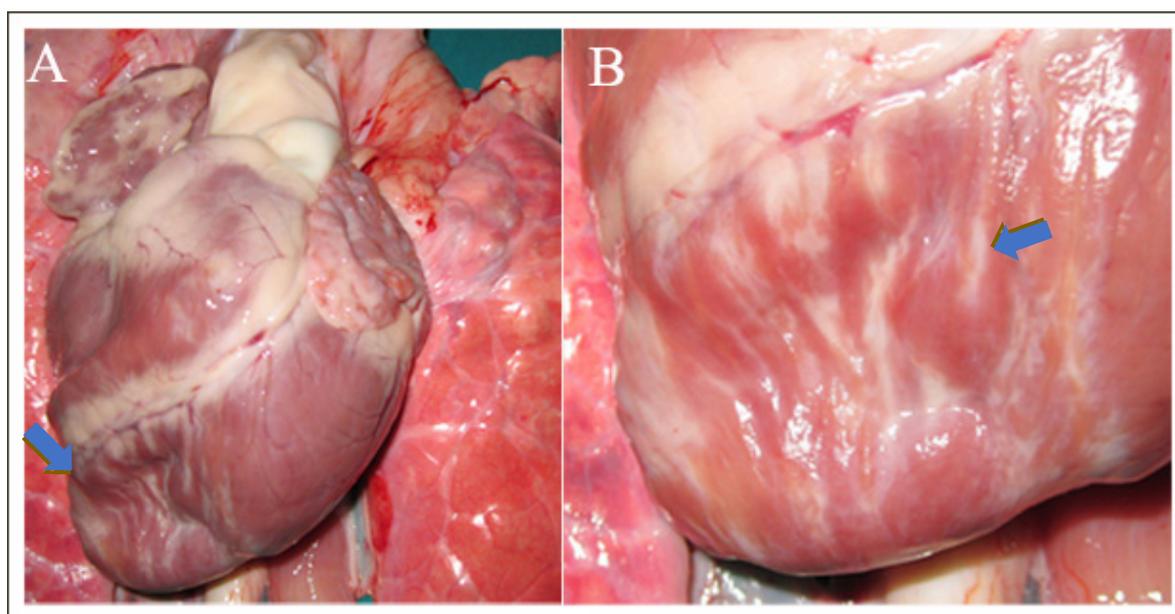


Figura 31. Estudio *post mórtem*. Grupo I (administración intracoronaria). Animal P11. Cara anterior del corazón. A. Adelgazamiento de la pared libre del ventrículo izquierdo (flecha). B. Imagen ampliada del tercio apical del corazón, la flecha señala la cicatriz formada en la zona afectada por la isquemia.

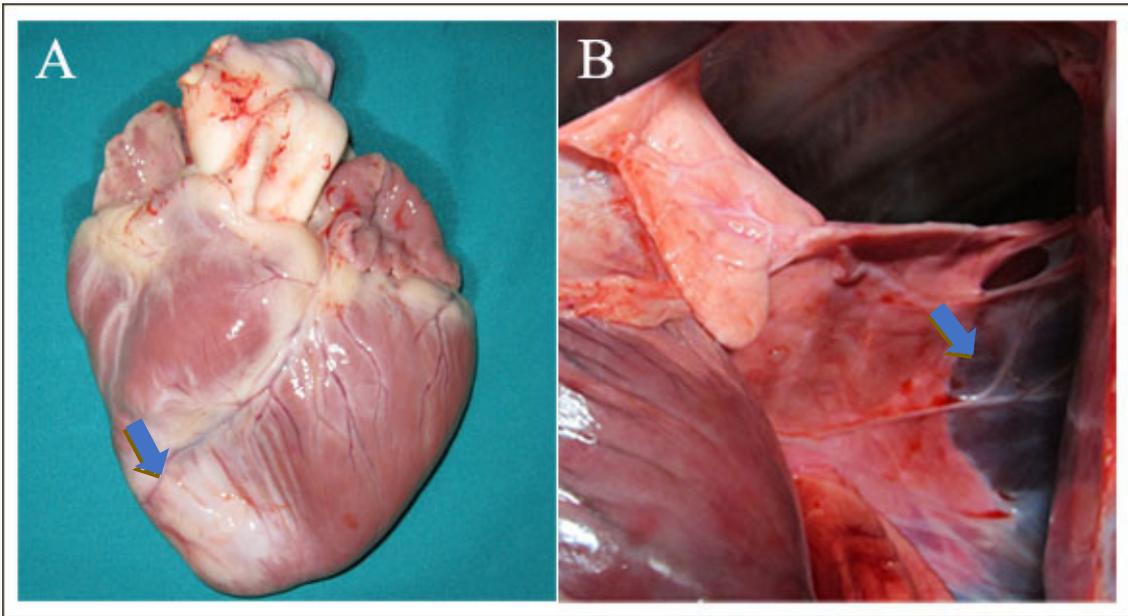


Figura 32. Estudio *post mórtem*. Grupo II (administración intrapericárdica). Animal P22. A. Cicatriz provocada por la isquemia que afecta a los ventrículos derecho e izquierdo (flecha). B. Adherencias en cavidad torácica (flecha).

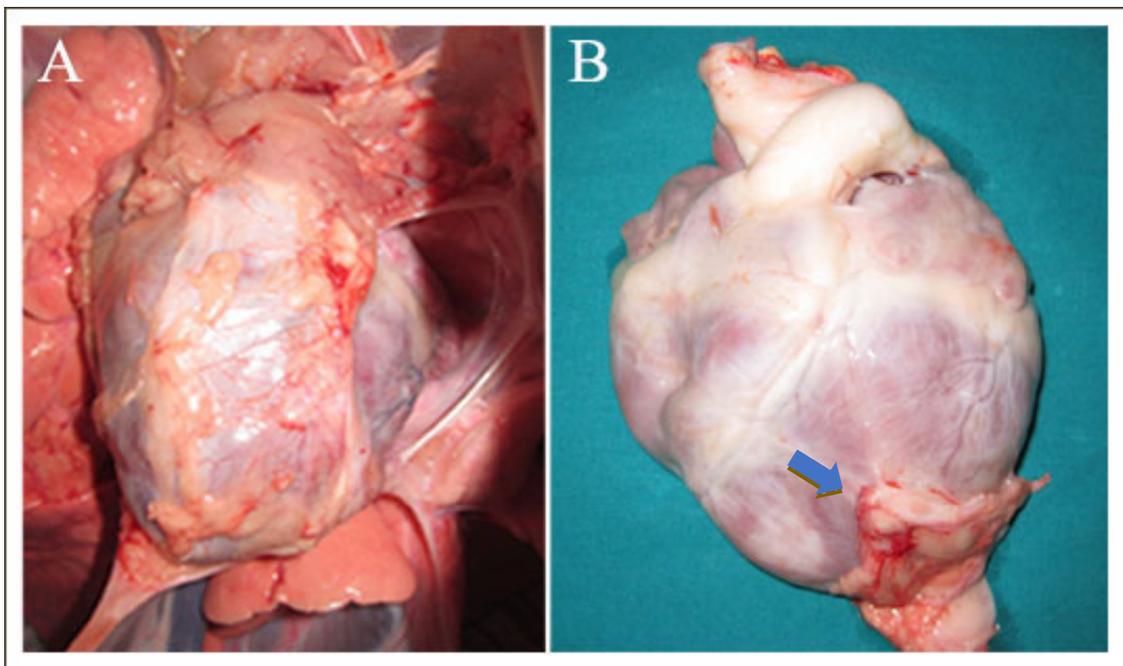


Figura 33. Estudio *post mórtem*. Grupo III (administración intramiocárdica). Animal P30. A. Abundantes adherencias entre el saco pericárdico, el pulmón y la pared del tórax. B. Adherencias en la cara posterior del corazón entre el miocardio y el pericardio (flecha).

Histología

El grupo tratado vía intracoronaria fue el que presentó lesiones más severas tanto en lo referente a la extensión como al grado de fibrosis e inflamación. Las lesiones más frecuentes halladas en los tres grupos fueron la fibrosis localizada entre los miocardiocitos, zonas de necrosis y formación de neovasos. El infiltrado inflamatorio fue especialmente evidente en el grupo tratado vía intracoronaria y, atendiendo al grado de fibrosis y a la inflamación, fue este grupo el que presentó lesiones más severas. Si bien en los grupos intrapericárdica e intramiocárdica las áreas de

infarto fueron también extensas, su número y la severidad de las lesiones fueron menores (Tabla 13).

Grupo intracoronaria

El tejido muscular fue sustituido por tejido conjuntivo denso, es decir, con gran cantidad de fibroblastos maduros y matriz extracelular. Se observó una celularidad elevada y los fibroblastos presentaron una morfología alargada y ondulada. Entre ellos, también aparecen numerosas células inflamatorias (linfocitos y células plasmáticas), en una cantidad entre moderada (P6 y P10) y muy elevada (P5 y P12) (Figura 1, D y E),

Tabla 13. Valores individuales y medias de los parámetros histológicos

| Grupo | ID | fibrosis | infiltrado inflamatorio | necrosis | metaplasia/ calcificación | neo-vascularización | SUMA |
|------------------|-------|----------|-------------------------|----------|------------------------------|---------------------|------|
| Intracoronaria | P1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | P5 | 4 | 4 | 2 | 0 | 3 | 13 |
| | P6 | 4 | 3 | 1 | 0 | 3 | 11 |
| | P10 | 4 | 3 | 2 | 2 | 1 | 12 |
| | P12 | 4 | 4 | 3 | 0 | 3 | 14 |
| | MEDIA | 3,2 | 2,8 | 1,6 | 0,4 | 2 | 10 |
| Intrapericárdica | ID | fibrosis | infiltrado inflamatorio | necrosis | metaplasia/ calcificación | neo-vascularización | SUMA |
| | P18 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 3 |
| | P23 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | P22 | 3 | 2 | 3 | 0 | 3 | 11 |
| | P19 | 2 | 2 | 3 | 0 | 2 | 9 |
| | P24 | 2 | 3 | 3 | 0 | 3 | 11 |
| MEDIA | 1,6 | 1,8 | 2 | 0 | 1,6 | 7 | |
| Intramiocárdica | ID | fibrosis | infiltrado inflamatorio | necrosis | metaplasia/ calcificación | neo-vascularización | SUMA |
| | P31 | 3 | 2 | 3 | 1 | 3 | 12 |
| | P30 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | 4 |
| | P32 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | 4 |
| | P35 | 2 | 1 | 1 | 0 | 2 | 6 |
| | P36 | 3 | 1 | 2 | 0 | 2 | 8 |
| MEDIA | 2 | 1 | 1,4 | 0,2 | 2,2 | 6,8 | |

ID: identificación del animal. Valor 0: ausencia de lesión. Valor 1: cambios escasos pero por encima de los considerados normales. Valores 2-4: grado de severidad de la lesión (leve, moderada o grave).

indicativas de un proceso crónico. Además, en el animal P5 se encontraron macrófagos cargados de hemosiderina, lo que indica la existencia de hemorragias previas (Figura 34).

Asimismo, se observaron zonas de necrosis que fueron especialmente evidentes en la muestra correspondientes al animal P12. En la muestra del animal P10 se encontraron depósitos de calcio rodeados de células inflamatorias y células gigantes multinucleadas. Por último, respecto a la neovascularización reseñar que fue importante en casi todas las muestras analizadas, observándose numerosos neovasos entre el tejido conjuntivo y, especialmente, en los bordes de las muestras.

Grupo intrapericárdica

Este grupo se caracterizó por una disminución de la extensión y la fibrosis comparado con el grupo I. Así, se observaron áreas de tejido conjuntivo laxo mayores, con menor cantidad de fibroblastos y matriz extracelular y mayor

cantidad de edema intercelular. De nuevo, el infiltrado inflamatorio fue de tipo crónico, aunque en la mayoría de los casos fue leve (Figura 35).

Grupo intramiocárdica

Este grupo presentó lesiones menos severas que el grupo I y también ligeramente inferiores a las observadas en el grupo II. La composición del tejido de sustitución fue menos fibrosa presentando una mayor cantidad de edema. Además, en la muestra del animal P31, aparecieron unas agrupaciones celulares con características similares a los miocardiocitos ya que se tiñeron de color rojo con la tinción de TCM.

Por último, señalar que la inflamación fue leve y la neovascularización fue ligeramente mayor a la encontrada en los otros grupos, hecho que también está asociado al menor desarrollo de fibrosis (Figura 36).

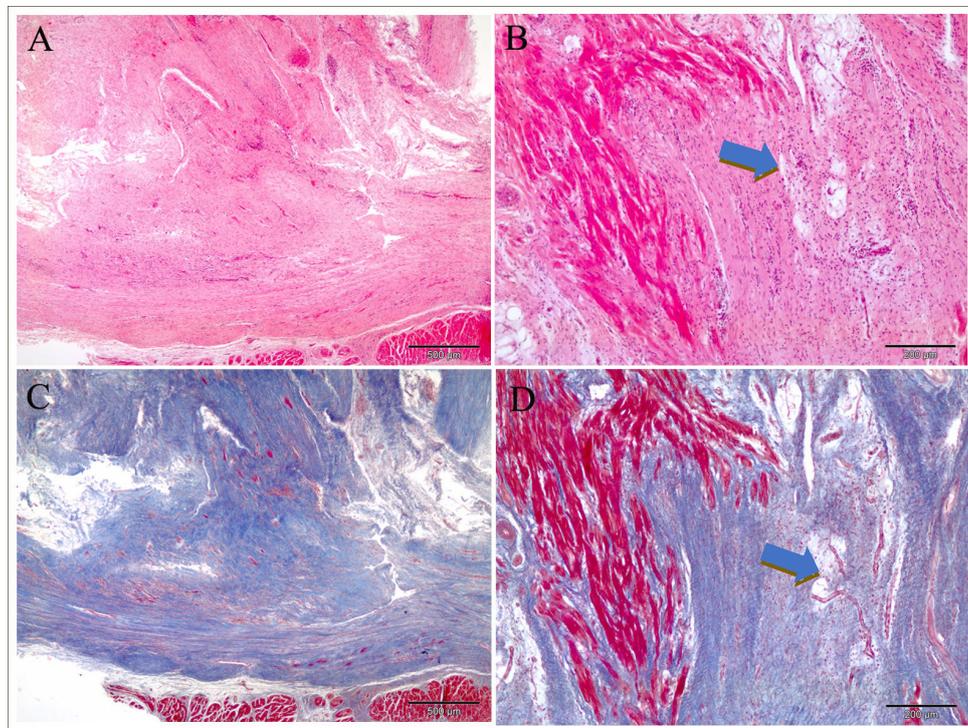


Figura 34. Histología del grupo intracoronaria. A y B. Tinción H-E. A. Extensas áreas de infarto ocupadas por tejido conjuntivo denso (x4). B. Infiltrado inflamatorio severo y difuso (x10). C (x4) y D (x10). Tinciones de TCM sustitución del tejido muscular propio del miocardio por tejido conjuntivo fibroso (teñido de azul). Presencia de neovasos (flecha).

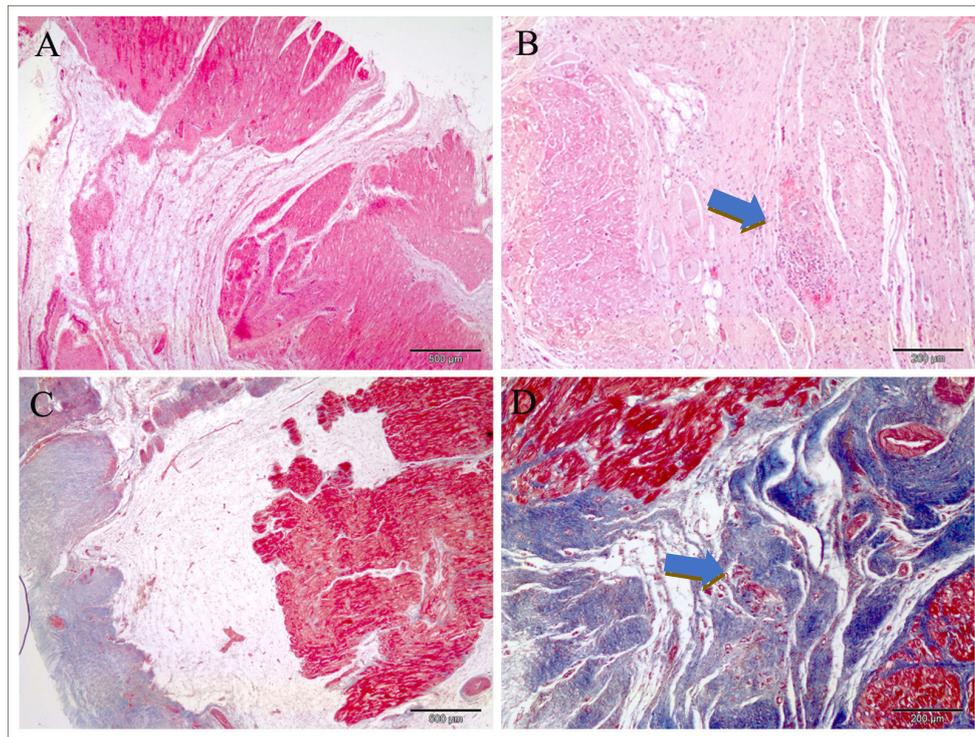


Figura 35. Histología del grupo intrapericárdica. A y B. Tinción con Hematoxilina-Eosina. A. Tejido conjuntivo laxo con edema y neovascularización (x4). B. Áreas de fibrosis e infiltrado inflamatorio de tipo focal (x10) (flecha). C y D. Tinciones de Tricrómico de Masson. C. La flecha señala el edema (x4). D. Gran cantidad de neovasos (x10) (flecha).

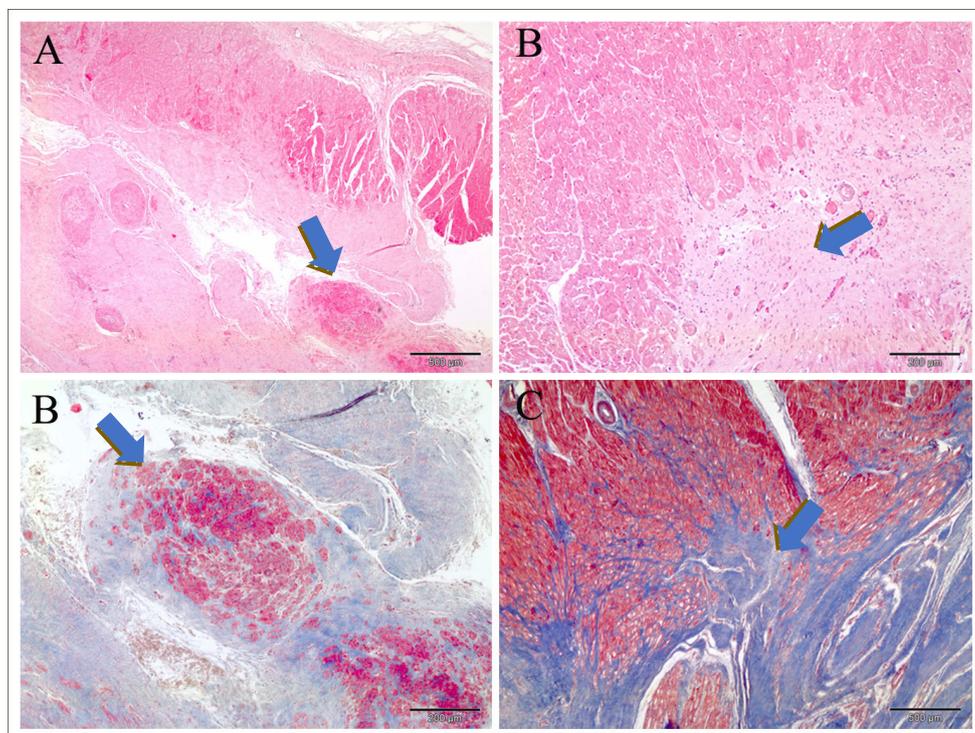


Figura 36. Histología del grupo intramiocárdica. A y B. Tinción con Hematoxilina-Eosina. A. Se observan nódulos de células musculares entre el tejido conjuntivo en el área del infarto (x4). B. Se aprecian pequeñas zonas de tejido conjuntivo laxo con numerosos neovasos (x4). C y D. Tinciones de Tricrómico de Masson. C. La flecha señala unos nódulos musculares de color rojizo entre la fibrosis (x4). D. Áreas de tejido conjuntivo infiltrado entre las células musculares (x10) (flecha).

Discusión

La elevada incidencia, en la sociedad actual, de las ECV y más concretamente de la isquemia miocárdica ha ido acompañada de un incremento de los ensayos preclínicos. El fin último de estos ensayos ha sido evaluar los posibles tratamientos cuyo objetivo común es limitar la lesión inicial que se produce tras la isquemia.

En la última década, el uso de la terapia celular ha despertado un cierto optimismo en el tratamiento de la patología isquémica cuyo objetivo fundamental ha sido reducir el tamaño de la cicatriz y estimular el crecimiento del músculo cardíaco sano. En consecuencia se ha experimentado un incremento del número de investigaciones desarrolladas en torno a la terapia celular como una potencial modalidad terapéutica del infarto (Ostadal, 2009; Lee ST, 2011; Makkar RR, 2012; Cuellas-Ramón C, 2013).

Este incremento en las investigaciones, en el campo del infarto de miocardio y el desarrollo de nuevas terapias, ha ido acompañado del empleo de modelos animales para valorar su eficacia y seguridad antes de ser trasladadas a la clínica.

Al igual que en otras muchas investigaciones previas, en nuestro ensayo utilizamos la especie porcina como sujeto de estudio. Esta especie ha sido ampliamente utilizada debido, sobre todo, por sus importantes similitudes con la especie humana (el tamaño, la estructura y la distribución de las arterias coronarias). Este gran parecido entre ambas especies ha permitido, a su vez, extrapolar los resultados obtenidos (van der Spoel, 2011; Cuellas-Ramón C, 2013).

Sin embargo, la bibliografía recoge una serie de limitaciones sobre el uso de esta especie que hemos debido tener en cuenta a la hora de realizar nuestro trabajo. Así, la eminente tasa de mortalidad consecuencia de la elevada incidencia de fibrilación ventricular durante la

modelización, el estrés derivado del manejo, así como el rápido incremento de peso que experimentan algunas razas, son algunos de los factores que se deben valorar a la hora de realizar un ensayo.

Así, en la especie porcina, la incidencia de fibrilación ventricular asociada a la oclusión de las arterias coronarias oscila entre el 50 y el 75%. Este tipo de arritmias se asocian a una elevada mortalidad en los modelos de isquemia miocárdica (Regueiro-Purriños M, 2011; García-Lindo M, 2014). La susceptibilidad al padecimiento de este tipo de arritmias resulta mayor al aumentar el porcentaje de infarto por encima del 25% de la masa del ventrículo izquierdo (Suzuki M, 1999 ; Huang Z, 2010). En nuestro caso, sólo en dos animales (P4 y P7) el porcentaje de miocardio afectado por el infarto superó el 25% , con un 36% y un 29% de infarto, respectivamente. Sin embargo, solo en el animal P7 se observó una mayor cantidad de FV durante la creación del modelo.

Algunos autores han referido que el control de la localización y del tiempo de isquemia permite controlar el desarrollo de este tipo de arritmias. Así, Krombach GA (2005) relacionó una mayor incidencia de FV a una sobredilatación de la arteria al utilizar un balón con un tamaño superior al diámetro del vaso, demostrando que el número de sucesos se reducía (del 42% al 10%) utilizando un balón de menor tamaño. En cambio, otros autores como Suzuki Y (2010) han concluido que la incidencia de arritmias resulta ser mayor en aquellos animales en los que el balón de angioplastia se sitúa más próximo al nacimiento de la LAD y, por tanto, a un mayor tamaño del área afectada por el infarto.

En nuestro ensayo, la tasa de FV fue del 36%, resultando mortal en uno de los animales durante la inducción del modelo y en otros dos animales

antes de la administración del tratamiento, mientras estaban monitorizados.

Con el fin de reducir la incidencia de FV, se tuvo en cuenta lo referido en la bibliografía, de tal manera que en todos los animales el balón se colocó por debajo del origen de la primera rama diagonal de la arteria descendente anterior. Asimismo se efectuó la medición del vaso antes de colocar el balón mediante fluoroscopia evitando, así, la sobredilatación del mismo.

Aunque la incidencia de fibrilación ventricular recogida en nuestro estudio fue menor en comparación con otros estudios consultados, se sucedieron diversos episodios que hicieron necesario aplicar el protocolo de RCP. Nuestros datos concuerdan con los descritos por Kim W (2010) en el sentido de que aquellos animales que presentaron mayor área de infarto presentaron una mayor incidencia de arritmias ventriculares. Además, estamos de acuerdo con lo expuesto por Krombach GA (2005) quien reseñó que la incidencia de las arritmias ventriculares era inversamente proporcional al peso. En nuestro estudio se documentó una mayor incidencia de fibrilación ventricular en aquellos animales que tenían menor peso.

A lo largo de los años se han sostenido diferentes teorías sobre en qué momento hay mayor riesgo de aparición de las arritmias. Así, Tennant R y Wiggers CJ (1935) demostraron en un estudio experimental en perros que la aparición de arritmias ventriculares se originaba tras el comienzo de la reperfusión de la arteria, una vez finalizado el tiempo de isquemia. Sin embargo, Harris AS y Rojas AG (1943) señalaron que la aparición de las mismas ocurría tanto durante el periodo de isquemia como durante el tiempo de reperfusión. Ya en 1990, Hackett D reseñó que la aparición de la mayoría de las arritmias ventriculares ocurría durante el tiempo de isquemia no siendo tan frecuente su aparición durante la reperfusión.

Posteriormente, Suzuki Y (2010) refirió, en concordancia con lo comentado anteriormente por Harris AS y Rojas AG, que la fibrilación ventricular aparece con más frecuencia entre

los 20-30 minutos tras la inducción del infarto y dentro de los 10 minutos siguientes al restablecimiento del flujo coronario. Esto concuerda con los resultados de nuestro estudio, ya que la mayoría de los episodios de FV sobrevinieron durante los 20-30 minutos siguientes a la oclusión de la arteria. Tan solo en tres individuos se documentó la presencia de arritmias ventriculares durante el periodo de reperfusión.

En este sentido, consideramos de especial relevancia el empleo de un tratamiento médico preventivo para el control de las arritmias, llegando a reducir así la morbilidad y la mortalidad durante el estudio. La administración de amiodarona desde la semana anterior a la inducción del infarto y la administración de lidocaína durante la creación del mismo creemos que permite controlar el desarrollo de las arritmias de manera segura.

Otro de los factores que parecen influir directamente en la tasa de supervivencia es el sexo de los animales, existiendo peores tasas de supervivencia en los machos de la especie porcina como consecuencia de un mayor grosor del miocardio, a diferencia de las hembras en las que se aprecia una mayor presencia de tejido conectivo cardiaco (Huang S, 2001 Pérez de Prado A, 2009; Cuellas-Ramón C, 2013). Esto supondría una mayor susceptibilidad de los machos a cuadros de insuficiencia cardiaca con un peor manejo de la sobrecarga de volumen.

Algunos autores aún continúan incluyendo machos en sus investigaciones, si bien en la mayoría de los ensayos desarrollados en la actualidad se utilizan hembras (Halkos ME, 2008; Pérez de Prado A, 2009; Bravo E, 2009; Schuleri KH, 2009; Li X, 2013; Crisóstomo V, 2013). En nuestro estudio, solo empleamos hembras hecho que, junto a los ya reseñados, podría explicar la baja tasa de mortalidad documentada.

Otros factores que se asocian a la tasa de mortalidad son la susceptibilidad que presenta esta especie al padecimiento de estrés y a la necesidad de realizar un cuidadoso manejo

durante el desarrollo del estudio. Parece evidente que un manejo inadecuado puede provocar estrés en los animales y como consecuencia su muerte, máxime si tenemos en cuenta que se trata de animales con una patología cardíaca. Así mismo, las arritmias ventriculares se han descrito como una de las causas más frecuentes de muerte en pacientes hospitalizados con infarto agudo de miocardio, siendo la forma más común de muerte súbita secundaria a una isquemia (Pasotti M, 2006). Así, creemos que la muerte del animal P6, durante la fase fin de estudio, pudo deberse a una muerte súbita secundaria a la presencia de arritmias ventriculares durante el proceso de premedicación (Pérez de Prado A, 2005; Kim W, 2010).

La especie porcina presenta una serie de limitaciones relacionadas con el rápido crecimiento de determinadas razas y que limitan la realización de estudios de larga duración (Kim W, 2010). En nuestro estudio se utilizaron animales jóvenes con una curva de crecimiento bastante acusada en los primeros meses de vida, lo que influyó en la determinación de los volúmenes sistólico y diastólico, principalmente debido a la variación de peso de los animales durante el estudio. Por ello, y con el fin de evitar la influencia que este aumento de peso pudiera tener sobre nuestros resultados, indexamos los datos obtenidos de la resonancia magnética y de la ecocardiografía en función de la superficie corporal (BSA) utilizando la fórmula publicada por Kelley KW, en 1973 (Kelley KW, 1973).

De la misma manera que resulta relevante la especie animal, también es importante el método empleado para la inducción del modelo. Numerosos ensayos preclínicos emplean un modelo conseguido mediante la oclusión completa y permanente de una de las arterias coronarias (Makkar RR, 2005). Sin embargo, en nuestro caso, al igual que habían efectuado previamente otros autores (Halkos ME, 2004; Valina C, 2007; Schuleri KH, 2009; Le ST, 2011), optamos por un modelo de isquemia reperfundida por asemejarse más a la situación clínica, donde la mayoría de los infartos son reperfundidos ya sea de forma espontánea o de forma terapéutica.

Entre los modelos descritos, la oclusión de la arteria descendente anterior, utilizando la toracotomía como abordaje, presenta diversas desventajas y limitaciones asociadas a la técnica. Se ha descrito que la propia toracotomía, así como la apertura del pericardio, pueden influenciar el remodelado ventricular en los modelos crónicos. Coincidimos con Kraitchman DL (2003) y Krombach GA (2005) en que este abordaje puede retrasar la recuperación de la anestesia y producir artefactos en la RM como consecuencia de la formación de adherencias. Asimismo, estamos de acuerdo en que puede aumentar el riesgo de infección al utilizar una incisión de gran tamaño para acceder al interior de la cavidad torácica. En resumen, una mayor tasa de complicaciones que puede resultar en un aumento de la mortalidad y morbilidad. En este sentido, consideramos que el uso del abordaje toracoscópico para realizar el acceso al corazón reduce la formación de adherencias al emplear incisiones de menor tamaño comparado con la toracotomía disminuyendo, así, los artefactos en la imagen de RM y favoreciendo la recuperación de los individuos tras la intervención.

Otros modelos propuestos han sido aquellos que se sirven de sustancias trombogénicas para provocar la oclusión del vaso (microcoils o trombofibrinógeno). Esencialmente, presentan el inconveniente de no permitir la reperfusión del vaso una vez ocluido y, además, como en el resto de modelos, se dificulta la estandarización del mismo debido a las diferencias de calibre vascular entre individuos. Esto se debería a que las sustancias se administran vía intracoronaria y son arrastradas por la circulación hasta el lugar donde se reduce el diámetro del vaso que puede diferir entre animales de la misma especie (Krombach GA, 2005).

Partiendo de la premisa de intentar desarrollar modelos de infarto de miocardio fiables y reproducibles en los que el tamaño de infarto esté estandarizado, para así facilitar el análisis de los resultados (Huang Z, 2010), en nuestro estudio decidimos utilizar un modelo de isquemia-reperfusión inducido con balón de angioplastia ya que de todos los modelos descritos, éste permite controlar el tamaño del infarto mediante

el control del tiempo de isquemia y la localización de la oclusión (Krombach GA, 2005; van der Spoel TIG, 2011).

No obstante, este modelo no nos permitió conseguir que el tamaño del infarto fuera similar en todos los animales, oscilando el porcentaje de miocardio afectado por el mismo entre el 0 y el 36%. Este hecho pudo deberse, entre otros factores, a las diferencias observadas en el calibre y la distribución del patrón arterial de los diferentes animales. Así, para trabajos futuros consideramos que para lograr una mayor estandarización del tamaño del infarto puede ser de utilidad utilizar como referencia la longitud del vaso y no las ramas diagonales, cuya variación (en calibre y posición) puede ser mayor, hecho que ha sido reseñado previamente por Huang Z (2010).

Asimismo, debemos resaltar que en dos de nuestros animales (P6 y P15) el porcentaje de infarto, en la fase 2 días, fue muy inferior al del resto de individuos, siendo de 0 y 1%, respectivamente. En el caso del animal P4 fue necesario cambiar el balón. En el animal P15 el balón se desplazó al inflarlo por lo que tuvimos que desinflarlo para situarlo en el lugar correcto. En ambos casos, el hecho de desinflar el balón supuso un breve periodo de reperfusión durante el periodo de isquemia, lo que puede explicar que el tamaño del infarto fuera menor en estos animales. Esto concuerda con el preconditionamiento descrito por Murry CE (1986) quien lo definió como un método capaz de limitar el tamaño del infarto de una manera consistente y reproducible por debajo del 10% del área en riesgo. En este sentido, la amplia reproducibilidad de este mecanismo cardioprotector endógeno usado en una gran variedad de protocolos de preconditionamiento, tanto de forma experimental como en los seres humanos, lo ha llevado, hoy en día, a ser establecido como el "*gold standar*" de la cardioprotección (Ferdinandy P, 2007; Csonka C, 2010).

Asimismo, descartamos la posibilidad de que el reducido porcentaje de infarto se produjera como consecuencia de la presencia de circulación

colateral debido a la escasa o nula presencia de ramas colaterales observadas durante la coronariografía basal. Esta circunstancia ha sido referida previamente por otros autores y resulta contraria a lo encontrado en otras especies como la canina o las cobayas, en las que resulta complicado la inducción de un IM debido a la gran cantidad de circulación colateral que presentan en el corazón (Rodrigues M, 2005; Kim W, 2010; Cuellas-Ramón C, 2013).

En el animal P10, redujimos el tiempo de isquemia a 80 minutos debido a los continuos episodios de FV que sufrió y que no respondían al protocolo de RCP. A pesar de ello, decidimos mantenerlo en el estudio ya que al calcular el porcentaje de infarto, en la fase 2 días, observamos que el área infartada era similar o incluso mayor a la del resto de animales en esta fase (29%). Este hallazgo unido a que otros autores habían contemplado que a partir de los 60 minutos de isquemia el área de miocardio afectada por el infarto era similar, no consideramos necesario su exclusión del ensayo (García-Dorado 1987; Ruiz-Meana M, 2009; Suzuki Y, 2009).

La fragilidad de los vasos sanguíneos en la especie porcina, así como que resultan más propensos al vasoespasmo en comparación con el ser humano ya fue referida por Vilahur G (2011). Asimismo, McCall FC (2012) reseñó que la manipulación excesiva de los catéteres dentro del vaso o durante la reperfusión, para la inducción de un modelo de IM con balón de angioplastia, pueden desencadenar espasmos vasculares (McCall FC, 2012). En nuestro caso, documentamos vasoespasmo en 2 animales: el P22, incluido en el grupo II y el P28, incluido en el grupo III. Aunque a diferencia de los estudios anteriores, nosotros los identificamos tras el periodo de isquemia no durante la colocación del balón y, en ambos casos, documentamos la oclusión total de la porción distal de la arteria descendente anterior.

En ambos se empleó nitroglicerina para reducir el vasoespasmo, utilizando el mismo protocolo descrito por McCall FC (2012) consistente en 200 mg de nitroglicerina diluidos

en 2 ml de una solución salina estéril administrada mediante infusión intracoronaria lenta. Tras su administración, confirmamos la permeabilidad del vaso mediante una coronariografía.

La necrosis celular que tiene lugar tras un infarto de miocardio resulta en una disminución de la función cardiaca y en un remodelado ventricular (Shu-ren L, 2008). Como consecuencia de la necrosis se produce un incremento de diferentes proteínas relacionadas con el daño en los cardiomiocitos (troponina y CKMB) en circulación periférica. De éstas, la troponina cardiaca (cTn) es la enzima de elección para realizar un diagnóstico de infarto de miocardio debido a la gran especificidad que presenta por el tejido miocárdico, permitiendo determinar tanto la presencia de isquemia como la severidad de la misma (Bardají A, 2005; Jaffe AS, 2008; Welch TD, 2012; Thygesen K, 2012; Hamm CW, 2012).

A pesar de que varios autores han reseñado la correlación existente entre la concentración plasmática de cTn con el tamaño del infarto (O'Brien PJ, 1997; Zacharowski K; 1999; Friedrich MG, 2008; Csonka C, 2010), en nuestro estudio no fue posible comprobar este hecho debido a que tras la inducción del infarto algunos valores enzimáticos fueron superiores a los valores máximos detectados por el dispositivo de determinación enzimática, lo que impidió conocer el valor exacto de esta enzima.

Los avances logrados en el ámbito de la revascularización, tanto a nivel farmacológico como a nivel intervencionista, han reducido, de forma significativa, la morbilidad y mortalidad de la enfermedad isquémica del corazón en el último medio siglo. Si bien estos avances no se han producido directamente sobre la causa que provoca el fallo ventricular, las alteraciones en el sistema eléctrico del corazón o el remodelado ventricular, secundarios al infarto de miocardio, sí han repercutido en la aparición de nuevas modalidades terapéuticas (Karantalis V, 2012).

Así, por ejemplo, la medicina regenerativa tiene como objetivo establecer la seguridad y la eficacia de la terapia celular, que trata de ofrecer a los pacientes una nueva vía terapéutica.

Esta investigación no solo pretende restaurar la función cardiaca, sino también prevenir o revertir los efectos negativos que se suceden tras una isquemia intentando dar respuesta a una importante necesidad médica no cubierta (McCall FC, 2012).

En este sentido, los resultados de varios estudios preclínicos (Kraitchman DL, 2003; Valina C, 2003; Amado LC, 2005; Zhang H, 2007; Poncelet AJ, 2010; Perin EC, 2011; van der Spoel TIG, 2011) y otros ensayos clínicos como PRECISE (Perin EC, 2014), TECAM (Arnold R, 2010), POSEIDON (Hare JH, 2012), SCPIO (Bolli R, 2011; Chugh AR, 2012) sugieren que la terapia celular ofrece efectos sobre el remodelado que conducen a la restauración de la función contráctil en pacientes con cardiomiopatía isquémica (Karantalis V, 2012; McCall FC, 2012; Sousonis V, 2015).

Sin embargo, a pesar de los prometedores resultados que la terapia celular ha otorgado a pacientes con infarto, el mecanismo por el cual las células trasplantadas en el miocardio producen una mejoría siguen sin estar bien definidos. En este sentido, se reconoce que cuestiones prácticas como el momento adecuado para la administración de las células, el método de entrega más eficaz y la dosificación pueden contribuir considerablemente a buscar los mejores resultados de la investigación clínica (Karantalis V, 2012).

En el marco del infarto agudo de miocardio, parece existir un rango de tiempo específico de oportunidad terapéutica, un periodo tras el infarto en el que el miocardio en riesgo es más receptivo al uso de la terapia celular (Karantalis V, 2012). Con este fin, algunos estudios han intentado determinar el momento y la frecuencia óptimas de las inyecciones celulares necesarias para obtener la mayor eficacia terapéutica (Crisóstomo V, 2015). Por un lado, algunos de ellos han referido que la eficacia de la terapia celular es mayor si la administración de las células se realiza en etapas más tempranas debido, en gran parte, al ambiente hostil que se produce en la zona como consecuencia de la reacción inflamatoria que ocurre tras el infarto

(Moelker AD, 2006; van der Spoel, 2011). Por otro lado, otros autores han sugerido que la implantación celular en etapas más tardías podría resultar menos efectiva como consecuencia de la instauración de la cicatriz definitiva, lo que provocaría una disminución de la expresión de las citoquinas, así como, una menor adhesión de las células (Zhang H, 2007; Tang XL, 2010).

Así por ejemplo, Zhang Y (2011) evaluó la relación entre el momento de la inyección (a los 3, a los 7 y a los 14 días postinfarto) y el potencial terapéutico de células procedentes de médula ósea en un modelo murino, concluyendo que únicamente la inyección de células realizada tres días después de haberse producido el infarto reducía el tamaño del mismo y mejoraba la función del ventrículo izquierdo.

En nuestro caso, coincidimos con Zhang H (2007) y Tang XL (2010) en que la administración de células en etapas más tardías puede resultar menos efectiva. Así, en nuestro estudio, decidimos realizar la administración de las células madre mesenquimales 48 horas después de haberse inducido el modelo.

Respecto al tipo celular, los numerosos ensayos preclínicos y clínicos han demostrado que una amplia gama de células inyectadas en el miocardio pueden cambiar la naturaleza del tejido dañado y mejorar la funcionalidad cardiaca tras un infarto, si bien aun queda por establecerse qué tipo celular es el más adecuado (Pittenger MF, 2004; Lara-Martínez LA, 2012; Crisóstomo V, 2015).

Las células madre mesenquimales han sido ampliamente estudiadas. Diversos ensayos clínicos han demostrado que las MSC son una fuente prometedora de células para la terapia regenerativa (Blázquez R, 2015). Aisladas inicialmente a partir de médula ósea, actualmente se pueden obtener de varios tejidos (Aggarwal S, 2005; Crisóstomo V, 2015).

Numerosos estudios desarrollados en animales han demostrado la eficacia de este tipo celular en la reparación o regeneración del tejido miocárdico, hueso, tendón, cartílago y menisco. Además, presentan como ventaja que son

menos inmunogénicas, lo que evita la necesidad de utilizar protocolos de inmunosupresión o el uso exclusivo de células autólogas. Así mismo, se ha demostrado que las propiedades inmunomoduladoras que poseen podrían mejorar y acelerar el proceso de cicatrización (Tomita S, 1999; Shake JG, 2002; Pittenger MF, 2004; Aggarwal S, 2005).

Una gran proporción de los ensayos preclínicos han demostrado la eficacia de las células autólogas en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares (Wollert KC, 2004; Backta S, 2007; Valina C, 2007; Kang S, 2008; Miettinen JA, 2010; Bolli R, 2011). Este mayor interés por utilizar células madre autólogas frente a células madre alogénicas reside, sobre todo, en las cuestiones inmunológicas (Lee ST, 2011). Sin embargo, las propiedades inmunomoduladoras que poseen las MSC podrían ser las responsables de la ausencia de rechazo inicial y su seguridad a corto-medio plazo. Este hecho contribuiría a explicar la ausencia de complicaciones derivadas del trasplante celular durante nuestro estudio, pese a que no se administró un tratamiento inmunosupresor.

A pesar de las ventajas que presenta el uso de células autólogas, existen ciertas limitaciones derivadas del largo proceso de aislamiento y expansión que se requiere para obtener el número de células necesario para realizar el tratamiento, haciendo imposible su aplicación en fases agudas del infarto de miocardio. Además, aunque algunos autores han sugerido una mejora de la funcionalidad cardiaca en pacientes tratados con células madre autólogas, el potencial regenerativo de las células obtenidas de pacientes cardiopatas ha sido cuestionado (Cheng K, 2011; Karantalis V, 2012; Crisóstomo V, 2015). En nuestro estudio, debido a que decidimos trasplantar células en una etapa temprana, se optó por utilizar células madre mesenquimales aisladas a partir de una única muestra de tejido adiposo procedente de un animal cuyo aislamiento y cultivo se llevó a cabo antes del comienzo del estudio.

El tejido adiposo representa una fuente de células madre adultas capaces de diferenciarse

a varios tipos celulares que presentan potencial terapéutico para reparar el tejido dañado y la terapia angiogénica (Erickson GR, 2002; Gimble J and Guilak F, 2003; Planat-Benard V, 2004; Safford KM, 2002; Zuk PA, 2002).

Los resultados obtenidos por Puissant B (2005), apoyaron la hipótesis de que las células derivadas de tejido adiposo comparten propiedades inmunosupresoras con las derivadas de médula ósea. Por lo tanto, la terapia regenerativa basada en células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo podría emplear células alogénicas y debido a sus propiedades inmunosupresoras, éstas podrían ser una fuente alternativa a las MSC de médula ósea alogénicas.

Todo ello unido a la posibilidad de obtenerlas de forma sencilla mediante lipoaspirados y su capacidad de ser aisladas en grandes cantidades mediante procedimientos poco agresivos contribuyó a la decisión de emplear MSC derivadas de tejido adiposo, en este trabajo.

Al mismo tiempo, estas células presentan cierta capacidad para diferenciarse *in vitro* a cardiomiocitos aunque *in vivo*, ésta resulta muy limitada. Esta capacidad ha estimulado su empleo en numerosos ensayos, con el fin de evaluar su eficacia para reparar y regenerar el tejido cardíaco (Joggerst SJ, 2009). De igual modo, estudios preclínicos llevados a cabo en ratón en los que se había trasplantado MSC tras un infarto, demostraron una mejora de la función ventricular así como una reducción del tamaño del infarto y una disminución de la mortalidad. Produciéndose dichas mejoras a pesar del reducido número de células diferenciadas a cardiomiocitos (Joggerst SJ, 2009). Sin embargo, Mignone JL (2010) resaltó que tan solo una pequeña cantidad de las células madre capaces de diferenciarse a cardiomiocitos tenían actividad contráctil.

En nuestro ensayo, el análisis histológico reveló la presencia de unas agrupaciones celulares con características similares a los cardiomiocitos en uno de los animales (P32) perteneciente al grupo II, vía de administración intrapericárdica. Sin embargo, el análisis

evidenció que se trataba de células más pequeñas y no estaban organizadas en haces.

Con todo ello, en los últimos años se ha barajado la posibilidad de que el éxito de la terapia con células madre no dependa exclusivamente de la capacidad de las células de diferenciarse a cardiomiocitos (Mignone JL, 2010). La imposibilidad de explicar los efectos que producen las células una vez trasplantadas, en base a su diferenciación, ha llevado a la “hipótesis paracrina”, es decir, el concepto de que las células trasplantadas inducen la reparación del miocardio mediante la liberación de diferentes señales en el tejido circundante (citoquinas, factores de crecimiento, etc.) que, a su vez promueven un número de procesos de restauración (neovascularización, inhibición de la apoptosis, inhibición de la hipertrofia y alteraciones favorables de la matriz extracelular). En conjunto, estas acciones resultarían en una mayor función del ventrículo izquierdo, en una mejora de la perfusión y en la reparación del miocardio (van der Spoel, 2011; Sanganalmath SK, 2013).

Como inconveniente al uso de MSC, cabe destacar su gran capacidad de diferenciación que resulta impredecible una vez son trasplantadas, lo que se presenta como una limitación. Así, por ejemplo, se ha descrito la presencia de células no pertenecientes al ámbito cardíaco (osteoblastos) en el interior del tejido ventricular (Joggerst SJ, 2009). En nuestro caso, el examen histopatológico no evidenció la presencia de células que no fueran características de este tejido en ninguno de los tres grupos de estudio.

Otra cuestión por resolver, a la hora de definir la eficacia del tratamiento, es la cantidad adecuada de células a trasplantar. Por un lado, algunos trabajos sugieren que dosis elevadas de células madre mesenquimales (200×10^6 células) provocan una mejora significativa en la función cardíaca y ayudan a reducir la cicatriz provocada por el infarto (Williams AR, 2013). Por otro lado, datos derivados del ensayo clínico POSEIDON sugieren que concentraciones bajas de células (20×10^6 células) producen un mayor descenso de los volúmenes finales sistólico y diastólico así

como un aumento de la FE frente a dosis altas de células (100×10^6 o 200×10^6 de células) (Hare JM, 2012; Sousonis V, 2015).

Aunque instintivamente se puede suponer que a mayor cantidad de células trasplantadas más beneficiosos son sus efectos, (Karantalis V, 2012) hasta la fecha no hay un consenso sobre la dosis de células más adecuada para que este tipo de tratamiento resulte efectivo.

Schuleri KH (2009) realizó un estudio, en la especie porcina, en el que analizó el efecto conseguido tras la administración, vía intramiocárdica, de células mesenquimales autólogas derivadas de médula ósea (20 millones y 200 millones), concluyendo que en aquellos animales tratados con dosis mayores se había conseguido reducir el tamaño del infarto. Asimismo, afirmó que la contractilidad en este grupo había mejorado tanto en la zona isquémica como alrededor de la misma. Sin embargo, en este mismo año, el grupo de Hamamoto H (2009) publicó un estudio, realizado en ovejas, donde comparaban el efecto de 4 dosis diferentes de MSC (25, 75, 225 y 450 millones de células), administradas vía intramiocárdica. En este caso fueron los grupos tratados con dosis inferiores de células los que mostraron una reducción de la extensión de la cicatriz y una disminución del volumen final diastólico y sistólico (Hamamoto H, 2009).

En nuestro caso, optamos por la administración de una dosis baja de células madre y aunque sí hemos observado una disminución del infarto en los grupos II (intrapericárdica) y III (intramiocárdica), respecto al grupo control, el hecho de utilizar una baja concentración de células madre puede ser la causa de tan escasa mejoría, en comparación con otros estudios similares.

Otro pilar fundamental del que depende el éxito de la terapia celular consiste en la correcta entrega de las células en el área afectada por la isquemia. Para poder valorar la eficacia terapéutica posterior, resulta esencial comparar los métodos de entrega y su impacto en la retención de las células (Heldman AW, 2008). Para ello, son necesarias las comparaciones

directas que permitan aclarar el balance de riesgos y beneficios de los diversos enfoques de entrega que son relativamente escasos, y que resultan esenciales para guiar el futuro de los ensayos clínicos (Heldman AW, 2008; Quang TB, 2010). Coincidimos con estos autores en que una correcta elección de la vía de administración es crucial en el éxito de esta modalidad de tratamiento (Moscoso I, 2009).

Sin embargo, si bien existe un acuerdo general en que las células madre son una pauta terapéutica prometedora en el tratamiento de la patología isquémica, el método de entrega más adecuado sigue siendo un tema de intensos debates (Karantalis V, 2012). Este hecho ha llevado al desarrollo de varios estudios cuyo fin último ha sido valorar la seguridad y la eficacia de diferentes vías de administración de células madre (Perin EC, 2008; Carr CA, 2008; Li Y, 2009; Moscoso I, 2009; Quang TB, 2010; Bui QT, 2010; Li Y, 2011).

Con nuestro estudio, tratamos de valorar la seguridad y la eficacia de tres vías de inoculación de células madre en un modelo experimental de infarto de miocardio: las vías intracoronaria, intrapericárdica e intramiocárdica. A diferencia de otros trabajos, empleamos el abordaje toracoscópico en dos de ellas (intrapericárdica e intramiocárdica transepicárdica) ya que consideramos que puede aportar ventajas a la hora de inocular las células además de permitir al paciente una mejor recuperación.

Respecto a la vía intracoronaria, estamos de acuerdo con Dib N (2010) en que presenta la ventaja de su fácil aplicación posibilitando una distribución homogénea de las células. Por otra parte, algunos estudios asocian el uso de esta vía a la aparición de diversas complicaciones como el riesgo de provocar disecciones de la íntima (Meluzin J, 2006; Hirsch A, 2008) o la posibilidad de provocar microinfartos tras la administración de las células (Vulliet PR, 2004; Freyman T, 2006; Perin EC, 2008). Además, Freyman T (2006) refirió una disminución del flujo en la porción distal de la LAD tras la administración intracoronaria de 50×10^6 MSC, hecho que también fue descrito por Perin EC (2008) quien reseñó la muerte de uno

de los animales incluidos en el estudio como consecuencia de la obstrucción completa del vaso tras la inyección de 100×10^6 MSC.

En este sentido coincidimos en que, como consecuencia de su tamaño, la administración de células madre mesenquimales puede producir una reducción total o parcial del flujo de la arteria al inyectar las células. No obstante, en nuestro estudio solo se observó la obstrucción total de la porción distal de la arteria descendente anterior tras la administración de las mismas en uno de los animales (P7). Y, al contrario que en el caso descrito por Perin EC (2008), pudimos comprobar que se produjo como consecuencia de un vasoespasma ya tras la administración de nitroglicerina se comprobó que el vaso era permeable.

Asimismo, debemos resaltar el hecho de que al igual que reseñó Vulliet PR (2004), en nuestro estudio, la administración intracoronaria de células madre produjo alteraciones en el ECG en dos de los animales, provocando en uno de ellos dos episodios consecutivos de fibrilación ventricular que hicieron necesario aplicar el protocolo de reanimación cardiopulmonar. Esto posiblemente se debiera a una oclusión temporal de la arteria coronaria como consecuencia de una agregación celular (Gyöngyösi M, 2011).

La obstrucción completa del vaso es conocida como fenómeno de “no reflujo” y se produce como consecuencia de una deficiencia en el flujo derivado de una microembolización y una interrupción de la vascularización. Este hallazgo fue descrito, entre otros, por Vulliet PR (2004) quien refirió un aumento de las enzimas cardíacas y la aparición de microinfartos en perros sanos tras la administración intracoronaria de células madre mesenquimales. En nuestro estudio, aunque las concentraciones de enzimas cardíacas (TnI y CKMB), medidas después de la administración de las células, estaban por encima de los valores considerados normales para esta especie, no podemos afirmar que fuera como consecuencia de su administración debido a que no se obtuvo una muestra previa a la inoculación del tratamiento y la concentración de las enzimas cardíacas permanece elevada varios días tras producirse el infarto.

Respecto a la vía intramiocárdica se trata de una técnica a la que se le ha dado un nuevo impulso en el entorno clínico y está considerada como el método más fiable de entrega de las células. Se ha demostrado que se trata de una vía segura en ensayos realizados con animales y datos iniciales de ensayos clínicos, sugiriéndose que la inyección de células madre mediante esta vía mejora la contractilidad de la zona afectada por el infarto aportando efectos beneficiosos para el paciente (Williams AR, 2013).

Mientras que la vía intracoronaria permite una entrega menos invasiva, la administración de células vía intramiocárdica permite visualizar la lesión, favoreciendo una inyección más precisa de las células en el epicardio debido a la exposición directa del corazón y, además, permite administrar las células de forma más precisa. En consecuencia, el número de células implantado y la tasa de retención resulta ser mayor por lo que se considera que podría mejorar la contractilidad miocárdica secundaria al infarto de miocardio (Li Y, 2009; Dib N, 2010; McCall FZ, 2012; Karantalis V, 2012). Además, a diferencia de la vía intracoronaria, que requiere la transmigración de la barrera endotelial, las células se administran directamente en el espacio intersticial.

Por otro lado, la principal desventaja es que las grandes áreas con cicatrices requieren inyecciones múltiples y ha sido cuestionada por la posibilidad de provocar la perforación del ventrículo en los puntos de inyección de las células, hecho en el que estamos de acuerdo con Dib N (2010). Asimismo, se ha descrito una escasa supervivencia de las células administradas por esta vía (Zakharova L, 2010) y una mayor inflamación del tejido como consecuencia del procedimiento, lo que aumenta los riesgos asociados al mismo, como por ejemplo la aparición de arritmias (Cheng, 2009; Dib N, 2010). En este punto también coincidimos con Cheng YH (2014) y Dib N (2010) en que durante la administración de las células documentamos arritmias ventriculares en el ECG durante la tracción del pericardio necesaria para abrir la ventana pericárdica.

Con todo ello, el mayor inconveniente que observamos en esta vía de administración es la

necesidad de someter a determinados pacientes a una intervención quirúrgica (toracotomía) para acceder a la zona afectada por la isquemia. Sí tendría una mejor indicación, por ejemplo, en aquellos casos en los que los pacientes con infarto de miocardio fueran sometidos a un bypass coronario o a una intervención necesaria para salvar la vida del paciente permitiendo el tratamiento adicional con un mínimo riesgo quirúrgico (McCall FZ, 2012). Estamos de acuerdo con lo expuesto por McCall FZ (2012), en que si se demostrase que esta vía proporciona una mejoría de la función cardiaca y que aumenta la vascularización de la zona, reduciendo la lesión, debería replantearse su utilización.

Además, varios autores han sugerido que la realización de una toracotomía y la apertura del saco pericárdico para inyectar las células influyen en el remodelado del ventrículo izquierdo en modelos crónicos de infarto de miocardio. Asimismo, han referido la formación de una gran cantidad de adherencias tras la intervención que podrían dar lugar a artefactos en las imágenes de resonancia magnética (Kraitchman DL, 2000; Edwards R, 2002; Krombach GA, 2005).

En este sentido, creemos que la toracoscopia puede jugar un papel importante como abordaje al corazón. Este abordaje ha representado una alternativa útil para el diagnóstico (exploración y toma de biopsias) de patologías localizadas en la pleura, tráquea, en la porción torácica del esófago, corazón, pulmón, pericardio, diafragma y nódulos linfáticos mediastínicos. Y a su vez ha permitido desarrollar numerosas intervenciones quirúrgicas como lobectomías, drenajes, miotomía esofágica, pericardiectomía, tratamiento del conducto arterioso persistente, etc. (Walsh PJ, 1999; Fossum TW, 2004; Monnet E, 2009; Mauhew KN, 2009; Sánchez-Margallo FM, 2009).

Como ya afirmáramos en trabajos previos (Sánchez-Margallo FM, 2009) nuestro grupo considera que el abordaje toracoscópico ofrece las ventajas la cirugía mínimamente invasiva procurando una mejor visualización del campo quirúrgico, así como una magnificación de las estructuras, lo que facilitaría localizar la zona

isquémica de forma precisa favoreciendo, así, la inyección de las células en el lugar de elección. Además, requiere incisiones más pequeñas, lo que se traduce en menor riesgo de infección, menor formación de adherencias y disminución del dolor posoperatorio, favoreciendo la reducción del tiempo de convalecencia y, por tanto, una menor estancia hospitalaria.

Si bien este abordaje permite un acceso directo al corazón y una inyección precisa de las células en la zona circundante a la lesión, presenta como inconveniente que se trabaja en un espacio reducido; con un instrumental más largo de lo habitual, lo que requiere un minucioso entrenamiento del cirujano. Además, Thompson RB (2004), describió como limitaciones de este abordaje la dificultad para acceder a la pared posterior del corazón y la presencia de latido cardiaco. En nuestro caso, la mayor limitación técnica que encontramos fue el reducido espacio de trabajo dificultado por la constitución anatómica de la cavidad torácica en la especie porcina. Sí que estamos de acuerdo con Thompson RB (2004), en que la presencia de un ritmo no sinusal dificulta la inyección de las células. Por el contrario, no creemos que este abordaje sea limitante para acceder a determinadas zonas del corazón, ya que variando la posición de las puertas de entrada, en función de la localización del infarto, se puede facilitar el acceso a las mismas. De hecho, en nuestro estudio fue necesario variar la posición de los trocares en tres animales para acceder de forma segura a la zona isquémica.

Para evitar este inconveniente, Thompson RB (2004) y Williams RA (2013) reseñaron el uso de un sistema con aguja acodada para facilitar la inyección en las zonas menos accesibles del corazón, como puede ser el ápex o la porción inferior de la pared libre del ventrículo izquierdo.

Por otro lado, en ninguno de los dos trabajos publicados que describen este abordaje para la administración de las células se hace referencia al cierre del saco pericárdico tras la administración del tratamiento ni a que ello haya influido en el remodelado ventricular (Thompson RB, 2004; Williams RA, 2013). En nuestro caso no se

llevó a cabo el cierre del saco pericárdico tras la administración del tratamiento para intentar reducir al máximo, el tiempo quirúrgico y de anestesia. En este sentido, y comparado con lo expuesto anteriormente por Kraitchman DL (2003) y Krombach GA (2005), consideramos que el abordaje toracoscópico podría haber influido en la reducción del remodelado y en la disminución de artefactos en la RM. Todo ello debido, principalmente, a dos motivos: primero a que la ventana pericárdica requerida para realizar la administración de las células es menor que la necesaria para llevar a cabo la inyección mediante una toracotomía. Y, segundo, a que el empleo de incisiones más pequeñas para acceder a la cavidad torácica reducen la formación de adherencias.

En cuanto a las complicaciones que surgieron, en nuestro estudio, derivadas del uso de esta vía fue la aparición de arritmias ventriculares en varios animales al traccionar del saco pericárdico para abrir la ventana, hecho que no describen ni Thompson RB (2004) ni Williams AR (2013) en sus respectivos trabajos. En nuestro caso, se produjeron tanto en el grupo I, tratado vía intramiocárdica, como en el grupo II, administración intrapericárdica donde se registraron arritmias ventriculares en 3 animales. En la bibliografía se han descrito distintas causas que pueden provocar la alteración del ritmo cardíaco durante la cirugía de mínima invasión como son la hipertensión arterial mantenida o como consecuencia de una tracción visceral durante el procedimiento, con estimulación simpática o vagal (Olivé JB, 2013). En nuestro caso, la causa más probable de las arritmias fue una reacción simpática vagal como consecuencia de la tracción del pericardio para la administración del tratamiento y la apertura de la ventana pericárdica.

Respecto a la vía de administración intrapericárdica, consideramos que se trata de una vía muy interesante sobre todo si se pretenden administrar grandes cantidades de células. El espacio pericárdico se ha considerado durante mucho tiempo un depósito ideal para la administración local de fármacos. Durante años esta vía ha sido ampliamente utilizada

como depósito de fármacos para el tratamiento de pacientes con patologías del pericardio (pericarditis) (Maisch B, 2004; Kolettis TM, 2005; Maisch B, 2010). Además, debido a su característica de barrera natural, el pericardio retrasa y reduce la absorción sistémica si la comparamos con otras vías como la intravenosa, lo que permitiría a las células actuar durante más tiempo (Spodick DH, 2000; Verrier RL, 1998). Esta vía admite una dosis local bastante elevada y permite un tiempo de contacto prolongado, lo que favorece una mayor especificidad para actuar sobre los tejidos diana mientras que se minimizan los efectos sistémicos secundarios adversos (Sun F, 2006; Branco E, 2009; Vidi V, 2010). Las implicaciones clínicas de la administración de fármacos vía intrapericárdica han sido expuestas en numerosos ensayos con animales en el tratamiento de la isquemia coronaria aguda y crónica, terapia antiarrítmica y terapias angiogénicas para el infarto de miocardio, siendo los resultados alentadores e indicadores de un gran potencial en la aplicación humana (Landau C, 1995; Spodick DH, 2000; Sun F, 2006). Más recientemente, la entrega intrapericárdica de células madre para terapias regenerativas cardíacas ha despertado gran interés (Branco E, 2009; Rupp H, 2010; Ladage D, 2011; Sun F, 2012; Blázquez R, 2015) presentándose no solo como una vía de administración de las células madre sino también como una ruta para modular la actividad de las células progenitoras cardíacas residentes (Maisch B, 2002; Rupp H, 2010).

Recientemente Blázquez, R (2015) ha demostrado que la entrega intrapericárdica proporciona un entorno óptimo para el mantenimiento de la viabilidad celular, ofreciendo una adecuada retención e implantación de las células en el lugar afectado por la isquemia. Asimismo, ha afirmado que el líquido pericárdico es un vehículo excelente para las MSC que favorece la viabilidad, la proliferación y la supervivencia de las mismas.

En este sentido, los estudios se han dirigido a resolver la cuestión de si las células o agentes para promover la regeneración cardíaca administrados en el espacio pericárdico son capaces de alcanzar la zona de la lesión. Así,

Branco E (2009) demostró en cerdos que las células madre autólogas derivadas de médula ósea administradas en el saco pericárdico presentaban tropismo por el miocardio siendo más pronunciado en el grupo con infarto que en el grupo control. Este hecho también ha sido demostrado, recientemente, por Blázquez R (2015) quien ha publicado un estudio en el que ha confirmado, mediante PCR, la presencia de MSC en la zona afectada por el infarto tras su administración intrapericárdica.

En la bibliografía se han referido distintos accesos para alcanzar el espacio pericárdico: mediante toracotomía, abordaje transatrial, transventricular o acceso subxifoideo (Landau C, 1995; Sun F, 2006; Branco E, 2009; Ladage D, 2011; Sun F, 2012). Sin embargo, consideramos que el uso de estos abordajes para la administración de células en un paciente que, como consecuencia del infarto, puede tener una dilatación de las cámaras cardiacas puede no resultar seguro. Además, todos ellos comparten el inconveniente de que se realizan bajo guía fluoroscópica lo que supone la irradiación del paciente durante el procedimiento (Sun F, 2012).

Entre las complicaciones registradas en la bibliografía durante el empleo de este método de administración destaca el hemopericardio, consecuencia de la perforación del ventrículo izquierdo durante la punción (Sosa E, 1996). En este sentido, Rupp H (2010) reseñó, respecto al abordaje subxifoideo empleado por Branco E (2009), que mientras que este abordaje se puede utilizar en animales de experimentación en ausencia de derrame pericárdico, no se justifica en pacientes cuando el pericardio no se separa de manera adecuada del epicardio. En nuestro caso, no documentamos la perforación del ventrículo en ninguno de los animales durante la administración del tratamiento, por lo que creemos que el abordaje toracoscópico facilita la inyección de las células en el saco pericárdico aportando seguridad y evitando la punción de las cámaras cardiacas y el hemopericardio. Sin embargo, sí observamos la presencia de arritmias ventriculares secundarias a la tracción del pericardio. Además, la formación de adherencias

en este grupo fue muy escaso y estaba asociado a las puertas de entrada.

Existen pocos datos en la bibliografía sobre el tiempo empleado para la administración de células madre a través de las diferentes rutas. Tan solo hemos encontrado la referencia aportada por Sun F (2012), quien refirió un tiempo medio de 55 minutos para la colocación de un catéter intrapericárdico mediante abordaje subxifoideo percutáneo. Consideramos el tiempo quirúrgico un dato de gran interés debido al hecho de que repercute en el tiempo total de anestesia al que son sometidos los sujetos. En este sentido, no encontramos grandes diferencias entre los grupos, aunque el tiempo empleado en la administración de las células vía intrapericárdica fue inferior al empleado en los otros dos procedimientos y eso, teniendo en cuenta que en el grupo tratado vía intramiocárdica no se realizó el cierre de la ventana pericárdica, lo que habría supuesto un aumento del tiempo quirúrgico total. En este sentido, solamente en el grupo tratado vía intrapericárdica el tiempo empleado en la administración de las MSC fue menor al empleado por Sun F (2012).

La función ventricular sistólica izquierda hace referencia a la capacidad del ventrículo izquierdo para generar la fuerza durante la sístole. Y, aunque se han propuesto otros parámetros cuya relación con la función ventricular es más directa, la FEVI y las dimensiones ventriculares son los más utilizados en los ensayos clínicos debido a su facilidad de aplicación, su alta reproducibilidad, a que se pueden obtener de forma no invasiva y, sobre todo, porque se ha demostrado una estrecha relación entre estos parámetros y el beneficio clínico.

Parece existir una evidencia incuestionable sobre la relación de la FE y los volúmenes ventriculares con el pronóstico en pacientes que han tenido un infarto agudo de miocardio, que padecen insuficiencia cardiaca y en pacientes sin cardiopatía conocida (San Román JA (2009). Hay que considerar que el aumento de los volúmenes finales sistólico y diastólico se produce como consecuencia del remodelado

ventricular secundario a un infarto de miocardio (Makkar RR, 2012). Teniendo en cuenta esto, en nuestro ensayo utilizamos la FE, el VFD_i y el VFS_i para evaluar los efectos que las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo pudieran tener sobre la funcionalidad cardiaca.

Al analizar cada vía de administración de manera independiente (intracoronaria, intrapericárdica e intramiocárdica) los resultados fueron poco alentadores al referirnos a los beneficios que el uso de las MSC aportó a la funcionalidad cardiaca de nuestros animales, observándose que en el grupo tratado por vía intracoronaria no se produjo una mejoría de la función cardiaca de los animales tratados con células con respecto a los animales tratados con placebo (SSF). En estos últimos, la FE permaneció constante mientras que en los animales tratados con células ésta continuó disminuyendo hasta el final del estudio. En cuanto a los volúmenes (VFD_i y VFS_i) aumentaron tanto en unos como en otros, siendo el aumento significativo en los animales tratados con MSC. En ambos grupos se observó una reducción del porcentaje de miocardio afectado por el infarto que no fue significativo en ninguno de los grupos.

En el grupo II, vía intrapericárdica, se observó una recuperación de la FE similar tanto en los animales tratados con células como en los tratados con SSF. En este caso en el grupo control los volúmenes finales indexados aumentaron de forma significativa mientras que en los animales tratados con células el aumento resultó ser menor y no fue significativo. En este grupo, los animales tratados con MSC el porcentaje de infarto se redujo de forma significativa entre la fase 2 días y 3 meses.

Por último, en el grupo III (vía intramiocárdica) en el grupo tratado con MSC se observó una recuperación de la FE. Por el contrario no se observó recuperación de los volúmenes que aumentaron, a lo largo del estudio, aunque no de forma significativa. Por último, en este grupo los animales tratados con placebo se observó un aumento no significativo del porcentaje de

infarto. En los animales tratados con MSC el porcentaje se redujo entre el inicio y el final del estudio pero la reducción no fue significativa.

En conjunto, respecto al remodelado ventricular, podemos afirmar que en los tres grupos se produjo remodelado del ventrículo izquierdo tanto en los animales control, tratados con placebo (SSF) como en aquellos animales tratados con MSC. Por otro lado, si consideramos la FE como parámetro predictivo de funcionalidad cardiaca, como apuntaba San Román JA (2009), podemos alegar que en aquellos animales tratados con células cuya administración se había realizado vía intrapericárdica e intramiocárdica, apreciaríamos una ligera recuperación de la función cardiaca.

En el análisis realizado, teniendo en cuenta solo los animales que se trataron con MSC, observamos que en aquellos tratados vía intrapericárdica e intramiocárdica la FE mostraba una recuperación comparado con el grupo tratado vía intracoronaria. En el caso del VFD_i el aumento fue mayor en el grupo tratado vía intracoronaria resultando significativo con respecto al grupo tratado vía intrapericárdica, en la fase 3 meses. El VFS_i aumentó, significativamente, en el grupo intracoronaria, mientras que en los grupos intramiocárdica e intrapericárdica apenas sufrió variación durante el estudio.

Podemos afirmar que en los tres grupos se produjo remodelado ventricular postinfarto que resultó ser mayor en el grupo tratado vía intracoronaria. Así, los grupos intrapericárdica e intramiocárdica experimentaron una ligera recuperación de la funcionalidad cardiaca al final del estudio.

Finalmente, al considerar el porcentaje de miocardio afectado por el infarto observamos que, en los tres grupos, los animales tratados con células mostraron un menor porcentaje de infarto que los animales tratados con placebo, al final del estudio. Al comparar únicamente los animales tratados con células, observamos que efectivamente el área de tejido afectada por la isquemia se redujo en los tres grupos. Sin embargo, sólo en el grupo tratado vía

intrapericárdica la reducción de la zona afectada por el infarto fue significativa.

Aunque se han desarrollado numerosos estudios cuyo objetivo ha sido determinar la vía de entrega más adecuada, la comparación con nuestros resultados resulta complicada debido a la gran heterogeneidad existente en el protocolo de estudio (dosis, tiempo de administración...). Muchos de los trabajos publicados se refieren al uso de una vía concreta de administración donde comparan las variaciones en el tamaño del infarto o en la funcionalidad cardíaca al administrar diferentes dosis o tipos celulares a diferentes momentos de administración (Halkos, ME, 2004; Hung QL, 2009; Valina C, 2007; Schuleri KH, 2009; Makkar RR, 2012). Por otro lado, en los trabajos que hemos revisado, y que comparan diferentes vías de administración, muchos se centran en determinar la capacidad de retención de las células por el corazón y la migración de las mismas hacia otros órganos en función de la vía empleada (Hou D, 2005; Freyman T, 2006; Moscoso I, 2009).

Así, por ejemplo, Dubois C (2010) evaluó la recuperación funcional y estructural en cerdos con IM tras la administración intracoronaria de 2 tipos celulares (células endoteliales progenitoras autólogas y MSC alogénicas). Para el estudio de funcionalidad evaluaron la fracción de eyección y los volúmenes finales (diastólico y sistólico) mediante resonancia magnética 1 y 7 semanas tras la inyección de las células. Al igual que nosotros documentaron una disminución significativa de la FE después de la inducción del infarto. Por contra, en su estudio seis semanas más tarde, la FE mostró un aumento modesto y similar en los 3 grupos mientras que en el nuestro la FE no mostró recuperación alguna. Respecto a los volúmenes (VFS y VFD), ellos documentaron un aumento significativo en los grupos control y tratado con MSC pero no en el grupo tratado con células endoteliales. Por contra, en nuestro caso, aunque en los tres grupos se observó un aumento no significativo de los volúmenes a lo largo del estudio, éste resultó ser más moderado en los grupos tratados vía intrapericárdica e intramiocárdica.

No obstante, a pesar de realizar un estudio funcional, no podemos hacer un estudio comparativo preciso de los resultados debido a la existencia de varias diferencias: en su caso la duración del ensayo fue menor (7 semanas) y, al contrario que nosotros indujeron el infarto en la ACx. Además, utilizaron dosis más bajas de MSC (10×10^6 MSC) y realizaron la inyección transcurrida 1 semana desde la creación del modelo.

Respecto a los métodos de diagnóstico por imagen hemos empleado dos de los métodos más utilizados para determinar la funcionalidad cardíaca: la ecocardiografía, al presentarse como el método de elección en el contexto agudo y la resonancia magnética que nos permitió evaluar no solo la funcionalidad cardíaca sino también el porcentaje de miocardio afectado por el infarto a través de un único estudio.

A pesar de tratarse de dos técnicas ampliamente utilizadas y validadas para cuantificar la funcionalidad cardíaca, hemos de destacar que a la hora de analizar los datos obtenidos durante nuestro estudio se encontraron algunas diferencias en los volúmenes y la fracción de eyección. En este sentido creemos que han influido varios factores: los derivados del propio animal como la frecuencia cardíaca; factores derivados del protocolo de estudio ya que en el caso de la RM los individuos estaban anestesiados mientras que en la ecografía solo estaban sedados; y, por último, factores derivados de la propia técnica: la ecografía, por ejemplo depende en gran medida de la experiencia del operador, de la correcta visualización de las ventanas acústicas, etc.

Asimismo, a la hora de emplear la ecocardiografía, hemos debido tener en cuenta que aunque el modo M es el método clásico en la valoración de la función ventricular izquierda en ventrículos normales, en ventrículos dilatados o asimétricos, donde las relaciones de sus ejes se alteran, puede no ser fiable (San Román JA, 2009). Este hecho nos condujo al uso del estudio bidimensional para medir la fracción de eyección mediante el método de Simpson, ya que se ha descrito que mediante este método no se ve

afectada la exactitud del cálculo por ventrículos dilatados, asimétricos o con alteraciones de la dinámica segmentaria (San Román JA, 2009).

Por otro lado, en la bibliografía encontramos que la cuantificación de la función sistólica por resonancia magnética es más fiable y reproducible y resulta más precisa que la realizada por la ecocardiografía al no estar sometida a presunciones geométricas. Su alta resolución espacial y temporal, así como el contraste que proporciona entre sangre y miocardio, la convierten en una técnica excelente para el estudio de la funcionalidad del ventrículo izquierdo (San Román JA, 2009).

En nuestra opinión, a pesar de la necesidad de anestesiarse a los animales para realizar la RM, creemos que se trata de una técnica más precisa a la hora de realizar la medición de la funcionalidad cardíaca. Aunque sí influyen factores como la frecuencia cardíaca a la hora de obtener las imágenes, al contrario que la ecocardiografía, no necesita tener una buena ventana acústica para obtener las imágenes y no es operador dependiente.

Un último apunte para evaluar la eficacia del uso de la terapia celular en el infarto de miocardio se refiere a los cambios histopatológicos que se suceden tras el mismo.

La lesión isquémica provocada por infarto agudo de miocardio suele ir seguida de un proceso de reparación del ventrículo lo que se conoce como remodelado ventricular postinfarto y que se traduce en un aumento de los volúmenes, como ya hemos reseñado previamente (Pfeffer M, 1990; Vilahur G, 2011). El grado de remodelación cardíaca es reconocido como un factor determinante en el desarrollo de la insuficiencia cardíaca, y podría ser un factor predictivo de mortalidad y morbilidad en pacientes con infarto de miocardio (Gaudron P, 1993; Vilahur G, 2011).

En respuesta al proceso isquémico se producen una serie de cambios progresivos en el miocardio, que entre las 2 y 8 semanas después de haberse producido el infarto da lugar a una cicatriz. El proceso que resulta en un

infarto cicatrizado suele tardar, como mínimo, 5-6 semanas. En este sentido, un infarto con una duración de 12 semanas, como es nuestro caso, se espera encontrar un proceso cicatrizal finalizado donde se aprecia una cicatriz firme, blanquecina y que, generalmente, tiene un grosor menor al del miocardio sano (Pasotti, M, 2006; Vilahur G, 2011; Thygesen K, 2012). A nivel microscópico, los cambios que se encuentran son una cicatriz fibrosa y acelular caracterizada por depósitos de colágeno. Ocasionalmente, en la zona, se pueden observar agrupaciones de miocitos vivos (Chang, 2012).

En nuestro estudio, el análisis histopatológico mostró algún área de infarto en todos los animales analizados excepto en las muestras correspondientes a los animales P1 (grupo intracoronaria) y P23 (grupo intrapericárdica). Sin embargo, en el caso del animal P1, es posible que la muestra no fuera representativa dada la extensión del infarto en el resto de las muestras del grupo I. El grupo I (administración intracoronaria) es el que presentó las lesiones más severas tanto si nos referimos a la extensión como si nos referimos al grado de fibrosis e inflamación. En los grupos II y III, a pesar de que se observaron en algunas muestras extensas áreas de infarto, su número y la severidad de las lesiones fueron menores. Además, en el animal P32 (grupo intramiocárdica), con la tinción de TCM, se observaron unas agrupaciones celulares con características de miocardiocitos por lo que podría tratarse de áreas de neoformación de tejido muscular.

De los hallazgos histológicos podríamos deducir que las vías intrapericárdica e intramiocárdica parecen ser más eficaces a la hora de administrar las células.

En resumen, a la vista de los resultados obtenidos en nuestro estudio, creemos que el abordaje toracoscópico aporta seguridad a la administración de las células, permitiendo una inoculación precisa de las mismas y disminuyendo los inconvenientes de una intervención quirúrgica en un paciente con patología cardíaca. Asimismo, consideramos que la vía de administración intrapericárdica

resulta interesante como vía de administración del tratamiento favoreciendo una inyección segura de las células, mejorando la funcionalidad cardíaca y reduciendo el área afectada por la isquemia.

A pesar de que tanto los ensayos en modelos animales como los clínicos basados en el uso de células madre sugieren que la terapia regenerativa es una técnica factible, segura y beneficiosa, el grado de regeneración miocárdica y de mejoría de la función cardíaca obtenidos, hasta la fecha, han sido muy limitados. Esto ha influido en la puesta en marcha de procedimientos alternativos basados en la combinación de células con capacidad regenerativa, factores de crecimiento proangiogénicos, matrices biológicas, polímeros sintéticos biocompatibles y sistemas de registro online mediante bioimplantes (Gálvez-Montón C, 2013).

A modo de ejemplo reciente, un equipo investigador encabezado por Izpisúa JC, ha desarrollado un cóctel molecular capaz de reprogramar las células epiblasticas humanas otorgándoles la capacidad de diferenciarse a cualquier tipo celular. A partir de aquí las han trasplantado en un embrión murino obteniendo diferentes tipos celulares con capacidad para originar otros con potencial para generar todas las células, tejidos y órganos del cuerpo. Actualmente están intentando reproducir estos resultados en la especie porcina a la espera de poder utilizarlo en el ser humano una vez probada su eficacia como método alternativo de terapia regenerativa (Wu J, 2015).

Limitaciones del estudio

Las diferencias existentes entre la enfermedad humana y la inducida experimentalmente, tanto en los mecanismos de regulación genética como en los factores que determinan la función cardíaca y vascular, consideramos que serían sus principales limitaciones (Chorro FJ, 2009).

El reducido número de animales incluidos en cada grupo podría ser la causa de la falta de resultados significativos obtenidos de nuestro estudio. Asimismo, la duración del ensayo pudo

resultar insuficiente a la hora de comprobar la eficacia de las células. En este sentido, la dificultad de manejo que presentan, a largo plazo, animales en crecimiento limitaría la duración de los ensayos haciendo necesario el empleo de razas miniatura para facilitar ensayos de larga duración (Suzuki Y, 2008).

Por otro lado, la imposibilidad de conocer el valor exacto de la concentración de troponina, nos impidió relacionar este dato con el tamaño del infarto, hecho que ya se había referido previamente en la bibliografía (O'Brien PJ, 1997; Zacharowski K; 1999; Friedrich MG, 2008; Csonka C, 2010).

En nuestro estudio asumimos que la células madre mesenquimales alogénicas, derivadas de tejido adiposo, no provocarían respuesta inmune en los sujetos de estudio. Y, aunque no llegamos a comprobar este hecho en ningún caso se encontraron evidencias de rechazo en la histología.

Por último, aunque asumimos los datos referidos en la bibliografía sobre estas células, desconocemos sus mecanismos de acción así como su capacidad para permanecer en el lugar afectado por la isquemia. Así, la realización de estudios que permitan rastrear las células (inmunohistoquímica, PCR, marcado con BrdU, etc.) para conocer si las células habían alcanzado el área de isquemia, hubiera resultado de gran interés.

Líneas futuras

En trabajos futuros consideramos de utilidad la realización de estudios que nos permitan comprobar la correcta entrega de las células en el lugar de elección mediante estudios de inmunohistoquímica o de PCR por ejemplo mediante la detección del cromosoma Y, en caso de que las células trasplantadas se hayan aislado a partir de una muestra de tejido obtenida de machos, como ha reseñado recientemente Blázquez R (2015).

Por el contrario, el uso de materiales biológicos y/o sintéticos que actúen como soporte de células madre, aplicados directamente sobre la zona

afectada por la isquemia podría resultar de gran interés en este tipo de investigaciones. En este sentido consideramos que podría resultar de gran interés el uso del abordaje toracoscópico para la colocación de estos biomateriales en el área de elección y que será abordado en trabajos futuros.

Por otro lado, a pesar de las ventajas que se han asociado al uso de las MSC en el

tratamiento del infarto, estudios recientes sugieren que las células madre cardiacas aportan mayores beneficios por lo que sería interesante comparar ambos tipos celulares bajo las mismas condiciones con el fin de determinar qué tipo celular es el más apropiado.

Conclusiones

1.- El abordaje toracoscópico favorece un acceso rápido al interior de la cavidad torácica, reduciendo el tiempo quirúrgico. Además, facilita la localización del área afectada por la isquemia permitiéndo realizar una entrega precisa de las células en el lugar de elección.

2.- Las vías intrapericárdica e intramiocárdica son más eficaces en el tratamiento del infarto de miocardio con células madre que la vía intracoronaria. Ambas permiten una mejora de la funcionalidad cardiaca, siendo la vía intrapericárdica superior.

3.- La vía intrapericárdica es la vía de inoculación más segura para realizar la entrega de las células al presentar menor número de complicaciones, intraoperatorias y postoperatorias, asociadas al desarrollo de la técnica.

Resumen

Las ECV son la principal causa de muerte en todo el mundo representando un 30% de todas las muertes registradas. En los últimos años, el uso de la terapia celular ha despertado un cierto optimismo en el tratamiento de este conjunto de patologías cuyo objetivo fundamental ha sido reducir el tamaño de la cicatriz y estimular el crecimiento del músculo cardíaco sano. Sin embargo, a día de hoy aún existen cuestiones que resolver. El objetivo de nuestro trabajo fue comparar tres vías de inoculación de células madre (intracoronaria, intrapericárdica e intramiocárdica) incorporando el abordaje toracoscópico en dos de ellas (intrapericárdica e intramiocárdica) y comprobar qué método aportaba mayores beneficios.

Se emplearon 39 hembras de la especie porcina con un peso de $30,69 \pm 2,78$ Kg. Se creó un modelo de infarto de miocardio mediante la colocación de un balón de angioplastia durante 90 minutos distal a la primera rama diagonal de la arteria descendente anterior. 2 días después de la creación del modelo, los animales se dividieron aleatoriamente en tres grupos teniendo en cuenta la vía empleada para la administración del tratamiento: Grupo I: vía intracoronaria, Grupo II: vía intrapericárdica y Grupo III: vía intramiocárdica. Se realizaron seguimientos al mes, 2 meses y 3 meses coincidiendo con el fin de estudio. Posteriormente se realizó el sacrificio humanitario de los animales y se realizó una recogida de muestras para el análisis histológico. La funcionalidad cardíaca se evaluó mediante ecocardiografía y resonancia magnética. En primer lugar se realizó un estudio comparativo entre el grupo control (tratado con SSF) y el grupo células (tratado con MSC) de cada vía de administración del tratamiento. Y posteriormente, se hizo un estudio comparativo entre los grupos tratados con células de cada una de las vías. Los datos de VFD y VFS se indexaron en función de la superficie corporal. Para el análisis de los datos se utilizó una prueba no paramétrica: test de Kruskal-Wallis con prueba Post hoc de U de Mann-Whitney. En todos los casos se asumió una significación de $p < 0,05$.

En el grupo I, vía intracoronaria, la FE permaneció constante en los animales tratados con placebo mientras que en los animales tratados con células ésta continuó disminuyendo hasta el final del estudio. Los volúmenes (VFD_i y VFS_i) aumentaron de forma significativa en los animales tratados con MSC. En ambos grupos se observó una reducción del porcentaje de miocardio afectado por el infarto que no fue significativo en ninguno de los grupos.

En el grupo II, vía intrapericárdica, se observó una recuperación de la FE tanto en los animales tratados con células como en los tratados con placebo (SSF). Aunque en ambos grupos aumentaron los volúmenes indexados, solo en el grupo control el aumento fue significativo. Además, en los animales tratados con MSC el porcentaje de infarto se redujo de forma significativa entre la fase 2 días y 3 meses.

Por último, en el grupo III, vía intramiocárdica, en los animales tratados con MSC se observó una recuperación de la FE. Sin embargo los volúmenes indexados aumentaron, a lo largo del estudio, aunque no de forma significativa. Solo en los animales tratados con MSC el porcentaje de infarto se redujo entre el inicio y el final del estudio aunque no fue significativo.

Al comparar solo aquellos animales que se trataron con MSC, observamos que en los tratados vía intrapericárdica e intramiocárdica la FE mostraba una recuperación entre las fases 2 días y 3 meses comparado con el grupo tratado vía intracoronaria. El VFD_i fue significativamente mayor en el grupo tratado vía intracoronaria que en el grupo tratado vía intrapericárdica, en la fase 3 meses. El aumento del VFS_i fue significativamente mayor en el grupo intracoronaria que en los otros grupos, en la fase 3 meses. Finalmente, el área de tejido afectada por la isquemia disminuyó en los tres grupos. Sin embargo, sólo en el grupo tratado vía intrapericárdica fue significativa.

El abordaje toracoscópico favoreció un acceso rápido al interior de la cavidad torácica facilitando la localización del área afectada por la isquemia y permitiéndonos realizar una entrega precisa de las células en el lugar de elección. Las vías intrapericárdica e intramiocárdica resultaron ser las más eficaces en el tratamiento del infarto de miocardio con células madre, ambas vías propiciaron una mejora de la funcionalidad cardíaca. Además, en el grupo II se consiguió una reducción significativa del porcentaje de infarto.

Summary

Cardiovascular diseases are the leading cause of death throughout the world, representing a 30% of all registered deaths. In recent years, the use of cell therapy has aroused a certain optimism in the treatment of this set of diseases whose major objective has been to reduce the size of the scar and stimulate the growth of healthy heart muscle. However, today there are still issues to solve. Our objective was to compare three ways for inoculation of stem cells (intracoronary, intrapericardial and intramyocardial) incorporating the thoracoscopic approach in two of them (intramyocardial and intrapericardial) and to verify which is the method that provide greater benefits.

39 female domestic pigs were subjected to a 90-minutes balloon occlusion of the mid left anterior descending artery. 2-days after infarction animals were randomly allocated to intracoronary (Group I, n=12), intrapericardial (Group II, n=12) and intramyocardial (Group III, n=12) administration. In each group, placebo was injected in 5 animals and 30×10^6 Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells (MSC) were injected on the other 7 animals. All animals underwent cardiac magnetic resonance and echocardiography to evaluate cardiac function at 2 days, 1 month, 2 months and 3 months after myocardial infarction. Euthanasia was then performed and samples were collected for pathology.

Firstly, an intragroup comparison between the control animals saline and animals treated with MSC with each route was performed. Then, comparative study between the 3 treated groups was carried out. End Diastolic Volume (EDV) and End Systolic Volumen (ESV) were indexed to body surface area. Statistical analyses were performed in SPSS version 19 for Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois). For comparison of the three treatment groups a non-parametric test (Kruskal-Wallis test, Post hoc U Mann-Whitney) was performed. All p values <0.05 were deemed significant.

In group I (intracoronary administration) ejection fraction (EF) remained constant in the animals treated with placebo while in the animals treated with cells it decreased until the end of the study. Ventricular volumes (EDV_i and ESV_i) increased significantly in the MSC treated animals. In both groups there was a reduction in the percentage of infarction but it was not significant.

In group II (intrapericardial administration) EF improved in both the animals treated with cells and the placebo-treated. Although in both groups volumes indexed increased, only in the control group the increase was significant. In addition, in the animals treated with MSC the percentage of infarction was significantly reduced between the phase 2 days and 3 months.

In group III (intramyocardial administration) a recovery of the EF was seen in the animals treated with MSC. However the indexed volumes increased, over the course of the study, although not significantly so. Only in the animals treated with MSC the percentage of infarction was reduced over time but not significantly so.

Finally, EF improved in those animals treated with MSC by intrapericardial and intramyocardial routes. The EDV_i was significantly higher in the intracoronary group compared to intrapericardial group, at 3 months. Similarly, the increase in ESV_i was significantly greater in the intracoronary group than in the other groups, also at 3 months. Finally, the area of tissue affected by ischemia decreased in the three groups. However, only in the intrapericardial group was it significant.

The thoracoscopic approach favored a quick access to the inside of the chest cavity by facilitating the location of the area affected by ischemia and allowing us perform a precise delivery of cells in

the place of choice. The intrapericardial and intramyocardial administrations proved to be the most effective routes in the treatment of myocardial infarction with stem cells, both routes resulted in improved functionality of the heart. In addition, in the intrapericardial group a significant reduction in infarction was observed.

Bibliografía

Abbasi M, Javan H, Alizadeh B *et al.* Can intracoronary injection permanently improve cardiac function after myocardial infarction? *Interactive Cardio Vasc Thoracic Surgery* 2010;12(2):229-31.

Abdel-Latif A, Bolli R, Tleyjeh IM *et al.* Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med* 2007;167:989-997.

Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005;105(4):1815-22.

Alonso Gómez AM, Paré Bardera C, Payá Serrano R *et al.* Papel de la ecocardiografía Doppler en el manejo de la cardiopatía isquémica crónica. *Rev Esp Cardiol* 1997;50:15-25.

Alpert JS, Thygesen K, Antman E *et al.* Myocardial Infarction redefined—a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/ American College of Cardiology Committee for redefinition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36(3): 959-69.

Amado LC, Saliaris AP, Schuleri KH *et al.* Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(32):11474-9.

Aparato Circulatorio. En García-Porrero JA y Hurlé JM. *Anatomía Humana*. Editorial McGraw-Hill. Interamericana. Colombia 2005. Pp:579-639.

Arnold R, Villa A, Gutiérrez H *et al.* Absence of accelerated atherosclerotic disease progression after intracoronary infusion of bone marrow derived mononuclear cells in patients with acute myocardial infarction—Angiographic and intravascular ultrasound—Results from

the Terapia Celular Aplicada al Miocardio Pilot study (TECAM). *Am Heart J* 2010;159(6):1154.e1-1154.e8.

Assmus B, Honold J, Schächinger *et al.* Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006;355(12):1222-1234.

Avilés FF, San Román JA, García Frade J *et al.* Regeneración miocárdica mediante implantación intracoronaria de células madre en el infarto agudo de miocardio. *Rev Esp Cardiol* 2004;57(3):201-8.

Barbash IM, Chouraqui P, Baron J *et al.* Systemic delivery of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells to the infarcted myocardium. Feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation* 2003;108:863-868.

Bardají A. El papel de las troponinas en el diagnóstico y el pronóstico de los síndromes coronarios agudos. *Rev Esp Cardiol Supl* 2005;5:19C-25C.

Blázquez R, Sánchez-Margallo FM, Crisóstomo V *et al.* Intrapericardial administration of mesenchymal stem cells in a large animal model: a biodistribution analysis. *PLoS One* 2015;10(3):e0122377.

Bolli R, Chugh AR, D’Amaro D *et al.* Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet* 2011;378(9806):1847-57.

Branco E, Fioretto ET, Cabral R *et al.* Myocardial homing after intrapericardial infusion of bone marrow mononuclear cells. *Arq Bras Cardiol* 2009;93(3):e38-e41.

Bueno H y Gómez de Diego J. Fisiopatología del infarto de miocardio: de la formación de la

placa al remodelado ventricular. *Rev Esp Cardiol* 2004;4(5):3-13.

Bui QT, Gertz ZM and Wilensky RL. Intracoronary delivery of Bone Marrow derived stem cells. *Stem Cell Res Ther* 2010, 1:29.

Cardiovascular Disease. Part 1: Past, Present and Future. En Fuster V, Walsh RA, Harrington RA. *Hurst's The Heart*, McGraw-Hill Professional; 13th edition. 2011. Pp: 3-62.

Carrasco Jiménez MS, Usón Gargallo J. Aprendizaje y aplicación de la anestesia en cirugía toracoscópica. Barcelona: EDIKA MED 1998:27-83. ISBN 84-7877-223-5.

Casado JG, Gómez-Mauricio G, Álvarez V *et al.* Comparative phenotypic and molecular characterization of porcine mesenchymal stem cells from different sources for translational studies in a large animal model. *Vet Immunol Immunopathol* 2012;147(1-2):104-12.

Charles CJ, Elliott JM, Nicholls MG *et al.* Myocardial infarction with and without reperfusion in sheep: early cardiac and neurohumoral changes. *Clin Sci* 2000;98:703-711.

Charwat S, Gyöngyösi M, Lang I *et al.* Role of adult bone marrow stem cells in the repair of ischemic myocardium: Current state of the art. *Exp Hematol* 2008;36(6):672-680.

Chorro FJ. Modelos animales de enfermedad cardiovascular. *Rev Esp Cardiol* 2009;62(1):69-84.

Cirugía del sistema cardiovascular. En: Fossum TW, Heldlund CS Hulse DA *et al.* *Cirugía en pequeños animales*. Intermédica editorial 2004. Pp:733-737.

Climent S, Sarasa M, Domínguez L *et al.* Corazón Adulto. En: Climent S, Sarasa M, Domínguez L *et al.* *Manual de anatomía y embriología de los animales domésticos*. Conceptos básicos y aplicativos. Editorial Acribia S.A. Zaragoza 2005. Pp:305-319.

Clinical indications for cardiovascular magnetic resonance (CMR): Consensus Panel report. *Eur Heart J* 2004;25:1940-1965.

Crisóstomo V, Maestre J, Maynar M *et al.* Development of a Closed Chest Model of Chronic Myocardial Infarction in Swine: Magnetic Resonance Imaging and Pathological Evaluation. *ISRN Cardiol* Volume 2013, Article ID 781762, 8 pages.

Crisóstomo V, Báez-Díaz C, Maestre J *et al.* Delayed administration of allogeneic cardiac stem cell therapy for acute myocardial infarction could ameliorate adverse remodeling: experimental study in swine. *J Transl Med* 2015;13(1):156.

Crisóstomo V, Casado JG, Báez-Díaz C *et al.* Allogeneic cardiac stem cell administration for acute myocardial infarction. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2015;13(3):285-99.

Csonka C, Kupai K, Kocsis GF *et al.* Measurement of myocardial infarct size in preclinical studies. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2010;61:163-170.

Dib N, Menasche P, Bartunek JJ *et al.* Recommendations for successful training on methods of delivery of biologics for cardiac regeneration. *J Am Coll Cardiol* 2010;3:265-75.

Donovan PJ and Gearhart J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature* 2001;414:92-97.

Dubois C, Liu X, Claus P *et al.* Differential Effects of Progenitor Cell Populations on Left Ventricular Remodeling and Myocardial Neovascularization After Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:2232-43.

El corazón. En: Guyton and Hall. *Tratado de Fisiología Médica*. 12ª edición. Editorial Elsevier. Barcelona, 2011.

Ema H, Takano H, Sudo K, Nakauchi H. In vitro selfrenewal division of hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 2000;192:1281-1288.

Enfermedades Cardiovasculares. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/>. Acceso el 10 de junio de 2015.

Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM *et al.* Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290:763-769.

European Cardiovascular Disease Statistics, 2012 edition. Disponible en: <http://www.escardio.org/about/Documents/EU-cardiovascular-disease-statistics-2012.pdf>. Acceso el 14 de mayo de 2015.

Ferdinandy P, Schulz R and Baxter GF. Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. *Pharmacol Rev* 2007;59:418–458.

Férez Santander SM, Márquez MF, Peña Duque MA *et al.* Daño miocárdico por reperfusión. *Rev Esp Cardiol* 2004;57(Supl 1):9-21.

Fernández-Avilés F, San Román JA, Gracia-Frade J *et al.* Experimental and clinical regenerative capability of human bone marrow cells after myocardial infarction. *Circ Res* 2004;95:742-748.

Ferreira-González I. Epidemiología de la enfermedad coronaria. *Rev Esp Cardiol* 2014;67(2):139-144.

Freyman T, Polin G, Osman H *et al.* A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction. *Eur Heart J* 2006;27:1114-1122.

Friedrich MG. Tissue characterization of acute myocardial infarction and myocarditis by cardiac magnetic resonance. *J Am Coll Cardiovasc Imaging* 2008;1:652-662.

Fuster V y Braunwald E. Definición, Patogenia y clasificación. En: Fuster V, Ross R, Topol EJ. *Aterosclerosis y enfermedad arterial coronaria*. Ed. Springer-Verlag Ibérica; Barcelona 1997. Pp:1373-1420.

Gálvez-Montón C, Prat-Vidal C, Roura S *et al.* Ingeniería tisular cardíaca y corazón bioartificial. *Rev Esp Cardiol* 2013;66:391-9.

Gálvez-Montón C, Prat-Vidal C, Díaz-Güemes I *et al.* Comparison of two preclinical myocardial infarct models: coronary coil deployment versus surgical ligation. *J Transl Med* 2014;12:137.

Ecocardiografía Básica. En: García Fernández MA, Zamorano JL and García Robles JA. *Manual*

de ecocardiografía. Indicaciones e interpretación en la práctica clínica. Editorial Edimed, S.L. Madrid. Pp:1-17.

García-Lindo M, Báez C, Crisóstomo V *et al.* Tiempos de aparición de episodios de fibrilación ventricular durante la inducción de infarto agudo de miocardio en modelo experimental mínimamente invasivo. IX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Anestesia y Analgesia Veterinaria. Zaragoza 30, 31 de mayo y 1 de junio de 2014.

Gaudron P, Eilles C, Kugler I and Ertl G. Progressive left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction. Potential mechanisms and early predictors. *Circulation* 1993;87(3):755-63.

George JC. Transvenous intramyocardial cellular delivery increases retention in comparison to intracoronary delivery in a porcine model of acute myocardial infarction. *J Interv Cardiol* 2008;21(5):424-431.

Gilson WD y Kraitichman DL. Técnicas no invasivas de imagen cardiovascular en investigación básica: aplicación en la terapia celular. *Rev Esp Cardiol* 2009;62(8):918-27.

Gimble J and Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy* 2003;5:362–369.

Gómez-Mauricio RG, Acarregui A, Sánchez-Margallo FM *et al.* A preliminary approach to the repair of myocardial infarction using adipose tissue-derived stem cells encapsulated in magnetic resonance-labelled alginate microspheres in a porcine model. *Eur J Pharm Biopharm* 2013;84(1):29-39.

Gyöngyösi M, Hemetsberger R, Wolbank S *et al.* Delayed Recovery of myocardial blood flow after intracoronary stem cell administration. *Stem Cell Rev* 2011;7(3):616-623.

Hackett D, Mckenna Davies G and Maseri A. Reperfusion arrhythmias are rare during acute myocardial infarction and thrombolysis in man. *Int J Cardiol* 1990;29:205-13.

Halkos ME, Kerendi F, Corvera JS *et al.* Myocardial protection with postconditioning is not enhanced by ischemic preconditioning. *Ann Thorac Surg* 2004;78(3):961-9.

Halkos ME, Zhao Z, Kerendi F *et al.* Intravenous infusion of mesenchymal stem cells enhances regional perfusion and improves ventricular function in a porcine model of myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 2008;103:525-536.

Hamamoto H, Gorman JH 3rd, Ryan LP *et al.* Allogeneic mesenchymal precursor cell therapy to limit remodeling after myocardial infarction: the effect of cell dosage. *Ann Thorac Surg* 2009;87:794-801.

Hamm CW, Bassand JP, Agewall S *et al.* Guía de práctica clínica de la ESC para el manejo del síndrome coronario agudo en pacientes sin elevación persistente del segmento ST. *Rev Esp Cardiol* 2012;65(2):173.e1-e55.

Hare JH, Fishman JE, Gerstenblith G *et al.* Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy. The POSEIDON Randomized Trial. *JAMA* 2012;308(22):1-11.

Harris SA and Rojas AG. The initiation of ventricular fibrillation due to coronary occlusion. *Exp med surg* 1943;1:105.

Heldman AW and Hare JM. Cell therapy for myocardial infarction: Special delivery. *J Mol Cell Cardiol* 2008;44(3):473-6.

Hendel RC, Patel MR, Kramer CM *et al.* CCF/ACR/SCCT/SCMR/ASNC/NASCI/SCAI/SIR. Appropriateness Criteria for Cardiac Computed Tomography and Cardiac Magnetic Resonance Imaging. *J Am Coll Cardiol* 2006;48(7):1476-1495.

Hicok KC, Du Laney TV, Zhou YS *et al.* Human adipose-derived adult stem cells produce osteoid in vivo. *Tissue Eng* 2004;10:371-380.

Hosoda T, Kajstura J, Leri A *et al.* Mechanisms of myocardial regeneration. *Circ J* 2010;74:13-17.

Hou D, Youssef EA, Brinton TJ *et al.* Radiolabeled cell distribution after intramyocardial, intracoronary and interstitial retrograde coronary venous delivery. *Circulation* 2005;112(I):I150-6.

Huang SY, Lin JU, En-Chung L. Effects of Birth Season, Breed, Sex, and Sire Family on Cardiac Morphology Determined in Pigs (*Sus scrofa domestica*) by Use of Echocardiography. *Comp Med* 2001;51:545-549.

Huang Z, Ge J, Sun A *et al.* Ligating LAD with its whole length rather than diagonal branches as coordinates is more advisable in establishing stable myocardial infarction model of swine. *Exp Anim* 2010;59(4):431-439.

Huerta Millán C, Villazón D, Azevedo Corona A, *et al.* Ventilación mecánica selectiva (a un pulmón) y manejo anestésico en cirugía toracoscópica videoasistida. Asociación Mexicana de Cirugía Endoscópica, AC. 2001;2(2):87-96.

Hughes HC. Swine in Cardiovasc Res. *Lab Anim Sci* 1986;36(4):348-350.

Hundley WG, Bluemke DA, Finn JP *et al.* ACCF/ACR/AHA/NASCI/SCMR 2010 Expert consensus Document on Cardiovascular Magnetic Resonance A report of the American College of Cardiology. Foundation Task Force on Expert Consensus Documents. *J Am Coll Cardiol* 2010;55(23):2614-62.

Hung QL, Hoshino K, Pomerantseva I *et al.* In vivo myocardial distribution of multipotent progenitor cells following intracoronary delivery in a swine model of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2009;30:2861-2868.

Informe de la Sociedad Española de Cardiología, 2013. Disponible en: <http://www.secardiologia.es/actualidad/notas-de-prensa/3479-las-enfermedades-cardiovasculares-siguen-siendo-la-principal-causa-de-muerte-en-espana>. Acceso el 14 de mayo 2015.

Ivanova NB, Dimos JT, Schaniel C *et al.* A Stem Cell Molecular Signature. *Science* 2002;298(5593):601-604.

Jaffe AS and Ordonez-Llanos J. Troponina cardiaca ultrasensible: de la teoría a la práctica clínica. *Rev Esp Cardiol* 2013;66(9):687-91.

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL *et al.* Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult bone marrow. *Nature* 2002; 418: 41-49.

Joggerst SJ and Hatzopoulos AK. Stem cell therapy for cardiac repair: benefits and barriers. *Exp Rev Mol Med* 2009;11:e20.

Johnston PV, Sasano T, Mills K *et al.* Engraftment, differentiation, and functional benefits of autologous cardiosphere-derived cells in porcine ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 2009;120:1075–1083.

Kang S, Yang YJ, Li CJ *et al.* Effects of intracoronary autologous bone marrow cells on left ventricular function in acute myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis for randomized controlled trials. *Coron Artery Dis* 2008;19:327-335.

Karantalis V, Balkan W, Schulman IH *et al.* Cell-based therapy for prevention and reversal of myocardial remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012;303:H256–H270.

Kaufman L, Crooks LE, Sheldon PE *et al.* Evaluation of NMR imaging for detection and quantification of obstruction in vessels. *Invest Radiol* 1982; 17: 554-560.

Kawaguchi O, Huang Y, Yuasa T *et al.* Improved efficiency of energy transfer to external work in chronic cardiomyoplasty based on the pressure–volume relationship. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998; 115:1358-1366.

Kelley KW, Curtis SE, Marzan GT, *et al.* Body surface area of female swine. *J Anim Sci* 1973; 36(5):927-930.

Kin H, Zhao ZQ, Sun HY *et al.* Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion. *Cardiovasc Res* 2004;62:74-85.

Klocke R. Surgical animal models of heart failure related to coronary heart disease. *Cardiovasc Res* 2007;74:29–38.

Kloner RA, Ganote HE *et al.* Effect of a Transient of ischemia on Myocardial Cells. *Am J Pathol* 1974;74:399-414.

Kolettis TM, Kazakos N, Katsouras CS *et al.* Intrapericardial drug delivery: pharmacologic properties and long-term safety in swine. *Int J Cardiol* 2005;99:415–421.

Kraitchman DL, Bluemke DA, Chin BB *et al.* A minimally invasive method for creating coronary stenosis in a swine model for MRI and SPECT imaging. *Invest Radiol* 2000;35:445-51.

Kraitchman DL, Gilson WD, Lorenz CH *et al.* Stem cell therapy: MRI guidance and monitoring. *J Magn Reson Imaging* 2008;27:299-310.

Kraitchman DL, Heldman AW, Atalar E *et al.* In vivo Magnetic Resonance imaging of mesenchymal stem cells in myocardial infarction. *Circulation* 2003;107:290-3.

Krijnen PA, Nijmeijer R, Meijer CJ *et al.* Apoptosis in myocardial ischemia and infarction. *J Clin Pathol* 2002;55(11):801-11.

Krombach GA, Kinzel S, Mahnken AH *et al.* Minimally Invasive close chest method for creating reperfused or occlusive myocardial infarction in swine. *Invest Radiol* 2005;40(1):14-8.

Kwong RY, Schussheim EA, Rekhraj *et al.* Detecting acute coronary syndrome in the emergency department with cardiac magnetic resonance imaging. *Circulation* 2003;107:531-7.

Ladage D, Turnbull IC, Ishikawa *et al.* Delivery of gelfoam-enabled cells and vectors into pericardial space using a percutaneous approach in a porcine model. *Gene Ther* 2011;18(10):979-985.

Lahera V y Garrido C. Sistema cardiovascular. En: Tresguerres JAF, Villanúa MA, López-Calderón A. Anatomía y fisiología del cuerpo humano. McGrawHill 2009. Pp:111-143.

Landau C, Jacobs Ak and Haudenschild CC. Intrapericardial basic fibroblast growth factor induces myocardial angiogenesis in a rabbit model of chronic ischemia. *Am Heart J* 1995;129:924-31.

Lang RM, Bierig M, Devereux RB *et al.* Recommendations for chamber quantification. *Eur J Echocardiography* 2006;7:79e108.

Lee ST, White AJ, Matsushita S *et al.* Intramyocardial injection of autologous cardiospheres or cardiosphere-derived cells preserves function and minimizes adverse ventricular remodeling in pigs with heart failure post-myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2011;57:455-465.

Li X, Pan X, Zhang C, Zhu D, Zhao J. Video-assisted thoracoscopic sleeve lobectomy. *J Thorac Dis* 2014;6(9):1351-3.

Litwin SH, Katz SE, Morgan JP *et al.* Serial Echocardiographic Assessment of left Ventricular Geometry and Function After large Myocardial Infarction in the rat. *Circulation* 1994;89:345-354.

Llaneras MR, Nance ML, Streicher JT *et al.* Large animal model of ischemic mitral regurgitation. *Ann Thorac Surg* 1994;57:432-9.

Llano R, Epstein S, Zhou R *et al.* Intracoronary delivery of mesenchymal stem cells at high flow after myocardial infarction improves distal coronary blood flow and decreases mortality in pigs. *Catheter Cardiovasc Interv* 2009; 73: 251-257.

Maisch B, Ristic A, Pankuweit S *et al.* Intrapericardial treatment of autoreactive pericardial effusion with triamcinolone. The way to avoid side effects of systemic corticosteroid therapy. *Eur Heart J* 2002;23:1503-1508.

Makkar RR, Smith RR, Cheng K *et al.* Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomized phase 1 trial. *Lancet* 2012;379:895-904.

Marín F, Díaz-Castro O, Ruiz-Nodar JM *et al.* Actualización en cardiopatía isquémica y cuidados críticos cardiológicos. *Rev Esp Cardiol* 2014;67(2):120-126.

Matsubara H. Risk to the coronary arteries of intracoronary stem cell infusion a G-CSF cytokine therapy. *Lancet* 2010;363:752-783.

Mazhari R and Hare JM. Translational Findings from Cardiovascular Stem Cell Research. *Trends Cardiovasc Med* 2012;22(1):1-6.

McCall FC, Telukuntla KS, Karantalis V *et al.* Myocardial infarction and intramyocardial injection models in swine. *Nat Protoc* 2012;7(8):1479-96.

Miettinen JA, Ylitalo K, Hedberg P *et al.* Effects of intracoronary injection of autologous bone marrow-derived stem cells on natriuretic peptides and inflammatory markers in patients with acute ST-elevation myocardial infarction. *Clin Res Cardiol* 2011;100(4):317-25.

Mignone JL, Kreutziger KL, Paige SL *et al.* Cardiogenesis from human embryonic stem cells. *Circ J* 2010;74(12):2517-26.

Miller RD, Eriksson LI, Fleisher LA *et al.* Wilson WC and Benumof JL. Chapter 66. Anesthesia for thoracic surgery. En *Miller's Anesthesia*. 2009. 7th Edition: Expert Consult Premium Edition.

Miranville A, Heeschen C, Sengenès C *et al.* Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation* 2004;110:349-355.

Moelker AD, Baks T, van den Bos EJ *et al.* Reduction in infarct size, but no functional improvement after bone marrow cell administration in a porcine model of reperfused myocardial infarction. *Eur Heart J* 2006;27:3057-3064.

Monnet E. Interventional Thoracoscopy in small animals. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 2009;39:965-975.

Moscoso I, Barallobre J, de Ilarduya *et al.* Analysis of different routes of administration of heterologous 5-Azacytidine-Treated Mesenchymal Stem Cells in a porcine model of myocardial infarct. *Transplant Proc* 2009;41:2273-2275.

Murry CE, Jennings RB and Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cells injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74:1124-36.

O'Brien PJ, Dameron GW, Beck ML *et al.* Cardiac troponin T is a sensitive, specific biomarker of cardiac injury in laboratory animals. *Lab Anim Sci* 1997;47:486-495.

Olivé JB. Anesthesia-related complications in laparoscopic surgery. *Rev Cub Anest Rea* 2013;12.

Ostadal B. The past, the present and the future of experimental research on myocardial ischemia and protection. *Pharmacol Rep* 2009;61:3-12.

Pérez de Prado A, Cuellas-Ramón JC, Regueiro-Purriños M *et al.* Closed-chest experimental porcine model of acute myocardial infarction-reperfusion. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2009;60:301-306.

Pérez de Prado A, Fernández-Vázquez F, Cuellas-Ramón JC *et al.* Coronariografía: más allá de la anatomía coronaria. *Rev Esp Cardiol* 2006;59(6):596-608.

Perin EC and Silva GV. Autologous cell-based therapy for ischaemic heart disease: clinical evidence, proposed mechanisms of action, and current limitation. *Catheter Cardiovasc Interv* 2009;73:281-288.

Perin EC, Dohmann HFR, Borojevic R *et al.* Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation* 2003;107:2294-2302.

Perin EC, Silva GV, Assad JAR *et al.* Comparison of intracoronary and transendocardial delivery of allogeneic mesenchymal stem cells in a canine model of acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2008;44:486-495.

Perin EC, Tian M, Marini FC *et al.* Imaging long-term fate of intramyocardially implanted mesenchymal stem cells in a porcine myocardial infarction model. *PLoS ONE* 2011;6(9):e22949.

Perin EC, Sanz-Ruiz R, Sánchez PL *et al.* Adipose-derived regenerative cells in patients with ischemic cardiomyopathy: The PRECISE Trial. *Am Heart J* 2014;168(1):88-95.

Pfeffer MA and Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* 1990;81(4):1161-72.

Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC *et al.* Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res* 1979; 44:503-512.

Pittenger MF and Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as Cardiac Therapeutics. *Cir Res* 2004;95:9-20.

Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B *et al.* Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 2004;109(5):656-663.

Poncelet AJ, Hiel AL, Vercruyse J *et al.* Intracardiac allogeneic mesenchymal stem cell transplantation elicits neo-angiogenesis in a fully immunocompetent ischaemic swine model. *Eur J Cardiothorac Surg* 2010;38(6):781-7.

Pons Lladó G, Carreras Costa F, Castro Beiras A *et al.* Guías de práctica clínica de la sociedad Española de Cardiología en resonancia magnética. *Rev Esp Cardiol* 2000; 53: 542-559.

Prósper F, Gavira JJ, Herreros J *et al.* Trasplante celular y terapia regenerativa con células madre. *An Sist Sanit Navar* 2006;29(2):219-234.

Puissant B, Barreau C, Bourin P *et al.* Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: Comparison with bone marrow-mesenchymal stem cells. *Br J Haematol* 2005;129:118-29.

Regueiro-Purriños M, Fernández Vázquez F, Pérez de Prado A *et al.* Ventricular Arrhythmias and mortality associated with isofluorane and sevofluorane in a porcine model of myocardial infarction. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2011;50(1):73-78.

Rodrigues M, Silva AC, Aguas AP *et al.* The coronary circulation of the pig heart. Comparison with the human heart. *Eur J Anat* 2005;9(2):67-87.

Ruiz-Meana M y García-Dorado D. Fisiopatología del daño miocárdico por isquemia-reperusión: nuevas oportunidades terapéuticas en el infarto agudo de miocardio. *Rev Esp Cardiol* 2009;62(2):199-209.

Rupp H, Rupp TP, Alter P *et al.* Intrapericardial proceures for cardiac regeneration by stem cells. *Herz* 2010;35:458-466.

Rutenberg MS, Hamazaki T, Singh AM *et al.* Stem cell plasticity, beyond alchemy. *Int J Hematol* 2004;79(1):15-21.

Sabbah HN, Stein PD, Kono T *et al.* A canine model of chronic heart failure produced by multiple sequential coronary microembolizations. *Am J Physiol* 1991;260(4):H1379-84.

Safford KM, Hicok KC, Safford SD *et al.* Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;294:371-379.

Salazah AE. Experimental myocardial infarction. Induction of coronary thrombosis in the intact closed-chest dog. *Cir Res* 1961;9:1351-6.

San Román JA, Candell-Riera J, Arnod R *et al.* Análisis cuantitativo de la función ventricular izquierda como herramienta para la investigación clínica. Fundamentos y metodología. *Rev Esp Cardiol* 2009;62(5):535-51.

Sánchez-Margallo FM, Díaz-Güemes I, Pérez FJ *et al.* Preliminary results with a training program for thoracoscopic atrial fibrillation therapy. *Surg Endosc* 2009;23(8):1882-6.

Sánchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Peláez F *et al.* Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 2000; 164: 247-256.

Sanchís J, Avanzas P, Bayes-Genis A *et al.* Síndromes coronarios agudos: nuevas estrategias de diagnóstico y tratamiento. *Rev Esp Cardiol* 2014;67(2):138.

Sanganalmath SK and Bolli R. Cell therapy for heart failure: a comprehensive overview of experimental and clinical studies, current challenges, and future directions. *Circ Res* 2013;113(6):810-34.

Schächinger V, Erbs S, Elsässer A *et al.* Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006;355(12):1210-1222.

Schiller NB and Foster E. Analysis of left ventricular systolic function. *Heart* 1996;75(2):17-26.

Schuleri KH, Feigenbaum GS, Centola M *et al.* Autologous mesenchymal stem cells produce reverse remodeling in chronic ischaemic cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2009;30:2722-2732.

Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA *et al.* Mesenchymal stem cells implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg* 2002;73:1919-1925.

Silva GV, Litovsky S, Assad JAR *et al.* Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, Enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation* 2005;111:150-156.

Skinner JE and Reed JC. Blockade of frontocortical-brain stem pathway prevents ventricular fibrillation of ischemic heart. *Am J Physiol* 1981;240(2):H156-63.

Sousonis V, Malliaras K, Terrovitis J *et al.* Cells therapy in cardiovascular diseases. En: Cokkinos DV. Introduction to translational Cardiovasc Res. Springer Science. International Publishing Switzerland 2015. Pp:565-583.

Spodick DH. Intrapericardial therapeutics and diagnostics. *Am J Cardiol* 2000;85(8):1012-1014.

Sun F, Sánchez FM, Crisóstomo V *et al.* Subxiphoid access to normal pericardium with micropuncture set: technical feasibility study in pigs. *Radiology* 2006;238(2):719-724.

Sun F, Sánchez FM, Fernández-Portales J *et al.* Chronic intrapericardial catheterization for repeated drug delivery: technical feasibility study in the Göttingen minipig. *J Invasive Cardiol* 2012;24(5):210-4.

Suzuki Y, Lyons JK, Yeung AC *et al.* In vivo porcine model of reperfused myocardial infarction: in situ double staining to measure precise infarct area/area at risk. *Catheter Cardiovasc Interv* 2008;71(1):100-107.

Suzuki Y, Yeung AC and Ikeno F. The representative porcine model for human cardiovascular disease. *J Biomed Biotechnol* 2011. Article ID 195483. 10 pages.

Swindle MM. Swine in the laboratory. Surgery, Anesthesia, Imaging, and Experimental Techniques. Second Edition. 2007 by Taylor and Francis Group.

Tang XL, Rokosh G, Sanganalmath SK *et al.* Intracoronary administration of cardiac progenitor cells alleviates left ventricular dysfunction in rats with a 30-day-old infarction. *Circulation* 2010;121(2):293-305.

Tennant R and Wiggers CJ. The effect of coronary occlusion on myocardial infarction. *Am J Physiol* 1935;112:351.

Thompson RB, Parsa CJ, van den Bos EJ *et al.* Video-assisted thoracoscopic transplantation of myoblasts into the heart. *Ann Thorac Surg* 2004;78:303-307.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S.S *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145-1147.

Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS *et al.* The writing group on behalf of the Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task force for the Universal Definition of Myocardial Infarction. Third universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2012;33:2551-2567.

Thygesen K, Mair J, Katus H. Recommendations for the use of cardiac troponin measurement in acute cardiac care. *Eur Heart J* 2010. doi:10.1093/eurheartj/ehq251.

Toma C, Pittinguer MF, Albo C *et al.* Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002;105:93-8.

Tomita S, Li RK, Weisel RD *et al.* Autologous transplantation of bone marrow cells improves damage heart function. *Circulation* 1999;100(supl.II):II247-II256.

Torrent-Guas F. Estructura y función del corazón. *Rev Esp Cardiol* 1998;51:91-102.

Tuma J, Fernández-Viña R, Carrasco A *et al.* *J Transl Med* 2011;9:183-89.

Valina C, Pinkernell K, Song Y *et al.* Intracoronary administration of autologous adipose tissue-derived stem cells improves left ventricular function, perfusion and remodeling after acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2007;28:2667-2677.

van der Spoel TIG, Jansen of Lockeers SJ, Agostoni P *et al.* Human relevance of pre-clinical studies in stem cell therapy: systematic review and meta-analysis of large animal models of ischaemic heart disease. *Cardiovasc Res* 2011;91:649-658.

Verrier RL, Waxman S, Lovett EG *et al.* Transatrial access to the normal pericardial space. A novel approach for diagnostic sampling, pericardiocentesis and therapeutic interventions. *Circulation* 1998;98:2331-2333.

Vilahur G, Juan-Babot O, Peña E *et al.* Molecular and cellular mechanisms involved in cardiac remodeling after acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2001;50:522-533.

Vulliet PR, Greeley M, Halloran M *et al.* Intra-coronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs. *Lancet* 2004;363(9411):783-784.

Wagers AJ and Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell* 2004; 116(5):639-48.

Walsh PJ, Remedios AM, Ferguson J *et al.* Thoracoscopic versus open partial pericardiectomy in dogs: comparison of postoperative pain and morbidity. *Veter Surg* 1999;28:472-479.

Wang D, Jin Y, Ding C *et al.* Intracoronary delivery of mesenchymal stem cells reduces proarrhythmic risks in swine with myocardial infarction. *Ir J Med Sci* 2011;180(2):379-385.

Watt FM and Hogan BL. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* 2000;287:1427-1430.

Waxman S, Pulerwitz TC, Rowe KA *et al.* Preclinical safety testing of percutaneous transatrial access to the normal pericardial space for local cardiac drug delivery and diagnostic sampling. *Catheter Cardiovasc Interv* 2000;49:472-477.

Welch TD, Yang EH, Reeder GS *et al.* Modern Management of Acute Myocardial Infarction. *Curr Probl Cardiol* 2012;37:237-310.

Williams AR, Hatzistergos KE, Addicott B *et al.* Enhanced effect of combining human cardiac stem cells and bone marrow mesenchymal stem cells to reduce infarct size and restore cardiac function after myocardial infarction. *Circulation* 2013;127:213-223.

Williams AR, Suncion VY, McCall F *et al.* Durable scar size reduction due to allogeneic mesenchymal stem cell therapy regulates whole-chamber remodeling. *J Am Heart Assoc* 2013;2(3):e000140.

Wu GD, Nolte JA *et al.* Migration of Mesenchymal Stem Cells to heart allografts During Chronic Rejection. *Transplantation* 2003;75(5):679-85.

Wu J, Okamura D, Li M *et al.* An alternative pluripotent state confers interspecies chimaeric competency. *Nature* 2015;521(7552):316-21.

Ytrehus K. The ischemic heart- Experimental Model. *Pharmacol Res* 2000;42(3):193-203.

Zakharova L, Mastroeni D, Mutlu N *et al.* Transplantation of cardiac progenitor cell sheet onto infarcted heart promotes cardiogenesis and improves function. *Cardiovasc Res* 2010;87(1):40-9.

Zacharowski K, Otto M, Hafner G *et al.* Reduction of myocardial infarct size with sCR1sLex, an alternatively glycosylated form of human soluble complement receptor type 1 (sCR1), possessing sialyl Lewis x.Br. *J Pharmacol* 1999;128:945-952.

Zhang H, Song P, Tang Y *et al.* Injection of bone marrow mesenchymal stem cells in the borderline area of infarcted myocardium Heart Status and cells distribution. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007;134:1234-40.

Zhang J, Wilke N, Wang Y *et al.* Functional and bioenergetic consequences of postinfarction left ventricular remodeling in a new porcine model. *Circulation* 1996;94:1089-1100.

Zhang Y, Sievers RE, Prasad M *et al.* Timing of bone marrow cell therapy is more important than repeated injections after myocardial infarction. *Cardiovasc Pathol* 2011;20:204-212.

Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME *et al.* Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285(2):H579-88.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P *et al.* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002;13:4279-4295.

ANEXO 1

1.- Estudio de funcionalidad cardiaca por resonancia magnética

1.a.- Grupo intracoronaria

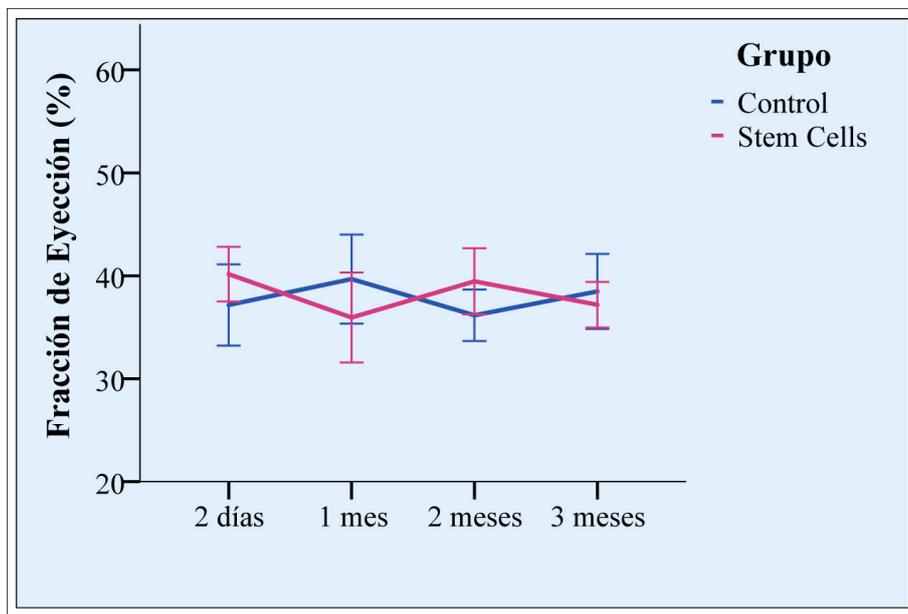


Gráfico 1.- Evolución de la fracción de eyección (FE).

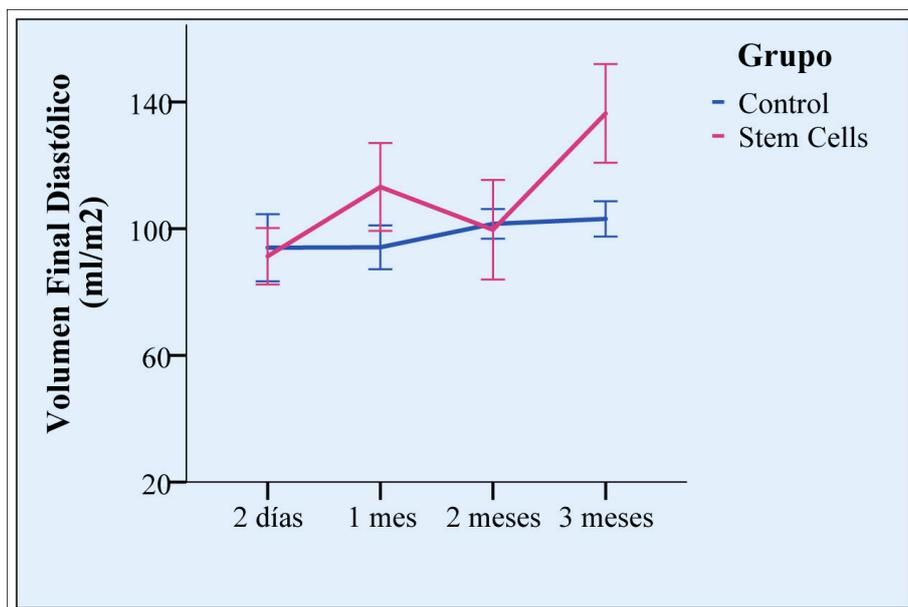


Gráfico 2.- Media del volumen final diastólico indexado (VFD_i).

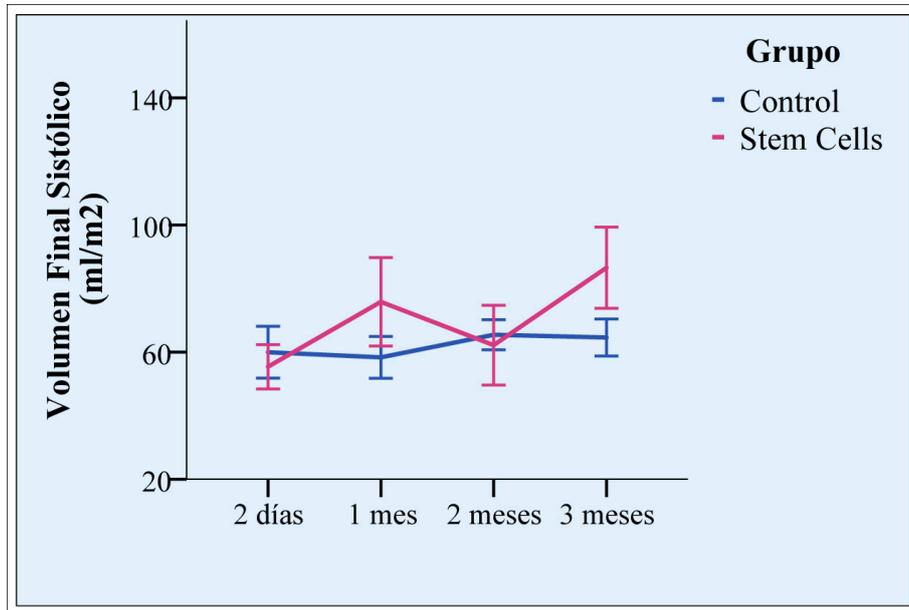


Gráfico 3.- Volumen final sistólico indexado (VFS_i).

1.b.- Grupo intrapericárdica

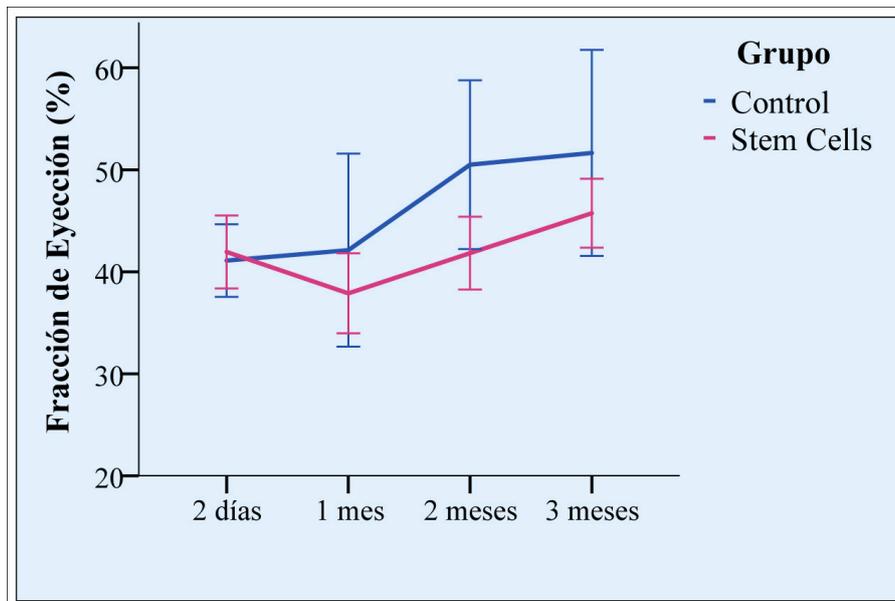


Gráfico 4.- Evolución de la fracción de eyección.

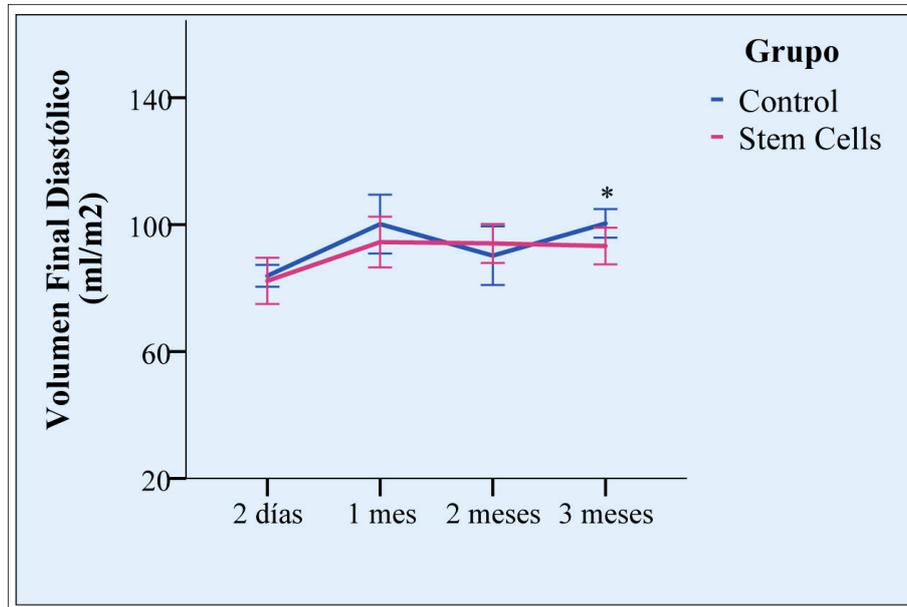


Gráfico 5.- Evolución del volumen final diastólico indexado (VFD).

* Indica diferencias estadísticamente significativas entre las fases 3 meses y 2 días, en el grupo control.

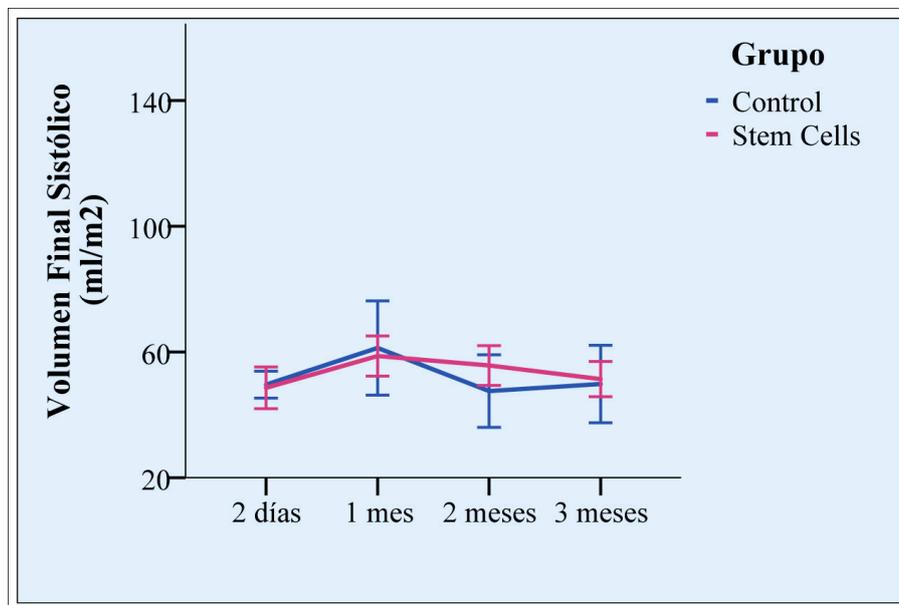


Gráfico 6.- Evolución del volumen final sistólico indexado (VFS).

1.c.- Grupo intramiocárdica

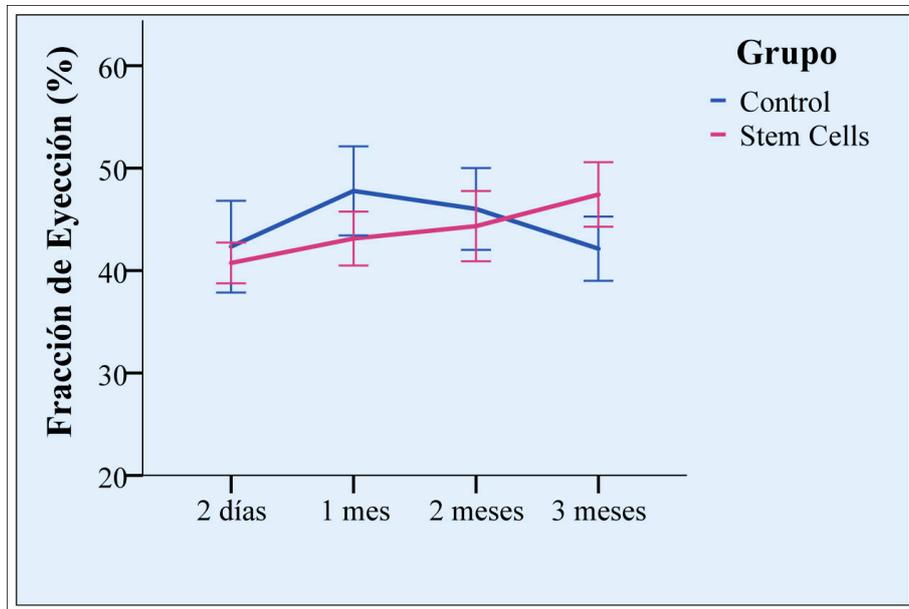


Gráfico 7.- Evolución de la fracción de eyección (FE).

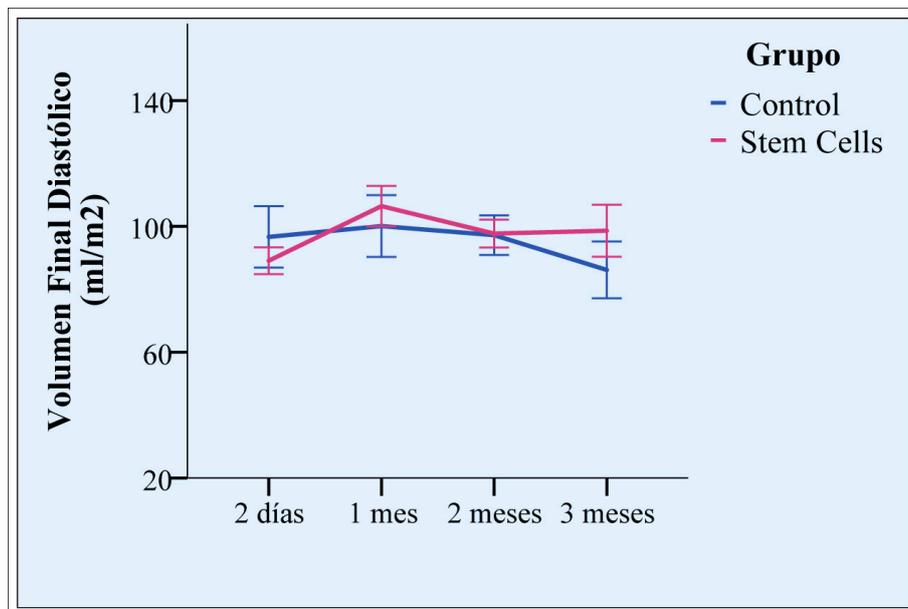


Gráfico 8.- Evolución del volumen final sistólico indexado (VFD_i).

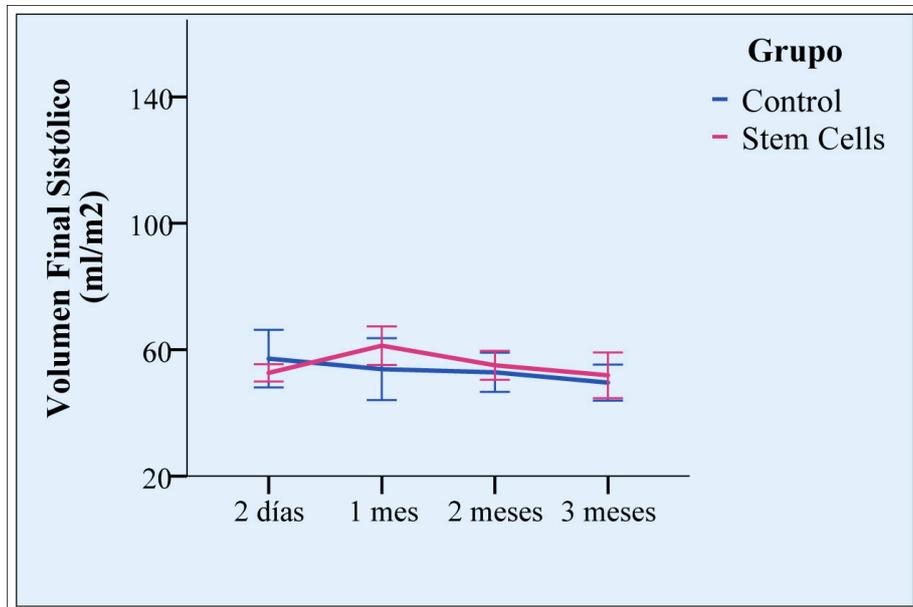


Gráfico 9.- Evolución del volumen final sistólico indexado (VFS_i).

1.d.- Estudio comparativo grupos tratados con MSC

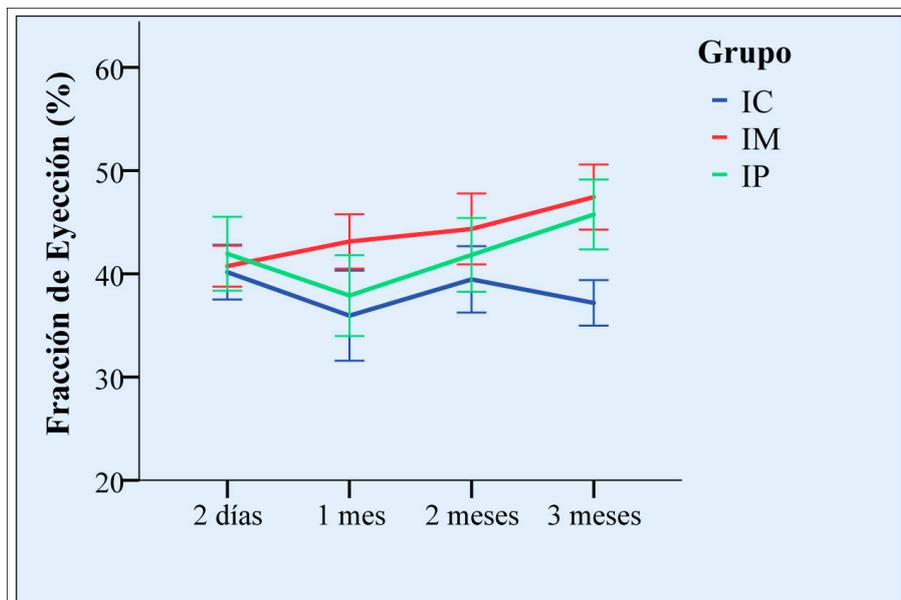


Gráfico 10.- Evolución de la fracción de eyección (FE).

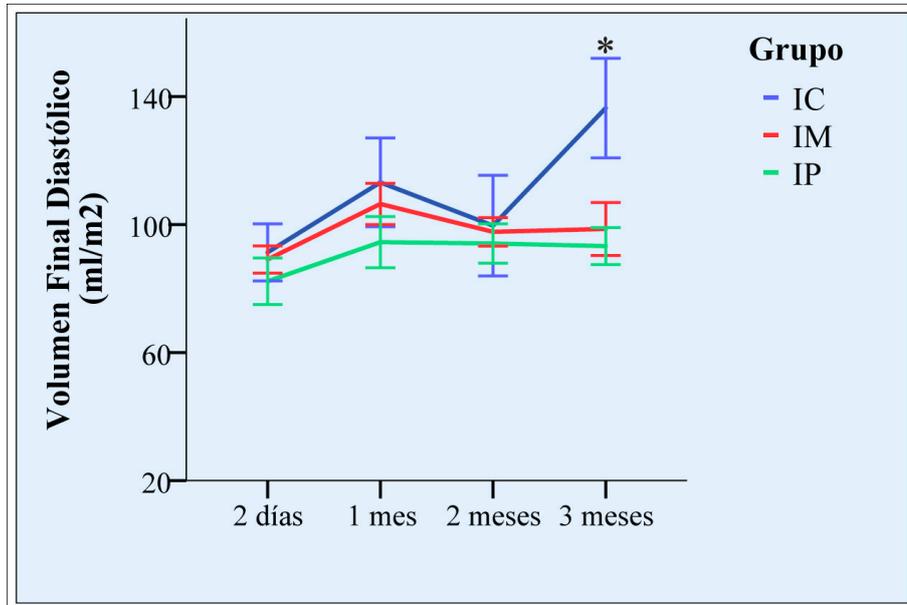


Gráfico 11.- Evolución del volumen final diastólico indexado (VFD_i).

*Indica diferencias estadísticamente significativas entre los grupos I y II y entre los grupos I y III.

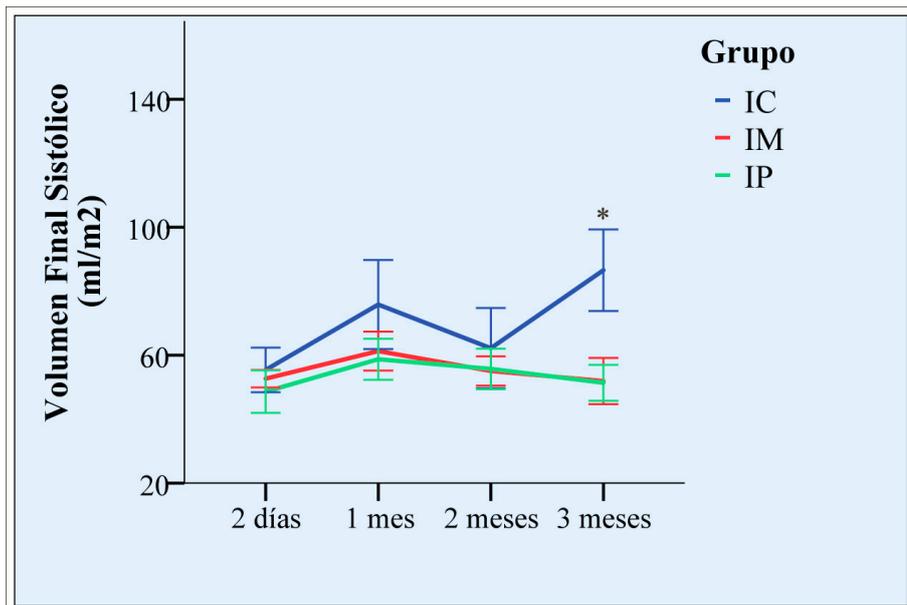


Gráfico 12.- Evolución del volumen final sistólico indexado (VFS_i).

*Indica diferencias estadísticamente significativas entre los grupos I y II y entre los grupos I y III.

ANEXO 2

2.- Estudio de funcionalidad cardiaca por ecocardiografía

2.a.- Vía intracoronaria

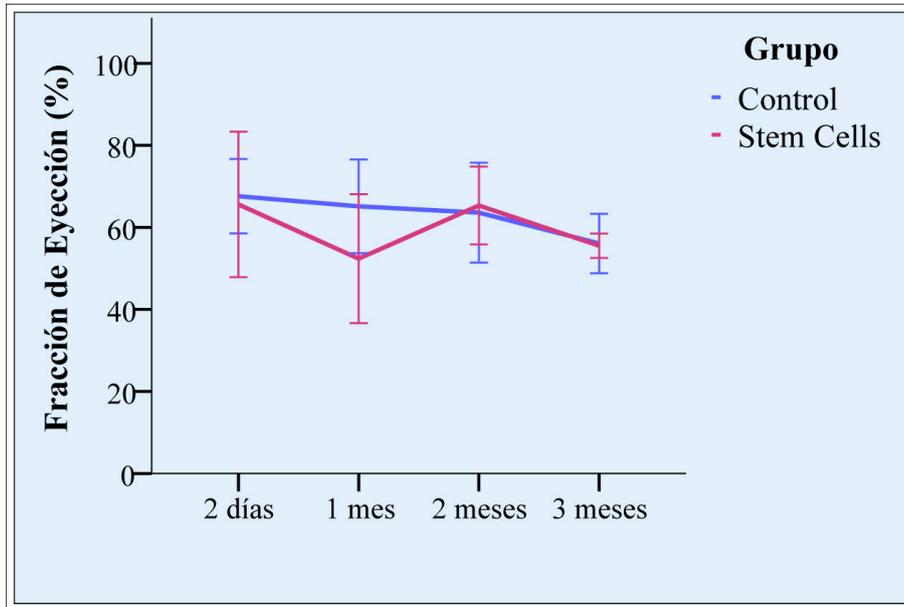


Gráfico 1.- Evolución de la fracción de eyección (FE).

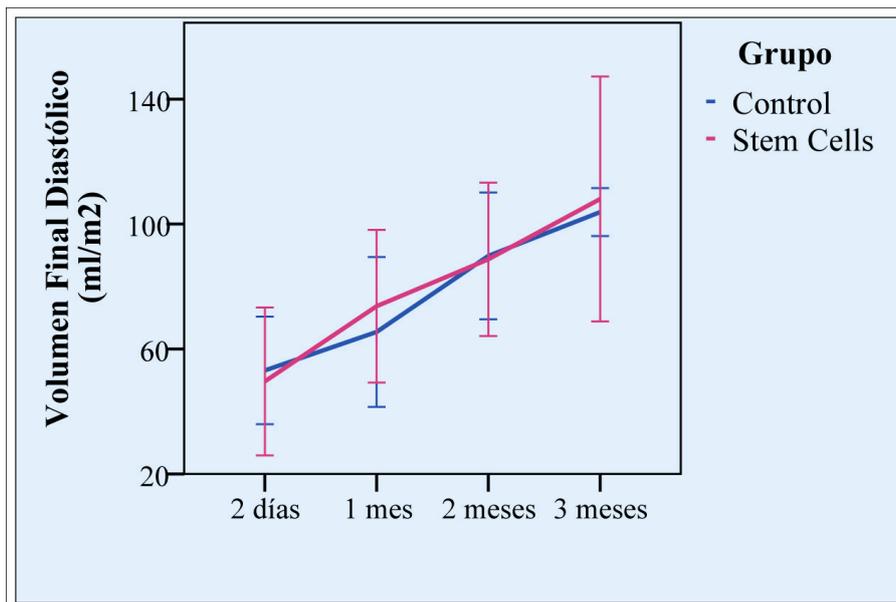


Gráfico 2.- Media del volumen final diastólico indexado (VFD).

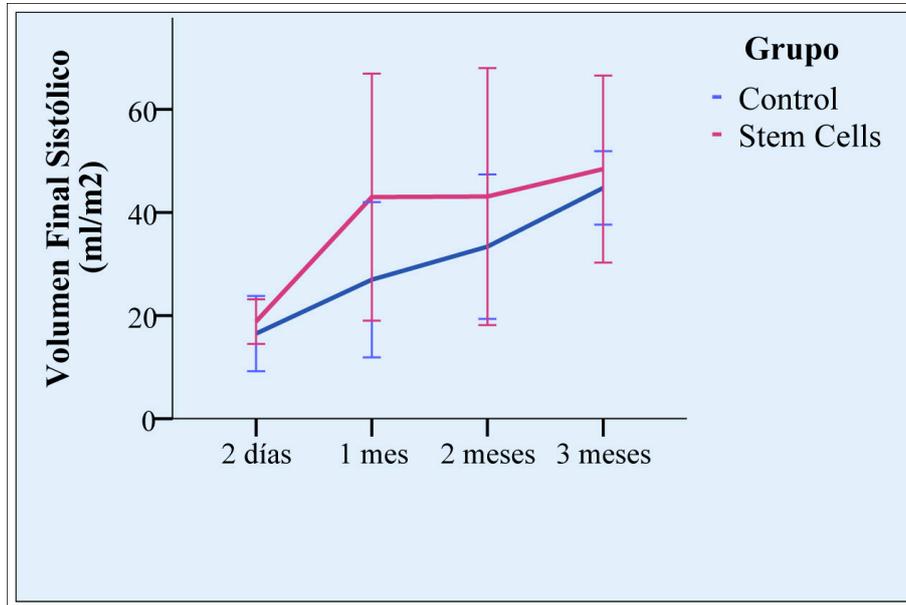


Gráfico 3.- Media del volumen final sistólico indexado (VFS_i).

2.b.- Vía intrapericárdica

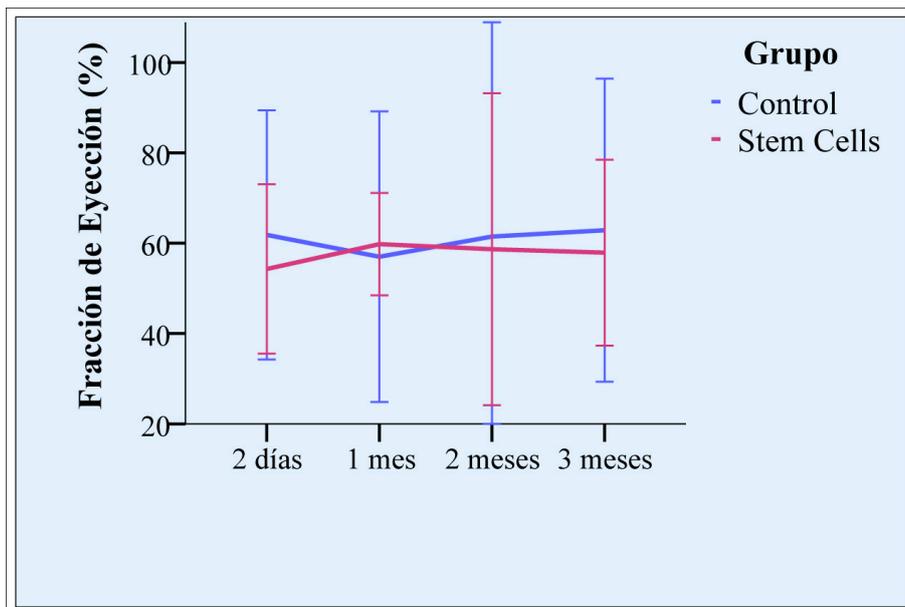


Gráfico 4.- Evolución de la fracción de eyección (FE).

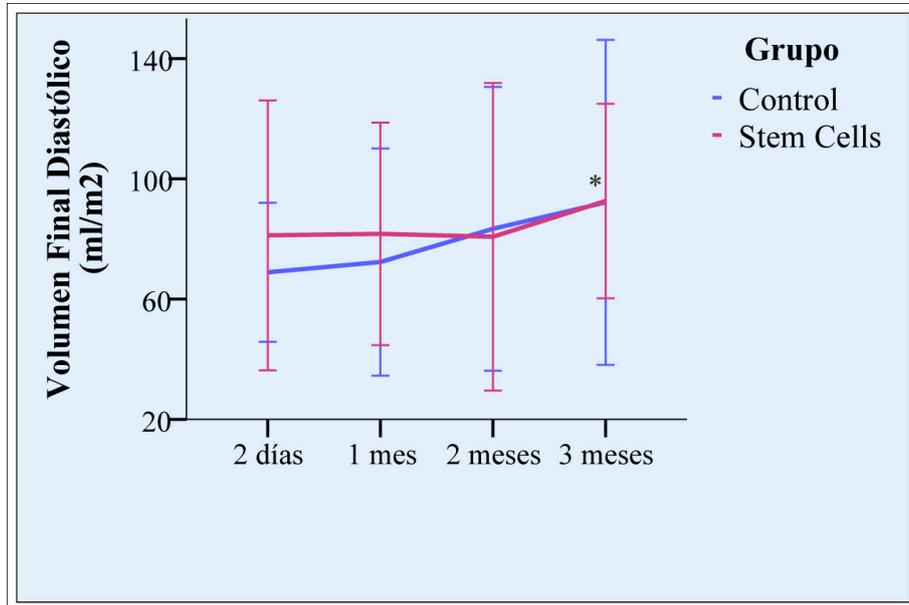


Gráfico 5.- Media del volumen final diastólico indexado (VFD_i).

* Indica diferencias estadísticamente significativas entre las fases 3 meses y 2 días, en el grupo tratado con MSC.

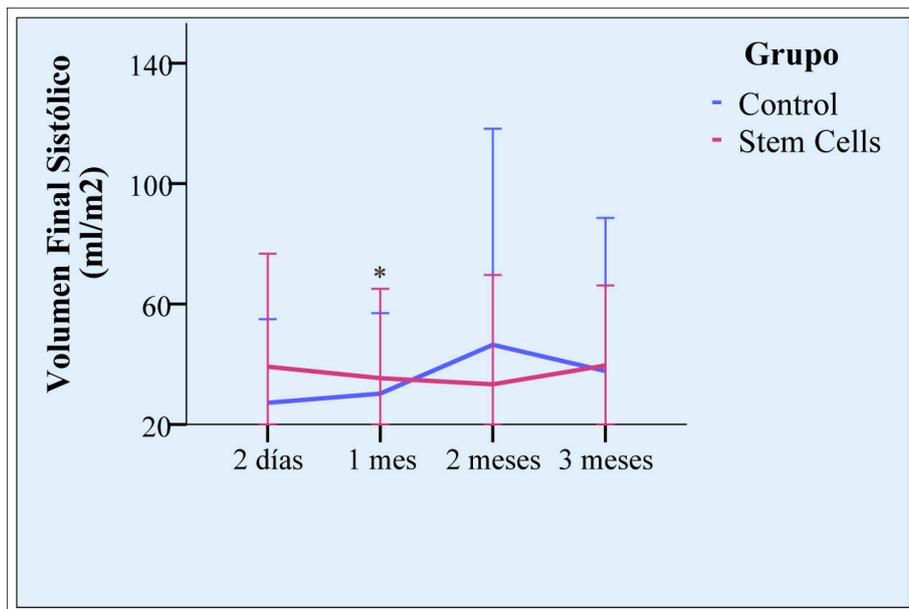


Gráfico 6.- Media del volumen final sistólico indexado (VFS_i).

* Indica diferencias estadísticamente significativas entre las fases 1 mes y 2 días, en el grupo control.

2.c.- Vía intramiocárdica

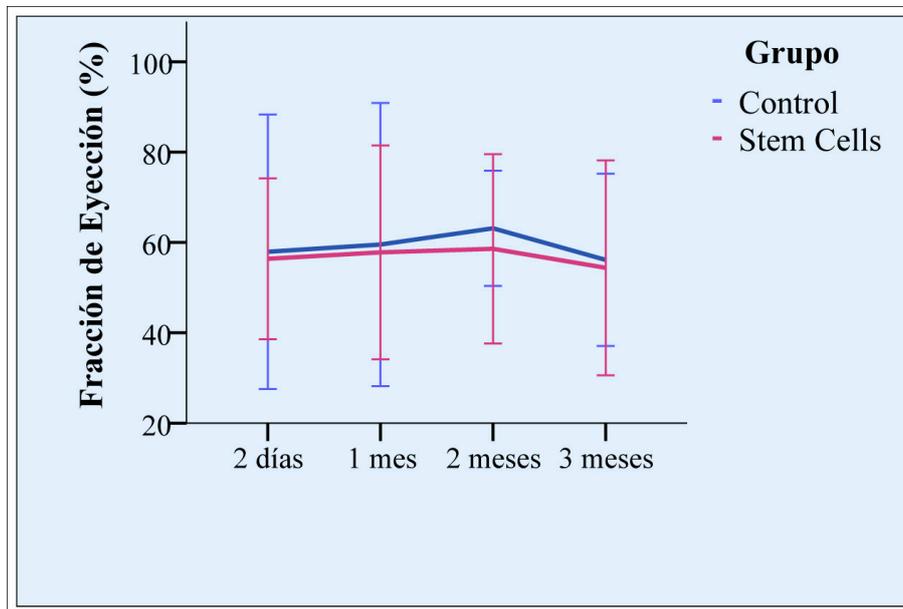


Gráfico 7.- Evolución de la fracción de eyección (FE).

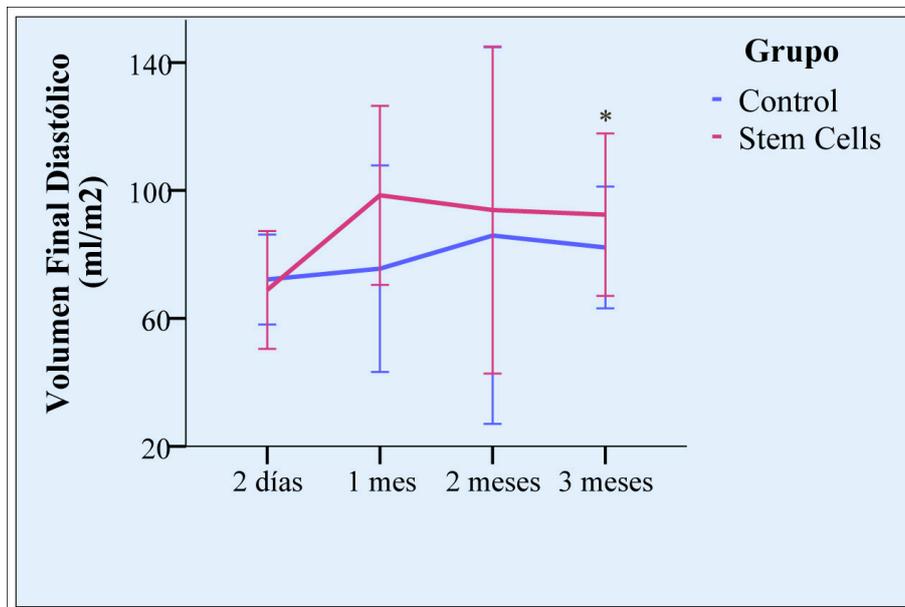


Gráfico 8.- Media del volumen final sistólico indexado (VFD_i).

* Indica diferencias estadísticamente significativas entre las fases 3 meses y 2 días, en el grupo tratado con células.

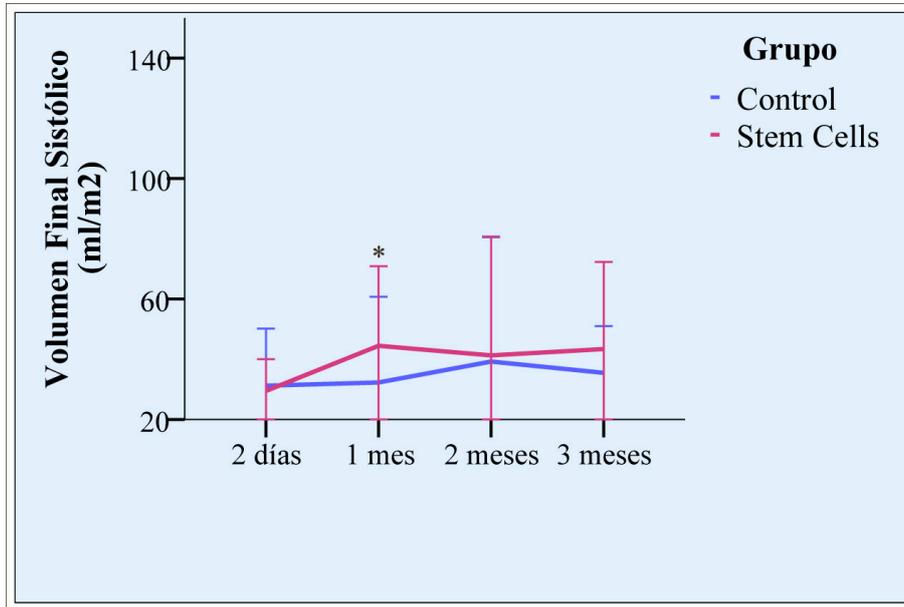


Gráfico 9.- Evolución del volumen final sistólico indexado (VFS).

* Indica diferencias estadísticamente significativas entre las fases 2 días y 1 mes, en el grupo tratado con células.

2.d.- Estudio comparativo grupos tratados con MSC

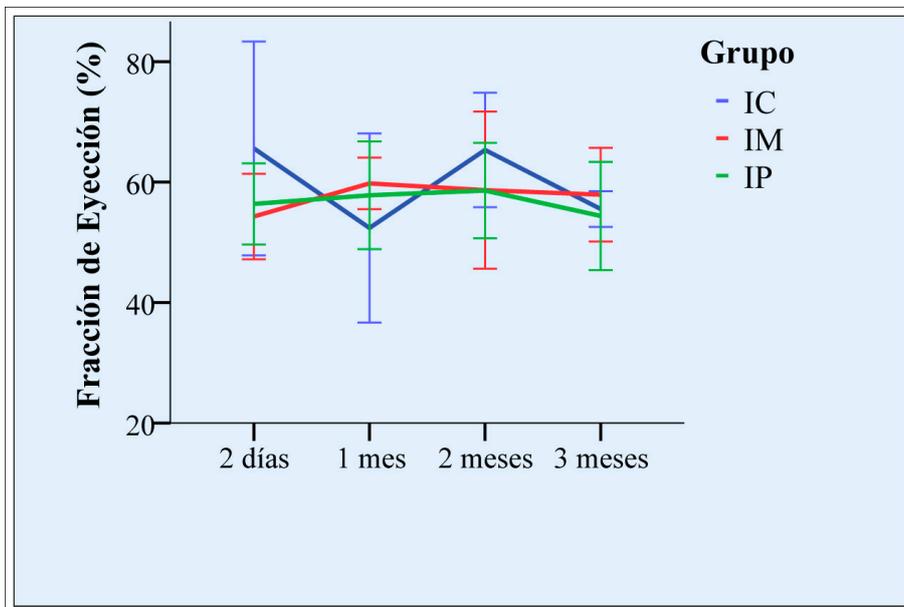


Gráfico 10.- Evolución de la fracción de eyeción (FE).

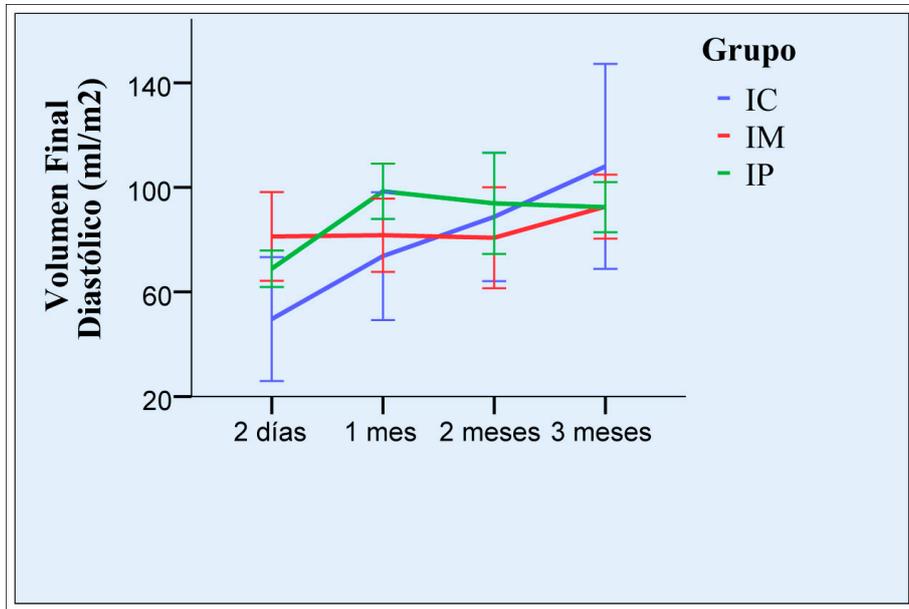


Gráfico 11.- Media del volumen final diastólico indexado (VFD_i).

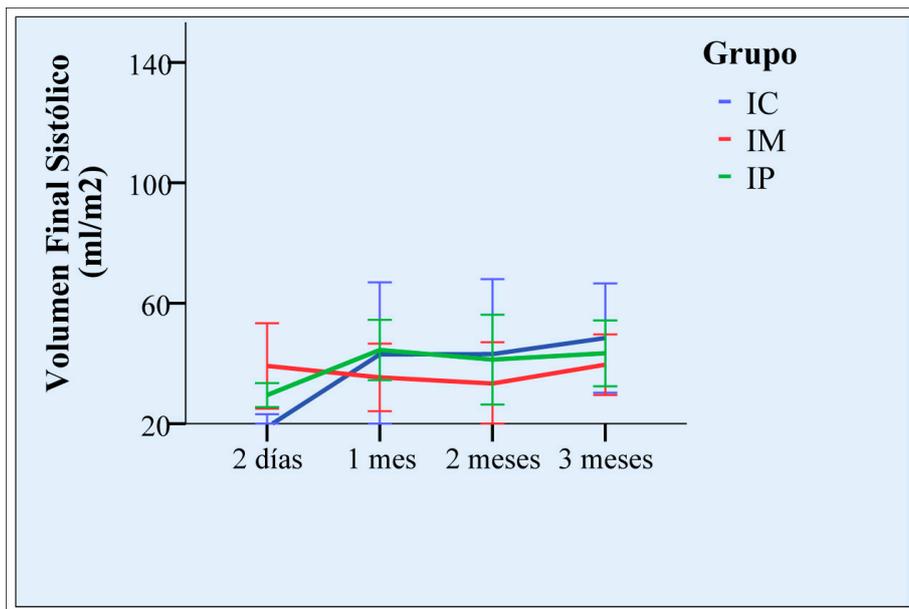


Gráfico 12.- Evolución del volumen final sistólico indexado (VFS_i).

Trabajos más relevantes del doctorando relacionados con la temática de la Tesis Doctoral

Formación

Executive Master en Innovación. INNCORPORA. Organizado por la Escuela de Organización Industrial y el Ministerio de Economía y Competitividad. Realizado del 3 de septiembre al 7 de diciembre de 2012.

Ayuda INNCORPORA

Ayuda del Ministerio de Ciencia e Innovación para la incorporación de personal investigador (2011-2013) asociada al proyecto de Tesis Doctoral titulado: *estudio de viabilidad y eficacia de diferentes vías de inoculación de células madre multipotenciales en la regeneración del infarto agudo de miocardio en modelo experimental porcino*, inscrita en el Departamento de Medicina Animal de la UEx. Programa: Medicina y Cirugía Canina y Felina.

Diploma de Estudios Avanzados (DEA)

Programa de doctorado (2007-2009): “Medicina y Cirugía canina y felina”. Título: *Creación de un modelo de infarto de miocardio por toracoscopia*. 1 diciembre del 2009. Calificación: sobresaliente.

Artículos Científicos

Moreno-Naranjo B., DVM, Díaz-Güemes I., DVM, PhD, Crisóstomo V., DVM PhD, Maestre J., BSc, Sánchez-Margallo F.M., DVM PhD. “Swine model of acute cardiac infarct: thoracoscopy or open surgery?” Under review.

Comunicaciones a Congresos nacionales e internacionales

Administración intracoronaria de células madre alogénicas en un modelo porcino de infarto agudo de miocardio. Comparación entre dos tipos celulares. Claudia Báez Díaz, Verónica Crisóstomo Ayala, Belén Moreno Naranjo, Juan Maestre Antequera, Javier García Casado, Idoia Díaz- Güemes Martín-Portugués, Itziar Palacios López y Francisco Miguel Sánchez Margallo. Congreso de la SEC. Bilbao, 22-24 de Octubre 2015).

Administration of stem cells for the treatment of myocardial infarction via thoracoscopic. Comparison of three routes. Moreno-Naranjo B, Díaz-Güemes I, Crisóstomo V, García Casado J, Maestre J, Sánchez-Margallo FM. 12th Symposium on stem cell therapy and cardiovascular innovations. Madrid, 28 y 29 de Mayo 2015.

Intracoronary infusion of allogeneic stem cells in a porcine model of acute myocardial infarction. Comparison between two different stem cell types. Claudia Báez Díaz, Verónica Crisóstomo Ayala,

Belén Moreno Naranjo, Juan Maestre Antequera, Javier García Casado, Idoia Díaz- Güemes Martín-Portugués, Itziar Palacios López y Francisco Miguel Sánchez Margallo. 12th Symposium on stem cell therapy and cardiovascular innovations. Madrid, 28 y 29 de Mayo 2015.

Administración de células madre para el tratamiento del infarto de miocardio vía toracoscópica. Comparación de tres vías. Belén Moreno Naranjo, Idoia Díaz-Güemes Martín-Portugués, Verónica Crisóstomo Ayala, Javier García Casado, Fei Sun, Juan Maestre Antequera, Claudia Báez Díaz y Francisco Miguel Sánchez Margallo. Congreso de la Sociedad Española de Cardiología. Póster. 30 de octubre al 1 de noviembre de 2014.

Administration of stem cells for the treatment of myocardial infarction via thoracoscopic. Comparison of three tracks. Belén Moreno Naranjo, Idoia Díaz-Güemes Martín-Portugués, Verónica Crisóstomo Ayala, Javier García Casado, Fei Sun, Juan Maestre Antequera, Claudia Báez Díaz y Francisco Miguel Sánchez Margallo. 26th International Conference of the Society for Medical Innovation and Technology (SMIT). Shanghai (China) from 18-20 September 2014.

Comparison of intrapericardial versus intracoronary delivery of mesenchymal stem cells in a swine model of myocardial infarct. Belén Moreno Naranjo, Idoia Díaz-Güemes Martín-Portugués, Verónica Crisóstomo Ayala, Javier García Casado, Juan Maestre Antequera, Claudia Báez Díaz y Francisco Miguel Sánchez Margallo. ESGCT and SETGyC Collaborative Congress, Madrid, 26-28 de octubre de 2013.

Administración toracoscópica de células madre mesenquimales en el saco pericárdico para el tratamiento del infarto agudo de miocardio. Autores: Belén Moreno-Naranjo, Idoia Díaz-Güemes Martín-Portugués, Verónica Crisóstomo Ayala, Javier García Casado, Fei Sun, Juan Maestre Antequera, Claudia Báez Díaz, Francisco Miguel Sánchez-Margallo. SEC octubre 2013

Comparison of thoracoscopy versus thoracotomy for the induction of an experimental acute myocardial infarction in the swine model. B. Moreno Naranjo, I. Díaz-Güemes Martín-Portugués, V. Crisóstomo Ayala, J. Maestre Antequera, F. M. Sánchez-Margallo. 47th Congress of the European Society for Surgical Research. Celebrado en Lille (Francia) del 6-9 de junio de 2012.

Evaluación de diferentes abordajes quirúrgicos mínimamente invasivos en la creación de modelo experimental para el entrenamiento en pieloplastia laparoscópica. Hernández Hurtado, L; Díaz-Güemes Martín-Portugués, I; Sánchez Hurtado, MA; Pérez Duarte, F; Enciso Sanz, S; Moreno Naranjo, B; Soares Azevedo, AM; Carrero Gutiérrez, A; Sánchez Margallo, FM. LXXVI Congreso Nacional de Urología, Málaga, 8 al 11 de junio de 2010, Málaga.

Toracoscopia quirúrgica. Sánchez FM, Díaz-Güemes I, Pérez Duarte FJ, Moreno Naranjo B. Revista "Canis et Felis" – N° 104 junio 2010.

Uso de animales de experimentación para la creación de un modelo de infarto de miocardio. Sánchez Margallo FM, Moreno B, Calles C, Díaz I, Crisóstomo V, Fantidis P. Presentada en el XVII Congreso Internacional – SECIVE. Cáceres 7 y 8 de noviembre, 2009.

Papel de la ecocardiografía en el diagnóstico del infarto de miocardio. Sánchez Margallo FM, Díaz-Güemes I, Moreno B, Calles C, Crisóstomo V, Usón J. Presentada en el XVII Congreso Internacional – SECIVE. Cáceres 7 y 8 de noviembre, 2009.

Participación en proyectos de I+D+i

Ablación intramiocárdica del sustrato de las tvms en un modelo porcino de cicatriz post infarto. Organismos o empresas que financia el Proyecto: Instituto de Salud Carlos III, Redes temáticas de investigación cooperativa en salud. Acrónimo: RETICS Duración: 2013-2014. FIS.

Estudio de viabilidad y eficacia de diferentes vías de inoculación de células madre multipotenciales en la regeneración del miocardio afectado durante un infarto agudo de miocardio en un modelo experimental porcino. Ayuda INNCORPORA del MICINN. Jefe Proyecto. Duración: 2011-2014.

Validación de la utilización de la resonancia magnética cardiovascular para la caracterización del sustrato de las arritmias ventriculares mediante cartografía de intensidad de señal endo-epicárdica en un modelo animal de infarto de miocardio. PRI-SALUD. Entidad financiadora: Junta de Extremadura y FEDER. Investigador Principal: Verónica Crisóstomo Ayala. Duración: 2011-2012.

Regeneración del miocardio mediante el empleo de injerto de músculo cardíaco autólogo. Evaluación experimental en modelo porcino de infarto de miocardio. Colaborador. Fundesalud. Duración: 2009-2010.

Creación de un modelo de infarto agudo de miocardio por toracoscopia. Jefe de proyecto. Duración: 2009. Proyecto interno del CCMIJU.

Desarrollo y caracterización de un modelo experimental de infarto de miocardio. Estudio mediante resonancia magnética en fase aguda y crónica. PRI. Investigador Principal: Verónica Crisóstomo Ayala. Investigador predoctoral. Duración: 2009-2010.

Cursos de formación

Profesora en cursos de formación para médicos y veterinarios en el ámbito de la Cirugía Toracoscópica:

- Cursos de Cirugía Toracoscópica Veterinaria
- Cursos de Endocirugía Torácica en Pediatría
- Cursos de Cirugía Toracoscópica avanzada