

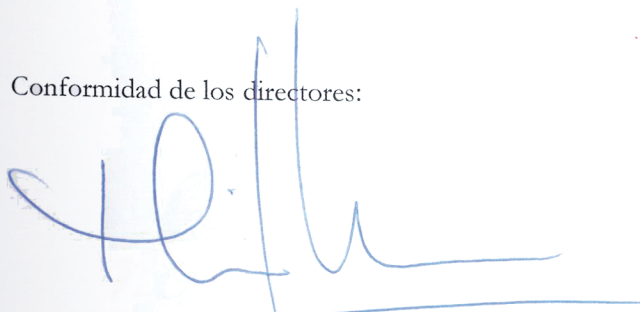
TESIS DOCTORAL

**Administración de factores de crecimiento microencapsulados en un
modelo porcino de cicatriz post infarto de miocardio reperfundido**

VIRGINIA BLANCO BLÁZQUEZ

Programa de Doctorado en Investigación Biomédica Aplicada

Conformidad de los directores:



Fdo. Dr. D. Francisco Miguel Sánchez Margallo



Fdo. Dra. Dña. Verónica Crisóstomo Ayala



Fdo. Dra. Dña. Claudia Báez Díaz



Esta tesis doctoral ha sido parcialmente financiada por la Consejería de Economía e Infraestructuras de la Junta de Extremadura y cofinanciada por el Fondo Social Europeo a través del *DECRETO 45/2016*, para la financiación de contratos predoctorales. Expediente *PD16069*.



Fondo Social Europeo
Una manera de hacer Europa

La realización de dicho proyecto ha tenido lugar en la Infraestructura Científica y Técnica Singular NANBIOSIS, en las unidades U24 (Medical Imaging), U14 (Cell Therapy), U21 (Experimental Operating Rooms) y U22 (Animal Housing) localizadas en el Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón.

Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Cardiovasculares
(CB16/11/00494)



AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a las empresas *Tigenix (Coretherapix)*, *Nanomi* e *Innocore Pharmaceuticals*, por el suministro de las microcápsulas y factores de crecimiento empleados en esta investigación.

ABREVIATURAS

- **ADSCs:** Células madre adiposas
- **BLANK:** Microcápsulas placebo
- **CABG:** Bypass coronario
- **CARE-MI:** Cardio Repair European Multidisciplinary Initiative
- **CCMIJU:** Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón
- **CDCs:** Células madre derivadas de cardiosferas
- **CK-MB:** Creatinquinasa MB
- **CMMO:** Células madre de la médula ósea
- **CSCs:** Células madre cardíacas
- **CTRL:** Control
- **ECG:** Electrocardiograma
- **eCSCs:** Células progenitoras cardíacas endógenas
- **ECVs:** Enfermedades cardiovasculares
- **EPCs:** Células progenitoras endoteliales
- **ESC:** Sociedad Europea de Cardiología
- **FE:** Fracción de eyección
- **FEVI:** Fracción de eyección del ventrículo izquierdo
- **FGF:** Factor de crecimiento de fibroblastos
- **FV:** Fibrilación ventricular
- **H.E.:** Hematoxilina-Eosina
- **HGF:** Factor de crecimiento de los hepatocitos
- **HSA:** Albúmina sérica humana

- **IAM:** Infarto agudo de miocardio
- **IAMCEST:** Infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST
- **IAMSEST:** Infarto agudo de miocardio sin elevación del segmento ST
- **IC:** Intracoronaria
- **IFN:** Interferón
- **IGF-1:** Factor de crecimiento insulínico-1
- **IL:** Interleucina
- **IM:** Infarto de miocardio
- **LAD:** Arteria coronaria descendente anterior izquierda
- **MACE:** Eventos cardíacos adversos mayores
- **MSCs:** Células madre mesenquimales
- **OAI:** Oblicuo Anterior Izquierdo
- **OMV:** Obstrucción microvascular
- **PET:** Tomografía por emisión de positrones
- **PTCA:** Angioplastia coronaria transluminal percutánea
- **RCP:** Reanimación cardiopulmonar
- **RMc:** Resonancia magnética cardíaca
- **RTG:** Realce tardío con gadolinio
- **SCA:** Síndrome coronario agudo
- **SPECT:** Tomografía computarizada por emisión de fotón único
- **TC:** Tomografía computarizada
- **T.C.M.:** Tricrómico de Masson
- **TEN:** Transendocárdica

- **TGF-β1**: Factor de crecimiento transformante beta-1
- **TIMI**: Grado de perfusión coronaria
- **Tn**: Troponina cardíaca
- **TNF**: Factor de necrosis tumoral
- **Tnl**: Troponina I
- **TTC**: Cloruro de Trifeniltetrazolio
- **VD**: Ventrículo derecho
- **VDFi**: Volumen Diastólico Final indexado
- **VEGF**: Factor de crecimiento del endotelio vascular
- **VI**: Ventrículo izquierdo
- **VO**: Vía oral
- **VSi**: Volumen Sistólico Final indexado

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	3
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES.....	5
2.2 EL INFARTO DE MIOCARDIO	5
2.2.1 <i>Diagnóstico del IM</i>	6
2.2.2 <i>Tratamiento del IM</i>	10
2.3 MODELOS EXPERIMENTALES	16
2.3.1 <i>Especies utilizadas en investigación cardiovascular</i>	16
2.3.2 <i>Modelos porcinos de IM</i>	19
3. MATERIAL Y MÉTODO	21
3.1 ANIMALES DEL ESTUDIO	21
3.2 JUSTIFICACIÓN DEL MÉTODO	22
3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL	24
3.4 ANESTESIA.....	25
3.5 INDUCCIÓN DEL MODELO DE IAM.....	27
3.6 RESONANCIA MAGNÉTICA CARDÍACA	29
3.7 PREPARACIÓN DE LA TERAPIA.....	31
3.8 ADMINISTRACIÓN DEL TRATAMIENTO	31
3.9 ANALÍTICAS SANGUÍNEAS.....	32
3.10 FIN ESTUDIO: RMC Y EUTANASIA.....	33
3.11 HISTOLOGÍA	34
3.12 EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO	35
3.13 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	36
4. RESULTADOS	37
4.1 INDUCCIÓN DEL MODELO.....	37
4.1.1 <i>Mortalidad</i>	37
4.1.2 <i>EKG</i>	38
4.1.3 <i>Flujo Coronario</i>	39
4.1.4 <i>Enzimas cardíacas</i>	41

4.2 ADMINISTRACIÓN DE LA TERAPIA.....	41
4.2.1 Flujo coronario.....	42
4.2.2 ECG.....	44
4.2.3 Enzimas cardíacas.....	45
4.2.4 Citoquinas.....	46
4.3 SEGUIMIENTOS DE RMC.....	50
4.3.1 Evaluación del tamaño de IM.....	51
4.3.2 Funcionalidad cardíaca.....	53
4.4 FIN ESTUDIO.....	57
4.4.1 Flujo coronario.....	57
4.4.2 Necropsias.....	58
4.4.3 Tinción TTC.....	59
4.4.4 Histología.....	60
5. DISCUSIÓN.....	65
5.1 LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	75
6. CONCLUSIONES.....	77
7. RESUMEN.....	79
SUMMARY.....	81
8. BIBLIOGRAFÍA.....	83
9. TRABAJOS DEL DOCTORANDO RELACIONADOS CON LA TEMÁTICA DE LA TESIS DOCTORAL.....	111

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares (ECVs) son la principal causa de muerte en todo el mundo (1,2). En Europa, las ECVs representan el 45% de todas las muertes (3), la mayoría debidas a la cardiopatía coronaria y, en menor medida, a los accidentes vasculares cerebrales (4). Éstas suponen el 49% de las defunciones de mujeres y un 40% de hombres (3). El síndrome coronario agudo (SCA) es de tres a cuatro veces más frecuente en hombres que en mujeres menores de 60 años, pero después de los 75 años, las mujeres representan la mayoría de los pacientes (5).

Sin embargo, en Europa, ha habido una tendencia general a la reducción de la tasa de mortalidad por cardiopatía isquémica en las últimas tres décadas (4), gracias al desarrollo de diferentes estrategias terapéuticas (6). Hasta la década de los años ochenta, el tratamiento se limitaba a proporcionar alivio sintomático y a la terapéutica de complicaciones como las arritmias, la insuficiencia cardiaca o la angina post infarto. Posteriormente, la introducción del tratamiento antitrombótico con ácido acetilsalicílico y fibrinólisis (sistémica o intracoronaria) resultó en una reducción significativa de la mortalidad de los pacientes con infarto agudo de miocardio (IAM) con elevación del segmento ST (IAMCEST). En la década de los noventa, se introdujo gradualmente la angioplastia coronaria transluminal percutánea (PTCA), actualmente intervención de elección para los pacientes que han sufrido un IAMCEST (7).

El envejecimiento de la población mundial y la creciente prevalencia del IAM han hecho que aumente la carga de las ECVs en los sistemas de salud europeos a pesar de la disminución de la mortalidad post-infarto (3,8). Se genera así un remodelado ventricular adverso y consecuentemente insuficiencia cardíaca crónica, riesgo de desarrollo de procesos arrítmicos y fallo cardíaco (9,10). Esto se debe a que las terapias tradicionales disminuyen la mortalidad pero no abordan el problema de la pérdida de cardiomiocitos ni la regeneración del tejido dañado (11), para lo que el único tratamiento curativo es el trasplante de corazón.

La carencia de un tratamiento curativo de amplia disponibilidad determina la necesidad evidente de desarrollar opciones terapéuticas que aborden tanto los síntomas de la enfermedad como los procesos patológicos subyacentes (12).

En vista del efecto más bien paliativo que curativo de estos tratamientos, como la fibrinólisis o la PTCA, se han explorado nuevas terapias alternativas durante más de una década, que incluyen terapias génicas, con proteínas y células madre (9).

Actualmente, la comunidad científica apunta a que los beneficios terapéuticos de las células madre son mayoritariamente debidos a sus efectos paracrinos al secretar sustancias cardioprotectoras angiogénicas, antiinflamatorias e inmunomoduladoras. Éstas son capaces de estimular la migración, proliferación y supervivencia de las células progenitoras cardíacas endógenas (eCSCs) (13,14), así como atenuar la fibrosis y modular la inflamación (15,16). La activación de estos procesos celulares puede aminorar la lesión por reperfusión o el remodelado adverso en pacientes con IAM o insuficiencia cardíaca, respectivamente. De hecho, el estrés por hipoxia en células madre implica un aumento de sus efectos paracrinos (17,18). La administración de estos factores en lugar de las células mismas puede presentar una opción terapéutica clínicamente atractiva desde una perspectiva regulatoria y comercial (16).

Entre estas sustancias, se encuentran diferentes citoquinas y factores de crecimiento que pueden limitar la inflamación miocárdica y la escara post-infarto (19). El factor de crecimiento insulínico-1 (IGF-1), factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF), angiopoyetina 2 o el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) son algunos de los factores de crecimiento liberados por el efecto paracrina de las células madre (20). Entre estas sustancias, enfocamos nuestro trabajo en el HGF, ya que existen estudios experimentales previos en modelo murino que soportan su capacidad de regeneración cardíaca a partir de sus propiedades antiapoptóticas, antifibróticas, antiinflamatorias e inmunomoduladoras (13,21,22).

Para lograr una traslación al entorno clínico, los datos obtenidos en roedores resultan insuficientes hasta el punto que se considera que el decepcionante resultado de los primeros ensayos clínicos en cardiología con diferentes terapias, puede ser debido a la extrapolación errónea de resultados y dosis desde un corazón murino (250mg) a uno humano (350g), siendo la especie porcina el modelo experimental más adecuado para dicha investigación traslacional (23).

Por otro lado, y como cualquier tratamiento, existen algunas consideraciones clave para la utilización de estos factores de crecimiento como terapia de cardioprotección tras el IAM, como son la localización y el modo de su administración (24). Algunos estudios en porcino han defendido la terapia localizada y controlada de los factores de crecimiento, ya que limita la diseminación sistémica de los mismos, generando así una terapia más segura y eficaz, añadiendo además las ventajas potenciales de una administración mínimamente invasiva de la terapia (25,26). Por ello, en nuestro estudio hemos utilizado la microencapsulación del HGF para su administración controlada, valorando la seguridad y eficacia en un modelo de IAM en

la especie porcina. El desarrollo de la microencapsulación ha permitido sintetizar partículas cargadas de diversos fármacos y sustancias (como los factores de crecimiento en este caso concreto), lo que hace posible incrementar la dosis de administración sin afectar a su tolerancia, así como poder realizar una liberación controlada al medio con una duración de acción programada. Además, esta formulación permite disminuir de forma eficaz los efectos secundarios y evitar la degradación de los factores durante su distribución.

En un proyecto anterior financiado por el Séptimo Programa Marco de la Unión Europea (Cardio Repair European Multidisciplinary Initiative, European Commission. Ref.- 7FP HEALTH-2009-1.4-3.-2442038 CARE-MI) establecimos una colaboración fructífera con diversas empresas relacionadas con la formulación farmacéutica, como son Nanomi e Innocore Pharmaceuticals. La colaboración entre estas dos compañías ha permitido a su vez el desarrollo de microesferas de polímeros biodegradables como sistema de vehiculación y liberación de pequeñas moléculas, péptidos y proteínas terapéuticas, ofreciendo así un método de administración para los factores de crecimiento mínimamente invasivo, sin acumulación ni degradación de los mismos.

En el presente estudio, hemos analizado la seguridad y eficacia de una nueva terapia para el tratamiento de la patología cardiovascular que más muertes genera en los países desarrollados, el infarto de miocardio, mediante un modelo porcino y utilizando técnicas de intervencionismo e imagen de grado clínico como la PTCA y la resonancia magnética cardíaca (RMc), que permita su traslación al ámbito clínico.

1.1 Hipótesis de trabajo y objetivos

Así, bajo la hipótesis de trabajo de que la administración intracoronaria (IC) de HGF microencapsulado en un modelo porcino de infarto de miocardio en una fase temprana de la patología (a las 48 horas del insulto isquémico), podría limitar o evitar los daños en el tejido cardíaco provocados por la isquemia, el objetivo principal del presente estudio ha sido: Evaluar la seguridad y la eficacia del tratamiento con HGF microencapsulado frente a la administración de vehículo o suero salino en el IAM en un modelo animal que permita su traslación rápida a la clínica.

Dicho propósito, se divide en diferentes objetivos secundarios:

- Estudiar la capacidad del tratamiento para preservar el tejido, disminuir el tamaño del infarto y limitar el grado de fibrosis.

- Evaluar la influencia de la terapia sobre el remodelado ventricular adverso y el desarrollo de las arritmias posteriores al infarto.
- Determinar si existe mejoría de la función cardíaca.
- Valorar la efectividad y seguridad de la inyección de HGF microencapsulado respecto a la administración del vehículo de la terapia y el grupo Control.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Las enfermedades cardiovasculares

Cada año mueren en el mundo 17 millones de personas a causa de las ECVs, principalmente por infarto de miocardio (IM) (7,4 millones de personas) y accidente cerebrovascular (6,7 millones de personas) (27). En Europa, las ECVs suponen el 45% de los fallecimientos. En concreto, la enfermedad coronaria es responsable del 19% de las muertes en hombres y del 20% en las mujeres (1). En Estados Unidos, la isquemia cardíaca también es la principal causa de muerte (43,8%) dentro de las ECVs, seguido del infarto cerebral (16,8%) y la hipertensión (9%) (2).

En cuanto a la población española, las ECVs constituyen la primera causa de defunción, originando en 2016 una tasa de 257,9 fallecidos por cada 100.000 habitantes. Además, las enfermedades isquémicas del corazón fueron el primer motivo de muerte en los hombres y las enfermedades cerebrovasculares en las mujeres. Las mayores tasas brutas de mortalidad por estas enfermedades se registraron en el Principado de Asturias (413,1 fallecidos por 100.000 habitantes), Galicia (367,5) y Castilla y León (339,9) (28).

La tendencia temporal en cuanto a la mortalidad ajustada por la edad en ECVs se encuentra en descenso en los últimos 40 años. Por el contrario, las tasas de morbilidad hospitalaria por ECVs casi se han triplicado en España durante ese periodo, aunque mostraron una disminución entre 2003 y 2012. Más de la mitad de la reducción de la mortalidad cardiovascular se ha atribuido a cambios en el nivel de factores de riesgo en la población, especialmente la disminución de la colesterolemia, la presión arterial y el tabaquismo, una tendencia favorable contrarrestada parcialmente por el aumento de otros factores de riesgo, principalmente la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2 (29).

Todo esto conlleva un coste total estimado de las ECVs en Europa de 196.000 millones de euros anuales, aproximadamente el 54% de la inversión total en salud, y da lugar a un 24% de las pérdidas en productividad (30).

2.2 El infarto de miocardio

Las ECVs engloban diferentes patologías, entre las que se encuentra el IM, la principal causa de muerte en toda Europa (4).

El IM se define como la muerte de células miocárdicas debido a una isquemia prolongada. Esta terminología debería ser utilizada, según la última definición de IM (31), cuando haya evidencia de lesión del tejido cardíaco en un entorno clínico compatible con isquemia miocárdica. Esta patología puede ser reconocida mediante una combinación de síntomas clínicos, alteraciones en el registro del electrocardiograma (ECG), elevación de los biomarcadores (enzimas cardíacas) de necrosis miocárdica y mediante diferentes pruebas de imagen no invasivas. Además, el IM puede ser la primera manifestación del SCA o puede ocurrir en pacientes con una enfermedad ya establecida (31).

2.2.1 Diagnóstico del IM.

Según la guía de la Sociedad Europea de Cardiología (ESC) sobre el tratamiento de pacientes con IAMCEST (32), el manejo tanto diagnóstico como terapéutico de este tipo de infarto comienza desde el primer contacto médico con el paciente que presente síntomas de dolor torácico difuso persistente, con irradiación del mismo hacia el cuello y brazo izquierdo y signos que indiquen isquemia miocárdica detectados mediante ECG de 12 derivaciones. Algunos pacientes presentan síntomas menos típicos, como falta de aire, náuseas o vómitos, fatiga, palpitaciones o síncope. Por otro lado, el alivio del dolor tras la administración de nitroglicerina puede conducir a error por lo que no se recomienda dicha aplicación como maniobra diagnóstica. Esta misma guía recomienda la monitorización electrocardiográfica de este tipo de pacientes para detectar posibles arritmias potencialmente mortales y proceder con la desfibrilación si fuera necesario. Asimismo, en casos de dolor torácico recurrente o de la normalización del segmento ST tras la administración de nitroglicerina y alivio de los síntomas, es necesario realizar inmediatamente una coronariografía.

➤ Detección electrocardiográfica

El electrocardiograma es un instrumento crucial en la identificación y el manejo del IAM (33), así como para la clasificación de los pacientes con IAM sin elevación del segmento ST (IAMSEST) o IAMCEST (34). Los criterios electrocardiográficos se basan en cambios de las corrientes eléctricas del corazón (medidas en milivoltios) (32).

Las alteraciones electrocardiográficas que acompañan a la isquemia miocárdica o IM pueden reflejarse en el segmento PR, en el complejo QRS, el segmento ST o la onda T. Las primeras manifestaciones de esta patología se detectan normalmente en la onda T y en el segmento ST (31).

La elevación del segmento ST puede indicar el desarrollo de una oclusión coronaria aguda en los siguientes casos: al menos 2 derivaciones contiguas con una elevación del segmento ST \geq 2,5 mm en los varones menores de 40 años, \geq 2 mm en los de 40 años o más o \geq 1,5 mm en las mujeres en las derivaciones V2-V3 o \geq 1 mm en otras derivaciones (en ausencia de hipertrofia del ventrículo izquierdo (VI) o bloqueo de la rama izquierda) (31,32).

Los cambios en el ECG que se desarrollan en la forma de las ondas ST-T y Q permiten al clínico identificar la arteria relacionada con el infarto, estimar la cantidad de miocardio en riesgo así como el pronóstico y determinar la estrategia terapéutica en el momento del acontecimiento (31). Siempre hay que tener en cuenta que el ECG por sí mismo a menudo es insuficiente para diagnosticar un IAM, ya que la desviación del segmento ST se puede observar en otras patologías, como en pericarditis aguda, hipertrofia del VI, bloqueos de rama o en el síndrome de Brugada, entre otros (31,35). El tamaño de la arteria coronaria y la distribución de los segmentos arteriales, los vasos colaterales, la ubicación, extensión y gravedad de la estenosis coronaria y la necrosis miocárdica previa pueden afectar a las manifestaciones en el ECG de la isquemia miocárdica (31,33). Por tanto, si el ECG es ambiguo o no muestra evidencia clara de IM, se debe repetir el examen, y cuando sea posible compararlo con registros anteriores, ya que hay pacientes con oclusión coronaria que pueden tener un registro electrocardiográfico inicial sin elevación del segmento ST, debido a que a veces, se les explora muy precozmente tras el inicio de los síntomas. Además, algunos pacientes con oclusión aguda de una arteria coronaria e IAM en curso pueden presentarse sin alteración del ECG y no se les practique la terapia de reperfusión, lo que produce infartos más extensos y peores resultados clínicos (2,32,36).

➤ **Detección mediante marcadores biológicos de necrosis miocárdica**

Para el diagnóstico de necrosis miocárdica por isquemia, la sintomatología clínica y los hallazgos electrocardiográficos son importantes, pero en numerosas ocasiones debe confirmarse en base a los resultados del análisis de marcadores biológicos (19,37–39), como es el aumento de la Troponina T, I (TnI) o la creatinquinasa MB (CK-MB)(31).

La troponina cardíaca (Tn) es el biomarcador preferido para la detección del IM, ya que tiene alta especificidad del tejido miocárdico así como alta sensibilidad clínica por ser un componente contráctil de las células miocárdicas que se expresa casi exclusivamente en el miocardio (19,31,40). En el caso de la Troponina T se han descrito casos en los que su elevación estaba asociada a un daño de músculo esquelético y no cardíaco, al contrario que la

TnI, de la cual no constan informes que evidencien aumentos de sus valores tras una lesión en tejidos no cardíacos (31,41). Aunque la elevación de estos biomarcadores en sangre, presentados en nanogramos por litro (ng/L) o picogramos por mililitro (pg/ml) (19,31), refleje una lesión de las células miocárdicas, no indica el mecanismo subyacente de esta lesión (31,42). Para considerarlo valor diagnóstico de IM, el incremento de estos marcadores en sangre se define como la elevación de troponinas cardíacas a valores superiores al percentil 99 del límite superior de referencia, es decir, por encima de la determinación estadística de corte que recomiendan las guías para diagnosticar la lesión miocárdica (31,32,43). Las mediciones para la Tn deberían realizarse al inicio y a las 3 horas desde el comienzo de los síntomas con repeticiones a las 6 horas en aquellos pacientes que continúan con la sintomatología (19). Los valores máximos se encuentran a las 24 horas del evento causante (34). Si el análisis de Tn no es posible, la mejor alternativa es la determinación de la CK-MB, cuyo incremento se valora igual que el de la Tn (31,44). La determinación de marcadores séricos mediante análisis de sangre es sistemática en la fase aguda pero, aunque está indicada, no debe retrasar la reperfusión, tratamiento de elección para los pacientes con IAMCEST en las primeras 12 horas tras el inicio de los síntomas (32).

➤ **Detección mediante técnicas de imagen no invasivas**

La hipoperfusión miocárdica regional y la isquemia generan una cascada de eventos, incluida la disfunción miocárdica, muerte celular y fibrosis. Por lo tanto, los parámetros importantes que se obtienen mediante las técnicas de imagen son la perfusión, la viabilidad de los miocitos, el grosor del miocardio, el movimiento y los efectos de la fibrosis sobre la cinética de los agentes de contraste paramagnéticos o radiopacos (31).

Las técnicas de imagen mejor validadas y comúnmente utilizadas en el IM agudo y crónico son la ecocardiografía, la ventriculografía con radionúclidos, la gammagrafía de perfusión miocárdica mediante tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT) y la RMc. La tomografía por emisión de positrones (PET) y la tomografía computarizada (TC) por rayos X son menos comunes (31,32,45).

Cada una de las técnicas puede, en mayor o menor medida, evaluar la viabilidad, la perfusión y la función del miocardio. Sólo las técnicas de radionúclidos proporcionan una evaluación directa de la viabilidad de los miocitos, mientras que otras técnicas proporcionan evaluaciones indirectas de la viabilidad del miocardio, como la respuesta contráctil a dobutamina evaluada por ecocardiografía o fibrosis miocárdica por RMc (31). Sin embargo, el tipo de técnica de

imagen y el momento idóneo para detectar la isquemia residual y viabilidad miocárdica no están claramente establecidos y suelen depender de la disponibilidad y la experiencia del centro (32).

Con la ecocardiografía se puede evaluar la estructura y función cardíaca y más en particular el grosor, el engrosamiento y movimiento del miocardio. Para mejorar la visualización del borde endocárdico y evaluar la perfusión miocárdica y obstrucción microvascular (OMV), se pueden utilizar los medios de contraste ecocardiográficos, así como el doppler tisular y la imagen de deformación que permiten la cuantificación de la función global y regional (31). Por tanto, la ecocardiografía de urgencia está indicada para los pacientes con parada cardíaca, shock cardiogénico, inestabilidad hemodinámica o sospecha de complicaciones mecánicas y cuando el diagnóstico de IAMCEST sea incierto. Además, se recomienda la ecocardiografía sistemática tras la intervención coronaria percutánea primaria para evaluar la función del VI en reposo, del ventrículo derecho (VD) y valvular, así como para descartar complicaciones mecánicas tras el IAM y la presencia de trombos en el VI (32). No obstante, la detección de isquemia residual mediante ecocardiografía después de un IAM es compleja debido a las alteraciones en la movilidad de la pared. Ésta técnica, por su gran disponibilidad, bajo coste y ausencia de radiación, es uno de los métodos más empleados para la evaluación de parámetros cardíacos (46).

La RMc es una técnica de diagnóstico por imagen que permite una evaluación exacta, amplia y profunda de la función y la estructura cardíaca (47). Además, la estandarización en los protocolos de adquisición y post procesado de las imágenes facilita la disminución de los costes (48,49). Existe un protocolo de función del VI y cicatriz/fibrosis, que evalúa los volúmenes y la función del corazón, mediante imágenes de cine, así como la presencia, el grado y el tipo de cicatriz/fibrosis mediante realce tardío con gadolinio (RTG). El uso de RTG manifiesta las diferencias de la distribución del gadolinio entre los distintos tipos de tejido, el miocardio sano y el necrótico o cicatricial. Este fenómeno se observa de 10 a 20 minutos después de la administración de dicho medio de contraste al paciente vía intravenosa. En las imágenes se evidencian zonas negras correspondientes al miocardio sano y zonas blancas que muestran la hipercaptación de contraste brillante en la cicatriz del tejido no viable (47). Además, el empleo del RTG aporta una visualización excelente de las complicaciones del IAM, incluidos los trombos del VI o la OMV, así como información sobre la etiología que subyace a la disfunción del miocardio (50,51). En comparación con otras modalidades de imagen como la SPECT, la RMc con RTG, debido a su mayor resolución espacial, es considerablemente más

exacta en la detección de cicatrices, cuya presencia, transmuralidad y extensión aportan información respecto al pronóstico y la viabilidad residual (47,52). Además, en investigación gracias a su precisión y reproducibilidad permite reducir el tamaño muestral con respecto a otras técnicas de imagen (32,46) y es considerada una buena técnica para las mediciones de funcionalidad y viabilidad cardíaca (53).

Por otro lado, la PET también es una técnica de alta resolución, pero los costes y la disponibilidad limitan su uso. Además, la utilización de la TC no está recomendada si el diagnóstico probable es IAMCEST, ya que produce retrasos en el manejo del paciente que debe ser dirigido hacia el cateterismo y la revascularización (32,46).

2.2.2 Tratamiento del IM

A lo largo de la historia, se han realizado diferentes estudios para mejorar el tratamiento de los pacientes con IAMCEST. Cuatro de ellos, dos experimentales y dos clínicos, cambiaron el curso de dicha terapéutica (10): 1.- La demostración de la progresión espacial de la necrosis durante un infarto (54); 2.- La evidencia de la reducción del tamaño de infarto con la reperfusión (“Tiempo es músculo”) (55); 3.- La declaración de que la trombosis coronaria está presente en la mayoría de los casos de este tipo de IM (56); 4.- La primera experiencia de administración de trombolíticos vía intracoronaria (57).

Hasta la década de los años ochenta, el tratamiento se centraba en atenuar la sintomatología y las complicaciones asociadas al IAM (7). Posteriormente, en la década de los noventa, se introdujo el tratamiento que actualmente se realiza a los pacientes con IAMCEST, la angioplastia coronaria percutánea (58). Esta terapia ha provocado una disminución de la mortalidad debida al IAM, sin embargo, no es capaz de evitar la pérdida de cardiomiocitos ni de recuperar el tejido cardíaco dañado, y generan un daño adicional, denominado lesión por isquemia-reperfusión (10). Consecuentemente, se genera un remodelado ventricular adverso y se produce un incremento en la incidencia de una enfermedad crónica, la insuficiencia cardíaca (9–11,59,60). Actualmente, el trasplante de corazón es la única opción curativa para la insuficiencia cardíaca avanzada, una terapia con limitaciones importantes como el rechazo agudo, complicaciones quirúrgicas, falta de donantes óptimos y costes elevados (59,61). Por ello, es imprescindible investigar sobre nuevas terapias que aborden tanto la sintomatología de la enfermedad como los procesos patológicos subyacentes, para obtener un efecto del tratamiento más curativo que paliativo (9,12).

➤ **Tratamiento mediante terapia celular**

En el año 2003, Beltrami y cols. descubrieron la existencia de poblaciones de células progenitoras cardíacas residentes en el corazón adulto, desafiando la noción tradicional de que el miocardio estaba terminalmente diferenciado, sin células madre y carente de capacidad regenerativa (61). Así, durante los últimos años, se han utilizado diferentes enfoques regenerativos para conseguir la disminución del tamaño del infarto y mejorar el remodelado ventricular posterior al mismo. En éste ámbito, la utilización de la terapia celular ha sido durante muchos años el foco principal del tratamiento del IM (9,11,14,16,24,64–73), destacando sobre todo el tratamiento con células madre mesenquimales (MSCs) (74), tanto en estudios experimentales (75–84) como clínicos (85–88). Las células madre cardíacas (CSCs) también han sido el objetivo principal de numerosas investigaciones en el área de la cardiopatía isquémica en pequeños y grandes animales, así como en humanos (63,75,89–94).

En la siguiente tabla (Tabla 1) se resumen algunos de los ensayos clínicos realizados con diferentes tipos celulares para el tratamiento del IM en su fase aguda o subaguda:

Estudio	Año	Tipo celular	Vía administración	Resultados
TOPCARE-AMI (95) (NCT00289822)	2002	CMMO autólogas	IC	↑FEVI, perfusión, viabilidad
BOOST (96) (NCT00224536)	2004	CMMO autólogas	IC	No mejoras significativas
REPAIR-AMI (97) (NCT00279175)	2006	CMMO autólogas	IC	↓FEVI ↑Contractilidad ↓MACE
MYSTAR (98) (NCT00384982)	2009	CMMO autólogas	IC & TEN	↓% Infarto ↑Viabilidad-perfusión
APOLLO (99) (NCT00442806)	2012	ADSCs autólogas	IC	↑Perfusión ↓% Infarto
CADUCEUS (100) (NCT00893360)	2012	CDCs autólogas	IC	↓Cicatriz ↑Viabilidad-contractilidad
ALLSTAR (101) (NCT01458405)	2017	CDCs alogénicas	IC	No mejoras significativas
CAREMI (102) (NCT02439398)	2018	CSCs alogénicas	IC	Seguro y factible

Tabla 1: Resumen de ensayos clínicos que han utilizado la terapia celular como tratamiento para el IM en fase aguda. **CMMO:** Células madre de la médula ósea; **ADSCs:** Células madre adiposas; **CDCs:** Células madre derivadas de cardiosferas; **CSCs:** Células madre cardíacas; **IC:** Intracoronaria; **TEN:** Transendocárdica; **FEVI:** Fracción eyección ventrículo izquierdo; **MACE:** Eventos cardíacos adversos.

Por tanto, aunque la terapia con células madre parece segura, la mayoría de los ensayos clínicos realizados han sido generalmente pequeños e inconclusos y han mostrado un beneficio modesto o neutro (9,16,103–105).

➤ **Nuevas estrategias terapéuticas**

Se considera que la reparación cardíaca mediante la terapia con células madre se produce a través de tres diferentes mecanismos de acción: a) La diferenciación de las células administradas en los tejidos constituyentes del corazón (procesos de cardiomiogénesis y vasculogénesis); b) La liberación de factores con propiedades de señalización paracrina; c) La estimulación de la reparación endógena mediante la activación de los nichos de células madre cardíacas (9,60,106,107).

Actualmente, el concepto de la señalización paracrina se considera la hipótesis más probable en cuanto a los efectos terapéuticos de la terapia celular en órganos dañados (15,16,107–109). Según esta teoría, los beneficios de este tipo de tratamiento se deben a la secreción de diversas sustancias como citoquinas, micropartículas o factores de crecimiento. Estos elementos promueven procesos de regeneración o reparación cardíaca y protegen al corazón frente al remodelado adverso, induciendo neovascularización y la activación de células madre cardíacas endógenas e inhibiendo la apoptosis de las células miocárdicas (9,16,20,26,60).

Por tanto, existen nuevas estrategias terapéuticas que se basan en la administración de diferentes factores de crecimiento o citoquinas para fortalecer la capacidad intrínseca del corazón de reaccionar ante un daño agudo y limitar la escara post-infarto. Entre ellos se encuentran, por ejemplo el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF) o la angiopoyetina 2 (15,20,25,110).

Diferentes estudios, tanto *in vitro* como en modelos murino, porcino y canino, apoyan la utilización del HGF como terapia para el tratamiento del infarto de miocardio, debido a sus propiedades angiogénicas, antifibróticas, antiapoptóticas y por tanto, cardioregenerativas (12,13,21,22,26,110–141).

El HGF es liberado por diferentes células madre como las CDCs, MSCs, CMMO y las células endoteliales (EPCs). Este factor estimula las CSCs endógenas, induciendo la movilización, expansión y diferenciación de cardiomiocitos y células vasculares, facilitando así la protección y regeneración cardíaca mediante diferentes rutas (13,135,142):

- Disminuye la inflamación, proceso implicado en el daño tisular cardíaco y determinante de su grado de extensión y del remodelado ventricular asociado al IM (143,144). Para ello, este factor actúa sobre células endoteliales inhibiendo la expresión de moléculas de adhesión, como ICAM-1 o E-selectina, e impidiendo la unión de los leucocitos al endotelio (135,145,146) Además, inhibe la producción de interleucinas (IL) involucradas en el remodelado ventricular post infarto, como la IL-1, IL-6 e IL-18 (147), mediante la inducción de la hemo oxigenasa-1 (148) y la liberación de citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 e IL-4 (149).
- Reduce la fibrosis, proceso asociado al deterioro de la función cardíaca, de su capacidad de contracción y a la aparición de arritmias (150). El HGF disminuye esta respuesta a través del incremento del óxido nítrico (NO) en las células endoteliales, regulador de la permeabilidad capilar, frecuencia cardíaca y procesos de hipertrofia y apoptosis entre otros (151–153). Además actúa inhibiendo la producción del factor de crecimiento transformante beta-1 (TGF- β 1), potente activador de la transición de miofibroblastos a fibroblastos (154,155), y de la angiotensina II (156), implicada en la fibrosis cardíaca mediante el sistema renina-angiotensina-aldosterona (150,155).
- Disminuye el estrés oxidativo y por tanto la apoptosis de los cardiomiocitos, mecanismos claves para la patogénesis del daño cardíaco posterior a la isquemia/reperfusión (13,146,151). Así, el HGF protege las células cardíacas de la apoptosis inducida por estrés oxidativo mediante la activación de la vía asociada a la cardioprotección PI3K/Akt (89,157), MEK/Erk1,2 (158), p38MAPK (159,160). Asimismo interviene a través de la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 (89,136), así como por la inhibición de las caspasas, enzimas implicadas en la muerte celular (161,162). Además, protege a las células cardíacas de la autofagia mediante la vía de protección mTOR (161,163).
- Promueve la angiogénesis, y por tanto protege a los cardiomiocitos del daño isquémico, a través de su efecto mitógeno en células endoteliales, promoviendo la regeneración de éstas células y la neovascularización durante el IM. Igualmente estimula la formación de vasos sanguíneos indirectamente mediante la secreción de factores como el VEGF o la IL-8 (136) implicados en este proceso así como estabilizando los recientemente formados (164).

Además de los estudios preclínicos, hay diversos estudios clínicos, en patologías vasculares periféricas y cardíacas que muestran las ventajas de la terapia génica con HGF comparado con otros factores de crecimiento (136,165–169) .

➤ **Vías de administración del tratamiento**

Respecto a las vías de administración de la terapia, las más importantes y utilizadas actualmente son (9,24,67,170,171):

- Infusión intravenosa o periférica: Esta ruta ha sido probada en estudios preclínicos con la liberación de EPCs o MSCs, generando unos resultados de mejora de la funcionalidad cardíaca. Sin embargo, implica una baja retención de la terapia en el tejido cardíaco. Asimismo, el desplazamiento de la misma a otros órganos ha limitado su aplicación en el ámbito de la clínica (9,170,171).
- Transepicárdica: Vía de inyección que se ha experimentado durante cirugías cardíacas con bypass coronario (CABG). No obstante, la eficacia del trasplante celular ha sido difícil de evaluar mediante esta técnica ya que se suma a la CABG, además de ser más invasiva que el resto de vías de administración (9,24).
- Transendocárdica: Mediante este mecanismo, la terapia es liberada directamente en la pared del ventrículo, gracias a un catéter y a un mapa electromecánico del corazón. Esta técnica permite la administración del tratamiento en la región cicatricial y en casos de oclusión total de la arteria coronaria. Sin embargo, esta inyección intramiocárdica puede alterar la estructura del tejido miocárdico y generar grupos celulares que mueran a causa de la falta de riego sanguíneo. Además, la terapia inyectada se distribuye de manera heterogénea en la zona infartada (9,24,171).
- IC: Se puede realizar durante la angioplastia, técnica empleada como primer tratamiento post-IAM, por lo que no necesita de equipamiento ni aprendizaje específico para llevarse a cabo. Además, permite la distribución uniforme de la terapia inyectada en la región infartada y es una técnica mínimamente invasiva (172).
Por otro lado, existe la posibilidad de provocar OMV si la terapia que se inyecta es de un tamaño grande respecto a los vasos capilares cardíacos. Asimismo, su liberación en la región infartada es imposible si la arteria está ocluida y si no se realiza una angioplastia previa (9,24,170,171).

Además de la vía de administración del tratamiento, se considera de gran importancia su posterior retención en el miocardio. El corazón se encuentra en constante contracción, lo que contribuye a la pérdida mecánica de la terapia por constricción del músculo cardíaco desviando el tratamiento hacia la vasculatura cardíaca (173). Así, el vehículo de la terapia realiza un papel importante en la liberación del tratamiento a nivel sistémico o en el tejido de interés (174). Desde hace dos décadas, se han elaborado diferentes métodos y materiales para la encapsulación de la terapia elegida como tratamiento en diferentes áreas. Recientemente, se han desarrollado avances en microtecnología para la encapsulación de las terapias, concretamente para la terapia celular, que pretenden su liberación prolongada y controlada en el tejido diana (175). Por ello, para este estudio se han utilizado unas microcápsulas de 16µm de diámetro como vehículo del HGF, permitiendo su liberación prolongada a lo largo de 3 semanas en el área infartada. Este tipo de infusión permite la retención de la terapia en el tejido deseado sin pasar a nivel sistémico y la ausencia de complicaciones a nivel de las arterias coronarias (como su obstrucción) debido al tamaño pequeño de las microesferas.

Otro factor de gran trascendencia, es la determinación del momento óptimo en el que se realiza dicho tratamiento. La reparación cardíaca posterior al IM consta de dos fases principales. La primera de ella es la fase inflamatoria en la que se eliminan las células y matriz extracelular del tejido dañado mediante el reclutamiento e infiltrado de células del sistema inmune. La segunda es la fase reparativa y proliferativa en la que se resuelve la inflamación mediante la proliferación de miofibroblastos, la neovascularización y la formación de la cicatriz. Estas fases están mediadas por la activación neurohormonal y el estrés mecánico asociado al IM. Un balance equilibrado de ambas etapas es estrictamente necesario para una correcta cicatrización y reparación cardíaca. En efecto, una fase inflamatoria excesivamente prolongada puede provocar una formación defectuosa de la escara, pérdida celular, tisular y de contractilidad, así como expansión del infarto, remodelado ventricular y dilatación de las cámaras ventriculares (144,176). Por tanto, el nivel de propagación del infarto depende de la respuesta inflamatoria a los miocitos cardíacos afectados por la isquemia prolongada. Éstos suponen la activación de la cascada del complemento, iniciando la liberación de citoquinas, moléculas de adhesión y radicales libres que movilizan células que comienzan dicha respuesta inflamatoria. Esto provoca efectos adversos para el resto de cardiomiocitos sanos, pero es un proceso imprescindible para poder eliminar los que no son viables y reparar el miocardio. Las células responsables de la respuesta inflamatoria segregan nuevos factores de crecimiento y citoquinas que iniciarán la formación de los fibroblastos para la creación de la escara fibrótica, así como nuevos vasos sanguíneos (143,144,150,176,177).

Así, diferentes grupos de investigación abogan por una infusión lo más precoz posible tras el proceso isquémico, para ejercer el efecto cardioprotector deseado y poder evitar así el remodelado tisular (26,107,178,179). Por otro lado, hay datos que defienden una administración más tardía de la terapéutica debido a que el microambiente inflamatorio generado en las horas siguientes al infarto provocaría una pérdida de la efectividad de la terapia siendo letal para las células (97). Por tanto, el plazo del tratamiento, se debería realizar en un momento equilibrado entre la administración temprana y tardía (180). Esto se debe a que sin la manifestación inflamatoria inicial del tejido y su consecuente fibrosis de la pared miocárdica existiría un alto riesgo de ruptura del mismo (154). Por otro lado, aproximadamente a la semana del proceso isquémico, disminuye esta inflamación tisular, pero las señales quimiotácticas y de movilización de células madre endógenas comienzan a disminuir, por lo que la capacidad regenerativa del tejido residente transcurrido este periodo podría ser menor (176). Así, la respuesta cicatricial fibrótica, si bien en un primer momento permite mantener la integridad tisular, al incrementarse en exceso será la responsable de la pérdida de las características fundamentales de la pared miocárdica y la consecuente disminución de la funcionalidad cardíaca (176). Por ello, una infusión IC a las 48 horas posteriores a la isquemia cardíaca podría ser el periodo clave para lograr el efecto beneficioso de la terapia sobre el tejido cardíaco.

2.3 Modelos experimentales

Para extrapolar los resultados de los estudios de investigación al escenario clínico, es necesario que las especies animales utilizadas sean lo más adecuadas posibles. Aunque no existe un modelo ideal que refleje la totalidad de la patología en cuestión, debemos basarnos en la finalidad y tipo de estudio así como en la disponibilidad y accesibilidad de la especie para realizar una buena elección (66,67,103,181–185).

2.3.1 Especies utilizadas en investigación cardiovascular

Muchos de los estudios realizados para la investigación de ECVs se han llevado a cabo en roedores, debido principalmente a cuestiones económicas y facilidad en el manejo. Estos trabajos han facilitado una gran cantidad de conocimientos en cuanto a las bases moleculares y celulares de la biología cardiovascular (186). Sin embargo, muchas diferencias anatómicas y/o fisiológicas, como la frecuencia cardíaca, el tamaño del corazón, los cardiomiocitos, el gasto cardíaco o la respuesta al esfuerzo, separan al modelo murino de la realidad observada en la clínica. Otros experimentos se han realizado en conejo, cuyo miocardio comparte

similitudes con el del ser humano, pero además de elevar los costes del estudio, sigue siendo un modelo demasiado alejado de la situación que se produce en las patologías cardíacas humanas (182).

En la investigación del IM se prefiere un modelo en animal grande, por ser más extrapolable al entorno clínico (65). Se han hecho estudios en perro, oveja, primates y cerdos. Así, la especie canina comparte con el ser humano muchas características a nivel celular y orgánico del corazón. Sin embargo, el perro tiene grandes vasos colaterales epicárdicos y la distribución de su vasculatura cardíaca principalmente es de dominancia izquierda, al contrario que ocurre en la mayoría de los humanos (186,187). Además, debido al alto coste asociado así como por la dificultad de aprobación por los comités de ética y la presión social en cuanto a su uso en investigación, otras especies son seleccionadas en este área de la investigación (182).

Los modelos en primates tienen gran cantidad de similitudes fisiológicas, metabólicas, bioquímicas y genéticas con los humanos. Sin embargo, las cuestiones éticas así como la necesidad de instalaciones muy especializados y de gran coste, hacen que su utilización se aplique en circunstancias muy limitadas (188).

Respecto a la oveja, comparte muchas similitudes fisiológicas y anatómicas cardíacas con el ser humano (182,188). Sin embargo, presenta ciertas desventajas como las variaciones en su anatomía coronaria que implican la creación de los modelos de IM mediante toracotomía (189) y la complejidad debido a sus contornos torácicos para la adquisición de imágenes mediante técnicas diagnósticas mínimamente invasivas (190).

Por todo ello, la comunidad científica apuesta por el uso de la especie porcina para la investigación de la cardiopatía isquémica (debido a sus similitudes anatómicas, fisiológicas y patológicas) (23,187,188,191–195). Entre sus paralelismos con el corazón humano, destacan la distribución de las arterias coronarias con dominancia derecha, la pequeña cantidad de vasos cardíacos colaterales y las características electrofisiológicas (182,186–188). Además, en cerdos de 20-30 kg la proporción entre el peso del corazón y el cuerpo es idéntica a la de un humano adulto (5g/kg), mientras que en perro adulto es aproximadamente de 7g/kg y en oveja de 3g/kg (186).

Las principales diferencias en cuanto a anatomía cardíaca entre porcino y humanos son el resultado de una estación cuadrúpeda y bípeda respectivamente, así como de la diferencia en la conformación del tórax, el cual está comprimido lateralmente en suidos, a diferencia de la compresión dorsoventral en las personas (196). Respecto al VI, las trabéculas apicales son

gruesas al contrario de lo que ocurre en humanos, lo que supone una alta variación en las fibras de Purkinje y probablemente sea la causante de las diferencias existentes en la conductividad y contractilidad (186). Esta diferencia da lugar a la principal desventaja de los modelos porcinos: su susceptibilidad a la fibrilación ventricular (FV). En el caso de los modelos de oclusión endovascular, generalmente acontece a los 30 minutos tras la oclusión del vaso y, en su caso, a los 10 minutos después de la reperusión (197), lo cual puede prevenirse con una técnica anestésica adecuada, monitorización y uso de agentes antiarrítmicos como la lidocaína o la amiodarona (26,187,188,197,198). Debido a este mayor grosor de la pared del VI en el cerdo el septo interventricular está desviado hacia la derecha y por tanto el ápex está formado íntegramente por el VI. Sin embargo, en el corazón humano el septo interventricular ocupa una posición central entre las dos cámaras de tamaños equitativos y por tanto el ápex está formado por ambos ventrículos proporcionalmente (196).

En el caso de las aurículas, el tamaño es similar en ambos lados en la especie porcina, mientras que en humanos la aurícula derecha es más grande que la izquierda. Además, la aurícula izquierda en cerdo recibe únicamente dos venas pulmonares, mientras que en humanos, generalmente existen cuatro orificios para estos vasos venosos (196).

En cuanto a la circulación coronaria arterial porcina la bibliografía describe su gran similitud respecto a la del ser humano (186,191,193,196,199). Existen dos vasos principales en el corazón tanto humano como porcino: la arteria coronaria derecha e izquierda. La primera, se divide en la arteria coronaria interventricular posterior y la arteria marginal derecha, transcurriendo por el surco interventricular posterior e irrigando el ventrículo derecho respectivamente. La arteria coronaria izquierda, se bifurca en la arteria interventricular paraconal anterior, avanzando por el surco interventricular, y la arteria circunfleja por el surco auriculoventricular (193,196). Hay que matizar que la terminología anatómica es diferente en la medicina humana y veterinaria (193), de modo que la rama correspondiente a la arteria interventricular paraconal anterior del cerdo es la arteria descendente anterior en humana, así como la arteria interventricular posterior se corresponde con la descendente posterior.

Sin embargo, la circulación cardíaca venosa porcina es diferente, mayoritariamente por la presencia de una prominente vena ázigos izquierda y la ausencia de la vena derecha, contrario a lo que ocurre en la especie humana (193,196).

2.3.2 Modelos porcinos de IM

En cuanto al método de inducción del modelo utilizado en animales, éste debe ser el más parecido a la realidad observada en la clínica humana. Existen diferentes modelos in vivo de IM, tanto por inducción de aterosclerosis como por oclusión de la arteria coronaria. En cuanto a los primeros, se han realizado en murino y porcino, pero debido a su elevado coste, dificultad en el manejo y al tiempo de inducción de las lesiones, raramente son utilizados en investigación (200). Respecto a los modelos de oclusión de la arteria coronaria hay dos variedades: las técnicas abiertas (quirúrgicas) y los modelos de tórax cerrado (201).

La creación de un IM por toracotomía, implica la utilización de técnicas de ligadura quirúrgica (permanente o temporal) o colocación de clamps vasculares y está generalmente asociada a una serie de limitaciones como el peor control de la temperatura cardíaca, la mayor incidencia de infecciones y complicaciones en el cierre de la herida quirúrgica. Además, supone una disminución de la tasa de supervivencia de los animales y peor calidad de las imágenes obtenidas por RMc, debido a la presencia de aire en las capas del tejido y la fibrosis post-quirúrgica (187,194,201,202).

Por otro lado, las técnicas cerradas suponen unos mejores resultados en supervivencia de los animales, menos complicaciones relacionadas con el procedimiento y costes del mismo. Para la realización de estos modelos endovasculares, los investigadores establecen un acceso vascular arterial a través de la arteria carótida o de la femoral (23). En el primer caso se requiere de un acceso quirúrgico ya que el pulso arterial a ese nivel es difícil de palpar debido a la profundidad anatómica del vaso. Por otro lado, el acceso femoral aunque es una alternativa menos invasiva que la primera, no es considerada ideal para el acceso percutáneo en porcino, debido al pequeño tamaño del vaso y la dificultad de palpación del pulso en el lugar de punción (195).

Dentro de los modelos de tórax cerrado, se pueden utilizar diferentes técnicas para la oclusión permanente como los coils, alcohol, geles, etc. Para la oclusión temporal, la mayoría de los modelos se basan en el empleo de balones de angioplastia que permiten ocluir la arteria coronaria y obtener después su reperusión (201,203). El procedimiento de reperusión es útil ya que en la práctica clínica habitual la mayoría de los pacientes con IAM reciben terapia de reperusión (92,188). En todos los modelos descritos, se persigue cumplir una de las premisas de la investigación general y experimental: la reproducibilidad. En el caso de las terapias regenerativas, conseguir un tamaño de infarto reproducible o al menos una similar relación de

necrosis/área en riesgo es fundamental. La selección de la arteria y el nivel en el que provocar la oclusión influyen de manera esencial en este objetivo (198). En algunos trabajos se ha descrito la oclusión de la arteria circunfleja para la creación del modelo, con la ventaja de tener una baja mortalidad asociada al IM (183,204). Sin embargo, el modelo preclínico más común en porcino es la oclusión de la arteria interventricular paraconal anterior, ya que esta obstrucción, la más frecuente en humanos en su arteria homóloga, provoca un infarto de la pared anteroapical y septal del VI que es similar en tamaño y distribución al que ocurre en personas con IM (195,197).

Dentro de los modelos de IM reperfundido, existen diferentes opciones en función del nivel de obstrucción de la arteria interventricular así como de la duración de la isquemia. En estudios de regeneración cardíaca son muchos grupos de investigación los que defienden un tiempo de oclusión de más de 60-75 minutos en un nivel inferior a la primera rama diagonal de la arteria interventricular paraconal (23,197,203,205), utilizándose un tiempo de obstrucción de 90 minutos para poder generar un área infartada del 75% del área en riesgo y una lesión transmural (187,195,205). Tiempos mayores de oclusión son principalmente utilizados para estudios preclínicos en minipigs y de electrofisiología cardíaca (23).

3. MATERIAL Y MÉTODO

Una vez aprobado el proyecto por parte del Comité de Ética en Experimentación Animal (CEEA) del Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón (CCMIJU) así como por la Consejería de Medio Ambiente y Rural, Políticas Agrarias y Territorio de la Junta de Extremadura, el estudio se llevó a cabo en las instalaciones del CCMIJU, centro acreditado por la Consejería de Agricultura y Desarrollo Rural de la Junta de Extremadura, como Centro Usuario y de Cría de Animales de Experimentación (ES 100370001499).

Las diferentes fases del estudio se realizaron en base al Real Decreto 53/2013, de 1 de Febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

3.1 Animales del estudio

Para la fase experimental se utilizaron 21 hembras de especie porcina y raza Large White, con un peso medio al inicio del estudio de $32,9 \pm 3,58$ Kg. Todos los animales llegaron al CCMIJU al menos dos semanas antes de la fecha prevista para la primera intervención, con el objeto de realizar un examen clínico exhaustivo y permitir un tiempo de cuarentena durante el cual pudiera detectarse la existencia de patologías silentes. Transcurrido el periodo de aclimatación, se alojaron individualmente en los cubículos del animalario del CCMIJU con pienso de mantenimiento una vez al día y agua *ad libitum*.

En todos los animales se instauró una terapia farmacológica (Tabla 2) con el objetivo de aliviar el dolor asociado a las diferentes intervenciones del estudio así como prevenir y tratar posibles infecciones, procesos tromboembólicos y/o arritmias.

Los animales se distribuyeron de manera aleatoria en los siguientes grupos de estudio:

- Grupo 1, HGF microencapsulado (HGF; n=7): Administración de HGF microencapsulado (10 ml, $0,5 \times 10^6$ microesferas/ml, cargadas al 5% de HGF) por vía IC.
- Grupo 2, Microcápsulas placebo (BLANK; n=7): Infusión de microcápsulas sin HGF (10 ml, $0,5 \times 10^6$ microesferas/ml) por vía IC.
- Grupo 3, Suero (CTRL; n=7): Inyección de 10 ml de suero salino por vía IC.

FÁRMACO	PRESENTACIÓN	POSOLOGÍA
AMIODARONA (Trangorex®)	Comprimidos de 200 mg	400 mg/24h, Vía Oral (VO) Desde 1 semana antes de la creación del IAM y hasta 3 días después del tratamiento.
CLOPIDOGREL (Clopidogrel Sandoz®)	Comprimidos de 75 mg	300 mg VO día previo al IAM. 75 mg/24h VO durante el resto del estudio.
ÁCIDO ACETIL SALICÍLICO (A.A.S Sanofi®)	Comprimidos de 500 mg	500 mg/24h VO desde un día antes de la inducción del IAM hasta fin de estudio.
SUCRALFATO (Laboratorios Guinama®)	Suspensión oral de 1 g	1 sobre/24h VO desde el inicio del estudio hasta su fin.
CEFTIOFUR CLORHIDRATO (Actionis®)	Suspensión inyectable 50 mg/ml	3 mg/kg vía intramuscular desde el día de la creación del IAM hasta 5 días después.
BUPRENORFINA (Bupaq®)	Inyectable de 0,3 mg/ml	1 ampolla intramuscular la tarde de la creación del IAM, a las 12 h y posterior a la administración IC.
FENTANILO (Fentanilo Matrix Kern Pharma®)	Parche transdérmico de 25µg/h	1 parche en piel tras la inducción del IAM.

Tabla 2: Terapia farmacológica aplicada a todos los animales en las diferentes fases del estudio.

3.2 Justificación del método

En este estudio hemos empleado la especie porcina, ya que existe amplia bibliografía que apoya su utilización como modelo experimental en la investigación traslacional de enfermedades cardiovasculares. Esto es debido a sus similitudes, tanto anatómicas como fisiológicas, con el ser humano en lo que se refiere al sistema cardiovascular (23,182,186,188,192,193,196).

Además de la especie animal, un aspecto muy importante para los experimentos cardiovasculares es la elección de la propia estrategia de creación del IM. Así podemos distinguir, por un lado, técnicas abiertas como la ligadura o colocación de clamps vasculares, asociadas a una mayor mortalidad y complicaciones quirúrgicas, como inflamación e

infecciones y peor calidad de imagen en la RMc debido a la presencia de aire y fibrosis en los tejidos adyacentes. Por otro lado, las técnicas cerradas o endovasculares, como el inflado de un balón de angioplastia o la colocación de coils en la arteria coronaria, tienen mejores resultados en cuanto a incidentes quirúrgicos y suponen la creación de un modelo más representativo del proceso clínico (23,187,194). Por tanto, en nuestro estudio, llevamos a cabo el modelo de IAM en la especie porcina a través de una técnica endovascular bajo guía fluoroscópica.

Un correcto modelo experimental tiene que cumplir una serie de criterios para que los resultados puedan extrapolarse al entorno clínico. Así, el modelo debe ser reproducible y mínimamente invasivo para disminuir las variables que influyan sobre el mismo, permitir el control del tamaño de infarto, la permeabilización de las arterias coronarias tras el insulto isquémico y minimizar las variables que pudieran influir en los resultados (53). Así, la técnica más cercana a estos requisitos es la oclusión temporal de la arteria interventricular paraconal a través del inflado de un balón de angioplastia. Este procedimiento permite la reperfusión de esta arteria (195,206) y es la más utilizada para los modelos experimentales debido a su accesibilidad, y a que el remodelado ventricular generado a partir de la oclusión de dicha arteria es muy parecido al del humano (195,207).

Por tanto, hemos utilizado el modelo de creación de IAM reperfundido mediante oclusión de la arteria interventricular paraconal por inflado de un balón de angioplastia en hembras de la especie porcina, ya que diversos estudios han referido peores supervivencias de los machos (198,203) por su mayor grosor del miocardio (198,208) y menor contenido en tejido conectivo cardíaco (198), generando así, una mayor susceptibilidad de los machos a desarrollar una insuficiencia cardíaca (198).

En las últimas décadas se han utilizado diferentes terapias celulares para intentar disminuir el tamaño del infarto y mejorar el remodelado ventricular posterior al mismo. Actualmente se considera que la acción beneficiosa de las células madre se debe a sus efectos paracrinos mediante la secreción de diversas sustancias (13,14). Entre ellas, se encuentran los factores de crecimiento y las citoquinas, como el VEGF, HGF o el FGF entre otros. El VEGF tiene capacidad angiogénica, sin embargo, produce un aumento de la permeabilidad vascular con el consiguiente edema, adhesión leucocitaria y expresión de moléculas de adhesión que provocan una inflamación excesiva comparado con el HGF (13,132,209). El FGF es igualmente angiogénico pero induce la maduración de la fibrosis a diferencia de la acción antifibrótica del HGF (132). Así, en nuestro estudio hemos utilizado el HGF ya que diversos estudios llevados a

cabo *in-vitro*, en modelo murino, porcino y canino, sostienen su gran actividad angiogénica, antiapoptótica, antiinflamatoria e inmunomoduladora, y por tanto, cardioregenerativa (13,14,22,132,135).

En cuanto a la forma de aplicación del tratamiento existen diferentes vías de administración (9). Entre ellas, hemos seleccionado la inyección IC con microencapsulación del factor de crecimiento, ya que permite su distribución uniforme en la región infartada y una liberación localizada de la terapia a lo largo de tres semanas, impidiendo la oclusión vascular de la zona, y permitiendo la llegada del tratamiento de manera gradual a la zona dañada (9,210). Esta vía de administración es trasladable a la clínica humana, ya que actualmente muchos pacientes con IAM reciben terapia de reperfusión (92,188). Además, es una técnica disponible en la mayoría de hospitales del mundo que requiere un entrenamiento mínimamente específico del especialista que lo aplica.

Respecto al momento de administración del tratamiento, sería conveniente realizarlo encontrando un equilibrio entre una terapia precoz y tardía respecto al desarrollo de las consecuencias del IM. Por tanto, hemos decidido instaurar la terapia en la fase subaguda del IM, a las 48 h del mismo, para poder obtener los beneficios terapéuticos del HGF sobre el tejido cardíaco.

3.3 Diseño experimental

El estudio (Figura 1), comienza con la creación de un IAM por vía endovascular en 21 hembras de especie porcina. Transcurridas 48 horas de la inducción del modelo, se realizaron las RMc de cada una de ellas y la posterior administración IC de la terapia en función del grupo de estudio. Como fase final del experimento se adquirieron nuevos estudios de RMc a las 10 semanas desde la creación del IM, se eutanasiaron a los animales y se extrajeron muestras cardíacas para el análisis histopatológico de cada uno de ellos.

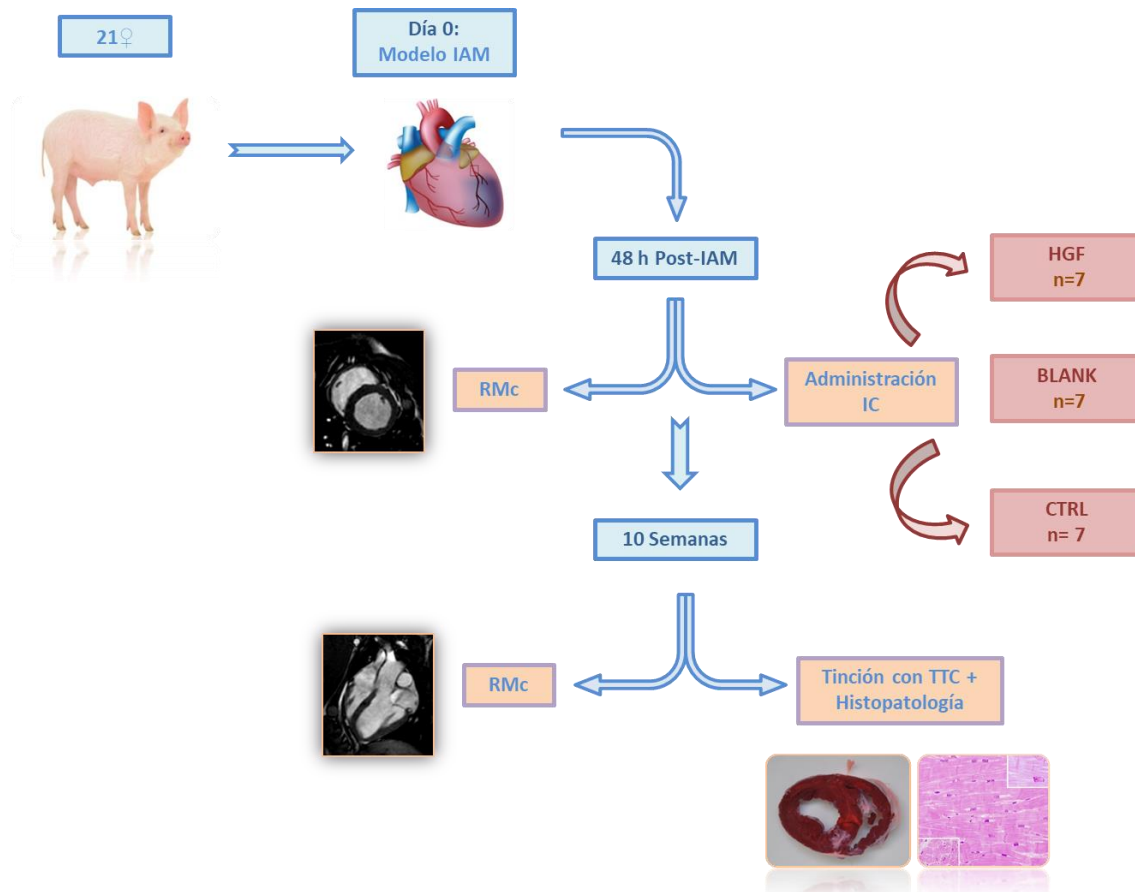


Figura 1: Esquema del diseño experimental del estudio. **IAM:** Infarto Agudo de Miocardio. **RMc:** Resonancia Magnética Cardíaca. **IC:** Intracoronaria. **HGF:** Grupo HGF microencapsulado. **BLANK:** Grupo microcápsulas placebo (vehículo). **CTRL:** Grupo control (suero). **TTC:** Cloruro de Trifeniltetrazolio.

3.4 Anestesia

Los protocolos anestésicos y/o analgésicos se realizaron en función del tipo de intervención, diferenciándose entre la inducción del modelo de IAM o la inyección IC de la terapia, y los estudios de imagen.

- **Protocolo de anestesia para la creación del modelo de IAM y la administración del tratamiento:**

Los animales fueron premedicados por vía intramuscular profunda con 0,2 mg/Kg de diazepam (Valium® 10mg/2ml solución inyectable. Roche Farma, S.A. Madrid, España) y 10 mg/Kg de ketamina (Ketamidor® 100mg/ml solución inyectable. Richter Pharma AG. Wels, Austria), para posteriormente, mediante la cateterización de la vena auricular marginal, inducir la anestesia

con 3 mg/kg de propofol 1% (Propofol Sandoz® 10 mg/ml emulsión inyectable, Sandoz Farmacéutica, S.A., Madrid, España) vía intravenosa. Posteriormente, los animales fueron intubados mediante tubos endotraqueales con neumotaponamiento de tamaño adecuado al peso del animal (nº 6.5-9.0). Una vez intubados, el mantenimiento anestésico fue llevado a cabo utilizando sevoflurano en oxígeno a una fracción espirada (EtSEVO) de 2-2,5%.

Los sujetos fueron conectados a un circuito circular semicerrado con ventilador, administrando un flujo de gas fresco inicial de 3 L/min. Tras alcanzar el plano anestésico adecuado se instaurará un FGF de 0,5-0,7 L/min. La ventilación se controló por volumen, programando una frecuencia respiratoria de entre 8-14 rpm y un volumen tidal de 8-10 ml/kg ajustados para obtener valores de normocapnia (35-45 mmHg de CO₂).

La analgesia intraoperatoria se obtuvo mediante la administración de 1 mg/kg de Ketorolaco (Ketorolaco Normon® 30mg/ml solución inyectable, Laboratorios Normon S.A., Madrid, España) vía intravenosa al inicio de la experiencia y de una infusión continua de 15-18µg/kg/h de remifentanilo (Remifentanilo Normon® 2 mg polvo para concentrado para solución inyectable, Laboratorios Normon S.A., Madrid, España). Se instauró fluidoterapia con suero salino fisiológico 0,9% (Solución para perfusión fisiológica B. Braun 0,9%, Braun Medical, Barcelona, España) a una velocidad de infusión de entre 5 y 10 ml/kg/h a través de la vena marginal de la oreja durante el mantenimiento anestésico.

Como terapia antiarrítmica los animales recibieron Lidocaína al 2% (Lidocaína B. Braun® 20 mg/ml solución inyectable, B.Braun Medical S.A., Barcelona, España) en infusión intravenosa continua (1 mg/kg/h), comenzando tras la estabilización anestésica inicial del animal y finalizando tras una hora de reperfusión post IAM. Previo a la oclusión coronaria, fue administrado un bolo de 1 mg/kg de Lidocaína 2%.

Una vez finalizado el procedimiento, los animales fueron recuperados de la anestesia mediante el cese de la administración del agente halogenado en el vaporizador e incrementando el FGF a 4-5 L/min para lavar el circuito anestésico. Como analgesia postoperatoria recibieron buprenorfina por vía intramuscular a una dosis de 10 µg/kg/12 h durante 1 día así como un parche transdérmico de fentanilo de 25 µg/h.

➤ **Protocolo de anestesia para los estudios de imagen:**

La premedicación, inducción anestésica e intubación traqueal fueron realizadas de igual manera que para la creación de IAM y la administración de la terapia. Una vez anestesiados, los animales pasaron a la sala de RM, realizándose el mantenimiento anestésico mediante sevoflurano en oxígeno. Los animales se mantuvieron con ventilación mecánica controlada por volumen ajustado para mantener valores de normocapnia. una infusión continua de NaCl 0,9 % (5-10 ml/kg/h) a través de la vena auricular marginal durante el procedimiento.

3.5 Inducción del modelo de IAM

Una vez premedicados, anestesiados e intubados, los animales fueron colocados en decúbito dorsal encima de la mesa de operaciones del quirófano de radiología, con extensión craneal y caudal de las extremidades anteriores y posteriores respectivamente. Seguidamente, se realizaron el rasurado y lavado quirúrgico de la zona infra-umbilical e inguinal para establecer el acceso vascular percutáneo en una arteria femoral (derecha o izquierda indistintamente) mediante la técnica de Seldinger modificada, utilizando una vaina introductora de 7 Fr (Terumo Corporation, Tokio, Japón). Tras su colocación, la heparinización sistémica del animal fue realizada con 150 UI/kg de heparina sódica endovenosa (Heparina Hospira® 5% solución inyectable, Hospira Invicta S.A, Madrid, España), administración que se repitió cada hora durante el proceso de la intervención.

La cateterización selectiva de la arteria coronaria izquierda fue llevada a cabo bajo guía fluoroscópica (BV Pulsera, Philips Medical Systems®, Best, Países Bajos). A través de la vaina femoral de 7 Fr se introdujo un catéter guía Hockey Stick® (Boston Scientific Inc., Natick, EEUU) de 6 Fr sobre una guía hidrofílica de 150 cm de longitud y 0,035 pulgadas (") (Terumo Corporation, Tokio, Japón) avanzándolo hasta el orificio de origen de la arteria coronaria izquierda.

En esta localización, fueron administrados 200 µg de nitroglicerina (Solinitrina® 1mg/ml, Kern Pharma, Barcelona, España), diluidos en suero salino fisiológico al 0,9% (Braun Medical, Barcelona, España), por vía IC como tratamiento profiláctico para posibles espasmos vasculares. Se efectuó una angiografía coronaria basal para medir el flujo coronario, en base a la escala TIMI (211,212), y el diámetro de la arteria interventricular paraconal, teniendo como referencia el diámetro de catéter guía, en el segmento inmediatamente distal al origen de la primera rama diagonal, zona diana de colocación del balón de angioplastia. Para realizar la coronariografía, se inyectó manualmente Amidotrizoico Ácido (Urografín, 76% Bayer Hispania,

S.L., Barcelona, España) como medio de contraste diluido al 50% con suero salino en la proyección Oblicuo Anterior Izquierdo (OAI) 40° (Figura 2).

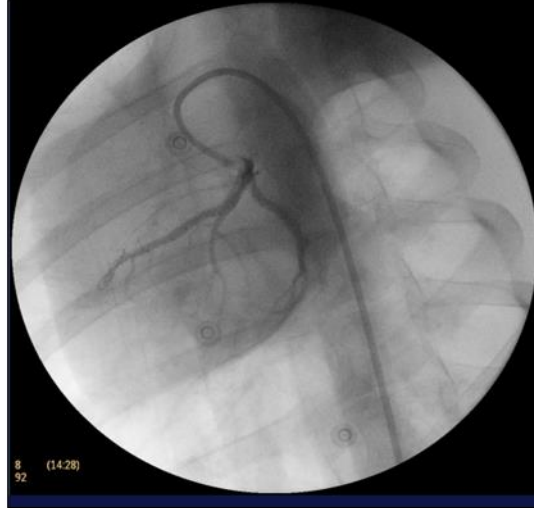


Figura 2: Angiografía coronaria en proyección OAI 40°.

Se avanzó una microguía de 0,014" (Spartacore 14®, Abbott Vascular, Santa Clara, EEUU) hasta la parte distal de dicha arteria para, sobre ella, colocar en la zona diana un balón de angioplastia coronaria (Xperience®, iVascular, Barcelona, España) de entre 2,5 y 3,5 mm de diámetro (en función del diámetro de la zona diana, 1:1,1) y 10 mm de longitud. Un bolus de 1 mg/kg de Lidocaína al 2% fue administrado previo a la oclusión coronaria. La insuflación del balón fue realizada con un manómetro (Encore®, Boston Scientific, Natick, EEUU) y la oclusión correcta del vaso fue comprobada mediante coronariografía (Figura 3A), manteniendo la interrupción del flujo vascular durante 90 minutos. La vigilancia y monitorización mediante ECG de los animales se mantuvo durante toda la intervención, con la finalidad de detectar los posibles cambios en el segmento ST (IAMCEST o IAMSEST), así como tratar, en caso necesario, arritmias o fibrilaciones con masaje cardíaco y/o un desfibrilador externo (Zoll M Series Bifásico 200J, Zoll Medical Corporation, Massachussets, EEUU).

Tras dicho intervalo de tiempo una nueva angiografía coronaria fue realizada para verificar la oclusión arterial completa en el periodo de isquemia. Seguidamente se llevó a cabo el desinflado y la retirada del balón y se comprobó la permeabilidad del vaso mediante otra coronariografía (Figura 3B) en base a la escala TIMI. Por último, el catéter y la vaina femoral fueron retirados, realizándose mediante compresión manual la hemostasia durante 10 minutos en el punto de acceso arterial.

Durante el periodo de reperfusión (60 minutos tras la inducción del infarto) los animales estuvieron monitorizados, bajo anestesia general, para tratar posibles arritmias malignas, procediéndose después a su recuperación anestésica y traslado a sus respectivos cubículos de alojamiento.

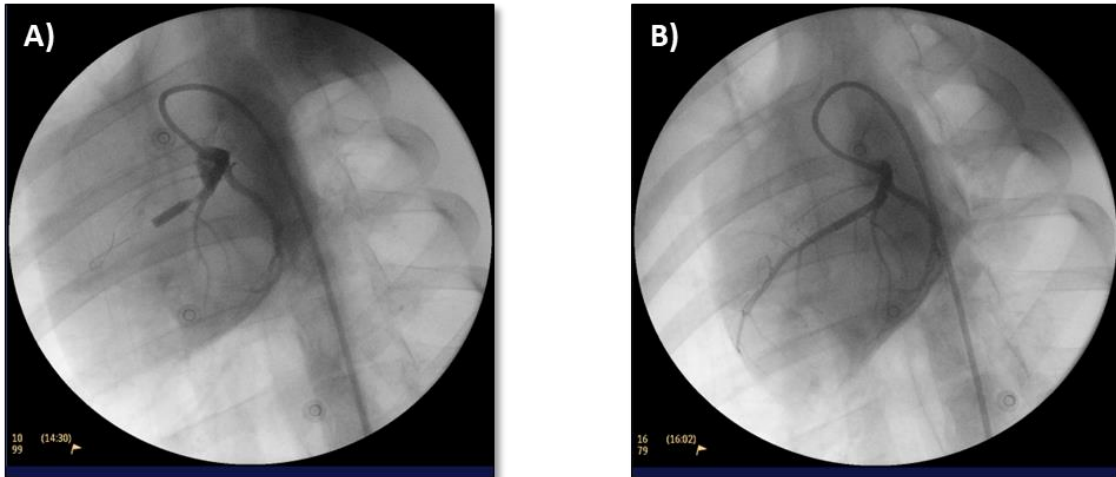


Figura 3: **A)** Coronariografía en proyección OAI 40° para la verificación de la correcta oclusión del vaso inmediatamente distal a la primera rama diagonal de la arteria interventricular paraconal. **B)** Coronariografía para comprobar la permeabilidad del vaso tras la retirada del balón de angioplastia.

Para la evaluación del daño miocárdico provocado por el modelo de isquemia-reperfusión, se determinaron los valores de las enzimas cardíacas TnI y CK-MB en los tiempos pre y post-infarto. Además, mediante la RMc realizada a las 48h de la creación del modelo, se obtuvieron los parámetros de funcionalidad cardíaca Fracción de Eyección (FE), Volumen Sistólico y Diastólico Finales indexados a la superficie corporal de cada animal (VSFi, VDFi). Igualmente en las imágenes de realce tardío, se calculó el porcentaje de infarto de miocardio (%IM) obtenido tras la inducción del modelo.

3.6 Resonancia magnética cardíaca

Transcurridos dos días desde la creación del modelo de IAM, se sometieron de nuevo los animales a una anestesia general (citado en el apartado 3.4: *Protocolo de anestesia para los estudios de imagen*) para la realización de un estudio de RMc (RM1) mediante un sistema de 1,5 Tesla (Intera 1,5 Tesla, Philips Medical Systems, Best, Países Bajos) con sistema de gradientes Nova (33mt/m; 160mt/m/ms) y una antena multicanal de 5 elementos específica para estudios cardíacos.

Se evaluaron funcional y morfológicamente los corazones de los 21 animales, incluyendo secuencias de funcionalidad y viabilidad con realce tardío. Las imágenes se obtuvieron con sincronismo cardiaco basado en vectocardiograma y en apnea.

En los estudios de RMc se incluyeron las siguientes adquisiciones:

-Secuencias en modo cine con estado estacionario de precesión libre para analizar la función ventricular (SENSE x 2, TR 2.4 ms, TE 1.2 ms, resolución espacial de 1.6 x 2 mm, 30 fases por ciclo, grosor de corte de 8 mm sin espaciado).

-Realce tardío de la escara miocárdica (secuencia 3D de eco de gradiente potenciado en T1, inversión-recuperación; retraso del pulso optimizado para la máxima supresión de la señal miocárdica mediante secuencia look-locker; TR 3.4 ms, TE 1.3 ms, resolución espacial 1.4 x 1.7 mm, grosor de corte de 5 mm, tiempo de inversión 200-300 ms).

Tanto las imágenes en modo cine como el realce tardío se obtuvieron en los mismos planos: eje corto (10-14 cortes consecutivos, cubriendo ambos ventrículos desde las válvulas auriculo-ventriculares hasta el ápex), 4 cámaras y eje largo (Figura 4). Las imágenes de realce tardío se adquirieron 10-15 minutos tras la administración de 0,2 mmol/kg de Gadobutrol (Gadovist® 1mmol/ml, Bayer Hispania, S.L., Barcelona, España).

Finalizado el estudio de RMc, los animales se trasladaron al quirófano de radiología donde se procedió a la administración de la terapéutica IC en función del grupo asignado.



Figura 4: Imágenes representativas de las secuencias en modo cine de la RMc obtenidas en los tres planos: **A)** Cuatro cámaras; **B)** Eje largo; **C)** Eje corto.

3.7 Preparación de la terapia

El vehículo y medio de protección del factor de crecimiento HGF fueron las microcápsulas, compuestas de polímeros biodegradables y de un tamaño máximo de 16 μm de diámetro (Figura 5). Estas microcápsulas, suministradas y fabricadas mediante tecnología patentada por Innocore Pharmaceuticals® y Nanomi®, se almacenaron hasta su uso en viales a una temperatura de -80°C en el CCMIJU, con una cantidad de 6 millones de microesferas cargadas de HGF (5%) o vacías por vial. Tras la descongelación se homogeneizó el contenido por agitación de los mismos. Se resuspendió cada vial en 10 ml de suero salino fisiológico con 5% de HSA (Albunorm®, solución para perfusión 50 g/l, Octapharma S.A., Madrid) ajustando la concentración a $0,5 \times 10^6$ microcápsulas por mililitro. Se contabilizaron las microesferas verificando que no existía agregación de las mismas con un contador automático (Countees Automated Cell Counter, Invitrogen®), de tal modo que el volumen a inyectar fue siempre de 10ml de solución y la dosis total de 5 millones de microcápsulas placebo o cargadas al 5% de HGF.

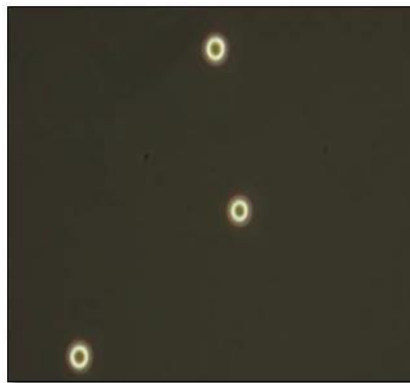


Figura 5: Fotografía representativa de las microcápsulas utilizadas como vehículo del tratamiento obtenida mediante microscopio.

3.8 Administración del tratamiento

El estudio fue ciego y aleatorizado de modo que la distribución de los tratamientos en grupos era información únicamente conocida por el personal de laboratorio de Terapia Celular del CCMIJU, la cual no se facilitó hasta la finalización del análisis de funcionalidad de los datos obtenidos por la RMc. Para la inyección IC de la terapia se colocaron los animales del mismo modo que para la creación del modelo de infarto y se estableció de nuevo, bajo condiciones de esterilidad, el acceso percutáneo de una arteria femoral. Se alcanzó la arteria interventricular

paraconal a la misma altura de la creación del infarto, inmediatamente distal al origen de la primera rama diagonal, con la misma técnica ya explicada anteriormente en el protocolo de la inducción del modelo. A través del catéter guía se inyectaron 150 µg de nitroglicerina para prevenir vasoespasmos coronarios. Seguidamente, se introdujo una microguía de 0,014" y 300 cm de longitud (Spartacore 14®, Abbott Vascular, Santa Clara, EEUU) sobre la que se desplazó un microcatéter de infusión de 3Fr y 150 cm de longitud (Microferret®, Cook, Bloomington, Indiana, USA) hasta la zona diana donde se había colocado el balón de angioplastia coronario durante la inducción del IM. Se retiró la microguía y se llevó a cabo la inyección de la terapia, a través del microcatéter a una velocidad de 1 ml/min hasta alcanzar un volumen total igual en los tres grupos de estudio de 10 ml (para asegurar el enmascaramiento del operador).

El protocolo de administración del tratamiento en los tres grupos fue el mismo: Una vez agitada suavemente la solución, se suministraron 2,5 ml de la terapia seguidos de una pausa de 3 min de espera para permitir la difusión del tratamiento, repitiéndose este ciclo de inyección cuatro veces hasta completar la solución (10 ml). En función del grupo de estudio, la terapia consistió en la inyección intracoronaria de:

- Grupo HGF microencapsulado (HGF; n=7): 5×10^6 de HGF microencapsulado (10 ml, $0,5 \times 10^6$ microesferas/ml, cargadas al 5% de HGF).
- Grupo Microcápsulas placebo (BLANK; n=7): 5×10^6 de microcápsulas sin HGF (10 ml, $0,5 \times 10^6$ microesferas/ml).
- Grupo Suero (CTRL; n=7): 10 ml de suero salino.

Se realizaron registros electrocardiográficos previos, durante y a la finalización de la administración de la terapia, así como monitorización de cada sujeto del estudio y analíticas sanguíneas previas y posteriores al procedimiento. Finalizado el tratamiento, se mantuvieron monitorizados bajo anestesia durante una hora para controlar y/o tratar posibles arritmias cardíacas. Posteriormente, se procedió a la recuperación anestésica de los animales y su traslado al animalario.

3.9 Analíticas sanguíneas

En todos los animales de cada grupo, se realizaron extracciones sanguíneas, a través de la vena cava craneal, en los siguientes tiempos:

- Pre y post infarto (T1 y T2).
- Pre y post administración de la terapia (T3 y T4).
- 24 horas posteriores al tratamiento (T5).

- 1 semana post-terapia (T6).
- Fin de estudio (10 semanas post-terapia) (T7).

Para facilitar las extracciones de sangre que no coincidían en tiempo con ninguna intervención del estudio, se utilizó únicamente la premedicación para sedar a los animales (citado en el apartado de anestesia).

En dichas muestras sanguíneas, se efectuaron estudios de hematología completa empleando el analizador automático BC-5300 Vet. (Mindray Bio-medical Electronics Co., LTD. China), estudios de diferentes parámetros bioquímicos determinados con el autoanalizador clínico Metrolab 2300 (UV-Vis Metrolab SA. Buenos Aires, Argentina) y de marcadores de daño miocárdico (Tnl/CK-MB) con el analizador de inmunoensayo para mediciones de marcadores cardíacos AQT90 FLEX (Radiometer Ibérica, SL. Madrid, España). Además, se llevó a cabo la determinación de un panel de citoquinas pro- y antiinflamatorias (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- α , IFN- γ , TFN- α) a partir de suero en un subgrupo de animales seleccionado al azar (n=5 de cada grupo) mediante análisis de citoquinas y otros factores en plasma circulante (Kit Luminex: Cytokine&Chemokine 9-Plex Porcine ProcartaPlex™ Panel 1). Este análisis se llevó a cabo para conseguir una monitorización del estado inmunológico e inflamatorio de los sujetos del estudio, con el objetivo de valorar tanto la evolución del estado inflamatorio como la respuesta a la terapia, elaborando un perfil exhaustivo de todos los factores estudiados. Para ello se utilizaron las muestras de suero obtenidas de las extracciones sanguíneas desde el tiempo T3 hasta T7.

3.10 Fin estudio: RMc y eutanasia

Transcurridas 10 semanas tras la administración terapéutica, se realizó el estudio final de RMc (RM2) según el protocolo ya descrito, así como el último control sanguíneo y una coronariografía para determinar el flujo coronario.

Seguidamente, se llevó a cabo la eutanasia de los animales mediante una dosis letal de cloruro potásico (KCl) en un plano profundo de anestesia general, bajo las recomendaciones recogidas en el Real Decreto 53/2013, de 1 de Febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales en experimentación y otros fines científicos, incluida la docencia (transposición de la Directiva 2010/63/EU del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de Septiembre de 2010). Una vez realizado este procedimiento, se trasladaron los animales a la sala de necropsias, donde se llevó a cabo un estudio *post-mortem* general y se

extrajeron los corazones para ser fotografiados, así como también se registraron el tamaño y localización de los infartos.

3.11 Histología

Una vez extraídos los corazones de los animales del estudio, se seccionaron transversalmente, a distintos niveles representativos de los cortes en eje corto obtenidos mediante RMc (Figura 6A). Dichas secciones, se introdujeron durante 10 minutos en una solución de Cloruro de Trifeniltetrazolio (TTC) a 37°C (213), para valorar el tamaño y la localización del infarto a nivel macroscópico (Figura 6B).

Se obtuvieron fotografías de estos cortes con una cámara digital para poder comparar macroscópicamente los resultados con los obtenidos en la RMc y en el estudio histológico.

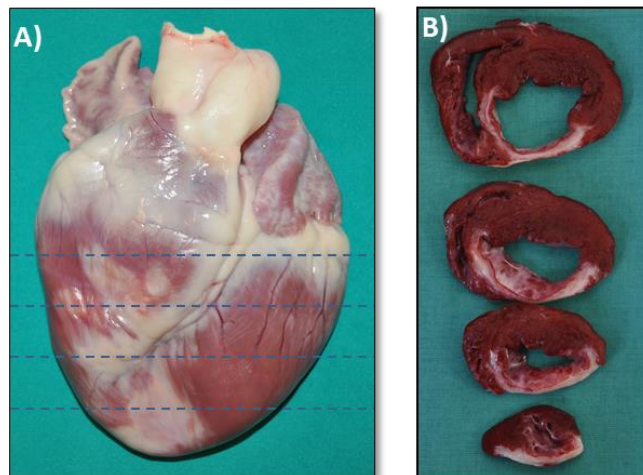


Figura 6: **A)** Representación de los diferentes niveles donde se realizan las cortes transversales del corazón; **B)** Secciones transversales del corazón obtenidas tras el corte y teñidas con TTC.

Dichas secciones se almacenaron en duquesas con formaldehído al 10% para posteriormente tomar muestras del VI de las zonas que macroscópicamente revelaron la presencia de infarto.

Las secciones se enumeraron desde el ápex (Nivel 1, N1) hasta la zona basal (N5) y se adquirieron muestras de cada animal en los mismos niveles (N3 y N4) para posteriormente realizar el análisis histopatológico de cada una de ellas.

Para la determinación de las lesiones del tejido a nivel estructural, fibrosis miocárdica así como la posible angiogénesis, inflamación y calcificación en los 3 grupos de estudio se utilizaron las tinciones de Hematoxilina-Eosina (H.E.) y Tricrómico de Masson (T.C.M.) con verde brillante. En cuanto a los parámetros de inflamación y calcificación se determinó el grado de severidad

de las lesiones en los dos niveles (N3 y N4) estudiados. Así, la determinación “-“(sin cambios) indicó ausencia de lesiones en la totalidad de la muestra. El valor “+” (ligero-moderado) se atribuyó a las alteraciones de severidad ligera-moderada de pequeña propagación en la muestra. El valor “++” (moderado) implicó cambios importantes con un aumento en cuanto a severidad y extensión de las lesiones. El valor “+++” (grave) supuso lesiones graves en gran parte de la muestra.

Sin embargo para el IM, la necrosis/apoptosis, fibrosis y angiogénesis se estableció la escala de valoración de las lesiones con “-“ y “+”, correspondiéndose respectivamente con la ausencia o presencia de las mismas. Además se valoró la presencia de cicatriz hipertrófica en la muestra (Q) en la determinación de la fibrosis, así como la existencia de edema subendotelial en arteriolas de calibre intermedio en la angiogénesis.

3.12 Evaluación del tratamiento

➤ **Seguridad**

Se utilizaron diferentes pruebas para valorar la seguridad de la inyección IC en los tres grupos de estudio:

- Coronariografía: Valoración de la calidad del flujo coronario (escala TIMI) previa y posterior a la infusión IC, así como al final del estudio.
- Analíticas: determinación de TnI, hematología, bioquímica y citoquinas desde antes de la inyección (T3) hasta el fin de estudio (T7).
- ECG: detección de cambios producidos durante el procedimiento, como alteraciones del segmento ST y diferentes arritmias cardíacas posibles asociadas a la intervención.

También se tuvieron en cuenta los posibles cambios de coloración, prurito o inflamación en la piel y/o mucosas de los animales durante la inyección de la terapia, así como los días posteriores a la misma.

➤ **Eficacia**

Para determinar la eficacia del tratamiento se valoraron los cambios en los parámetros obtenidos mediante RMc, en los tiempos 48 horas post-IAM y 10 semanas post-tratamiento. Comparando entre ellos, se determinaron la existencia de mejora de la funcionalidad cardíaca, indicada por incrementos en la fracción de eyección (%FE), y la limitación del remodelado ventricular (VSFi, VDFi), así como la reducción del tamaño de infarto (%IM).

A nivel histológico se evaluó la existencia de neovascularización y angiogénesis, así como la fibrosis y necrosis miocárdica, como parámetros relacionados con la efectividad de la terapia.

3.13 Análisis estadístico

Para el estudio estadístico se utilizó el programa estadístico SPSS 15.0 (SPSS, Inc, Chicago, Ill, EEUU).

Una vez obtenidos todos los resultados del estudio, se realizó el análisis estadístico del mismo. Para ello, se llevó a cabo la prueba de normalidad (Shapiro Wilk ($n < 30$)).

Para las variables que cumplían una distribución normal se utilizaron las pruebas de Anova (comparación entre los 3 grupos), T Student (entre 2 grupos) y prueba T para muestras relacionadas (intragrupos). En aquellas variables que no se determinó una distribución normal se aplicaron las pruebas de Kruskal-Wallis (3 grupos), U Mann-Whitney (2 grupos) y Wilcoxon (intragrupos). Se consideró significativo un nivel de $p < 0,05$.

El análisis de datos de las RMc se realizó comparando los resultados a tiempos de estudio 48 horas post- infarto (pre-tratamiento) y a las 10 semanas de la administración de la terapia y entre los tres grupos del estudio.

Para el estudio de las citoquinas se incluyeron los tiempos T3, T4, T5, T6 y T7 y para los flujos coronarios T1, T2, T3, T4 y T7.

4. RESULTADOS

Los resultados del estudio se presentan organizados por procedimientos: inducción del modelo, administración de la terapia, seguimientos de RMc y fin de estudio.

Todos los animales incluidos en el estudio mostraron en su examen clínico basal un estado de salud normal, así como los resultados de hematología y bioquímica iniciales se encontraron dentro de los rangos establecidos para la especie porcina.

4.1 Inducción del modelo

4.1.1 Mortalidad

Tres animales murieron durante la creación del IM, antes de la distribución en grupos siendo reemplazados para obtener un total de 7 animales por grupo, por lo que el modelo se creó en un total de 24 animales. Por tanto, la mortalidad asociada al procedimiento de inducción del modelo de IM fue del 12,5%.

El primero de ellos sufrió un episodio de FV a los 30 minutos de la oclusión del vaso, por lo que se estableció el protocolo estándar de reanimación cardiopulmonar (RCP) mediante masaje cardíaco, 10 descargas eléctricas con un desfibrilador a 200 Julios (J) y farmacoterapia, sin que el animal respondiera a las maniobras de RCP.

El segundo de ellos experimentó dos episodios de FV. En primer lugar, a los 5 minutos del inflado del balón, respondiendo a la RCP tras 10 descargas eléctricas a 200J y masaje cardíaco. La FV recidivó a los 30 minutos de la oclusión coronaria, resultando imposible su recuperación tras 20 descargas a 200J, masaje cardíaco y medicación.

El tercer animal desarrolló FV a los 30 minutos de la restricción del flujo coronario. Tras 10 descargas de 200J, masaje cardíaco y farmacoterapia como establece el protocolo estándar, no fue posible su recuperación.

4.1.2 ECG

De todos los sujetos del estudio que sobrevivieron a la inducción del modelo de infarto, un 61,90 % (13 animales) sufrió FV. Estas alteraciones del ECG se produjeron mayoritariamente tras la oclusión de la arteria coronaria, y sólo en un caso, tras el desinflado del balón de angioplastia (Tabla 3).

Animal	Nº Descargas (200 J)	Momento Aparición FV
P01	1	65 min oclusión
P02	0	-
P03	0	-
P04	1	30 min oclusión
P05	0	-
P06	0	-
P07	0	-
P08	0	-
P09	1	30 min oclusión
P10	2	30 y 60 min oclusión
P11	1	30 min oclusión
P12	0	-
P13	3	35 min oclusión
P14	1	30 min oclusión
P15	0	-
P16	8	30 min oclusión
P17	2	30 min oclusión
P18	3	30, 40 y 65 min oclusión
P19	5	30 min oclusión
P20	5	30 min oclusión
P21	3 (+1)	30 min oclusión (+desinflado)
Media±dt	1,76±2,19	-
Mediana	1,00	-

Tabla 3: Número de descargas realizadas con el desfibrilador así como el momento de aparición de la FV en cada uno de los sujetos que sobrevivieron a la creación del modelo.

En todos los casos se observó un aumento del segmento ST (Figura 7 A y B) tras el inflado del balón, alteración electrocardiográfica presente en este tipo de IAM.

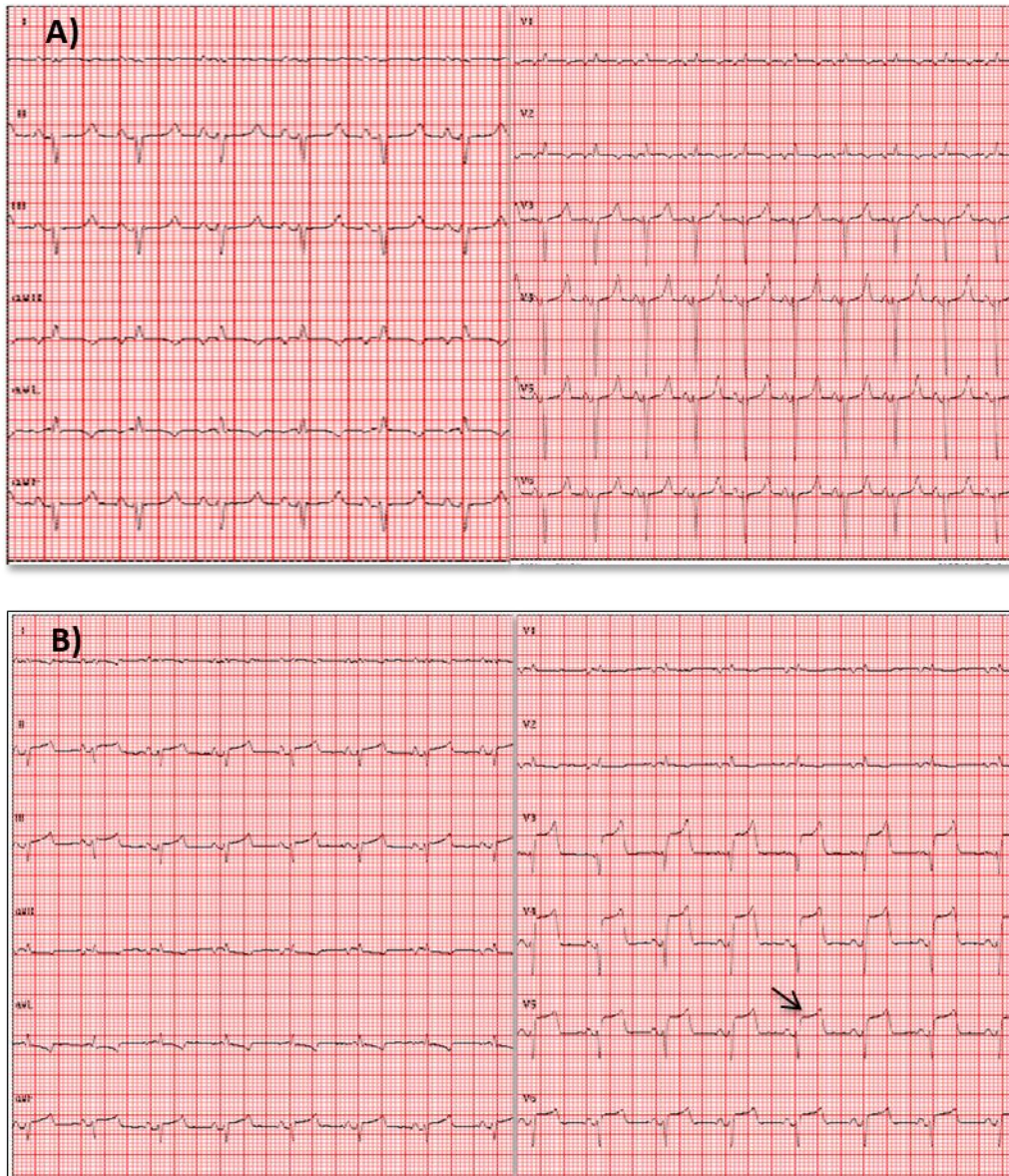


Figura 7: ECG de uno de los sujetos del estudio (P03), previo a la inducción del modelo (A) sin ningún tipo de alteración electrocardiográfica y tras la creación del infarto (B) con aumento del segmento del ST en todas las derivaciones (señalado con la flecha en V5).

4.1.3 Flujo Coronario

En todos los animales del estudio se observó, previo a la inducción del modelo, un flujo coronario basal normal (TIMI 3).

En 10 de los animales que sobrevivieron a la creación del IAM, el origen de la primera rama de la arteria interventricular paraconal se encontraba en el primer cuarto del recorrido de la misma, mientras que en los sujetos restantes (11 individuos) dicho origen era distal (Figura 8).

La oclusión de la arteria coronaria para la creación del IM fue correcta en todos los casos, eliminándose el flujo sanguíneo a partir del punto de inflado del balón (Figura 9).

Respecto a la coronariografía post-procedimiento para la confirmación de la reperfusión, la mayoría de los sujetos del estudio mostraron un flujo arterial normal, excepto un animal en el cual disminuyó a TIMI 2 (P09).

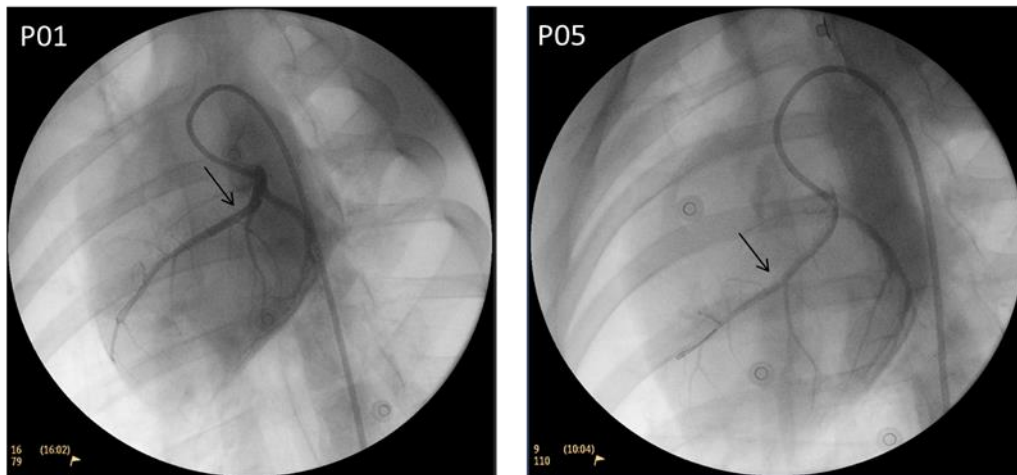


Figura 8: Angiografías coronarias basales en proyección OAI 40º de un animal (P01) representativo de los sujetos que mostraron el origen de la primera rama de la arteria interventricular paraconal en el primer cuarto del recorrido de la misma y de otro individuo (P05) representativo de los que lo hicieron de manera más distal que los anteriores.

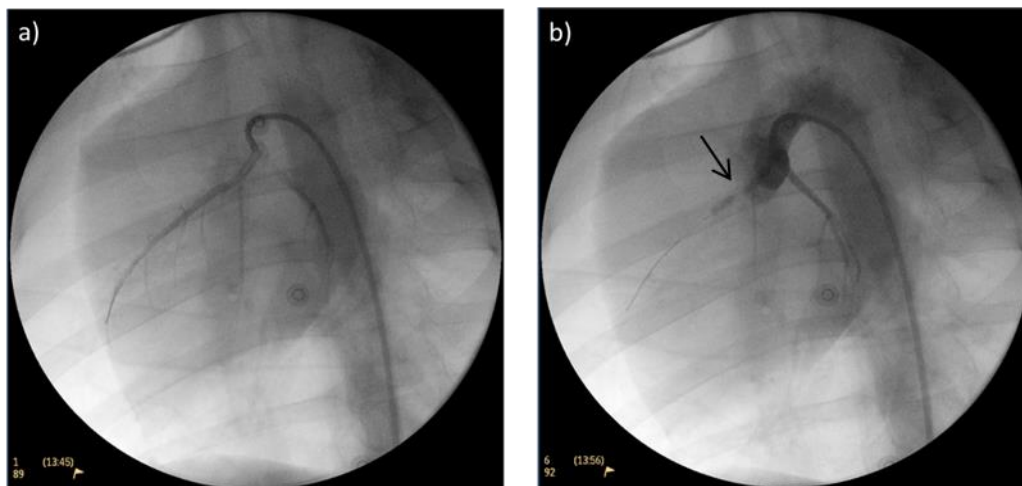


Figura 9: a) Coronariografía basal en proyección OAI 40º de un sujeto del estudio (P10) con flujo TIMI 3; b) Comprobación de la oclusión de la arteria coronaria a partir del punto de inflado del balón (indicado mediante una flecha), manteniéndose permeable la primera rama diagonal.

4.1.4 Enzimas cardíacas

En todos los animales del estudio las determinaciones basales de la enzima cardíaca Tnl mostraron valores normales con una media de $0,024 \pm 0,021 \mu\text{g/l}$.

Tras la reperfusión, se detectó un ascenso significativo de los valores de esta enzima cardíaca respecto a su valor inicial ($p=0,000$; *Wilcoxon*) (Tabla 4).

ANIMAL	T1	T2
P01	0,01	16,00
P02	0,01	3,40
P03	0,01	4,90
P04	0,06	16,00
P05	0,05	4,90
P06	0,01	8,70
P07	0,01	0,06
P08	0,04	12,00
P09	0,01	5,60
P10	0,03	18,00
P11	0,02	2,20
P12	0,02	34,00
P13	0,10	13,00
P14	0,03	8,00
P15	0,03	2,80
P16	0,01	5,20
P17	0,01	3,70
P18	0,01	20,00
P19	0,01	6,60
P20	0,01	5,50
P21	0,01	17,00
Media\pmdt	0,02\pm0,02	9,88\pm8,06

Tabla 4: Valores de la Tnl de cada uno de los sujetos del estudio y Media \pm desviación típica en los tiempos basal (T1) y post-reperfusión (T2).

4.2 Administración de la terapia

Hay que destacar que si bien la administración de la terapia fue ciega, se presentan los resultados una vez retirado dicho enmascaramiento.

Se administró a los animales del estudio, previamente a la infusión del tratamiento, una dosis de $150 \mu\text{g}$ de nitroglicerina para la prevención de vasoespasmos, excepto en 6 casos de los cuales en 4 de ellos (P06, P14, P20, P21) debido a una baja presión arterial, se decidió

suministrar la mitad de la dosis. Además, en dos sujetos (P16, P18) no se realizó su administración debido a una hipotensión severa.

4.2.1 Flujo coronario

La inyección IC de la terapia se realizó con éxito en todos los animales del estudio, a excepción del sujeto P18 (Tabla 5). Este animal del grupo 2, inició la fase de infusión de la terapia con un flujo coronario de TIMI 2 y además, no se pudo administrar la nitroglicerina debido a la hipotensión severa que presentaba. Tras el segundo bolo del tratamiento aparecieron arritmias cardíacas que derivaron en FV por lo que se activó sin éxito el protocolo de RCP, produciéndose la muerte del animal.

ANIMAL	Grupo	TIMI pre-tratamiento	TIMI post-tratamiento
P10	1	3	3
P11	1	3	3
P19	1	2	2
P20	1	2	2
P21	1	2	2
P06	1	2	2
P09	1	2	2
P12	2	3	2
P13	2	2	2
P14	2	3	3
P15	2	3	2
P16	2	3	2
P17	2	2	2
P18	2	2	-
P01	3	3	3
P02	3	3	3
P03	3	2	2
P04	3	2	2
P05	3	2	1
P07	3	3	2
P08	3	2	2

Tabla 5: Flujos coronarios de cada uno de los sujetos del estudio en los tiempos pre-tratamiento (T3) y post-tratamiento (T4).

A pesar de que en el resto de animales se llevara a cabo la infusión completa (Figura 10), se observaron ciertas alteraciones del flujo coronario en algunos casos que al retirar el enmascaramiento resultaron pertenecer a los grupos 2 y 3.

En el animal P05 del grupo 3, se observó una disminución del flujo coronario de TIMI 2 al inicio del tratamiento a TIMI 1 al finalizar el mismo.

En el caso P08 perteneciente al grupo 3, el animal comenzó con un flujo coronario de TIMI 2 previo al tratamiento. Tras la infusión completa de la terapia se observó un flujo de TIMI 1, por lo que se inyectaron otros 100µg de nitroglicerina, recuperándose un TIMI 2 como al inicio del tratamiento.

Los sujetos P12, P15, P16 (grupo 2) y el P07 (grupo 3), sufrieron un empeoramiento del flujo de TIMI 3 a TIMI 2 tras la administración de la terapia.

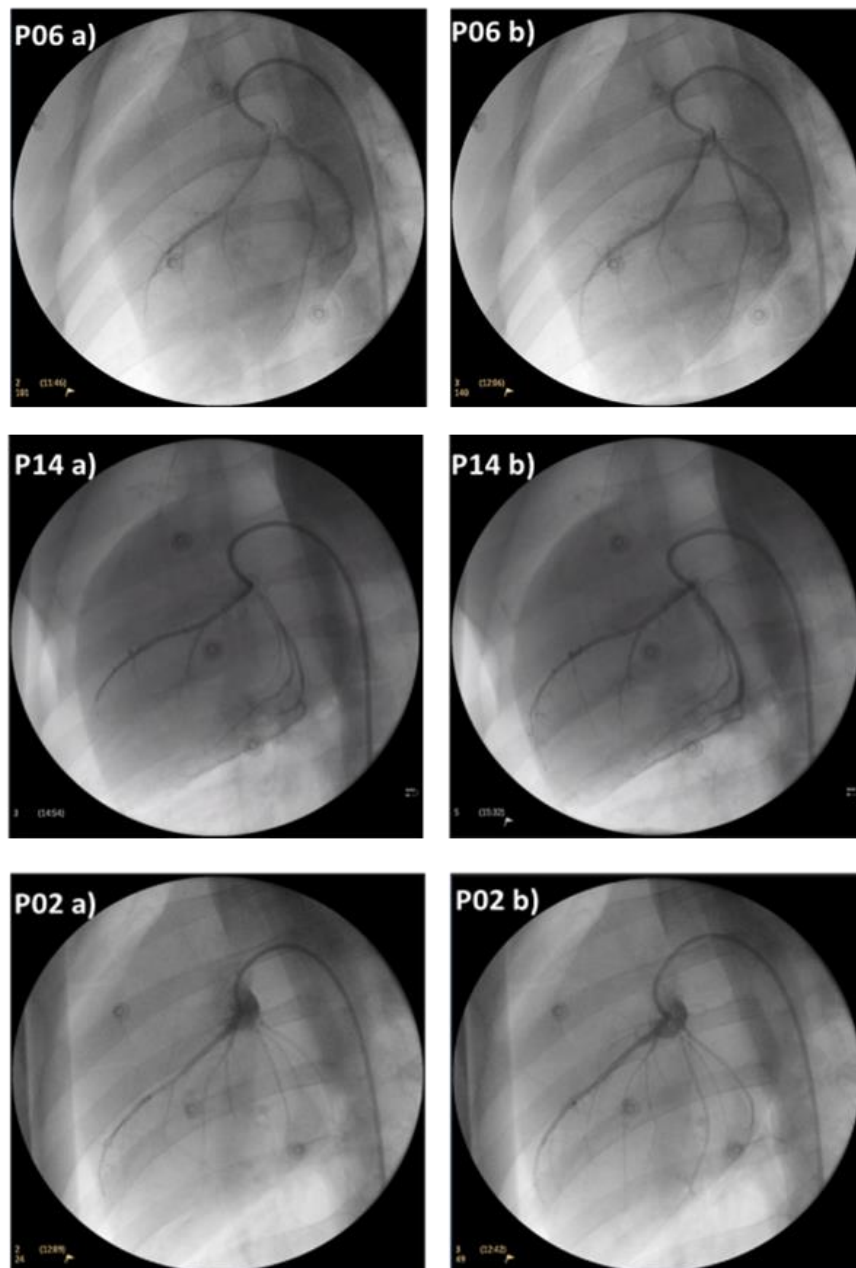


Figura 10: Angiografías coronarias realizadas en proyección OAI 40º previas a la inyección del tratamiento (a) y en el momento post-inyección (b) en un animal representativo del grupo 1 (P06), grupo 2 (P14) y grupo 3 (P02).

4.2.2 ECG

Los animales no mostraron cambios electrocardiográficos relevantes asociados a la administración intracoronaria (Figura 11 A y B), a excepción del sujeto del grupo 2 (P18) que sufrió FV durante la inyección de la terapia y finalmente murió, como se ha mencionado en el apartado anterior.

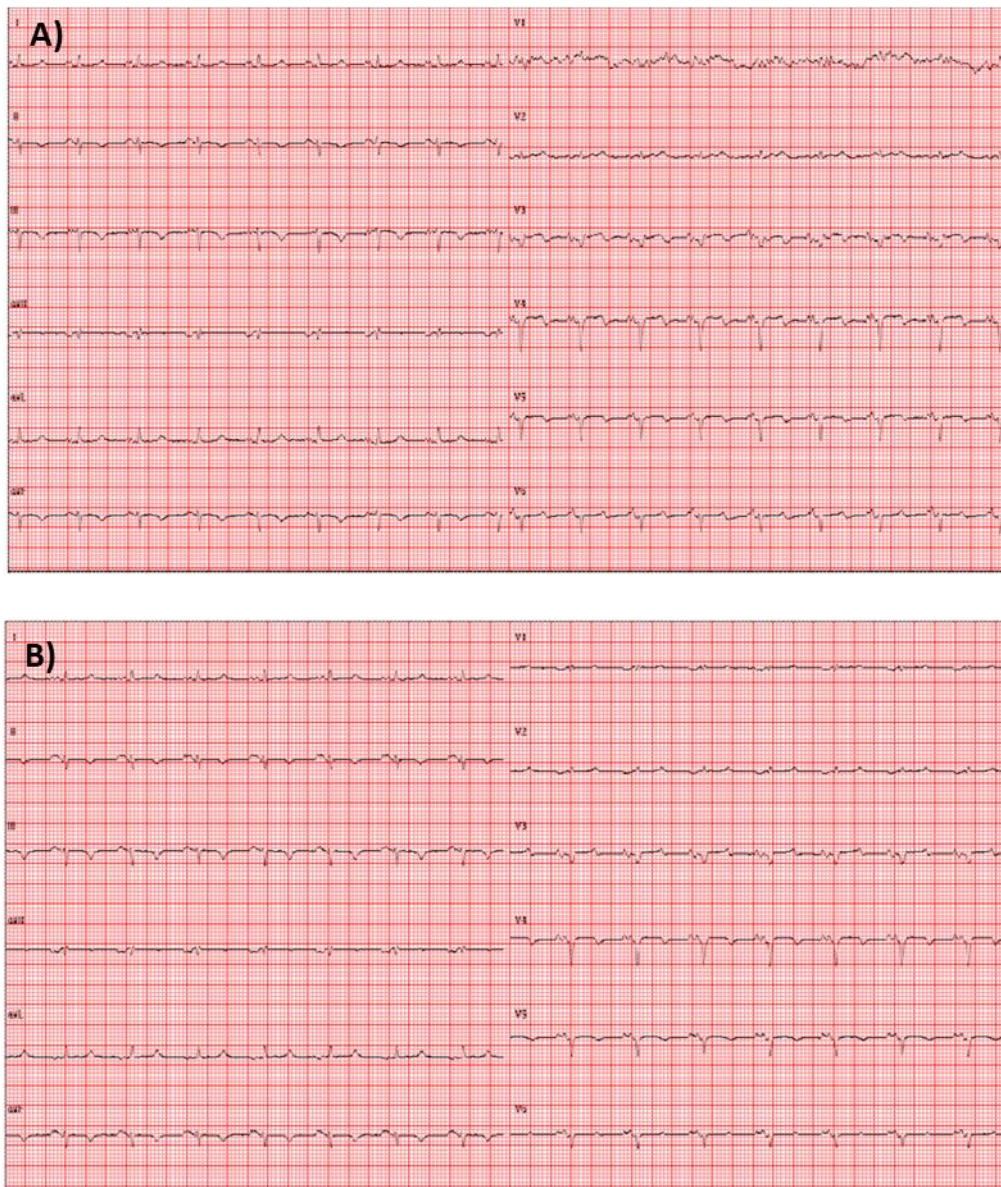


Figura 11: Registro electrocardiográfico de un sujeto del estudio (P05) en el que no se observan cambios entre el examen pre-inyección (A) y post-inyección (B).

4.2.3 Enzimas cardíacas

Las determinaciones de la Tnl previas a la administración de la terapia no resultaron ser estadísticamente diferentes entre los grupos de estudio (Grupo 1-2-3: $p=0,650$; *Kruskal Wallis*; Grupo 1-2: $p=0,609$; Grupo 1-3: $p=0,655$; Grupo 2-3: $p=0,371$; *U Mann-Whitney*).

Tampoco lo fueron en T4 tras finalizar el tratamiento ($p=0,264$; *Kruskal Wallis*; Grupo 1-2 $p=0,317$; Grupo 1-3 $p=0,481$; Grupo 2-3 $p=0,116$; *U Mann-Whitney*).

A las 24h del tratamiento se observaron diferencias significativas entre los tres grupos de estudio ($p=0,071$; *Kruskal Wallis*). En la comparativa post-hoc, los resultados de la prueba *U Mann-Whitney* sólo mostraron diferencias significativas entre los grupos 2 y 3 ($p=0,03$; *U Mann-Whitney*). Sin embargo, dichas diferencias habían desaparecido a la semana de la administración de la terapia entre los diferentes grupos ($p>0,05$; *Kruskal Wallis*; $p>0,05$; *U Mann-Whitney*).

En cuanto a las variaciones del valor de esta enzima cardíaca a lo largo del tiempo (Tabla 6; Figura 12), no se observó aumento significativo del mismo entre T3 y T4 en ninguno de los grupos de estudio (Grupo 1 $p=0,268$; Grupo 2 $p=0,225$; Grupo 3 $p=0,735$; *Wilcoxon*).

Sin embargo, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en todos ellos comparando el resto de tiempos, disminuyendo el valor de la Tnl en todos los casos (Entre T4-T5: Grupo 1 $p=0,018$; Grupo 2 $p=0,028$; Grupo 3 $p=0,028$; Entre T5-T6 Grupo 1 $p=0,018$; Grupo 2 $p=0,028$; Grupo 3 $p=0,018$; *Wilcoxon*).

Grupo	Tnl T3	Tnl T4	Tnl T5	Tnl T6
1	11,65±6,45	10,57±5,11	7±4,17	0,18±0,24*
2	12,97±12,92	7,98±4,03	3,59± 2,87	0,08±0,06*
3	12,6±5,58	12,43±5,96*	7,7± 3,09	0,17±0,16*

Tabla 6: Medias ± desviaciones típicas de la enzima cardíaca Tnl ($\mu\text{g/L}$) de los tres grupos en los tiempos T3 (Pre-tratamiento), T4 (Post-tratamiento), T5 (24h post-tratamiento) y T6 (1 semana post-tratamiento). * $p<0,05$.

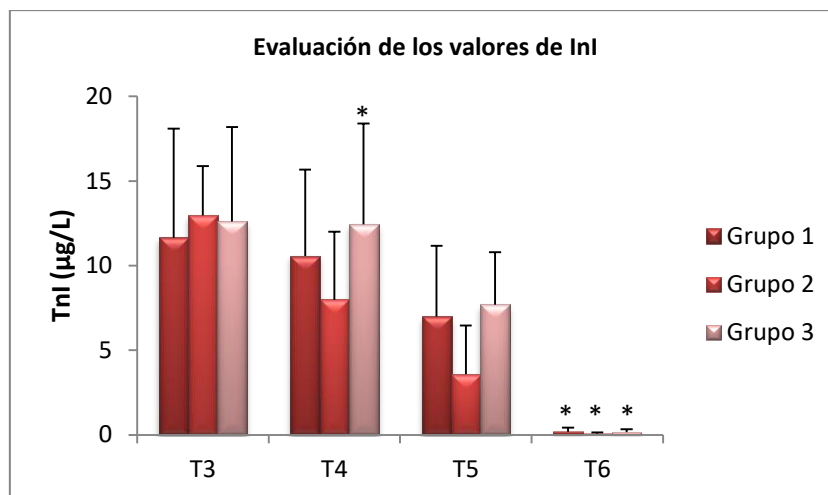


Figura 12: Valores medios \pm desviación típica de la TnI ($\mu\text{g/L}$) en los tres grupos del estudio en los tiempos T3 (pre-inyección), T4 (post-inyección), T5 (24h tras la inyección) y T6 (1 semana post-inyección).

4.2.4 Citoquinas

Se presentan únicamente los datos relativos a IFN- α , IFN- γ , IL1- β , IL-12, IL-6 e IL-8 ya que los valores correspondientes a las citoquinas IL-4, IL-10 y TNF- α en la mayoría de los animales se encontraron por debajo del rango mínimo de detección del sistema utilizado para su medición (Tabla 7), por lo que no se pudieron realizar las determinaciones estadísticas correspondientes.

Citoquina	Valor mínimo	Valor máximo
IL-4	1,44	5.900
IL-10	3,76	15.400
TNF- α	6,47	26.500
IFN- α	0,81	3.300
IFN- γ	4,98	20.400
IL1- β	3,74	15.300
IL-12	45,14	184.900
IL-6	7,67	31.400
IL-8	15,77	64.600

Tabla 7: Valores mínimos y máximos de detección (pg/ml) de las citoquinas estudiadas mediante el Kit Luminex: Cytokine&Chemokine 9-Plex Porcine ProcartaPlex™ Panel 1.

○ IFN- α

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos de estudio

en ningún tiempo (T3 $p=0,995$; T4 $p=0,898$; T5 $p=0,835$; T6 $p=0,781$; T7 $p=0,898$; *Kruskal Wallis*) (Tabla 8; Figura 13 A).

Del mismo modo tampoco se observaron diferencias en las pruebas *post hoc* entre los diferentes pares de grupos ($p>0,05$ en todos los casos; *U Mann-Whitney*)

De manera similar ocurrió en las comparaciones de cada grupo a lo largo del tiempo ($p>0,05$; *Wilcoxon*).

Grupo	T3	T4	T5	T6	T7
1	7,34±6,52	6,27±3,18	21,7±19,7	1,67±1,14	598,6±843,88
2	8,30±8,27	6,98±7,32	34,39±54,85	4,81±5,52	3,33±1,93
3	6,35±5,04	6,99±2,42	13,47±12,84	1,38±0,93	5,07±6,05
Media±dt	7,49±6,46	6,75±4,84	23,30±33,93	2,84±3,68	173,9±450,40

Tabla 8: Medias \pm desviaciones típicas de los valores de IFN- α (pg/ml) de los tres grupos en los tiempos T3 (Pre-tratamiento), T4 (Post-tratamiento), T5 (24h post-tratamiento), T6 (1 semana post-tratamiento) y T7 (fin estudio).

○ IFN- γ

No se detectaron diferencias estadísticamente significativas para IFN- γ entre los 3 grupos de estudio en ningún tiempo ($p>0,05$; *Kruskal Wallis*) (Tabla 9; Figura 13 B).

Sin embargo, sí se observaron diferencias para esta citoquina entre los grupos 1 y 2 en el tiempo 6 ($p= 0,025$; *U Mann-Whitney*), pero no entre los grupos 1-3 ni 2-3 en ninguno de los tiempos de estudio ($p>0,05$ *U Mann-Whitney*).

En las comparaciones a lo largo del tiempo dentro de cada grupo sólo se registraron diferencias significativas en el grupo 1 entre los tiempos T3-T6 y T3-T7 ($p=0,043$ y $p=0,042$; *Wilcoxon*).

Grupo	T3	T4	T5	T6	T7
1	0,60±0,12*	1,58±1,23	0,93±0,59	1,15±0,38	1,27±1,08
2	0,97±0,80	0,94±0,80	0,86±0,48	0,65±0,17*	1,64±2,15
3	0,93±0,58	0,84±0,34	0,64±0,19	1,11± 1,13	0,87± 0,36
Media±dt	0,83± 0,56	1,12± 0,87	0,81± 0,44	0,97 ±0,68	1,26 ± 1,34

Tabla 9: Medias \pm desviaciones típicas obtenidas de los valores de IFN- γ (pg/ml) de los tres grupos en los tiempos T3 (Pre-tratamiento), T4 (Post-tratamiento), T5 (24h post-tratamiento), T6 (1 semana post-tratamiento) y T7 (fin estudio). * $p<0,05$.

○ **IL1-β**

En esta citoquina no se registraron diferencias significativas entre los 3 grupos en ningún tiempo ($p>0,05$; *Kruskal Wallis*). En las comparativas post hoc por pares de grupos sólo se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos 1 y 2 en T7 ($p=0,032$; *U Mann-Whitney*).

Dentro de cada grupo a lo largo de los tiempos de estudio tampoco se evidenciaron diferencias significativas ($p>0,05$; *Wilcoxon*) (Tabla 10; Figura 13 C).

Grupo	T3	T4	T5	T6	T7
1	13,87±9,85	11,91±7,26	12,66±11,55	20,40±6,21	53,18±25,28*
2	7,44±7,69	5,29±1,39	17,74±17,48	8,44±9,57	7,03±3,66
3	27,05±16,28	33,29±36,87	38,06±29,94	21,17±7,07	20,80±19,65
Media±dt	16,40±13,83	16,83±22,67	25,64±23,91	17,20±8,51	25,47±26,01

Tabla 10: Medias ± desviaciones típicas de los valores de IL1-β (pg/ml) de los tres grupos en los tiempos T3 (Pre-tratamiento), T4 (Post-tratamiento), T5 (24h post-tratamiento), T6 (1 semana post-tratamiento) y T7 (fin estudio). * $p<0,05$.

○ **IL-12**

En esta determinación, no se encontraron diferencias entre los tres grupos en ningún tiempo ($p>0,05$; *Kruskal Wallis*) ni por pares de grupos (Grupo 1-2: $p>0,05$; Grupo 1-3: $p>0,05$; Grupo 2-3: $p>0,05$; *U Mann-Whitney*) (Tabla 11; Figura 13D).

Sin embargo, en la comparación de cada grupo en los tiempos de estudio se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los siguientes casos: Grupo 1 T3-T6 ($p=0,043$), T4-T6 ($p=0,043$); Grupo 2: T4-T6 ($p=0,043$), T4-T7 ($p=0,043$); Grupo 3: T5-T6 ($p=0,043$); *Wilcoxon*.

Grupo	T3	T4	T5	T6	T7
1	322,15±227,77	300,84±235,51	332,58±193,55	845,32±900,33*	1164,07±2044,82
2	403,65±342,96	285,74±230,14*	568,03±460,35	510,54±305,68	644,94±476,37
3	312,03±188,53	272,65±136,82	242,30±185,97	495,02±266,97*	190,77±17,76
Media±dt	345,94±245,73	286,41±190,97	380,97±318,33	616,96±533,75	666,59±1195,40

Tabla 11: Medias ± desviaciones típicas de los valores de IL-12 (pg/ml) de los tres grupos en los tiempos T3 (Pre-tratamiento), T4 (Post-tratamiento), T5 (24h post-tratamiento), T6 (1 semana post-tratamiento) y T7 (fin estudio). * $p<0,05$.

○ IL-6

No se registraron diferencias significativas entre los 3 grupos de estudio en ningún tiempo

($p > 0,05$; *Kruskal Wallis*) (Tabla 12; Figura 13 E).

Asimismo, entre los grupos 1-2, 1-3, 2-3 no se observaron diferencias en ningún tiempo ($p > 0,05$; *U Mann-Whitney*).

En el grupo 2 todos los valores de esta citoquina se obtuvieron por debajo del rango de detección en T4. En T5 en este mismo grupo no se obtuvieron suficientes determinaciones válidas de la IL-6 para poder realizar los estudios estadísticos correspondientes. En las comparativas del resto de tiempos no se encontraron diferencias para este grupo, así como en los grupos 1 y 3 a lo largo de los diferentes tiempos de estudio ($p > 0,05$; *Wilcoxon*).

Grupo	T3	T4	T5	T6	T7
1	65,47±45,98	61,44±45,93	44,43±39,90	56,11±29,11	153,38±193,05
2	54,31±32,97	-	59,01±61,89	67,26±26,58	72,44±38,14
3	164,71±105,93	129,80±80,64	55,56±43,38	118,37±94,65	125,41±172,29
Media±dt	107,10±88,76	88,60±75,28	53,20±44,97	83,91±67,61	116,04±129,39

Tabla 12: Medias ± desviaciones típicas de los valores de IL-6 (pg/ml) de los tres grupos en los tiempos T3 (Pre-tratamiento), T4 (Post-tratamiento), T5 (24h post-tratamiento), T6 (1 semana post-tratamiento) y T7 (fin estudio).

○ IL-8

Para la citoquina IL-8, no se encontraron diferencias significativas entre los 3 grupos en ningún tiempo ($p > 0,05$; *Kruskal Wallis*) (Tabla 13; Figura 13 F). Sin embargo, entre grupos sólo se detectaron diferencias significativas entre el grupo 2 y 3 en T6 ($p = 0,009$; *U Mann-Whitney*).

En la comparativa intragrupos, se observaron diferencias estadísticamente significativas en los siguientes casos: Grupo 1: T3-T6; T4-T6 ($p = 0,043$); Grupo 2: T3-T5; T3-T6; T4-T6; T6-T7; ($p = 0,043$); Grupo 3: T3-T5; T3-T6; T3-T7; T4-T5; T4-T6; T4-T7; T5-T6 ($p = 0,043$); (*Wilcoxon*).

Grupo	T3	T4	T5	T6	T7
1	35,89±21,55	36,16±45,08	57,87±61,07	202,61±164,82*	80,47±45,54
2	49,73±25,91*	52,58±55,95	181,12±158,57	315,51±61,85*	113,54±78,99
3	25,88±14,56*	23,19±13,97*	59,87±19,05*	160,50±36,55	128,52±164,20
Media±dt	37,17±22,08	37,31±41,06	99,62±109,15	226,21±117,58	107,51±102,52

Tabla 13: Medias ± desviaciones típicas de los valores de IL-8 (pg/ml) de los tres grupos en los tiempos T3 (Pre-tratamiento), T4 (Post-tratamiento), T5 (24h post-tratamiento), T6 (1 semana post-tratamiento) y T7 (fin estudio). * $p < 0,05$.

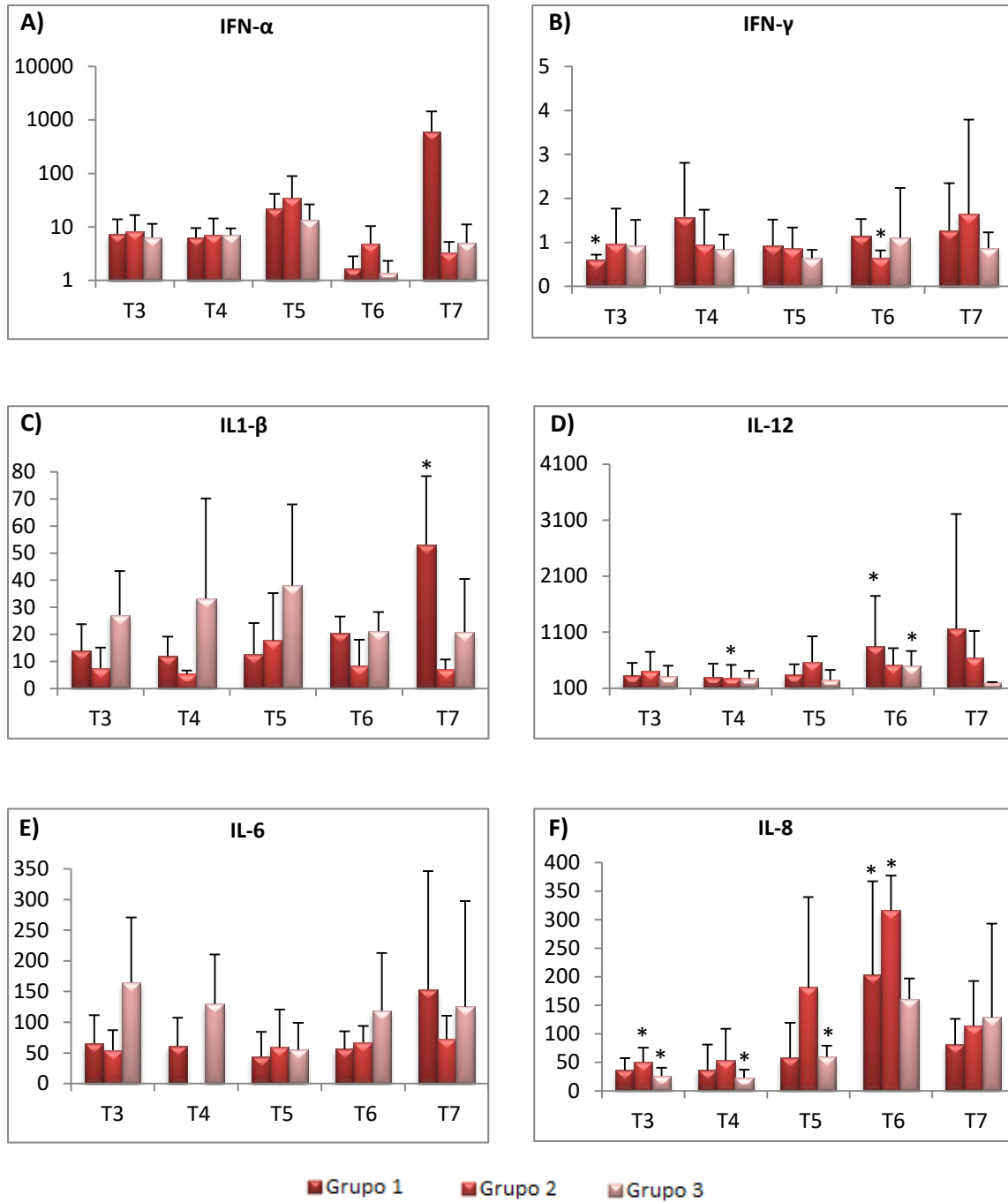


Figura 13: Representación gráfica de los valores medios \pm desviaciones típicas de IFN- α (A), IFN- γ (B), IL1- β (C), IL-12 (D), IL-6 (E) e IL-8 (F) (pg/ml) de los tres grupos de estudio en los tiempos T3, T4, T5, T6 y T7. * $p < 0,05$.

4.3 Seguimientos de RMc

4.3.1 Evaluación del tamaño de IM

El tamaño de los IM obtenidos en la RM1 tras la inducción del modelo fluctuó entre un 14% y un 37% y en la RM2 entre un 2% y un 14% (Figura 14). Los valores medios \pm desviaciones típicas del tamaño de IM de los tres grupos en los tiempos pre-tratamiento y fin de estudio se muestran en la Tabla 14.

- *Entre grupos*: No se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos del estudio en ningún tiempo ($p > 0,05$; *Kruskal Wallis*). En las comparativas *post hoc* el grupo 2 mostró el mayor %IM inicial medio ($20,14 \pm 5,40\%$). Sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas respecto al grupo 1 ($19,71 \pm 7,82\%$; $p = 0,650$, *U Mann-Whitney*) ni al grupo 3 ($19,33 \pm 3,27\%$; $p = 0,471$, *U Mann-Whitney*). El grupo 2 obtuvo el porcentaje medio de infarto final más bajo ($8,75 \pm 3,30\%$) comparado con el grupo 1 ($9,14 \pm 4,26\%$) y grupo 3 ($10,86 \pm 2,03\%$), sin alcanzar diferencias significativas entre los mismos ($p = 0,636$ y $p = 0,437$; *U Mann-Whitney*, respectivamente).

Grupo	% IM RM1	% IM RM2	Δ MI
1	$19,71 \pm 7,83$	$9,14 \pm 4,26^*$	$-10,57 \pm 6,37$
2	$20,14 \pm 5,40$	$8,75 \pm 3,30$	$-14,80 \pm 7,01$
3	$19,33 \pm 3,27$	$10,86 \pm 2,04^*$	$-8,83 \pm 4,31$

Tabla 14: Valores medios \pm desviaciones típicas del tamaño de infarto de miocardio (%) de los tres grupos en los tiempos pre-tratamiento (RM1), fin de estudio (RM2), así como su variación entre estos dos tiempos (Δ MI). * $p < 0,05$

- *En cada grupo*: En los grupos 1 y 3 se observaron diferencias significativas entre los tamaños de IM de la RM1 y de la RM2 (Grupo 1: $p = 0,016$; Grupo 3: $p = 0,031$; *Wilcoxon*) al contrario que en el grupo 2 ($p = 0,125$; *Wilcoxon*), con una disminución de los tamaños medios en todos ellos al final del experimento. Así, el grupo 2 mostró el mayor descenso de %IM (Tabla 14, Figura 15 y 16) a lo largo del estudio (Δ MI: $-14,80 \pm 7,01\%$), mientras que el grupo 3 experimentó la menor disminución del área de infarto (Δ MI: $-8,83 \pm 4,31\%$).

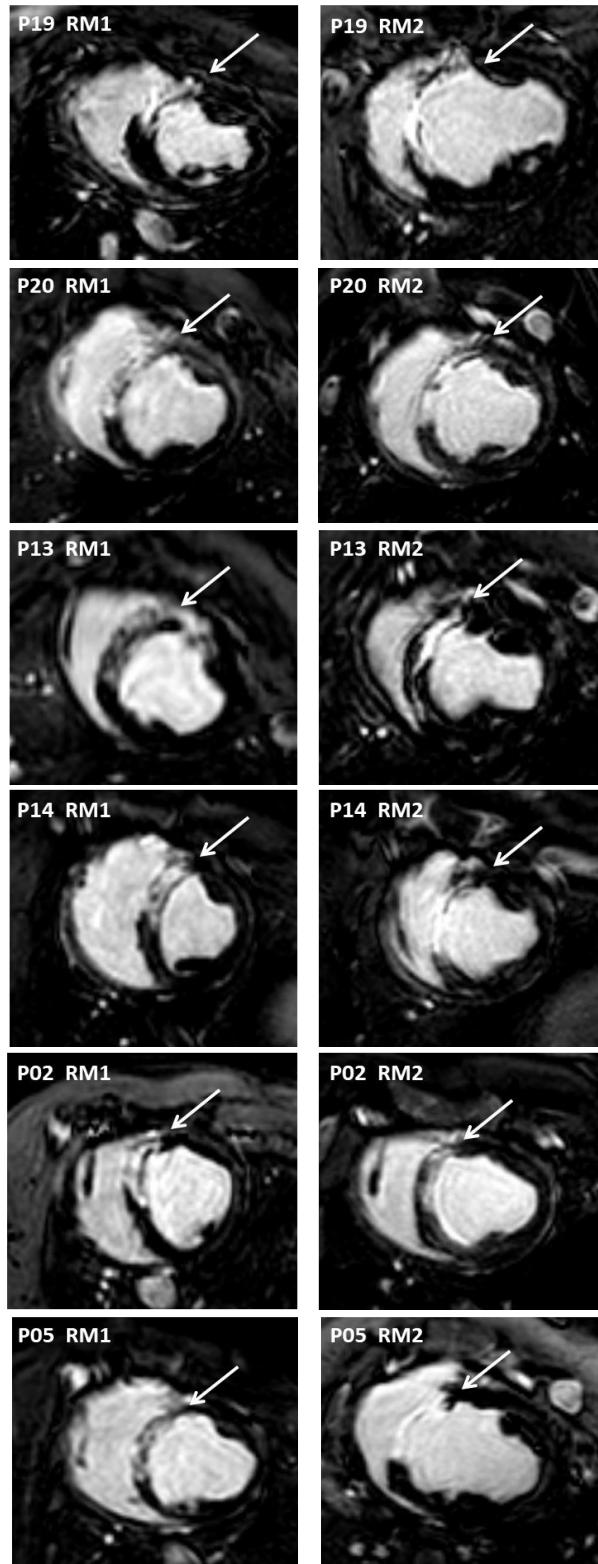


Figura 14: Imágenes de RMc de la secuencia de viabilidad de dos sujetos del estudio representativos de cada grupo: grupos 1 (P19 y P20), 2 (P13 y P14) y 3 (P02 y P05) en los tiempos pre-tratamiento (RM1) y fin de estudio (RM2) en las que se señala la zona del infarto de miocardio mediante una flecha.

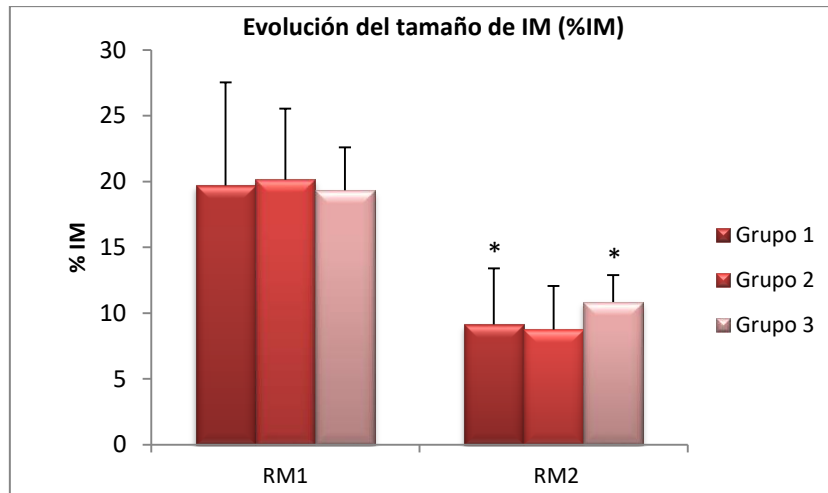


Figura 15: Evolución del tamaño de infarto de miocardio (%) \pm desviaciones típicas en los tres grupos en los tiempos pre-tratamiento (RM1) y fin de estudio (RM2).

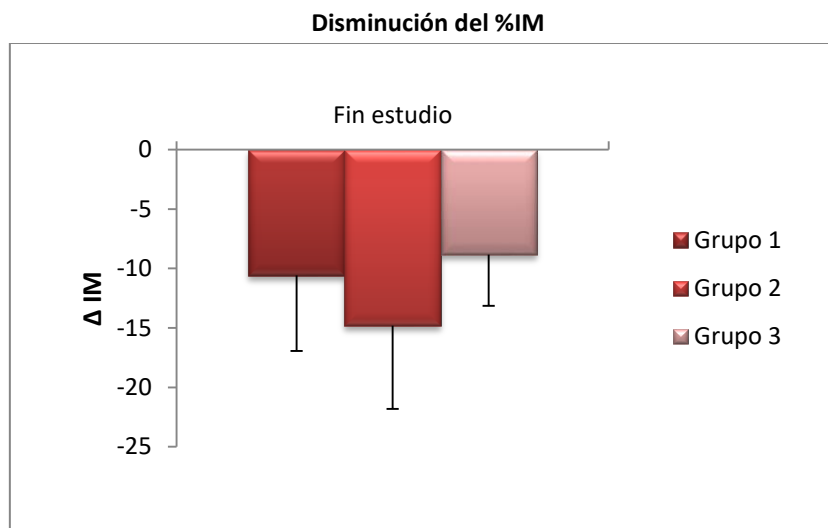


Figura 16: Representación gráfica de los valores del Δ IM \pm desviaciones típicas en la RMc de fin de estudio.

4.3.2 Funcionalidad cardíaca

Como indicadores de funcionalidad cardíaca se midieron los parámetros de FE, VDFi y VSFi.

○ FE:

No se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos del estudio en ningún tiempo ($p > 0,05$; Anova). Asimismo, tras la creación del infarto todos los grupos presentaron una FE media similar, sin existir diferencias significativas entre ellos (Grupo 1-2: $p = 0,862$; Grupo 1-3: $p = 0,541$; Grupo 2-3: $p = 0,542$; T Student).

En los tres grupos se observó un aumento de la FE en el fin de estudio (Tabla 15, Figura 17), siendo éste estadísticamente significativo en el grupo 1 ($p=0,031$; *T para muestras relacionadas*) y en el grupo 3 ($p=0,036$; *T para muestras relacionadas*). Sin embargo, no se encontró significación estadística en el grupo 2 ($p=0,179$; *T para muestras relacionadas*).

En la RM2, el grupo 1 obtuvo el mayor valor de FE ($36,29\pm 7,85\%$) sin encontrarse diferencias significativas respecto a los otros grupos del estudio para este parámetro de funcionalidad cardíaca (Grupo 1-2: $p= 0,437$; Grupo 1-3: $p=0,153$; Grupo 2-3: $p=0,856$; *T Student*). Así, el aumento más notorio de la FE se observó en el grupo 1 ($26,43 \pm 9,36\%$ en RM1 y $36,29\pm 7,85\%$ en RM2) y el menor incremento se produjo en el grupo 2 ($25,71\pm 4,96\%$ en RM1 y $31,8\pm 10,23\%$ en RM2).

Grupo	FE (%) RM1	FE (%) RM2	Δ FE
1	26,43 \pm 9,36	36,29 \pm 7,85*	9,86 \pm 9,30
2	25,71 \pm 4,96	31,80 \pm 10,23	6,2 \pm 8,53
3	23,57 \pm 7,50	30,86 \pm 5,01*	7,28 \pm 7,16

Tabla 15: Valores medios \pm desviaciones típicas de la fracción de eyección (FE) (%) de los tres grupos en los tiempos pre-tratamiento (RM1) y fin de estudio (RM2), así como su variación entre estos dos tiempos (Δ FE). * $p<0,05$.

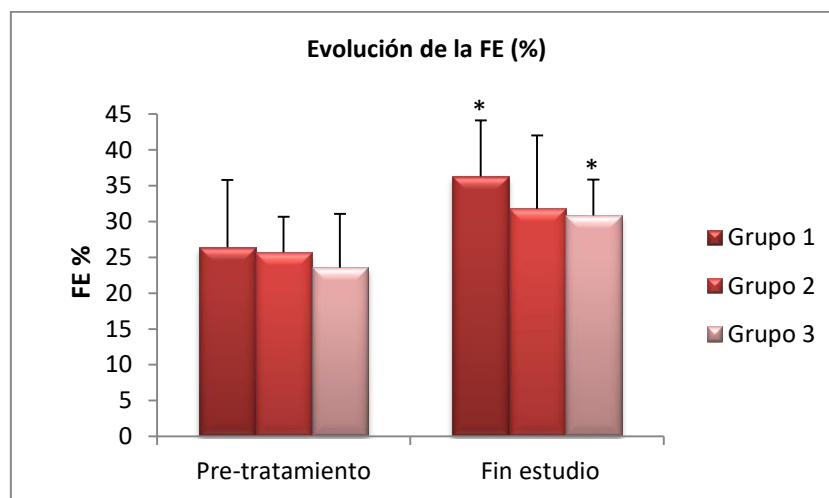


Figura 17: Representación gráfica de la evolución de la fracción de eyección (FE) (%) en los tres grupos en los tiempos pre-tratamiento (RM1) y fin de estudio (RM2). * $p<0,05$.

○ **VDFi:**

Entre los tres grupos del estudio no se observaron diferencias significativas en ningún tiempo ($p>0,05$; *Anova*).

En RM1 el valor medio del VDFi fue de $67,57 \pm 16,10 \text{ ml/m}^2$ en el grupo 1, de $68,45 \pm 10,08 \text{ ml/m}^2$ en el grupo 2 y de $79,81 \pm 13,59 \text{ ml/m}^2$ en el grupo 3, sin existir diferencias significativas entre ellos (Grupo 1-2: $p=0,905$; Grupo 1-3: $p=0,151$; Grupo 2-3: $p=0,103$; *T Student*).

Todos los grupos evidenciaron un aumento del VDFi en RM2 (Tabla 16, Figura 18), sin ser estadísticamente significativo en ninguno de ellos (Grupo 1 $p=0,124$; Grupo 2: $p=0,302$; Grupo 3: $p=0,240$; *T muestras relacionadas*).

Al final del estudio el grupo 3 mostró el valor más elevado de VDFi ($89,25 \pm 15,95 \text{ ml/m}^2$) y el grupo 2 el menor de ellos ($74,29 \pm 13,27 \text{ ml/m}^2$). Sin embargo, para este tiempo no se observaron diferencias significativas entre los tres grupos del estudio (Grupo 1-2: $p=0,276$; Grupo 1-3: $p=0,748$; Grupo 2-3: $p=0,108$; *T Student*).

Grupo	VDFi RM1	VDFi RM2	Δ VDFi
1	$67,57 \pm 16,10$	$85,91 \pm 21,55$	$18,34 \pm 27,11$
2	$68,45 \pm 10,08$	$74,29 \pm 13,27$	$7,06 \pm 13,33$
3	$79,81 \pm 13,59$	$89,25 \pm 15,95$	$9,44 \pm 19,16$

Tabla 16: Valores medios \pm desviaciones típicas del volumen diastólico final indexado (VDFi) (ml/m^2) de los tres grupos en los tiempos pre-tratamiento (RM1) y fin de estudio (RM2), así como su variación entre estos dos tiempos (Δ VDFi).

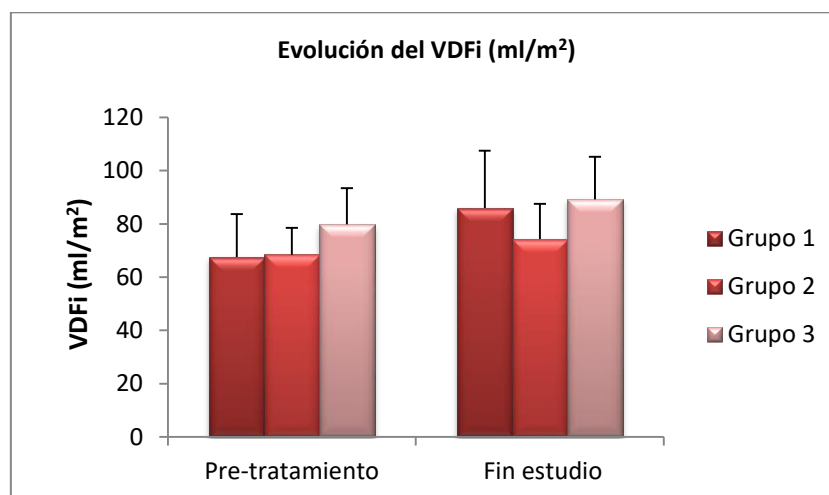


Figura 18: Representación gráfica de la evolución del volumen diastólico final indexado (VDFi) (ml/m^2) en los tres grupos en los tiempos pre-tratamiento (RM1) y fin de estudio (RM2).

○ **VFSi:**

En cuanto al VFSi, no se evidenciaron diferencias significativas entre los tres grupos del estudio en ningún tiempo ($p>0,05$; *Anova*).

El grupo 3 evidenció el mayor valor medio para este parámetro en RM1 ($61,58 \pm 15,01 \text{ ml/m}^2$), aunque no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de estudio (Grupo 1-2: $p=0,977$; Grupo 1-3: $p=0,233$; Grupo 2-3: $p=0,134$; *T Student*).

En RM2 no se observó un aumento significativo del VSFi en ningún grupo (Tabla 17, Figura 19). Asimismo, no se encontraron diferencias significativas intragrupos (Grupo 1: $p=0,610$; Grupo 2: $p=0,885$; Grupo 3: $p=0,948$; *T muestras relacionadas*) ni entre los tres grupos del experimento (Grupo 1-2: $p=0,600$; Grupo 1-3: $p=0,537$; Grupo 2-3: $p=0,172$; *T Student*).

Grupo	VSFi RM1	VSFi RM2	Δ VSFi
1	$50,64 \pm 17,45$	$56,01 \pm 20,77$	$5,37 \pm 26,44$
2	$50,86 \pm 8,66$	$50,83 \pm 12,23$	$0,72 \pm 10,54$
3	$61,58 \pm 15,01$	$62,05 \pm 13,95$	$0,47 \pm 18,12$

Tabla 17: Valores medios y desviaciones típicas del volumen sistólico final indexado (VSFi) (ml/m^2) de los tres grupos en los tiempos pre-tratamiento (RM1) y fin de estudio (RM2), así como su variación entre estos dos tiempos (Δ VSFi)

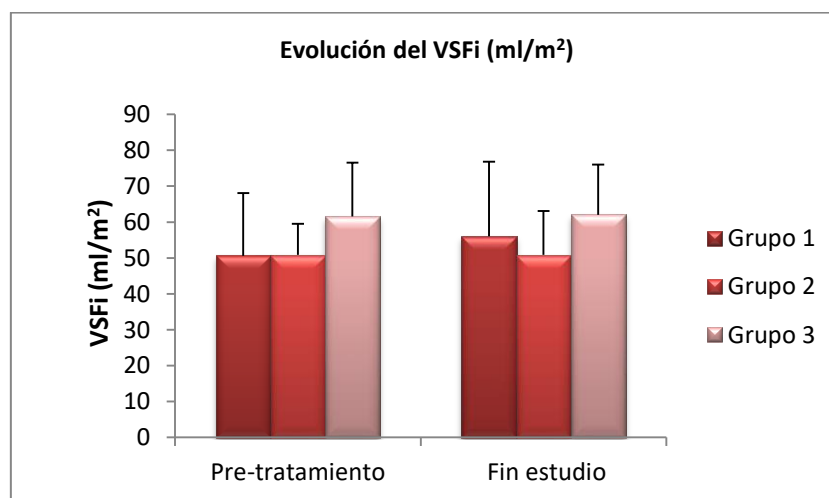


Figura 19: Representación gráfica de la evolución del volumen sistólico final indexado (VSFi) (ml/m^2) en los tres grupos en los tiempos pre-tratamiento (RM1) y fin de estudio (RM2).

En la valoración objetiva de las imágenes obtenidas de la secuencia de cine de la RM2, no se apreciaron diferencias en el grosor de la pared ventricular entre los diferentes grupos del estudio (Figuras 20 y 21).

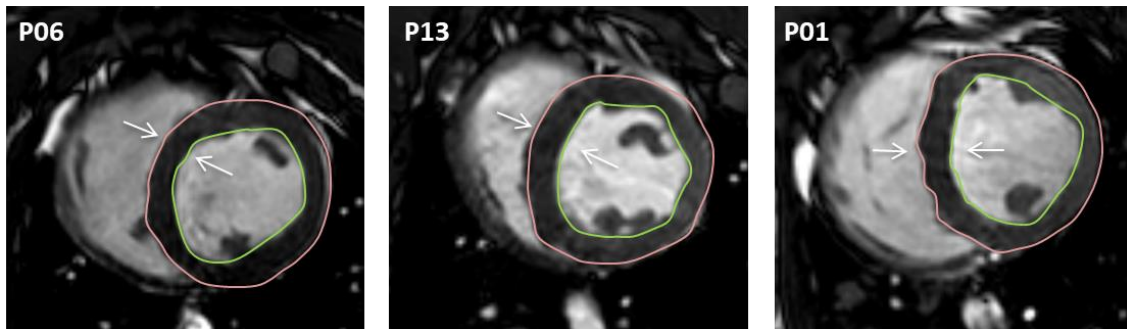


Figura 20: Imágenes de la RM2 obtenidas de la secuencia cine en EC (Eje corto) de los animales P06, P13 y P01 representativos de los grupos 1, 2 y 3 respectivamente, en las que no se aprecian diferencias en el grosor de la pared ventricular (indicado con flechas).

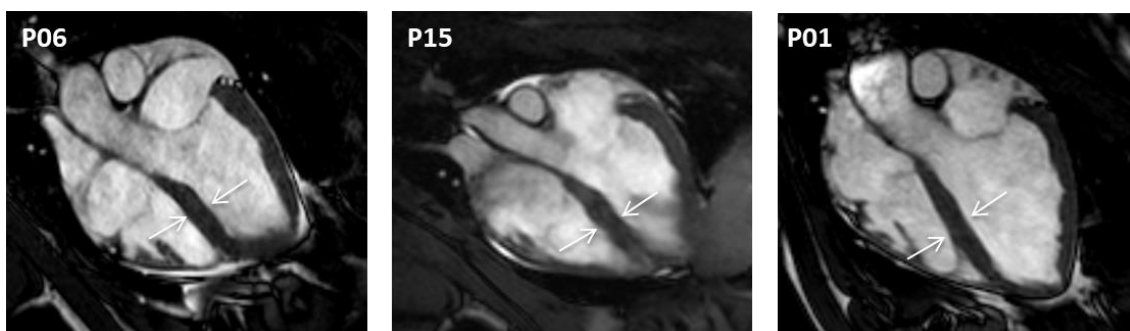


Figura 21: Imágenes de la RM2 obtenidas de la secuencia cine en 4CH (Cuatro cámaras) de los animales P06, P15 y P01 representativos de los grupos 1, 2 y 3 respectivamente, en las que no se aprecian diferencias en el grosor de la pared ventricular (indicado con flechas).

4.4 Fin estudio

4.4.1 Flujo coronario

De todos los animales del estudio que completaron el estudio (n=20), 15 sujetos evidenciaron un TIMI 3 en la angiografía coronaria previa a la eutanasia (Figura 22). En lo que se refiere a los animales restantes, un animal del grupo 1 (P19) presentó una calidad de flujo coronario de TIMI 2 y en un individuo del grupo 2 (P16) no se pudo realizar la coronariografía prevista de fin de estudio ya que murió durante la realización de la segunda RMc. Además, otro sujeto del mismo grupo (P15) evidenció un flujo TIMI 2.

En el grupo 3, dos animales presentaron TIMI 2 (P04 y P08) en la angiografía coronaria del fin de estudio.

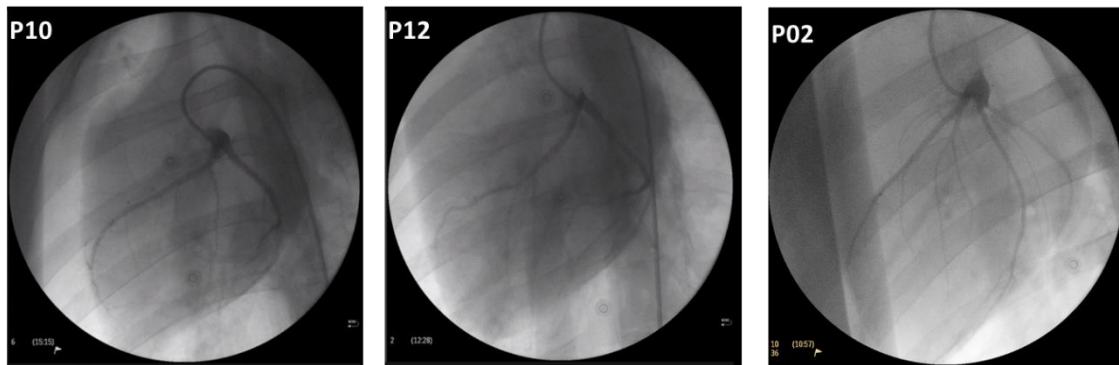


Figura 22: Angiografías coronarias en proyección OAI 40º del final del estudio de un animal representativo de los grupos 1 (P10), 2 (P12) y 3 (P02) con un flujo coronario de TIMI 3.

4.4.2 Necropsias

En los estudios de necropsia realizados tras la eutanasia de los animales no se encontraron alteraciones macroscópicas relevantes a nivel general ni cardíaco. Todos los corazones mostraron macroscópicamente una zona blanquecina anteroseptal y en la zona apical, de menor grosor y de tamaño similar, compatible con la zona del IM (Figura 23).

En uno de los sujetos (P03) del grupo 3 se observaron, tras efectuar las secciones transversales del corazón, áreas calcificadas en la zona infartada (Figura 24).

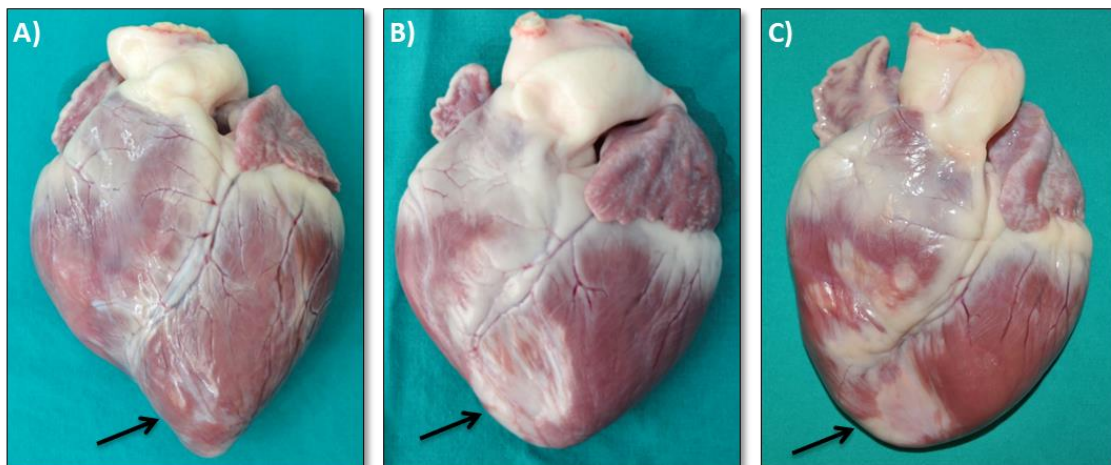


Figura 23: Fotografías de un corazón del grupo 1 (A: P06), grupo 2 (B: P13) y grupo 3 (C: P05) en las que se indica la zona infartada mediante una flecha.

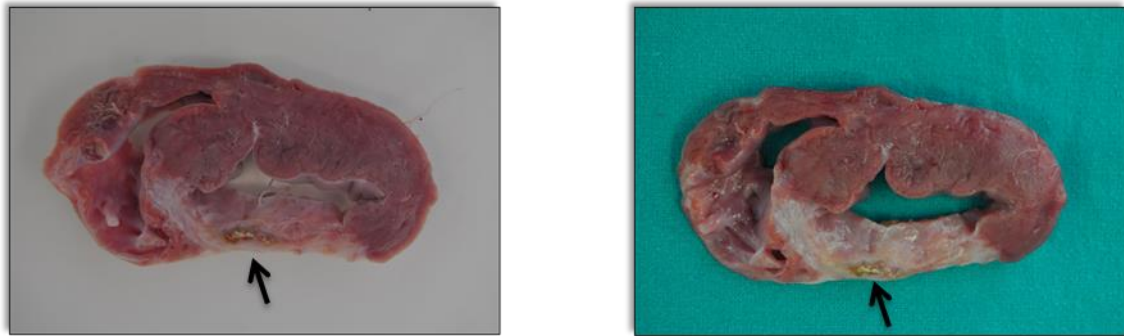


Figura 24: Fotografías de una de las secciones transversales del corazón del sujeto P03 perteneciente al grupo 3 en las que se indica la calcificación en el área infartada mediante una flecha.

4.4.3 Tinción TTC

La técnica de tinción mediante TTC (Figura 25) se realizó con éxito mostrando infartos de localización anteroseptal en todos los casos del estudio, de extensión aparentemente similar y sin grandes diferencias macroscópicas entre los grupos. Las secciones transversales teñidas evidenciaron las zonas sanas en color rojo oscuro y las infartadas de color blanco, que se correspondieron con las áreas blanquecinas observadas antes de la tinción.

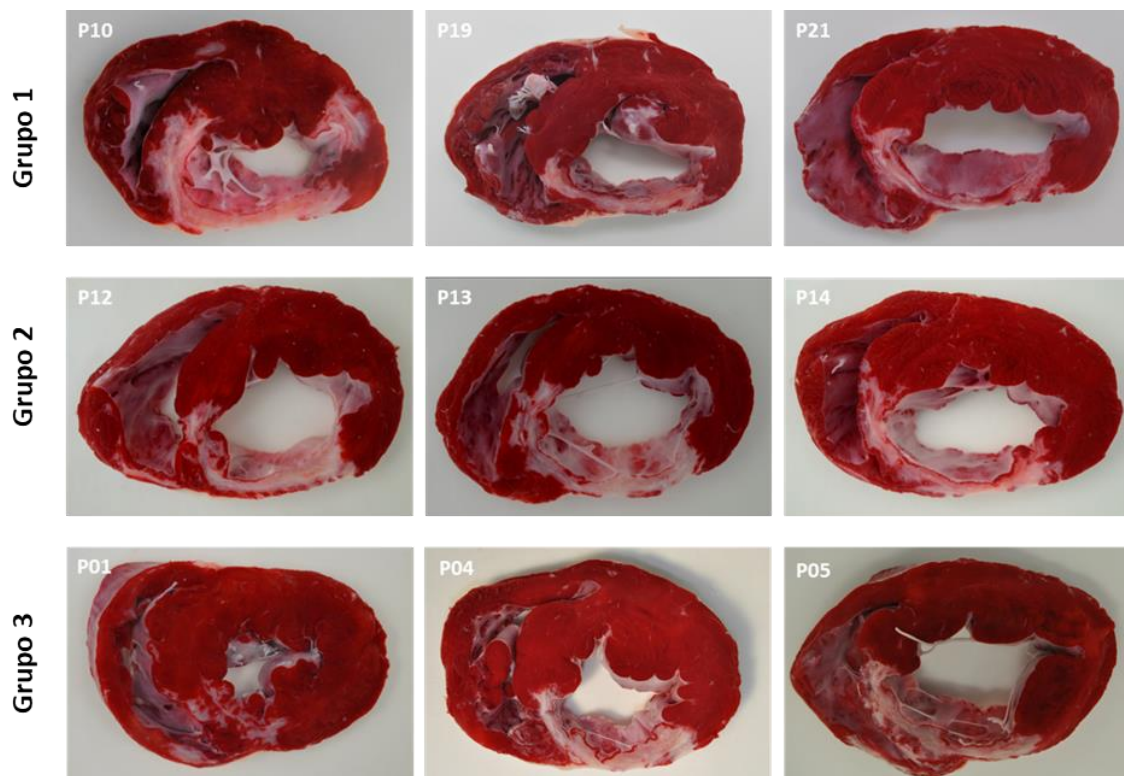


Figura 25: Fotografías de las secciones transversales del corazón teñidas con TTC de tres sujetos representativos de cada grupo del estudio (Grupo 1: P10, P19, P21; Grupo 2: P12, P13, P14; Grupo 3: P01, P04, P05)

4.4.4 Histología

De todos los animales del estudio, se realizó una selección aleatoria para evaluar histológicamente las muestras cardíacas de 5 animales representativos de cada grupo. Además, los cortes histológicos de dos animales del grupo 2 (P16, P17), así como del N4 del sujeto P13 presentaron cierta dificultad para su evaluación debido a la presencia de artefactos en los mismos, por lo que no se pudo obtener valoración de cada tipo de lesión en estos individuos.

El parámetro IM mostró la misma valoración en todos los grupos del estudio (Tabla 18), observándose en los cortes histológicos un infarto transmural en fase de fibrosis con bandas de miocardio subendocárdico. En algunos de estos cortes también se detectaron bandas subepicárdicas preservadas (Figura 26 y 27).

En el N3 de un animal del grupo BLANK (P13) se observó la presencia de necrosis / apoptosis así como en otro individuo del grupo HGF (P03).

En todos los grupos se evidenció la existencia de fibrosis y angiogénesis. Sin embargo, la mayoría de animales del grupo 1 (P10, P19, P20) y de manera más definida del grupo 2 (P12, P13, P14) mostraron una cicatriz hipertrófica en sus cortes histológicos. Sin embargo, sólo uno de los animales del grupo 3 (P08) manifestó esta particularidad. Se evidenció fibrosis con neovascularización capilar de manera más notoria en las zonas centrales de los infartos (Figura 28).

Respecto a la inflamación, el grupo que mostró mayor grado de severidad fue el grupo 2, mientras que el grupo tratamiento mostró el menor de ellos. Además, en el grupo 2 la zona periférica del infarto evidenció mayor inflamación linfocitaria perivascular (Figuras 29 y 30).

De modo similar ocurrió con la calcificación, cuya máxima severidad se observó el grupo BLANK y la menor en el grupo 3. Estas calcificaciones se detectaron mayoritariamente en las áreas de fibrosis de los cortes histológicos (Figura 31).

Animal	Grupo	Nivel	IM	Necrosis-Apoptosis	Fibrosis	Angiogénesis	Inflamación	Calcificación
P10	1	3	+	-	+ (Q)	+ (E)	+	+++
		4	+	-	+ (Q)	+ (E)	+	+++
P09	1	3	+	-	+	+	++	+
		4	+	-	+	+	++	-
P11	1	3	+	-	+	+	+	-
		4	+	-	+	+	++	+
P19	1	3	+	-	+ (Q)	+	+	++
		4	+	-	+	+	+	-
P20	1	3	+	-	+ (Q)	+	+	-
		4	+	-	+	+ (E)	+	-
P12	2	3	+	-	+ (Q)	+	+	+++
		4	+	-	+ (Q)	+	+	+++
P14	2	3	+	-	+ (Q)	++	+++	+
		4	+	-	+ (Q)	+	+++	+
P13	2	3	+	+	+ (Q)	+	+	++
		4					N/D	
P16	2					N/D		
P17	2					N/D		
P04	3	3	+	-	+	+	-	-
		4	+	-	+ (Q)	+	+	-
P02	3	3	+	-	+	+	+	-
		4	+	-	+	+ (E)	+	-
P03	3	3	+	+	+	+ (E)	-	+++
		4	+	-	+	+	-	+++
P08	3	3	+	-	+ (Q)	+ (E)	+	+
		4	+	-	+ (Q)	+ (E)	+	+
P07	3	3	+	-	+	+ (E)	+	-
		4	+	-	+	+ (E)	+	-

Tabla 18: Valores individuales de los parámetros histológicos estudiados en los tres grupos con las tinciones H.E. y T.C.M: IM, Necrosis-Apoptosis, Fibrosis, Angiogénesis, Inflamación y Calcificación. N/D: Resultados no disponibles por la presencia de artefactos en el corte histológico. Q: Cicatriz hipertrófica. E: Edema subendotelial en arteriolas de calibre intermedio, en el área de fibrosis.

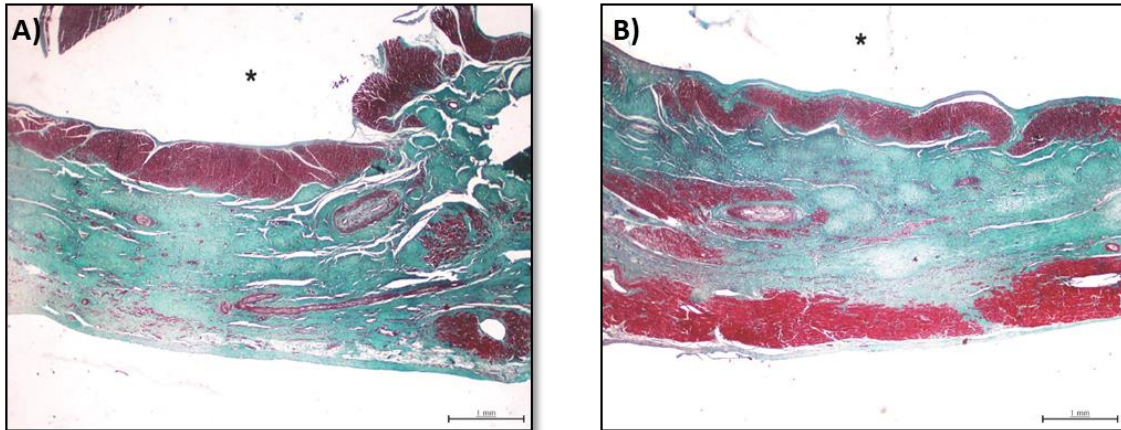


Figura 26: Tinción con T.C.M. en las muestras de un sujeto (P14) del grupo 2 (BLANK). **A)** Se observa zona central de infarto transmural en fase de fibrosis (color verde), con banda de miocardio subendocárdico preservada (color rojo); **B)** Se evidencian bandas de miocardio subendocárdico y subepicárdico preservadas, así como áreas perivasculares en el mesocardio (color rojo). (*) Cuidad del VI.

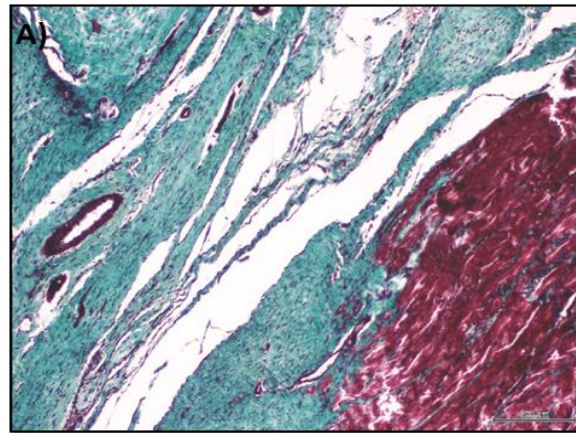


Figura 27: Tinción T.C.M. en las muestras de un sujeto (P14) del grupo 2 (BLANK). **A)** Se muestra borde lateral de infarto en fase de fibrosis (color verde), con miocardio normal (color rojo).

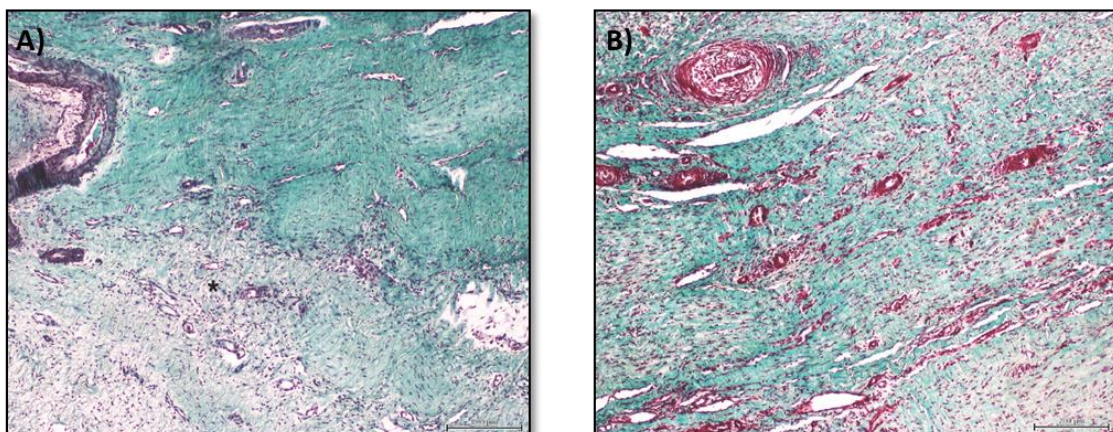


Figura 28: Tinción T.C.M. en las muestras de un sujeto (P14) del grupo 2 (BLANK). **A)** Se observa zona central de infarto transmural en fase de fibrosis (color verde) y neovascularización capilar, con presencia de pequeñas luces vasculares (*zona central e inferior). Arteriola de mediano calibre (ángulo superior izquierdo). **B)** Se evidencia neovascularización capilar en zona de fibrosis, con presencia de pequeñas luces vasculares (zona central e inferior).

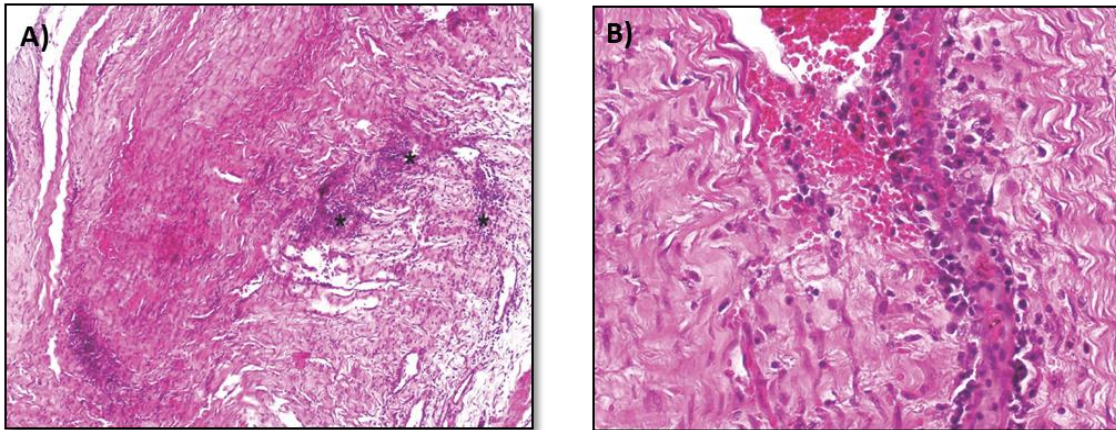


Figura 29: Tinción H.E. en las muestras de un sujeto (P14) del grupo 2 (BLANK). **A)** Se observa inflamación linfohistiocitaria perivascular capilar en la zona periférica del infarto (*). **B)** Se evidencia inflamación linfohistiocitaria perivascular capilar y hemorragia en la zona periférica del infarto.

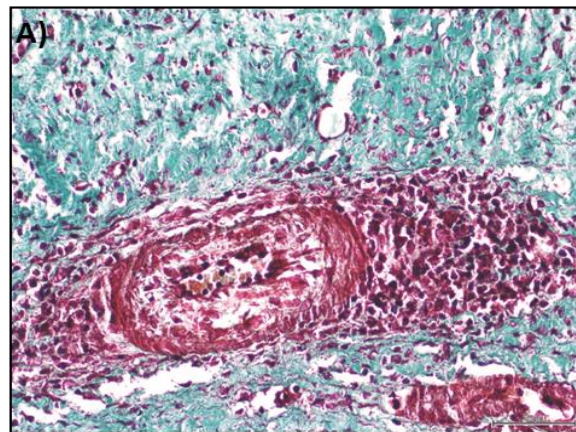


Figura 30: Tinción T.C.M. en las muestras de un sujeto (P14) del grupo 2 (BLANK). **A)** Se muestra arteriola de mediano calibre con edema subintimal (pálida) y disminución de la luz (centro). Se evidencia infiltrado inflamatorio linfohistiocitario perivascular.

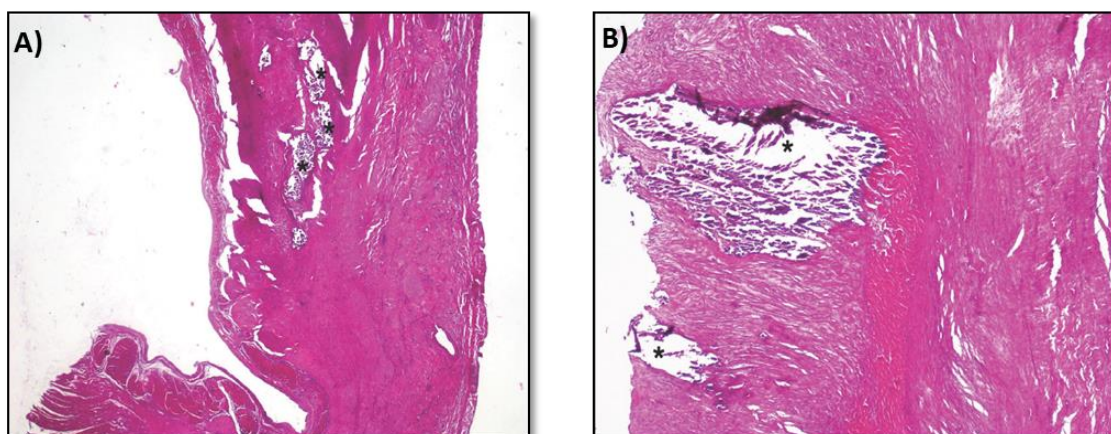


Figura 31: Tinción H.E. en las muestras de un sujeto (P03) del grupo 3 (HGF). **A)** Se observa calcificación distrófica (*) en el espesor del área de fibrosis. **B)** Se evidencia calcificación distrófica (*) extensa en el espesor del área de fibrosis.

5. DISCUSIÓN

Modelo de IM

Las similitudes anatómicas, fisiológicas y patológicas de la especie porcina con la humana, hacen de la primera un modelo experimental ampliamente utilizado en la comunidad científica para las investigaciones cardiovasculares (23,186–188,191,197,198). Existen, sin embargo, algunas diferencias en el grosor de las trabéculas apicales del VI, y por tanto en las fibras de Purkinje, implicadas en la conductividad y contractilidad del corazón (186). Esto genera la principal desventaja de este modelo porcino, la susceptibilidad a la taquicardia y la fibrilación ventricular.

En nuestro estudio, el 61,90% de los casos que sobrevivieron a la inducción del modelo presentaron FV. Este resultado se asemeja a los del estudio de *Krombach y cols.* (214) alejándose de los resultados de *Suzuki y cols.* entre otros autores, con aproximadamente un 91% de casos de FV (203,215,216). De manera similar a la especie humana la reperfusión coronaria supone un daño por sí misma, existiendo mayor riesgo de padecer FV en modelos de IM reperfundido, debido a la liberación de componentes tóxicos como las sustancias reactivas del oxígeno y una carga excesiva de calcio entre otras, que ocurre tras el restablecimiento del flujo coronario (10,146,185,187,217).

Según ciertos investigadores, todos los episodios de FV se producen a los 20-30 minutos de la inducción del IM y en los 10 primeros minutos de la reperfusión (203,215,216). En concordancia, los sujetos de nuestro experimento que mostraron eventos de FV lo hicieron en este periodo de tiempo, y el único que sufrió este tipo de arritmia tras la reperfusión lo hizo a los 5 minutos del desinflado del balón.

Todas las bajas durante la creación del modelo se produjeron tras episodios de FV, media hora después de la restricción del flujo coronario. La bibliografía describe tasas de mortalidad en modelos similares al nuestro que oscilan entre el 30 y el 35% (203,216). Sin embargo, los datos de nuestro estudio, con un 12,5% de muertes relacionadas con la inducción del IM, se encuentran más en la línea de otros estudios previos de nuestro grupo (23), con un 10% de mortalidad. Esta diferencia de resultados puede estar condicionada, entre otros factores, por el sexo del animal en el que se induce el modelo. Se han referido peores supervivencias en los machos, cuyo mayor grosor del miocardio podría generar una mayor susceptibilidad al desarrollo de cuadros de insuficiencia cardíaca con peor manejo de la sobrecarga de volumen

(198,203). Por otro lado, varios autores recomiendan el uso de agentes antiarrítmicos como la lidocaína o la amiodarona para disminuir la incidencia de FV y por tanto, la mortalidad (20,23,204,214,218–220). En nuestro caso, todos los sujetos utilizados para el estudio fueron hembras y además, se les administró un tratamiento antiarrítmico con amiodarona desde una semana previa a la inducción del modelo hasta tres días después de la inyección de la terapia. Con ello, se disminuyó el umbral de desfibrilación (203,221) y la tasa de mortalidad respecto a otros estudios (203,216).

Aparte de los episodios de FV, se detectó una alteración electrocardiográfica en todos los sujetos del estudio tras el inflado del balón de angioplastia: la elevación del segmento ST. Esta variación está descrita en muchos de los estudios que utilizan un modelo similar al nuestro (187,195,216,222,223) como un método más de comprobación de isquemia cardíaca e incluso ha sido utilizada hace décadas como método de medición del tamaño de infarto (224). Además en la clínica, la Sociedad Europea de Cardiología clasifica a los pacientes con dolor torácico en función de sus alteraciones electrocardiográficas, siendo la elevación del segmento ST uno de los principales indicadores de desarrollo de una oclusión coronaria aguda (31,33,34,225).

Para la confirmación del diagnóstico de necrosis miocárdica por IM se emplean los análisis de marcadores biológicos, principalmente la TnI o, en menor medida, la CK-MB (19,37–39). La elevación en sangre de estos marcadores de necrosis miocárdica sensibles y específicos no indica la patogenia asociada, aunque en el contexto clínico de una isquemia aguda, su elevación por encima del límite de referencia identifica la existencia de un IAM (31,37). En nuestro estudio se utilizó la TnI por su alta especificidad del tejido miocárdico y su alta sensibilidad comparada con la CK-MB (19,31,40). Así, se observó en todos los sujetos del experimento un aumento significativo de esta enzima cardíaca después de la creación del modelo comparado con su valor basal, indicando por tanto, una necrosis miocárdica provocada por la inducción del IAM.

La reproducibilidad de un modelo es una de las condiciones principales en la investigación experimental. Para ello, un tamaño de infarto reproducible es fundamental y por tanto, la selección de la arteria, su nivel y tiempo de oclusión son factores elementales para lograrlo (198,205,226). Existen estudios que defienden que un periodo de isquemia de 20-30 minutos es suficiente para inducir cambios irreversibles en las células del miocardio, mientras que tiempos menores de 15 minutos pueden permitir una reversión de los cambios en los cardiomiocitos y su supervivencia en el área isquémica (185). Otros han descrito que en la especie porcina, un tiempo de oclusión de 60-75 minutos de la arteria paraconal anterior distal

a su primera rama (23,197,203,205) supone un tamaño de infarto y grado de transmuralidad similar a los de una oclusión permanente, permitiendo la inducción de necrosis del área cardíaca implicada y la posterior recuperación de la permeabilidad de la arteria, como ocurre en la situación clínica del IM reperfundido (198,205). En nuestro caso, se llevó a cabo una obstrucción de 90 minutos, distal al origen de la primera rama diagonal de la arteria interventricular paraconal anterior, mediante el inflado de un balón de angioplastia (172,216,227). Esto supuso un área infartada media de $19,75 \pm 5,6\%$ y una lesión transmural de la pared anteroapical y septal del VI, similar a la que se desarrolla en la especie humana tras un IM de la arteria descendente anterior (187,195,197,205). Sin embargo, aunque en todos los sujetos del estudio se realizó el mismo protocolo de inducción de IM, los tamaños de infarto fluctuaron desde un 14% hasta un 37%. Esta variabilidad puede estar relacionada con las diferencias anatómicas a nivel vascular existentes en la especie porcina, tanto en el número como en la localización y diámetro de las ramas diagonales de la arteria interventricular paraconal anterior, como ocurrió particularmente en los sujetos del presente estudio.

La existencia de vasoespasmos durante las técnicas endovasculares puede estar relacionada con un manejo inadecuado o excesivo de los dispositivos como describieron *McCall y cols.* en 2012 (195). Conforme a estos autores, la administración de 200 μg de nitroglicerina supone un tratamiento profiláctico de estos espasmos vasculares. Así, en todos los animales del estudio, previo al inflado del balón de angioplastia, se llevó a cabo esta acción farmacológica de forma preventiva. A pesar de ello, uno de los sujetos del estudio (P09) mostró una reducción en la calidad del flujo coronario, probablemente asociada a un vasoespasmos por una manipulación incorrecta durante el procedimiento en el interior del vaso sanguíneo, en la coronariografía de comprobación tras el desinflado del balón. La escala TIMI es una de los métodos de valoración del IAMCEST, como predictor de riesgo de episodios isquémicos a corto o medio plazo (7,228). Sin embargo, esta alteración del flujo no supuso un aumento excesivo de la TnI ni del tamaño de IM comparado con el resto de sujetos del experimento, por lo que no se puede afirmar un daño miocárdico añadido.

Tratamiento IM

Como hemos mencionado anteriormente en este trabajo, la señalización paracrina producida por la liberación de sustancias que estimulan la reparación endógena mediante activación de las células madre cardíacas es la teoría más aceptada respecto a los beneficios de la terapia celular en el tejido cardíaco dañado (9,15,16,60,106–109). Según esta hipótesis, los efectos terapéuticos se deben a la secreción, entre otras sustancias, de factores de crecimiento

(9,16,20,26,60). De los diferentes tipos de factores (15,20,25,110,229) optamos por la utilización de HGF ya que diversos estudios preclínicos en diferentes especies, así como algunos ensayos clínicos, han evidenciado sus propiedades cardioregenerativas, como su actividad angiogénica, antiapoptótica, antiinflamatoria y antifibrótica (12,13,115–124,21,125–134,22,135–141,165–167,26,168,169,209,110–114).

La angiogénesis se desarrolla como respuesta natural a las obstrucciones coronarias y a la isquemia crónica miocárdica en humanos. Este proceso compensatorio a menudo es inadecuado o demasiado lento comparado con la hipoxia. Además, pacientes con patologías asociadas como hipercolesterolemia, hipertensión o diabetes, tienen una regulación comprometida de liberación de factores y citoquinas que promuevan la neovascularización, por lo que una administración exógena del factor angiogénico HGF podría mejorar su respuesta al IM. En efecto, diferentes estudios preclínicos y posteriormente en humanos han demostrado estos efectos angiogénicos cardioprotectores de este factor de crecimiento, gracias a la activación y proliferación de las células endoteliales, entre otras acciones (136,229,230). Probablemente, en nuestro estudio no se hayan obtenido resultados significativos en la mayoría de los parámetros analizados debido, además del bajo tamaño muestral, a la administración de los mismos en una fase incorrecta para establecer la angiogénesis. Por otro lado, el proceso inflamatorio y fibrótico asociado al IM es uno de los responsables de la patogénesis del remodelado ventricular y de la alteración de la funcionalidad del corazón (147,154,231). Diversos ensayos defienden la capacidad del HGF para minimizar esta inflamación a nivel cardíaco, gracias a su actividad antiapoptótica, la inhibición de citoquinas pro-inflamatorias y de moléculas de adhesión (13,136,147,163).

Respecto a la vía de administración del tratamiento, se seleccionó la ruta IC ya que ésta ha sido reiteradamente utilizada en diferentes ensayos clínicos (95–97,99–102,229) y preclínicos (92,232,233). Esto se debe a que dicha técnica se puede realizar tras la angioplastia para la revascularización de la arteria afectada, lo que representa el primer tratamiento en los pacientes con IAM de tiempo limitado de isquemia, por lo que no es necesario equipamiento ni aprendizaje específico para llevar a cabo dicha administración (58,225,234). Asimismo, permite la distribución uniforme de la terapia inyectada en la región infartada y es mínimamente invasiva (9,172). Por otro lado, existe el riesgo de provocar OMV si el material terapéutico a inyectar es de gran tamaño, como describieron *Johnston y cols.* (235). En dicho estudio realizado en la especie porcina, se inyectaron células vía IC de un diámetro aproximado de 21 μm con resultados seguros para esta ruta de administración. En la especie humana, se ha descrito el tamaño medio de las arteriolas y vasos capilares cardíacos inferior a 100 μm

(236). En nuestro caso se emplearon unas microesferas, vacías o cargadas con HGF y compuestas por polímeros biodegradables, de inferior tamaño, 16 μm , considerado por tanto un tamaño bien tolerado por la vasculatura coronaria porcina. Estas microcápsulas se caracterizan por su degradación a lo largo de 3 semanas para permitir la correcta y gradual difusión de la terapia, impidiendo la alteración del flujo coronario principal ni de la microvasculatura cardíaca. Por otro lado, se administró una dosis de 150 μg de nitroglicerina previa a la inyección de la terapia, además de efectuar tiempos de espera de 3 minutos entre cada bolo de inyección, para evitar vasoespasmos y la obstrucción de la arteria coronaria implicada, así como permitir la correcta difusión del tratamiento. La aplicación intracoronaria se realizó sin periodo de isquemia-infusión (227,237), que consiste en la aplicación de la terapia tras la oclusión de la arteria coronaria mediante un balón de angioplastia, evitando el reflujo de la terapia y facilitando su migración a la zona infartada deseada. Asimismo, este modo de administración selectiva permite disminuir la pérdida de la terapia inyectada debida a la migración de la misma a órganos no diana por el propio flujo circulatorio (92,234,238,239). Sin embargo, otros estudios mostraron una retención de la terapia igual o mayor en inyecciones intracoronarias sin emplear esta técnica (240,241).

El vehículo de la terapia es otro factor tan importante como la vía de administración, por su papel en la liberación del tratamiento a nivel sistémico o en el tejido de interés (174). Desde hace dos décadas, se han elaborado diferentes métodos y materiales para la encapsulación del tratamiento elegido en diferentes áreas clínicas. Más recientemente, se han desarrollado avances en microtecnología sobre la encapsulación, concretamente para la terapia celular, que favorecen su liberación prolongada y controlada en el tejido diana (175,242). Por ello, se han utilizado para este estudio las microcápsulas de 16 μm de diámetro como vehículo del HGF, permitiendo su liberación prolongada a lo largo de 3 semanas en el área infartada. Este tipo de microesferas permiten una infusión del tratamiento y su retención en el tejido deseado sin pasar a nivel sistémico y la ausencia de complicaciones coronarias como su obstrucción debido a su reducido tamaño y biodegradabilidad de sus componentes.

Flujo coronario, enzimas cardíacas y ECG

Para evaluar la seguridad y eficacia de la administración intracoronaria de 5×10^6 de microcápsulas con HGF a las 48 horas en un modelo porcino de IAM, se valoraron el flujo coronario y las enzimas cardíacas previos y posteriores al procedimiento así como los cambios electrocardiográficos registrados durante el mismo.

La determinación de la calidad del flujo coronario se realizó mediante la escala TIMI. A pesar de la utilización de la nitroglicerina profiláctica, se produjo su disminución inmediata de TIMI 3 a TIMI 2 en la angiografía post-inyección de ciertos sujetos de los grupos 2 (P12, P15, P16) y 3 (P07). Sólo el animal P05 perteneciente al grupo 3, redujo su flujo coronario de TIMI 2 a TIMI 1. Sin embargo, diferentes autores defienden el uso de otras técnicas más precisas para la valoración del flujo coronario, ya que la evaluación mediante la escala TIMI es subjetiva y dependiente de variables como la frecuencia cardíaca entre otras (225,236). No obstante, este descenso en el flujo no supuso una diferencia significativa en la elevación de la enzima cardíaca Tnl en esos sujetos respecto al resto. Además, esta variación del flujo pudo ser debida a una angiografía coronaria llevada a cabo de manera muy inmediata tras la administración del tratamiento, ya que en las realizadas al final del estudio, tres de estos individuos mostraron un TIMI 3 a excepción de los otros dos restantes. El P16 murió durante la RM2, probablemente atribuida a una mayor susceptibilidad a la respuesta individual de los fármacos utilizados para la anestesia, por lo que no se pudo obtener su flujo coronario final (243) . El P15, a pesar de mostrar TIMI 2 al igual que en el tiempo post-tratamiento, sufrió FV tras la inyección del contraste y murió. Esto pudo estar causado por la alta presión y/o alta velocidad de dicha inyección (244). También podría atribuirse a una posible manipulación excesiva o errónea del material endovascular durante el procedimiento, ya que previamente, no se evidenció ningún tipo de alteración electrocardiográfica indicadora de riesgo de FV (244) .

En cuanto a las enzimas cardíacas, los resultados estadísticos evidenciaron una disminución en todos los grupos de los valores medios de la Tnl en los seguimientos post-tratamiento comparados con los previos al mismo, por lo que la administración intracoronaria de la terapia no pareció implicar un daño de las células miocárdicas adicional al inducido por la isquemia (37). Además, la disminución significativa de la misma en los seguimientos post-tratamiento de todos los grupos es compatible con ausencia de un daño cardíaco asociado al tratamiento y su vía de aplicación, puesto que los daños se asocian a un aumento de dicha enzima cardíaca (31,40).

En relación al ECG, el animal P18 (grupo 2) experimentó episodios de FV durante la administración del segundo bolo del tratamiento, sin recuperación posible a pesar de los repetidos intentos de RCP. Este individuo evidenció una hipotensión severa previa a la inyección, lo que impidió la administración de la dosis de nitroglicerina profiláctica. Este hecho pudo influir en la aparición de la arritmia cardíaca y en la posterior muerte del animal.

RMc

Para la determinación del tamaño del infarto así como para la valoración de la funcionalidad y estructuras cardíacas pre-tratamiento y a las 10 semanas del mismo se empleó la RMc, técnica ampliamente recomendada para ello (47,245–248). En todos los grupos se observó una tendencia a la disminución del área infartada en el tiempo de fin de estudio en comparación con la RM1. En el grupo 2 se observó el mayor descenso mientras que en el grupo 3 se detectó el menor de ellos. Esta reducción del porcentaje de infarto, incluido en el grupo control, podría explicarse por la sobreestimación producida en el cálculo de dicho parámetro en las fases más tempranas del infarto. Numerosos autores afirman que ésta se debe a la inflamación, la hemorragia y el edema que incluso llegan a aumentar la estimación del tamaño en un 25 % (53,248–252). En el caso de nuestro experimento, la sobreestimación debida al edema no debería implicar una participación elevada puesto que la RM1 se realizó a las 48 h post-infarto. En esta fase se espera que el edema aparezca mínimamente ya que recientemente se ha descrito que el edema miocárdico posterior a la isquemia/reperfusión en cerdo sigue un patrón bimodal, con los picos más altos tras la reperfusión y a los 7 días del mismo, con el menor índice a las 24h de la creación del infarto (253,254). Sin embargo, la inflamación sí parece participar notablemente en esta sobredimensión, ya que la fase temprana de inflamación se produce en los primeros cuatro días tras el infarto mediante infiltrados de células inflamatorias y la digestión del tejido (176). Igualmente, la hemorragia influye en la sobredimensión de este parámetro debido a que en los modelos de infartos reperfundidos se genera hemorragia miocárdica por la extravasación de células sanguíneas, reflejando el daño microvascular, por el aumento de la permeabilidad capilar y su contribución a la muerte celular y a la inflamación (255–257). Además, esta disminución en el valor del porcentaje de infarto podría estar asociada a un adelgazamiento de la pared debido al proceso de remodelación ventricular asociado al IAM con la consecuente pérdida de cardiomiocitos, destrucción de la matriz extracelular de la zona necrótica y su reemplazo por una cicatriz fibrótica establecida en su fase tardía (100,258). Todo esto contribuyó a que en nuestro estudio se le prestara mayor atención a los parámetros funcionales, como los obtenidos en los volúmenes ventriculares y la FE como predictores de la funcionalidad cardíaca que al %IM.

La disminución del grosor de la pared ventricular produce la acción compensatoria del aumento de los volúmenes ventriculares con objeto de normalizar la presión diastólica, activando el sistema renina-angiotensina-aldosterona (53,259). En efecto, en los tres grupos del estudio se observó un aumento no significativo del VDFi a las 10 semanas (así como diferencias no significativas entre los valores de los distintos grupos). De manera similar

ocurrió con los VSFi en los que se detectó una tendencia al aumento en los grupos 1 y 3 entre los valores obtenidos en la RM1 y en la RM2. En ningún grupo se superó el criterio establecido para la determinación de remodelado adverso ventricular, el cual está definido por un aumento del 20% y 15% de los volúmenes ventriculares diastólico y sistólico finales indexados respectivamente (248). Hay que destacar que el grupo control mostró un aumento más notable de ambos volúmenes, evidenciando mayor alteración de la anatomía y funcionalidad cardíaca.

Estos aumentos no significativos de los volúmenes ventriculares no se acompañaron de una disminución de la FE en ninguno de los grupos en el fin de estudio. Además, en los grupos 1 y 3, el ascenso de los valores de este último parámetro desde la RM1 a la RM2 fue estadísticamente significativo, lo que evidenció una mejora en la funcionalidad cardíaca en estos dos grupos. Similares fueron los hallazgos que *Revilla y cols.* (260) describieron en 2011 de un estudio clínico de administración de terapia celular vía IC. En dicho estudio, los resultados no mostraron diferencias significativas en los parámetros del remodelado ventricular. Sin embargo, sí se observó una mejora significativa de la funcionalidad cardíaca por el aumento de la FE en las RMc de seguimiento tras la terapia.

Una de las posibles causas de que los resultados de los volúmenes ventriculares no sean estadísticamente significativos se puede atribuir al pequeño tamaño muestral, con 7 individuos en cada uno de los grupos. Otra de ellas, podría relacionarse con los tiempos, en los que se realizan los seguimientos de la RMc. Esto último no parece muy convincente, ya que otros estudios similares han mostrado resultados significativos con el mismo protocolo temporal de seguimiento (92). Asimismo, en un estudio anterior de nuestro grupo con seguimientos de estudio a las 5 semanas tampoco se obtuvieron resultados de relevancia estadística.

Citoquinas

El análisis de las citoquinas se realizó para la valoración del estado inmunológico e inflamatorio de los animales de los diferentes grupos, así como de la evolución de la respuesta a la terapia. La restringida disponibilidad de reactivos específicos para la especie porcina fue una limitación importante. En efecto, la tecnología de Luminex nos permitió únicamente la determinación de 9 citoquinas (IFN- α , IFN- γ , IL1- β , IL-12, IL16, IL-8, IL-4, IL-410, TNF- α), de las cuales sólo 6 pro-inflamatorias (IFN- α , IFN- γ , IL1- β , IL-12, IL16, IL-8) pudieron ser cuantificadas en todos los grupos (261). Las 3 restantes (IL-4, IL-410, TNF- α), no llegaron a los límites de detección mínimos en todos los animales, por lo que no se pudieron realizar las determinaciones estadísticas necesarias.

Respecto a las citoquinas pro-inflamatorias evaluadas, no se encontraron diferencias significativas para IL-6 ni IFN- α en ninguna de las comparativas posibles de grupos y tiempos de seguimiento. Los valores de IFN- α después del tratamiento disminuyeron y aumentaron de manera intercalada en cada seguimiento del estudio, encontrándose los niveles más reducidos en el grupo HGF. Tal y como describen *Prabhu y cols.* (176) estas variaciones del IFN- α podrían estar relacionados con las fases temporales de la inflamación, en las que ésta aumenta en los 4 primeros días concordando con el seguimiento 24h post-tratamiento de nuestro estudio. Posteriormente se reduce hasta la segunda semana, coincidiendo con la semana post-tratamiento y se incrementa de nuevo en los siguientes meses, incluyendo las 10 semanas del fin de estudio (176). En cuanto a IL-6, los datos reflejaron la mayor disminución, así como el valor más reducido en el fin de estudio del grupo HGF. Estos resultados podrían explicarse por la capacidad inhibidora del HGF del proceso inflamatorio posterior al infarto, coincidiendo con los hallazgos de *Rong y cols.* (147).

En referencia al IFN- γ el grupo HGF evidenció una disminución en el valor de esta citoquina desde antes del tratamiento hasta el fin de estudio, momento en el que mostró el valor más bajo de los tres grupos de estudio. Estos datos reflejan una mayor inflamación en los grupos 1 y 2, lo que podría relacionarse con la capacidad antiinflamatoria de los HGF (147) y la liberación controlada a lo largo de tres semanas de los mismos.

El grupo HGF mostró la mayor reducción a lo largo del estudio de la IL-1 β , lo que podría deberse a su capacidad de inhibir la producción de ésta y al carácter antiinflamatorio y antifibrótico de los HGF (143,147,148,152,156,176,262). Además la IL-1 β induce la transformación de los fibroblastos cardíacos en miofibroblastos, por lo que ejercería un papel importante en la fase de proliferación, reparación tardía y remodelado ventricular del miocardio tras un infarto (144,155).

El valor de IL-12 disminuyó de manera significativa en el grupo HGF entre las 24h y 10 semanas post-tratamiento, obteniendo el menor valor de todos los grupos en el fin de estudio. Esta reducción podría relacionarse con la capacidad de la terapia utilizada para inhibir el proceso inflamatorio. En efecto, el aumento de situaciones cardíacas adversas como el IAM, angina inestable o el infarto en pacientes con enfermedades coronarias, ha sido relacionado recientemente con niveles elevados de IL-12 a nivel sistémico en humanos (262,263).

En cuanto a la IL-8, en el grupo HGF se observaron las mayores diferencias significativas entre tiempos, obteniendo al final del estudio el valor más alto para esta citoquina. Estos resultados coinciden con los de *Frangogiannis y cols.* (264) que observaron implicación en la formación de

nuevos vasos en corazones después del IM. Otros estudios han desvelado que la liberación de células que expresan receptores de IL-8 reducen el tamaño de IM y la disfunción ventricular asociada al mismo (265,266). Además, los resultados obtenidos en nuestro estudio se podrían relacionar con la capacidad angiogénica de los HGF gracias a su efecto mitogénico en las células endoteliales, su capacidad de secreción de IL-8 y de estabilizar los vasos formados de manera reciente (136,164).

Por tanto, los análisis de las citoquinas manifestaron en el grupo HGF la actividad antiinflamatoria y antifibrótica de la terapia mediante la disminución de IL-1, IL-6, IL-12 e IFN- γ así como su capacidad angiogénica mediante el aumento de IL-8 (136,148,164), que sin embargo, no fue suficiente para mejorar los resultados de los parámetros evaluados debido al tamaño muestral o a los tiempos de seguimiento del estudio.

Histología

En las necropsias, la ausencia de alteraciones a nivel general en ningún animal del estudio se podría asociar a la seguridad de la terapia a nivel sistémico, ya que consideramos, a pesar de no haber realizado estudios de biodistribución, que el tamaño y vía de administración son ideales para ello. Las secciones transversales de los corazones teñidas con TTC evidenciaron IM anteroseptales y transmuralas como consecuencia del tipo y lugar de oclusión establecida durante el modelo. Macroscópicamente, todos los corazones y sus secciones, mostraron un tamaño de infarto similar, correspondiéndose con los resultados obtenidos mediante la RMc.

La ausencia de diferencias en los resultados histológicos podría relacionarse con el reducido tamaño muestral del estudio y sobre todo con la imposibilidad de la valoración de los cortes histológicos de algunos animales. También podría relacionarse con el protocolo de tiempos de seguimiento del estudio (227).

Los resultados respecto al IM a nivel histológico en todos los grupos del estudio manifestaron una extensión y transmuralidad similar, coincidiendo con los datos obtenidos de la RM y la tinción del TTC. Respecto a la necrosis/apoptosis, fibrosis y angiogénesis ocurrió de manera parecida, aunque en el grupo HGF se observó menor cicatriz hipertrófica, lo que podría atribuirse cautelosamente a la capacidad antifibrótica de la terapia administrada. Por otro lado, la inflamación y calcificación también fue de menor severidad en el grupo tratamiento, coincidiendo con los resultados del análisis de las citoquinas y, por tanto, pudiendo asociarse con la característica antiinflamatoria de la terapia (21,25,26,112,147).

Por tanto, los resultados histológicos confirman las tendencias de los resultados macroscópicos y de los otros análisis anteriormente realizados de la RMc y citoquinas, en los que se ha evidenciado un empeoramiento de las características anatómicas y funcionales cardíacas en los grupos CTRL y BLANK, no siendo así en el grupo HGF e incluso, mejorando algunos parámetros de diferentes pruebas.

5.1 Limitaciones del estudio

Si bien se ha hecho todo lo posible por obtener resultados representativos y extrapolables a la clínica, nuestro estudio no está exento de limitaciones. En cuanto a las restricciones de esta tesis, se puede definir una de ellas como la utilización de animales jóvenes, ya que no es comparable totalmente con el paciente humano adulto debido a que en esa etapa su corazón y su cuerpo aún se encuentran en crecimiento. Sin embargo, para poder eliminar o disminuir esta variación, se llevó a cabo el indexado de los volúmenes ventriculares obtenidos de la RMc al peso corporal del animal en cada momento del estudio, como han descrito otros autores (23). Sin embargo, el uso de animales de la raza porcina Large White en edad adulta para estudios de larga duración supone dificultades en el manejo debido al gran tamaño que adquieren, por lo que se proponen razas porcinas miniaturas para este tipo de experimentos (267). Además, los resultados obtenidos de estudios preclínicos que utilizan cerdos jóvenes implican un traslado prudente a la clínica ya que los animales utilizados, a parte de su edad, están sanos y sin ningún tipo de comorbilidad asociada a diabetes, hipercolesterolemia, hipertensión o incluso a la dieta o ejercicio como ocurre en el ser humano (185).

Otra limitación del estudio podría ser el bajo tamaño muestral y probablemente pudo ser el causante de la ausencia de mejores resultados y mayores diferencias estadística en muchos de los parámetros estudiados, tanto en lo que se refiere a las RMc como al análisis de las citoquinas y la histología. Por tanto, para futuros experimentos se estudiará la utilización de un mayor número de animales y, en caso de seguimientos prolongados, la selección de alguna raza miniatura de la especie porcina, para lograr mejores resultados y más fácilmente trasladables a la clínica.

6. CONCLUSIONES

1. La administración intracoronaria de 5×10^6 de microcápsulas cargadas al 5% de HGF 48 horas después de un IAM parece segura en un modelo porcino, si bien puede generar una disminución del flujo coronario de manera transitoria y sin consecuencias desfavorables a nivel cardíaco.
2. Este tratamiento intracoronario con HGF microencapsulados tiende a mejorar la funcionalidad cardíaca y limitar el remodelado ventricular aunque no va acompañada de una disminución del tamaño de infarto.
3. La terapia utilizada en este estudio aparenta restringir la reacción inflamatoria y fibrótica posterior al IAM.
4. Son necesarios más estudios para evaluar y mejorar la efectividad del tratamiento previo a su utilización en ensayos clínicos, mediante su administración en otra etapa del progreso del IAM y/o con diferentes dosis del mismo.

7. RESUMEN

Objetivo: El principal objetivo de este estudio fue evaluar de forma comparativa la eficacia y seguridad del tratamiento intracoronario (IC) con HGF microencapsulados, vehículo o suero salino en el IAM en un modelo porcino que permita su traslación rápida a la clínica.

Material y Métodos: Se indujo un infarto de miocardio a 24 hembras porcinas de raza Large White mediante la oclusión durante 90 min de la arteria interventricular paraconal distal a su primera rama diagonal. Los animales que sobrevivieron fueron tratados, 48 horas después, mediante la administración IC de 5×10^6 HGF microencapsulados (HGF, n=7), 5×10^6 de microcápsulas vacías (BLANK, n=7) o 10ml de suero (CTRL, n=7). La seguridad inmediata se determinó por el flujo coronario y el análisis de la enzima cardíaca Tnl, previa y posterior a la administración, así como por registros de ECG. La función cardíaca se evaluó mediante RMc pre-tratamiento y a las 10 semanas (%IM, FE, VDFi y VSFi). El perfil inflamatorio y la respuesta a la terapia se valoraron por análisis de citoquinas en diferentes tiempos del estudio. 10 semanas post-tratamiento, tras la eutanasia de los animales, los corazones fueron seccionados, teñidos con TTC y evaluados histopatológicamente.

Resultados: Tres sujetos murieron durante la creación del modelo. En la reperfusión, se detectó un ascenso significativo de los valores de la Tnl. Respecto a la seguridad del tratamiento, 2 animales del grupo HGF y 3 del grupo BLANK empeoraron su flujo coronario tras el tratamiento. Un animal del grupo BLANK sufrió FV y murió durante la administración IC. No se observó aumento significativo de la Tnl tras la fase del tratamiento en ninguno de los grupos. En cuanto a la eficacia, en el grupo tratado se observó una recuperación significativa de la FE y el menor incremento de VDFi y VSFi. Las citoquinas anti-inflamatorias y pro-inflamatorias mostraron los mayores y menores valores respectivamente en el grupo tratado. Las lesiones observadas histológicamente no evidenciaron diferencias importantes entre los grupos, a excepción de la inflamación y calcificación, las cuales fueron menos severas en el grupo HGF.

Conclusiones: La administración IC de 5×10^6 de microcápsulas cargadas al 5% de HGF 48 horas después de un IAM es seguro en un modelo porcino, si bien puede generar una disminución del flujo coronario de manera transitoria y sin consecuencias desfavorables. Este tratamiento tiende a mejorar la funcionalidad cardíaca y limitar el remodelado ventricular aunque sin una disminución del tamaño de infarto. Además, parece restringir la reacción inflamatoria y fibrótica posterior al IAM.

SUMMARY

Purpose: The main objective of this study was to compare the safety and efficacy of an intracoronary administration of placebo monodisperse microspheres (MSPs), HGF-loaded microspheres or saline in a myocardial infarction swine model.

Material and methods: A reperfused closed chest myocardial infarction was induced in 24 female large white swine by a 90 minutes balloon occlusion of the paraconal interventricular artery immediately distal to the origin of the first diagonal branch. The surviving animals received an IC infusion of 5×10^6 placebo microspheres (BLANK, n=7), 5×10^6 HGF-loaded microspheres (HGF, n=7) or saline (CTRL, n=7) two days after AMI. The safety of this treatment was determined by pre- and post- administration coronary flow, ECG and cardiac Troponin I values before and after the intervention. Cardiac function was evaluated with MR before injection and at 10 weeks (EF, %MI, EDVi, ESVi). The inflammatory profile and response to therapy were evaluated by analysis of cytokines on different time-points of the study. 10 weeks after treatment hearts were harvested, stained with TTC and histopathologically evaluated.

Results: Three animals died during the AMI model creation so they were replaced by other 3 pigs. The TnI values significantly increased at the reperfusion phase. Regarding safety, two animals belonging to the HGF group and three from BLANK group impaired their coronary flow after treatment. One animal from the BLANK group died during the therapy administration. No significant increases in TnI were observed after treatment in any group. Regarding efficacy, the HGF group showed a significant recovery of EF and the lowest increase in EDVi and ESVi. The treated group presented the highest and lowest values of anti-inflammatory and pro-inflammatory cytokines. There were no significant differences between groups in histological lesions, but inflammation and calcification were less severe in the HGF group.

Conclusions: The IC administration of 5×10^6 HGF loaded-microspheres 48 hours after infarction is safe in a porcine model, as well as it may cause a temporary reduction in coronary flow without unfavorable consequences. This treatment tends to improve cardiac function and limit ventricular remodeling, although without decreasing infarct size. In addition, this therapy seems to restrict post-AMI inflammatory and fibrotic reaction.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Timmis A, Townsend N, Gale C, Grobbee R, Maniadakis N, Flather M, et al. European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistics 2017. *Eur Hear J.* 2018;39(7):508–79.
2. Benjamin EJ, Virani SS, Callaway CW, Chang AR, Cheng S, Chiuve SE, et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2018 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation.* 2018;137:e67–492.
3. Townsend N, Wilson L, Bhatnagar P, Wickramasinghe K, Rayner M, Nichols M. Cardiovascular disease in Europe: Epidemiological update 2016. *Eur Heart J.* 2016;37(42):3232–45.
4. Hartley A, Marshall DC, Saliccioli JD, Sikkil MB, Maruthappu M, Shalhoub J. Trends in mortality from ischemic heart disease and cerebrovascular disease in Europe: 1980 to 2009. *Circulation.* 2016;133(20):1916–26.
5. Regitz-Zagrosek V, Oertelt-Prigione S, Prescott E, Franconi F, Gerds E, Foryst-Ludwig A, et al. Gender in cardiovascular diseases: Impact on clinical manifestations, management, and outcomes. *Eur Heart J.* 2016;37(1):24–34.
6. Ponikowski P, Anker S, AlHabib K, Cowie M, Force T, Hu S, et al. Heart failure: preventing disease and death worldwide. *ESC Hear Fail.* 2014;1(1):4–25.
7. Ruiz-nodar JM, Abu-assi E. Factores determinantes del riesgo isquémico del paciente tras un infarto agudo de miocardio. *Rev Esp Cardiol.* 2017;17(B):9–15.
8. Dégano IR, Elosua R, Marrugat J. Epidemiology of Acute Coronary Syndromes in Spain: Estimation of the Number of Cases and Trends From 2005 to 2049. *Rev Esp Cardiol.* 2013;66(6):472–81.
9. Sun R, Li X, Liu M, Zeng Y, Chen S, Zhang P. Advances in stem cell therapy for cardiovascular disease (Review). *Int J Mol Med.* 2016;38(1):23–9.
10. Ibáñez B, Heusch G, Ovize M, Van De Werf F. Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol.* 2015;65(14):1454–71.

11. Ji ST, Kim H, Yun J, Chung JS, Kwon SM. Promising Therapeutic Strategies for Mesenchymal Stem Cell-Based Cardiovascular Regeneration: From Cell Priming to Tissue Engineering. *Stem Cells Int.* 2017;2017:3945403.
12. Ylä-Herttua S, Bridges C, Katz MG, Korpisalo P. Angiogenic gene therapy in cardiovascular diseases: Dream or vision? *Eur Hear J.* 2017;38(18):1365–71.
13. Gallo S, Sala V, Gatti S, Crepaldi T. Cellular and molecular mechanisms of HGF/Met in the cardiovascular system. *Clin Sci.* 2015;129(12):1173–93.
14. Ma T, Sun J, Zhao Z, Lei W, Chen Y, Wang X, et al. A brief review: adipose-derived stem cells and their therapeutic potential in cardiovascular diseases. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(1):124.
15. Stempien-Otero A, Helterline D, Plummer T, Farris S, Prouse A, Polissar N, et al. Mechanisms of bone marrow-derived cell therapy in ischemic cardiomyopathy with left ventricular assist device bridge to transplant. *J Am Coll Cardiol.* 2015;65(14):1424–34.
16. Nguyen PK, Rhee J-W, Wu JC. Adult Stem Cell Therapy and Heart Failure, 2000 to 2016: A Systematic Review. *JAMA Cardiol.* 2016;1(7):831–41.
17. Henning RJ, Dennis S, Sawmiller D, Hunter L, Sanberg P, Miller L. Human umbilical cord blood mononuclear cells activate the survival protein Akt in cardiac myocytes and endothelial cells that limits apoptosis and necrosis during hypoxia. *Transl Res.* 2012 Jun 1;159(6):497–506.
18. Jin H, Sanberg PR, Henning RJ. Human umbilical cord blood mononuclear cell-conditioned media inhibits hypoxic-induced apoptosis in human coronary artery endothelial cells and cardiac myocytes by activation of the survival protein Akt. *Cell Transpl.* 2013;22(9):1637–50.
19. Reddy K, Khaliq A HR. Recent advances in the diagnosis and treatment of acute myocardial infarction. *World J Cardiol.* 2015;7(5):243–76.
20. Li TS, Cheng K, Malliaras K, Smith RR, Zhang Y, Sun B et al. Direct comparison of different stem cell types and subpopulations reveals superior paracrine potency and myocardial repair efficacy with cardiosphere-derived cells. *J Am Coll Cardiol.* 2012;59(10):942–53.
21. Sonnenberg SB, Rane AA, Liu CJ, Rao N, Agmon G, Suarez S, et al. Delivery of an

- engineered HGF fragment in an extracellular matrix-derived hydrogel prevents negative LV remodeling post-myocardial infarction. *Biomaterials*. 2015;45:56–63.
22. Salimath AS, Phelps EA, Boopathy A V., Che P lin, Brown M, García AJ, et al. Dual Delivery of Hepatocyte and Vascular Endothelial Growth Factors via a Protease-Degradable Hydrogel Improves Cardiac Function in Rats. *PLoS One*. 2012;7(11):e50980.
 23. Crisóstomo V, Sun F, Maynar M, Báez-Díaz C, Blanco V, Garcia-Lindo M, et al. Common swine models of cardiovascular disease for research and training. *Lab Anim*. 2016;45(2):67–74.
 24. Hastings CL, Roche ET, Ruiz-Hernandez E, Schenke-Layland K, Walsh CJ, Duffy GP. Drug and cell delivery for cardiac regeneration. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;84:85–106.
 25. Koudstaal S, Bastings MM, Feyen DA, Waring CD, Van Slochteren FJ, Dankers PY, et al. Sustained delivery of insulin-like growth factor-1/hepatocyte growth factor stimulates endogenous cardiac repair in the chronic infarcted pig heart. *J Cardiovasc Transl Res*. 2014;7:232–41.
 26. Ellison GM, Torella D, Dellegrottaglie S, Perez-Martinez C, Perez De Prado A, Vicinanza C, et al. Endogenous cardiac stem cell activation by insulin-like growth factor-1/hepatocyte growth factor intracoronary injection fosters survival and regeneration of the infarcted pig heart. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58(9):977–86.
 27. WHO. Enfermedades cardiovasculares [Internet]. Organización Mundial de la Salud. 2018. Available from: [http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
 28. Instituto Nacional de Estadística. Defunciones según la Causa de Muerte Año 2016. Capítulos de la Clasificación Internacional de Enfermedades 10ª revisión (CIE-10) de la OMS EDCM [Internet]. 2017; Available from: www.ine.es/prensa/prensa.htm
 29. Royo-Bardonada MA; Armario P, Lobos Bejrano JM, Pedro-Botet J, Villar Alvarez F, Elosua R et al. Adaptación Española De Las Guías Europeas De 2016 Sobre Prevención De La Enfermedad Cardiovascular En La Práctica Clínica. *Rev Esp Salud Pública*. 2016;90(24):e1-24.
 30. Ferreira-González I. Epidemiología de la enfermedad coronaria. *Rev Esp Cardiol*. 2014;67(2):139–44.

31. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA, et al. Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). *Eur Hear J.* 2018;00:1–33.
32. Ibanez B, James S, Agewall S, Antunes MJ, Bucciarelli-Ducci C, Bueno H, et al. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Eur Hear J.* 2018;39(2):119–77.
33. Zimetbaum PJ, Josephson ME. The Electrocardiogram in Acute Myocardial Infarction. *N Engl J Med.* 2003;348(10):933–40.
34. Welch TD, Yang EH, Reeder GS, Gersh BJ. Modern management of acute myocardial infarction. *Curr Probl Cardiol.* 2012 Jul;37(7):237–310.
35. Wang K, Asinger RW, Marriott HJL. ST-Segment Elevation in Conditions Other Than Acute Myocardial Infarction. *N Engl J Med.* 2003;349:2128–35.
36. Krishnaswamy A, Lincoff A, Menon V. Magnitude and consequences of missing the acute infarct-related circumflex artery. *Am Heart J.* 2009;158(5):706–12.
37. Santaló Bel M, Guindo Soldevila J, Ordóñez Llanos J. Marcadores biológicos de necrosis miocárdica. *Rev Esp Cardiol.* 2003;56(7):703–20.
38. Jaffe AS. Chasing Troponin. How Low Can You Go if You Can See the Rise? *J Am Coll Cardiol.* 2006;48(9):1763–4.
39. Apple FS, Jesse RL, Newby LK, Wu AHB, Christenson RH. National Academy of Clinical Biochemistry and IFCC Committee for Standardization of Markers Cardiac Damage Laboratory Medicine Practice Guidelines: analytical issues for biomarkers of heart failure. *Circulation.* 2007;116(5):e95-8.
40. Apple FS, Sandoval Y, Jaffe AS, Ordonez-Llanos J. Cardiac troponin assays: Guide to understanding analytical characteristics and their impact on clinical care. *Clin Chem.* 2017;63(1):73–81.
41. Wens SCA, Schaaf GJ, Michels M, Kruijshaar ME, Van Gestel TJM, In 'T Groen S, et al. Elevated Plasma Cardiac Troponin T Levels Caused by Skeletal Muscle Damage in Pompe Disease. *Circ Cardiovasc Genet.* 2016;9:6–13.
42. Jaffe S A, Babuin L, Apple S F. Biomarkers in Acute Cardiac Disease. The Present and the Future. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48(1):1–11.

43. Apple FS, Collinson PO. Analytical characteristics of high-sensitivity cardiac troponin assays. *Clin Chem*. 2012;58(1):54–61.
44. Apple FS, Quist HE, Doyle PJ, Otto AP, Murakami MM. Plasma 99th percentile reference limits for cardiac troponin and creatine kinase MB mass for use with European Society of Cardiology/American College of Cardiology consensus recommendations. *Clin Chem*. 2003;49(8):1331–6.
45. Neumann F-J, Sousa-Uva M, Ahlsson A, Alfonso F, Banning AP, Benedetto U, et al. 2018 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization. *Eur Hear J*. 2018;00:1–96.
46. Sevilla T, Arnold R, Amado M, Revilla A, San Román JA. Técnicas de imagen no invasivas en la investigación cardiovascular. *Rev Esp Cardiol Supl*. 2013;13(E):64–72.
47. Valbuena López S, Hinójar R, O-Puntmann V. Resonancia magnética cardiovascular en la práctica cardiológica: una guía concisa para la adquisición de imágenes y la interpretación clínica. *Rev Esp Cardiol*. 2016;69(2):202–10.
48. M Kramer C, Barkhausen J, D Flamm S, J Kim R, Nagel E. Standardized cardiovascular magnetic resonance (CMR) protocols 2013 update. *J Cardio Magn Reson*. 2013;15:91.
49. Schulz-Menger J, Bluemke DA, Bremerich J, Flamm SD, Fogel MA, Friedrich MG, et al. Standardized image interpretation and post processing in cardiovascular magnetic resonance: Society for Cardiovascular Magnetic Resonance (SCMR) Board of Trustees Task Force on Standardized Post Processing. *J Cardio Magn Reson*. 2013;15:35.
50. McCrohon JA, Moon JCC, Prasad SK, McKenna WJ, Lorenz CH, Coats AJS, et al. Differentiation of heart failure related to dilated cardiomyopathy and coronary artery disease using gadolinium-enhanced cardiovascular magnetic resonance. *Circulation*. 2003;108:54–9.
51. Assomull RG, Shakespeare C, Kalra PR, Lloyd G, Gulati A, Strange J, et al. Role of cardiovascular magnetic resonance as a gatekeeper to invasive coronary angiography in patients presenting with heart failure of unknown etiology. *Circulation*. 2011;124:1351–60.
52. Raymond J K, WU E, Rafael A, Enn-ling C, A Parker M, Simonetti O, et al. The use of contrast-enhanced magnetic resonance imaging to identify reversible myocardial dysfunction. *N Engl J Med*. 2000;343:1445–53.

53. Crisóstomo V, Maestre J, Maynar M, Sun F, Báez-Díaz C, Usón J, et al. Development of a Closed Chest Model of Chronic Myocardial Infarction in Swine: Magnetic Resonance Imaging and Pathological Evaluation. *ISRN Cardiol.* 2013;2013:781762.
54. Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation.* 1977;56(5):786–94.
55. Maroko PR, Libby P, Ginks WR, Bloor CM, Shell WE, Sobel BE, et al. Coronary artery reperfusion. I. Early effects on local myocardial function and the extent of myocardial necrosis. *J Clin Invest.* 1972;51(10):2710–6.
56. DeWood M A, Spores J, Notske R, Mouser LT, Burroughs R, Golden MS, et al. Prevalence of total coronary occlusion during the early hours of transmural myocardial infarction. *N Engl J Med.* 1980;303(16):897–902.
57. Chazov EI, Matveeva LS, Mazaev A V, Sargin KE, Sadovskaia G V, Ruda MI. Intracoronary administration of fibrinolysin in acute myocardial infarct. *Ter Arkh.* 1976;48(4):8–19.
58. Hartzler GO, Rutherford, B D, McConahay DR, Johnson, W L Jr, McCallister BD, Gura GMJ, Conn RC, Crockett JE. Percutaneous transluminal coronary angioplasty with and without thrombolytic therapy for treatment of acute myocardial infarction. *Am Heart J.* 1983;106(5 Pt 1):965–73.
59. Jiménez JFD. Tratamiento de la insuficiencia cardiaca avanzada en el siglo XXI . El trasplante cardiaco en la encrucijada. *rev.* 2015;15(B):8–12.
60. Sanz-Ruiz R, Núñez-García A, Gutiérrez-Ibañes E, Villa-Arranz A, Fernández-Santos ME, Sánchez-Fernández PL, et al. Resultados clínicos de las técnicas regenerativas en medicina cardiovascular. *Rev Esp Cardiol Supl [Internet].* 2013;13(E):81–91. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1131-3587\(13\)70096-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1131-3587(13)70096-7)
61. González-Vílchez F, Segovia Cubero J, Almenar L, Crespo-Leiro MG, Arizón JM, Sousa I, et al. Registro español de Trasplante Cardiaco . XXIV Informe Oficial de la Sección Registro Española de de Insuficiencia Cardiaca y Trasplante Cardiaco de la Sociedad Española de Cardiología. *Rev Esp Cardiol.* 2016;69(11):1071–82.
62. Beltrami A, Urbanek K, Kajstura J, Yan S, Finato N, Bussani R, et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2001;344(23):1750–

- 7.
63. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, et al. Adult Cardiac Stem Cells Are Multipotent and Support Myocardial Regeneration we have documented the existence of cycling ventricular myocytes in the normal and pathologic adult mam. *Cell*. 2003;114:763–76.
64. Sanz-Ruiz R, Fernández-Avilés F. Autologous and allogeneic cardiac stem cell therapy for cardiovascular diseases. *Pharmacol Res*. 2018;127:92–100.
65. Bolli R, Ghafghazi S. Cell therapy needs rigorous translational studies in large animal models. *J Am Coll Cardiol*. 2015;66(18):2000–4.
66. Fernández-Avilés F, Sanz-Ruiz R, Climent AM, Badimon L, Bolli R, Charron D, et al. Global overview of the transnational alliance for regenerative therapies in cardiovascular syndromes (TACTICS) Recommendations: A comprehensive series of challenges and priorities of cardiovascular regenerative medicine. *Circ Res*. 2018;122(2):199–201.
67. Fernández-Avilés F, Sanz-Ruiz R, Climent AM, Badimon L, Bolli R, Charron D, et al. Global position paper on cardiovascular regenerative medicine. *Eur Hear J*. 2017;38(33):2532–46.
68. van der Spoel TIG, Jansen of Lorkeers SJ, Agostoni P, van Belle E, Gyöngyösi M, Sluijter JPG, 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(4):649–58.
69. Malliaras K, Li T, Luthringer D, Errovitis J, Cheng K, Chakravarty T, et al. Safety and Efficacy of Allogeneic Cell Therapy in Infarcted Rats Transplanted with Mismatched Cardiosphere-Derived Cells. *Circulation*. 2012;125(1):100–12.
70. Crisostomo V, Casado JG, Baez-Diaz C, Blazquez R, Sanchez-Margallo FM. Allogeneic cardiac stem cell administration for acute myocardial infarction. *Expert Rev Cardio Ther*. 2015;13(3):285–99.
71. Richardson JD, Bertaso AG, Psaltis PJ, Frost L, Carbone A, Paton S, et al. Impact of Timing and Dose of Mesenchymal Stromal Cell Therapy in a Preclinical Model of Acute Myocardial Infarction. *J Card Fail*. 2013 May 1;19(5):342–53.
72. Tompkins BA, Balkan W, Winkler J, Gyöngyösi M, Goliash G, Fernández-Avilés F, et al.

- Preclinical Studies of Stem Cell Therapy for Heart Disease. *Circ Res.* 2018;122(7):1006–20.
73. Núñez García A, Sanz-Ruiz R, Fernández Santos M, Fernández-Avilés F. “Second-generation” stem cells for cardiac repair. *World J Stem Cells.* 2015;7(2):352–67.
 74. Bagnò L, Hatzistergos KE, Balkan W, Hare JM. Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy for Cardiovascular Disease: Progress and Challenges. *Mol Ther.* 2018;26(7):1610–23.
 75. Zwetsloot PP, Végh AMD, Jansen of Lorkeers SJ, van Hout GPJ, Currie GL, Sena ES, et al. Cardiac Stem Cell Treatment in Myocardial Infarction. A systematic review and meta-analysis of preclinical studies. *Circ Res.* 2016;118(8):1223–32.
 76. Orlic D. Adult bone marrow stem cells regenerate myocardium in ischemic heart disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 May;996:152–7.
 77. Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, Feinberg MS, Etzion S, Tessone A, et al. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: Feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation.* 2003;108(7):863–8.
 78. Nagaya N, Fujii T, Iwase T, Ohgushi H, Itoh T, Uematsu M, et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Am J Physiol Hear Circ Physiol.* 2004;287(6):H2670–6.
 79. Vulliet PR, Greeley M, Halloran SM, MacDonald KA, Kittleson MD. Intra-coronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs. *Lancet (London, England).* 2004 Mar;363(9411):783–4.
 80. Amado LC, Saliaris AP, Schuleri KH, St. John M, Xie J-S, Cattaneo S, et al. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci.* 2005;102(32):11474–9.
 81. Schuleri KH, Feigenbaum GS, Centola M, Weiss ES, Zimmet JM, Turney J, et al. Autologous mesenchymal stem cells produce reverse remodelling in chronic ischaemic cardiomyopathy. *Eur Heart J.* 2009;30(22):2722–32.
 82. Yin C, Liang Y, Zhang J, Ruan G, Li Z, Pang R, et al. Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells Relieve Hindlimb Ischemia through Enhancing Angiogenesis in Tree Shrews. *Stem Cells Int.* 2016;2016:9742034.

83. Vilahur G, Oñate B, Cubedo J, Béjar MT, Arderiu G, Peña E, et al. Allogenic adipose-derived stem cell therapy overcomes ischemia-induced microvessel rarefaction in the myocardium: Systems biology study. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(52):1–15.
84. Lee HW, Lee HC, Park JH, Kim BW, Ahn J, Kim JH, et al. Effects of intracoronary administration of autologous adipose tissue-derived stem cells on acute myocardial infarction in a porcine model. *Yonsei Medi J.* 2015;56(6):1522–9.
85. Heldman AW, DiFede DL, Fishman JE, Juan P, Trachtenberg BH, Karantalis V, et al. Transendocardial mesenchymal stem cells and mononuclear bone marrow cells for ischemic cardiomyopathy: the TAC-HFT randomized trial. *JAMA.* 2014;311(1):62–73.
86. Hare JM, DiFede DL, Rieger AC, Florea V, Landin AM, El-Khorazaty J, Khan A, Mushtaq M, Lowery MH, Byrnes JJ, Hendel RC, Cohen MG, Alfonso CE, Valasaki K, Pujol MV, Golpanian S, Ghersin E, Fishman JE, Pattany P, Gomes SA, Delgado C, Miki R, Abuzeid F, Vidr HA. Randomized Comparison of Allogeneic Versus Autologous Mesenchymal Stem Cells for Nonischemic Dilated Cardiomyopathy: POSEIDON-DCM Trial. *J Am Coll Cardiol.* 2017;69(5):526–37.
87. Florea V, Rieger AC, DiFede DL, El-Khorazaty J, Natsumeda M, Banerjee MN, et al. Dose comparison study of allogeneic mesenchymal stem cells in patients with ischemic cardiomyopathy (The TRIDENT study). *Circ Res.* 2017;121(11):1279–90.
88. Mathiasen AB, Qayyum AA, Jørgensen E, Helqvist S, Fischer-Nielsen A, Kofoed KF, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment in patients with severe ischaemic heart failure: A randomized placebo-controlled trial (MSC-HF trial). *Eur Hear J.* 2015;36(27):1744–53.
89. Broughton KM, Wang BJ, Firouzi F, Khalafalla F, Dimmeler S, Fernandez-Aviles F, et al. Mechanisms of Cardiac Repair and Regeneration. *Circ Res.* 2018;122(8):1151–63.
90. Bolli R, Chugh AR, D’Amario D, Loughran JH SM, Ikram S, Beache GM, Wagner SG, Leri A, Hosoda T SF, Elmore JB, Goichberg P, Cappetta D, Solankhi NK FI, Rokosh DG, Slaughter MS, Kajstura J AP. Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet.* 2011;378:1847–57.
91. Linke A, Muller P, Nurzynska D, Casarsa C, Torella D, Nascimbene A, et al. Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted

- myocardium, improving cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(25):8966–71.
92. Bolli R, Tang XL, Sanganalmath SK, Rimoldi O, Mosna F, Abdel-Latif A, Jneid H, Rota M, Leri A, Kajstura J. Intracoronary delivery of autologous cardiac stem cells improves cardiac function in a porcine model of chronic ischemic cardiomyopathy. *Circulation*. 2013;128(2):122–31.
93. Tang XL, Rokosh G, Sanganalmath S, Yuan F, Sato H, Mu J, et al. Intracoronary Administration of Cardiac Progenitor Cells Alleviates Left Ventricular. *Circulation*. 2010;121(2).
94. Dawn B, Stein AB, Urbanek K, Rota M, Whang B, Rastaldo R, et al. Cardiac stem cells delivered intravascularly traverse the vessel barrier, regenerate infarcted myocardium, and improve cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2005;102(10):3766–71. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0405957102>
95. Assmus B, Schächinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Döbert N, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*. 2002;106:3009–17.
96. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *J Card Fail*. 2013 Jul 10;364:141–8.
97. Schächinger V, Erbs S, Elsässer A, Haberbosch W, Hambrecht R, Hölschermann H, et al. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2006;355(12):1210–21.
98. Gyöngyösi M, Lang I, Dettke M, Beran G, Graf S, Sochor H, et al. Combined delivery approach of bone marrow mononuclear stem cells early and late after myocardial infarction: the MYSTAR prospective, randomized study. *Nat Clin Pr Cardiovasc Med* [Internet]. 2009 Nov 11;6(1):70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncpcardio1388>
99. Houtgraaf JH, Den Dekker WK, Van Dalen BM, Springeling T, De Jong R, Van Geuns RJ, et al. First experience in humans using adipose tissue-derived regenerative cells in the treatment of patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59(5):539–40.

100. Makkar RR, Smith RR, Cheng K, Malliaras K, Thomson LEJ, Berman D, et al. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet*. 2012;379(9819):895–904.
101. Chakravarty T, Makkar RR, Ascheim DD, Traverse JH, Schatz R, Demaria A, et al. ALLogeneic Heart STem Cells to Achieve Myocardial Regeneration (ALLSTAR) Trial: Rationale and Design. *Cell Transpl* [Internet]. 2017;26(2):205–14. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.3727/096368916X692933>
102. Fernández-Avilés F, Sanz-Ruiz R, Bogaert J, Casado Plasencia A, Gilaberte I, Belmans A, et al. Safety and Efficacy of Intracoronary Infusion of Allogeneic Human Cardiac Stem Cells in Patients with ST-segment Elevation Myocardial Infarction and Left Ventricular Dysfunction: A Multicenter Randomized, Double-Blind and Placebo-Controlled Clinical Trial. *Circ Res*. 2018;CIRCRESAHA.118.312823.
103. Chamuleau SAJ, Van Der Naald M, Climent AM, Kraaijeveld AO, Wever KE, Duncker DJ, et al. Translational research in cardiovascular repair: a call for a paradigm shift. *Circ Res*. 2018;122(2):310–8.
104. Fisher SA, Brunskill SJ, Doree C, Mathur A, Taggart DP, Martin-Rendon E. Stem cell therapy for chronic ischaemic heart disease and congestive heart failure. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;(4):CD007888.
105. Clifford DMM, Fisher SAA, Brunskill SJJ, Doree C, Mathur A, Watt S, et al. Stem cell treatment for acute myocardial infarction. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015;(9):CD006536.
106. Mazhari R, Hare JM. Mechanisms of action of mesenchymal stem cells in cardiac repair: potential influences on the cardiac stem cell niche. *Nat Clin Pr Cardiovasc Med*. 2007;4:S21-6.
107. Gnecci M, Zhang Z, Ni A DV. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res*. 2008;103(11):1204–19.
108. Nadal-Ginard B, Ellison GM, Torella D. The cardiac stem cell compartment is indispensable for myocardial cell homeostasis, repair and regeneration in the adult. *Stem Cell Res*. 2014;13:615–30.

109. Duran JM, Makarewich CA, Sharp TE, Starosta T, Fang Z, Hoffman NE, et al. Bone-derived stem cells repair the heart after myocardial infarction through transdifferentiation and paracrine signaling mechanisms. 2013;113(5):539–552.
110. Lewis FC, Kumar SD, Ellison-Hughes GM. Non-invasive strategies for stimulating endogenous repair and regenerative mechanisms in the damaged heart. *Pharmacol Res.* 2018;127:33–40.
111. Siltanen A, Kitabayashi K, Lakkisto P, Mäkelä J, Pättilä T, Ono M, et al. hHGF overexpression in myoblast sheets enhances their angiogenic potential in rat chronic heart failure. *PLoS One.* 2011;6(4):e19161.
112. Okayama K, Azuma J, Dosaka N, Iekushi K, Sanada F, Kusunoki H, et al. Hepatocyte growth factor reduces cardiac fibrosis by inhibiting endothelial-mesenchymal transition. *Hypertension.* 2012;59:958–65.
113. Deuse T, Peter C, Fedak PWM, Doyle T, Reichenspurner H, Zimmermann WH, et al. Hepatocyte growth factor or vascular endothelial growth factor gene transfer maximizes mesenchymal stem cell-based myocardial salvage after acute myocardial infarction. *Circulation.* 2009;120(suppl. 1):S247–54.
114. Jin H, Yang R, Li WEI, Ogasawara AK, Schwall R, Eberhard D a, et al. Early Treatment with Hepatocyte Growth Factor Improves Cardiac Function in Experimental Heart Failure Induced by Myocardial Infarction. *Pharmacology.* 2003;304(2):654–60.
115. Xu Z, Tao Z, Xu Z, Yang Y, Wang H, Wang L, et al. Cardiac-Specific Expression of the Hepatocyte Growth Factor (HGF) Under the Control of a Tnlc Promoter Confers a Heart Protective Effect After Myocardial Infarction (MI). *Curr Gene Ther.* 2014;14(1):63–73.
116. Ueda H, Nakamura T, Matsumoto K, Sawa Y, Matsuda H, Nakamura T. A potential cardioprotective role of hepatocyte growth factor in myocardial infarction in rats. *Cardiovasc Res.* 2001;51(1):41–50.
117. Iwasaki M, Koyanagi M, Kossmann H, Monsefi N, Rupp S, Trauth J, et al. Hepatocyte growth factor mobilizes non-bone marrow-derived circulating mesoangioblasts. *Eur Heart J.* 2011;32(5):627–36.
118. Yumoto A, Fukushima Kusano K, Nakamura K, Hashimoto K, Aoki M, Morishita R, et al. Hepatocyte growth factor gene therapy reduces ventricular arrhythmia in animal

- models of myocardial ischemia. Vol. 59, Acta Med Okayama. 2005. p. 73–8.
119. Nakamura T, Mizuno S, Matsumoto K, Sawa Y, Matsuda H, Nakamura T. Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by endogenous and exogenous HGF. *J Clin Invest.* 2000;106(12):1511–9.
 120. Wang Y, Liu J, Tao Z, Wu P, Cheng W, Du Y, et al. Exogenous HGF Prevents Cardiomyocytes from Apoptosis after Hypoxia via Up-Regulating Cell Autophagy. *Cell Physiol Biochem.* 2016;38(6):2401–13.
 121. González MN, de Mello W, Butler-Browne GS, Silva-Barbosa SD, Mouly V, Savino W, et al. HGF potentiates extracellular matrix-driven migration of human myoblasts: Involvement of matrix metalloproteinases and MAPK/ERK pathway. *Skelet Muscle.* 2017;7(1):20.
 122. Forte G, Minieri M, Cossa P, Antenucci D, Sala M, Gnocchi V, et al. Hepatocyte Growth Factor Effects on Mesenchymal Stem Cells: Proliferation, Migration, and Differentiation. *Stem Cells.* 2006;24(1):23–33.
 123. Yang ZJ, Chen B, Sheng Z, Zhang DG, Jia EZ, Wang W, et al. Improvement of heart function in postinfarct heart failure swine models after hepatocyte growth factor gene transfer: Comparison of low-, medium- and high-dose groups. *Mol Biol Rep.* 2010;37(4):2075–81.
 124. Koudstaal S, Bastings MMC, Feyen DAM, Waring CD, Van Slochteren FJ, Dankers PYW, et al. Sustained delivery of insulin-like growth factor-1/hepatocyte growth factor stimulates endogenous cardiac repair in the chronic infarcted pig heart. *J Cardiovasc Transl Res.* 2014;7(2):232–41.
 125. Wang W, Yang ZJ, Ma DC, Wang LS, Xu SL, Zhang YR, et al. Induction of collateral artery growth and improvement of post-infarct heart function by hepatocyte growth factor gene transfer. *Acta Pharmacol Sin.* 2006;27(5):555–60.
 126. Gómez-Mauricio G, Moscoso I, Martín-Cancho MF, Crisóstomo V, Prat-Vidal C, Báez-Díaz C, et al. Combined administration of mesenchymal stem cells overexpressing IGF-1 and HGF enhances neovascularization but moderately improves cardiac regeneration in a porcine model. *Stem Cell Res Ther [Internet].* 2016;7(1):1–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13287-016-0350-z>

127. Rastogi S, Guerrero M, Wang M, Ilisar I, Sabbah MS, Gupta RC, et al. Myocardial transfection with naked DNA plasmid encoding hepatocyte growth factor prevents the progression of heart failure in dogs. *Am J Physiol Hear Circ Physiol*. 2011;300(4):H1501-9.
128. Madonna R, Cevik C, Nasser M, de Caterina R. Hepatocyte growth factor: Molecular biomarker and player in cardioprotection and cardiovascular regeneration. *Thromb Haemost*. 2012;107(4):656–61.
129. Wolf D, Li J, Ley K. HGF Guides T Cells into the Heart. *Immunity* [Internet]. 2015;42(6):979–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2015.06.001>
130. Lieb W, Safa R, Benjamin EJ, Xanthakis V, Yin X, Sullivan LM, et al. Vascular endothelial growth factor, its soluble receptor, and hepatocyte growth factor: Clinical and genetic correlates and association with vascular function. *Eur Hear J*. 2009;30(9):1121–7.
131. Sala V, Crepaldi T. Novel therapy for myocardial infarction: Can HGF/Met be beneficial? *Cell Mol Life Sci*. 2011;68(10):1703–17.
132. Nakamura T, Mizuno S. The discovery of Hepatocyte Growth Factor (HGF) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine. *Proc Jpn Acad, Ser B Phys Biol Sci*. 2010;86(6):588–610.
133. Gherardi E, Sandin S, Petoukhov M V, Finch J, Youles ME, Ofverstedt L-G, et al. Structural basis of hepatocyte growth factor/scatter factor and MET signalling. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2006;103(11):4046–51. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1449643&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
134. Barbeito C, Laube A. Los Factores De Crecimiento. Aspectos Básicos Y Potencialidades Terapéuticas. *Analecta Vet*. 2005;8(251):8–27.
135. Gallo S, Sala V, Gatti S, Crepaldi T. HGF/Met Axis in Heart Function and Cardioprotection. *Biomedicines*. 2014;2(4):247–62.
136. Wang L-S, Wang H, Zhang Q-L, Yang Z-J, Kong F-X, Wu C-T. Hepatocyte Growth Factor Gene Therapy for Ischemic Diseases. *Hum Gene Ther*. 2018;29(4):413–23.
137. Nakagami H, Morishita R, Yamamoto K, Taniyama Y, Aoki M, Matsumoto K, et al. Mitogenic and Antiapoptotic Actions of Hepatocyte Growth Factor Through ERK, STAT3,

- and Akt in Endothelial Cells. *Hypertension*. 2001;37(2):581–6.
138. Rong SL, Wang XL, Zhang CY, Song ZH, Cui LH, He XF, et al. Transplantation of HGF gene-engineered skeletal myoblasts improve infarction recovery in a rat myocardial ischemia model. *PLoS One*. 2017;12(5):e0175807.
 139. V J, YJ W, Bish LT, Pirolli T, Chatterjee S, Berry MF, et al. Gene Transfer of Hepatocyte Growth Factor Attenuates Postinfarction Heart Failure. *Circulation*. 2003;108:II230-6.
 140. Chen H, Xia R, Li Z, Zhang L, Xia C, Ai H, et al. Mesenchymal stem cells combined with hepatocyte growth factor therapy for attenuating ischaemic myocardial fibrosis: Assessment using multimodal molecular imaging. *Sci Rep*. 2016;6:33700.
 141. Liu J, Wu P, Wang Y, Du Y, Nan A, Liu S, et al. Ad-HGF improves the cardiac remodeling of rat following myocardial infarction by upregulating autophagy and necroptosis and inhibiting apoptosis. *Am J Transl Res*. 2016;8(11):4605–27.
 142. Madonna R, Rokosh G, de Caterina R, Bolli R. Hepatocyte growth factor/Met gene transfer in cardiac stem cells —potential for cardiac repair. *Basic Res Cardiol*. 2010;105(4):443–52.
 143. Wang X, Guo Z, Ding Z, Mehta JL. Inflammation, autophagy, and apoptosis after myocardial infarction. *J Am Hear Assoc*. 2018;7(9).
 144. Frangogiannis NG. Cell biological mechanisms in regulation of the post-infarction inflammatory response. *Curr Opin Physiol*. 2018;1:7–13.
 145. Mizuno S, Nakamura T. Prevention of neutrophil extravasation by hepatocyte growth factor leads to attenuations of tubular apoptosis and renal dysfunction in mouse ischemic kidneys. *Am J Pathol*. 2005;166(6):1895–905.
 146. Hausenloy D, Yellon D. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest*. 2013;123(1):92–100.
 147. Rong S-L, Wang X-L, Wang Y-C, Wu H, Zhou X-D, Wang Z-K, et al. Anti-inflammatory activities of hepatocyte growth factor in post-ischemic heart failure. *Acta Pharmacol Sin* [Internet]. 2018;1–9. Available from: [http://europepmc.org/search?query=\(DOI:10.1038/aps.2018.14\)](http://europepmc.org/search?query=(DOI:10.1038/aps.2018.14))
 148. Kamimoto M, Mizuno S, Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor prevents

- multiple organ injuries in endotoxemic mice through a heme oxygenase-1-dependent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2009 Mar 6 [cited 2018 May 17];380(2):333–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X0900117X?via%3Dihub>
149. Futamatsu H, Suzuki J, Mizuno S, Koga N, Adachi S, Kosuge H, et al. Hepatocyte Growth Factor Ameliorates the Progression of Experimental Autoimmune Myocarditis: A Potential Role for Induction of T Helper 2 Cytokines. *Circ Res*. 2005;96(8):823–30.
 150. Travers JG, Kamal FA, Robbins J, Yutzey KE, Burns C. Cardiac Fibrosis : The Fibroblast Awakens. *Circ Res*. 2016;118(6):1021–40.
 151. Yang Q, He GW, Underwood MJ, Yu CM. Cellular and molecular mechanisms of endothelial ischemia/reperfusion injury: Perspectives and implications for postischemic myocardial protection. *Am J Transl Res*. 2016;8(2):765–77.
 152. Purdie KJ, Whitley GS, Johnstone AP, Cartwright JE. Hepatocyte growth factor-induced endothelial cell motility is mediated by the upregulation of inducible nitric oxide synthase expression. *CardiovascRes*. 2002;54(3):659–68.
 153. Tamargo J, Caballero R, Gómez R, Núñez L, Vaquero M, Delpón E. Efectos del óxido nítrico sobre la función cardíaca. *Revi Esp Cardiol*. 2006;6(Supl.A):3–20.
 154. Piek A, de Boer RA, Silljé HHW. The fibrosis-cell death axis in heart failure. *Hear Fail Rev*. 2016;21(2):199–211.
 155. Fan Z, Guan J. Antifibrotic therapies to control cardiac fibrosis. *Biomater Res* [Internet]. 2016;20(1):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s40824-016-0060-8>
 156. Taniyama Y, Morishita R, Nakagami H, Moriguchi A, Sakonjo H, Shokei-Kim, et al. Potential contribution of a novel antifibrotic factor, hepatocyte growth factor, to prevention of myocardial fibrosis by angiotensin II blockade in cardiomyopathic hamsters. *Circulation*. 2000;102(2):246–52.
 157. Wang Y, Ahmad N, Wani MA, Ashraf M. Hepatocyte growth factor prevents ventricular remodeling and dysfunction in mice via Akt pathway and angiogenesis. *J Mol Cell Cardiol*. 2004 Nov 1;37(5):1041–52.
 158. Kitta K, Day RM, Ikeda T, Suzuki YJ. Hepatocyte growth factor protects cardiac myocytes against oxidative stress-induced apoptosis. *Free Radic Biol Med*. 2001 Oct 1;31(7):902–

- 10.
159. Arechederra M, Carmona R, González-Nuñez M, Gutiérrez-Uzquiza Á, Bragado P, Cruz-González I, et al. Met signaling in cardiomyocytes is required for normal cardiac function in adult mice. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1832(12):2204–15.
160. Rossello X, Riquelme JA, He Z, Taferner S, Vanhaesebroeck B, Davidson SM, et al. The role of PI3K α isoform in cardioprotection. *Basic Res Cardiol*. 2017;112(6).
161. Gallo S, Gatti S, Sala V, Albano R, Costelli P, Casanova E, et al. Agonist antibodies activating the Met receptor protect cardiomyoblasts from cobalt chloride-induced apoptosis and autophagy. *Cell Death Dis*. 2014;5(4):e1185-12.
162. Pietronave S, Forte G, Locarno D, Merlin S, Zamperone A, Nicotra G, et al. Agonist monoclonal antibodies against HGF receptor protect cardiac muscle cells from apoptosis. *Am J Physiol Hear Circ Physiol* 298. 2010;298(4):H1155-65.
163. Gallo S, Gatti S, Sala V, Comoglio PM, Crepaldi T. HGF/Met axis has anti-apoptotic and anti-autophagic function in hypoxic cardiac injury. *Recept Clini Invest [Internet]*. 2014;1:e234. Available from: <http://www.smartscitech.com/index.php/rci/article/view/234>
164. Riess I, Sala V, Leo C, Demaria M, Gatti S, Gallo S, et al. A mouse model for spatial and temporal expression of HGF in the heart. *Transgenic res*. 2011 Dec;20(6):1203–16.
165. Kibbe MR, Hirsch AT, Mendelsohn FO, Davies MG, Pham H, Saucedo J, et al. Safety and efficacy of plasmid DNA expressing two isoforms of hepatocyte growth factor in patients with critical limb ischemia. *Gene Ther*. 2016 Mar;23(3):306–12.
166. Kim JS, Hwang HY, Cho KR, Park EA, Lee W, Paeng JC, et al. Intramyocardial transfer of hepatocyte growth factor as an adjunct to CABG: Phase I clinical study. *Gene Ther*. 2013;20:717–22.
167. Zhi-Jian Y, Shun-Lin X, Bo C, Shu-Lan Z, You-Long Z, Wang W, et al. Hepatocyte growth factor plays a critical role in the regulation of cytokine production and induction of endothelial progenitor cell mobilization: a pilot gene therapy study in patients with coronary heart disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2009;36:790–6.
168. Yang Z-J, Zhang Y-R, Chen B, Zhang S-L, Jia E-Z, Wang L-S, et al. Phase I clinical trial on intracoronary administration of Ad-hHGF treating severe coronary artery disease. *Mol*

- Biol Rep. 2009 Jul;36(6):1323–9.
169. Urbanek K, Rota M, Cascapera S, Bearzi C, Nascimbene A, De Angelis A, et al. Cardiac stem cells possess growth factor-receptor systems that after activation regenerate the infarcted myocardium, improving ventricular function and long-term survival. *Circ Res.* 2005;97(7):663–73.
 170. Dib N, Khawaja H, Varner S, McCarthy M, Campbell A. Cell therapy for cardiovascular disease: A comparison of methods of delivery. *J Cardiovasc Transl Res.* 2011;4(2):177–81.
 171. Sheng CC, Zhou L, Hao J. Current stem cell delivery methods for myocardial repair. *Biomed Res Int.* 2012;2013.
 172. Crisostomo V, Baez-Diaz C, Maestre J, Garcia-Lindo M, Sun F, Casado JG, 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;13:156.
 173. Hernández RM, Orive G, Murua A, Pedraz JL. Microcapsules and microcarriers for in situ cell delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010;62(7–8):711–30.
 174. Anitua E, Sánchez M, Orive G, Andia I. Delivering growth factors for therapeutics. *Trends Pharmacol Sci.* 2008;29(1):37–41.
 175. Orive G, Santos E, Poncelet D, Hernández RM, Pedraz JL, Wahlberg LU, et al. Cell encapsulation: technical and clinical advances. *Trends Pharmacol Sci.* 2015;36(8):537–46.
 176. Prabhu SD, Frangogiannis NG. The biological basis for cardiac repair after myocardial infarction. *Circ Res.* 2016;119(1):91–112.
 177. Frangogiannis NG. The extracellular matrix in myocardial injury , repair , and remodeling. *J Clin Invest.* 2017;127(5):1600–12.
 178. Dimmeler S, Burchfield J, Zeiher AM. Cell-based therapy of myocardial infarction. *Arter Thromb Vasc Biol.* 2008;28(2):208–16.
 179. Kubal C, Sheth K, Nadal-Ginard B, Galiñanes M. Bone marrow cells have a potent anti-ischemic effect against myocardial cell death in humans. *J Thorac Cardiovasc Surg.*

- 2006;132(5):1112–8.
180. Bartunek J, Wijns W, Heyndrickx GR VM. Timing of intracoronary bone-marrow-derived stem cell transplantation after ST-elevation myocardial infarction. *N Engl J Med*. 1985 Mar 1;312(14):932–6.
 181. Chorro FJ, Such-Belenguer L, López-Merino V. Modelos animales de enfermedad cardiovascular. *Rev Esp Cardiol*. 2009;62(1):69–84.
 182. Milani-Nejad N, Janssen PM. Small and Large Animal Models in Cardiac Contraction Research: Advantages and Disadvantages. *Pharmacol Ther*. 2014;141(3):235–49.
 183. Zwetsloot PP, Kouwenberg LHJA, Sena ES, Eding JE, den Ruijter HM, Sluijter JPG, et al. Optimization of large animal MI models; a systematic analysis of control groups from preclinical studies. *Sci Rep*. 2017;7(1):14218.
 184. Bolli R. Reflections on the irreproducibility of scientific papers. *Circ Res*. 2015;117(8):665–6.
 185. Lindsey ML, Bolli R, Canty JM, Du X-J, Frangogiannis NG, Frantz S, et al. Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction. *Am J Physiol Hear Circ Physiol* [Internet]. 2018;314(4):H812–38. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpheart.00335.2017>
 186. Lelovas PP, Kostomitsopoulos NG, Xanthos TT. A comparative anatomic and physiologic overview of the porcine heart. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2014;53(5):432–8.
 187. Lukács E, Magyari B, Tóth L, Petrási Z, Repa I, Koller A, et al. Overview of large animal myocardial infarction models (review). *Acta Physiol Hung*. 2012;99(4):365–81.
 188. Camacho P, Fan H, Liu Z, He J-Q. Large Mammalian Animal Models of Heart Disease. *J Cardiovasc Dev Dis*. 2016;3(4):30.
 189. Kim W, Jeong MH, Sim DS, Hong YJ, Song HC, Park JT, et al. A porcine model of ischemic heart failure produced by intracoronary injection of ethyl alcohol. *Heart Vessels*. 2011;26(3):342–8.
 190. Dixon AJ, Spinale FG. Large animal models of heart failure: a critical link in the translation of basic science to clinical practice. *Circ Hear Fail*. 2009;2(3):262–71.
 191. Gómez FA, Ballesteros LE. Morphologic expression of the left coronary artery in pigs. *An*

- approach in relation to human heart. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2014;29(2):214–20.
192. Suzuki Y, Yeung AC, Ikeno F. The Representative Porcine Model for Human Cardiovascular Disease. *J Biomed Biotechnol* [Internet]. 2011;2011:1–10. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2011/195483/>
 193. Rodrigues M, Silva a C, Águas a P, Grande NR. The coronary circulation of the pig heart : comparison with the human heart. *Eur J Anat*. 2005;9(2):67–87.
 194. Gálvez-Montón C, Prat-Vidal C, Díaz-Güemes I, Crisóstomo V, Soler-Botija C, Roura S, et al. Comparison of two preclinical myocardial infarct models: Coronary coil deployment versus surgical ligation. *J Transl Med*. 2014;12:137.
 195. McCall FC, Telukuntla KS, Karantalis V, Suncion VY, Heldman AW, Mushtaq M, et al. Myocardial infarction and intramyocardial injection models in swine. *Nat Protoc*. 2012;7(8):1479–96.
 196. Crick SJ, Sheppard MN, Ho SY, Gebstein L, Anderson RH. Anatomy of the pig heart: comparisons with normal human cardiac structure. *J Anat*. 1998;193(Pt1):105–19.
 197. Suzuki Y, Yeung AC, Ikeno F. The Representative Porcine Model for Human Cardiovascular Disease. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:1–10.
 198. Cuellas-Ramón C, de Prado AP, Pérez-Martínez C, Diego-Nieto A, Gonzalo-Orden JM, Fernández-Vázquez F. Investigación traslacional en isquemia, infarto de miocardio y reperfusión. *Rev Esp Cardiol Supl*. 2013;13(E):57–63.
 199. Weaver ME, Pantely GA, Bristow JD, Ladley HD. A quantitative study of the anatomy and distribution of coronary arteries in swine in comparison with other animals and man. *Cardiovasc Res*. 1986 Dec;20(12):907–17.
 200. Santos-Gallego CG, Badimon JJ, Ibáñez B. Modelos experimentales de aterosclerosis. *Rev Esp Cardiol Supl*. 2013;13(5):3–12.
 201. Cuellas-Ramón C, de Prado AP, Pérez-Martínez C, Diego-Nieto A, Gonzalo-Orden JM, Fernández-Vázquez F. Investigación traslacional en isquemia, infarto de miocardio y reperfusión. *Rev Esp Cardiol Supl*. 2013;13(5):57–63.
 202. Klocke R, Tian W, Kuhlmann MT, Nikol S. Surgical animal models of heart failure related to coronary heart disease. *Cardiovasc Res*. 2007;74(1):29–38.

203. Pérez de Prado A, Cuellas-Ramón C, Regueiro-Purriños M, Gonzalo-Orden JM, Pérez-Martínez C, Altónaga JR, et al. Closed-chest experimental porcine model of acute myocardial infarction-reperfusion. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2009;60(3):301–6.
204. Ishikawa K, Agüero J, Tilemann L, Ladage D, Hammoudi N, Kawase Y, et al. Characterizing preclinical models of ischemic heart failure: differences between LAD and LCx infarctions. *Am J Physiol Hear Circ Physiol*. 2014;307(10):H1478–86.
205. Garcia Dorado D, Thérout P, Elizaga J, Galiñanes M, Solares J, Riesgo M, et al. Myocardial reperfusion in the pig heart model: infarct size and duration of coronary occlusion. *Cardiovasc Res*. 1987;21:537–44.
206. Zhang J, Wilke N, Wang Y, Zhang Y, Wang C, Eijgelshoven MH, Cho YK, Murakami Y, Ugurbil K, Bache RJ FA. Functional and Bioenergetic Consequences of Postinfarction Left Ventricular Remodeling in a New Porcine Model. *Circulation*. 1996;94(5):1089–100.
207. Verdouw PD, van den Doel MA, de Zeeuw S, Duncker DJ. Animal models in the study of myocardial ischaemia and ischaemic syndromes. *Cardiovasc res*. 1998;39(1):121–35.
208. Huang SY, Lin JH, Lin EC, Yang PC, Tsou HL. 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(6):545–9.
209. Weis SM, Cheresch DA. Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature*. 2005 Sep;437(7058):497–504.
210. Wojakowski W, Tendera M, Cybulski W, Zuba-Surma EK, Szade K, Florczyk U, et al. Effects of intracoronary delivery of allogenic bone marrow-derived stem cells expressing heme oxygenase-1 on myocardial reperfusion injury. *Thromb Haemost*. 2012;108(3):464–75.
211. TIMI study group. The Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) trial. Phase I findings. *N Engl J Med*. 1985 Apr;312(14):932–6.
212. Pérez de Prado A, Fernández-Vázquez, Felipe Cuellas-Ramón J. Carlos Michael Gibson C. Coronariografía: más allá de la anatomía coronaria. *Rev Esp Cardiol*. 2006;59(6):596–608.
213. Klein H, Puschmann S, Schaper J, Schaper W. The mechanism of the tetrazolium reaction in identifying experimental myocardial infarction. Vol. 393, *Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medicin*. 1981. 287-297 p.

214. Krombach GA, Kinzel S, Mahnken AH, Gunther RW, Buecker A. Minimally invasive close-chest method for creating reperfused or occlusive myocardial infarction in swine. *Invest radiol.* 2005 Jan;40(1):14–8.
215. Suzuki Y, Lyons JK, Yeung AC, Ikeno F. In vivo porcine model of reperfused myocardial infarction: in situ double staining to measure precise infarct area/area at risk. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2008 Jan;71(1):100–7.
216. Chen Y, Shao DB, Zhang FX, Zhang J, Yuan W, Man YL, et al. Establishment and evaluation of a swine model of acute myocardial infarction and reperfusion-ventricular fibrillation-cardiac arrest using the interventional technique. *J Chin Med Assoc.* 2013;76(9):491–6.
217. Hausenloy DJ, Botker HE, Engstrom T, Erlinge D, Heusch G, Ibanez B, et al. Targeting reperfusion injury in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: Trials and tribulations. *Eur Heart J.* 2017;38(13):935–941d.
218. Wesley D G, L Kraitchman D. Técnicas no invasivas de imagen cardiovascular en investigación básica: Aplicación en la terapia celular. *Rev Esp Cardiol.* 2009;62(8):918–27.
219. Kraitchman DL, Bluemke DA, Chin BB, Heldman AW, Heldman AW. A minimally invasive method for creating coronary stenosis in a swine model for MRI and SPECT imaging. *Invest radiolradiology.* 2000 Jul;35(7):445–51.
220. Tsang HG, Rashdan NA, Whitelaw CBA, Corcoran BM, Summers KM, MacRae VE. Large animal models of cardiovascular disease. *Cell Biochem Funct* [Internet]. 2016;34(3):113–32. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cbf.3173>
221. Zhou L, Chen BP, Kluger J, Fan C, Chow MSS. Effects of amiodarone and its active metabolite desethylamiodarone on the ventricular defibrillation threshold. *J Am Coll Cardiol.* 1998;31(7):1672–8.
222. Dib N, Diethrich EB, Campbell A, Gahremanpour A, McGarry M, Opie SR. A percutaneous swine model of myocardial infarction. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2006;53(3):256–63.
223. Munz MR, Faria MA, Monteiro JR, Águas AP, Amorim MJ. Surgical porcine myocardial infarction model through permanent coronary occlusion. *Comp Med.* 2011;61(5):445–

- 52.
224. Capone RJ, Most AS, Sydlik PA. Precordial ST Segment Mapping. *Chest*. 1975 May 1;67:577–82.
225. Ibañez B, James S, Agewall S, Antunes MJ, Bucciarelli-Ducci C, Bueno H, et al. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Eur Hear J*. 2018;39(2):119–77.
226. Elizaga J, Garcia Dorado D, Galinanes M, Solares J, Fernandez Aviles F. Quantitative study of the differences in the areas of distribution of the epicardial coronary arteries in the dog and pig. *Rev Esp Cardiol*. 1985;38(5):348–50.
227. Báez-Díaz C. Estudio comparativo de la administración intracoronaria de dosis crecientes de células madre cardíacas alogénicas de origen porcino en un modelo animal de infarto agudo de miocardio: Valoración de seguridad y eficacia. (Tesis doctoral). Biblioteca Cáceres. 2013.
228. Amin ST, Morrow DA, Braunwald E, Sloan S, Contant C, Murphy S, et al. Dynamic TIMI risk score for STEMI. *J Am Heart Assoc*. 2013;2(1):1–9.
229. Thiagarajan H, Thiyagamoorthy U, Shanmugham I, Dharmalingam Nandagopal G, Kaliyaperumal A. Angiogenic growth factors in myocardial infarction: a critical appraisal. *Hear Fail Rev*. 2017;22:665–83.
230. Makarevich PI, Dergilev KV, Tsokolaeva ZI, Boldyreva MA, Shevchenko EK, Gluhanyuk EV, et al. Angiogenic and pleiotropic effects of VEGF165 and HGF combined gene therapy in a rat model of myocardial infarction. *PLoS One*. 2018;13(5):1–25.
231. Marín-García J. Cell death in the pathogenesis and progression of heart failure. *Hear Fail Rev*. 2016;21(2):117–21.
232. Nieves Meneses YA. Medición de citoquinas en cultivos in vitro de células mononucleares de sangre periférica humana expuestos a Nux vómica homeopatizada. 2012;51.
233. Hong KU, Guo Y, Li QH, Cao P, Al-Maqtari T, Vajravelu BN, et al. C-Kit+ Cardiac Stem Cells Alleviate Post-Myocardial Infarction Left Ventricular Dysfunction Despite Poor Engraftment and Negligible Retention in the Recipient Heart. *PLoS One*. 2014;9(5):1–7.

234. Strauer BE, Steinhoff G. 10 years of intracoronary and intramyocardial bone marrow stem cell therapy of the heart: From the methodological origin to clinical practice. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58(11):1095–104.
235. Johnston P V., Sasano T, Mills K, Evers R, Lee ST, Smith RR, et al. Engraftment, differentiation, and functional benefits of autologous cardiosphere-derived cells in porcine ischemic cardiomyopathy. *Circulation*. 2009;120(12):1075–83.
236. Díez-delhoyo F, Gutiérrez-Ibañes E, Loughlin G, Sanz-Ruiz R, Vázquez-Álvarez ME, Sarnago-Cebada F, et al. Coronary physiology assessment in the catheterization laboratory. *World J Cardiol*. 2015;7(9):525–38.
237. Gao LR, Chen Y, Zhang NK, Yang XL, Liu HL, Wang ZG, et al. Intracoronary infusion of Wharton’s jelly-derived mesenchymal stem cells in acute myocardial infarction: Double-blind, randomized controlled trial. *BMC Med*. 2015;13:162.
238. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Gattermann N, Hernandez A, Sorg R V, et al. Intracoronary, human autologous stem cell transplantation for myocardial regeneration following myocardial infarction. *Dtsch Med Wochenschr*. 2001 Aug;126(34–35):932–8.
239. Janssens S, Dubois C, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W, et al. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: Double-blind, randomised controlled trial. *Lancet*. 2006;367(9505):113–21.
240. Doyle B, Kemp BJ, Chareonthaitawee P, Reed C, Schmeckpeper J, Sorajja P, et al. Dynamic Tracking During Intracoronary Injection of ¹⁸F-FDG-Labeled Progenitor Cell Therapy for Acute Myocardial Infarction. *J Nucl Med*. 2007;48(10):1708–14.
241. Moelker AD, Baks T, Van Den Bos EJ, Van Geuns RJ, De Feyter PJ, Duncker DJ, et al. Reduction in infarct size, but no functional improvement after bone marrow cell administration in a porcine model of reperfused myocardial infarction. *Eur Hear J*. 2006;27(24):3057–64.
242. Saenz Del Burgo L, Ciriza J, Espona-Noguera A, Illa X, Cabruja E, Orive G, et al. 3D Printed porous polyamide macrocapsule combined with alginate microcapsules for safer cell-based therapies. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–14.
243. Regueiro-Purriños M, Ajenjo JM, Perez de Prado A, Garcia-Gomez M, Altónaga JR,

- Gonzalo-Orden JM, et al. Anestesia en el modelo animal de investigación cardiovascular. *Revi Esp Cardiol Supl.* 2013;13(E):47–56.
244. Chen J, Gao L, Yao M, Chen J. Ventricular arrhythmia onset during diagnostic coronary angiography with a 5F or 4F universal catheter. *Rev Esp Cardiol.* 2008 Oct;61(10):1092–5.
245. Souto ALM, Souto RM, Teixeira ICR, Nacif MS. Myocardial Viability on Cardiac Magnetic Resonance. *Arq Bras Cardiol.* 2017;458–69.
246. San Román JA, Candell-Riera J, Arnold R, Sánchez PL, Agudé-Bruix S, Bermejo J, et al. Análisis cuantitativo de la función ventricular izquierda como herramienta para la investigación clínica. *Fundamentos y metodología. Rev Esp Cardiol.* 2009;62:535–51.
247. Sanz J, Larocca G. Mapeo miocárdico con resonancia magnética cardiaca: valor diagnóstico de las nuevas secuencias. *Rev Esp Cardiol.* 2016;69(9):849–61.
248. Khan JN, McCann GP. Cardiovascular magnetic resonance imaging assessment of outcomes in acute myocardial infarction. *World J Cardiol.* 2017;9(2):109–33.
249. Reimer KA, Jennings RB. The changing anatomic reference base of evolving myocardial infarction. Underestimation of myocardial collateral blood flow and overestimation of experimental anatomic infarct size due to tissue edema, hemorrhage and acute inflammation. *Circulation.* 1979 Oct;60(4):866–76.
250. Hundley WG, Bluemke DA, Finn JP, Flamm SD, Fogel MA, Friedrich MG, 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.
251. Bulluck H, Hammond-Haley M, Weinmann S, Martinez-Macias R, Hausenloy DJ. Myocardial Infarct Size by CMR in Clinical Cardioprotection Studies: Insights From Randomized Controlled Trials. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2017;10(3):230–40.
252. Jablonowski R, Engblom H, Kanski M, Nordlund D, Koul S, Van Der Pals J, et al. Contrast-Enhanced CMR Overestimates Early Myocardial Infarct Size: Mechanistic Insights Using ECV Measurements on Day 1 and Day 7. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2015;8(12):1379–89.
253. Fernández-Jiménez R, Sánchez-González J, Agüero J, García-Prieto J, López-Martín GJ, García-Ruiz JM, et al. Myocardial edema after ischemia/reperfusion is not stable and

- follows a bimodal pattern: Imaging and histological tissue characterization. *J Am Coll Cardiol.* 2015;65(4):315–23.
254. Fernández-Jiménez R, Galán-Arriola C, Sánchez-González J, Agüero J, López-Martín GJ, Gomez-Talavera S, et al. Effect of Ischemia Duration and Protective Interventions on the Temporal Dynamics of Tissue Composition after Myocardial Infarction. *Circ Res.* 2017;121(4):439–50.
255. Garcia-Dorado D, Théroux P, Solares J, Alonso J, Fernandez-Avilés F, Elizaga J, et al. Determinants of hemorrhagic infarcts. Histologic observations from experiments involving coronary occlusion, coronary reperfusion, and reocclusion. *Am J Pathol.* 1990;137(2):301–11.
256. Ghugre NR, Pop M, Thomas R, Newbigging S, Qi X, Barry J, et al. Hemorrhage promotes inflammation and myocardial damage following acute myocardial infarction: Insights from a novel preclinical model and cardiovascular magnetic resonance. *J Cardiovasc Magn Reson.* 2017;19(1):1–13.
257. Betgem RP, De Waard GA, Nijveldt R, Beek AM, Escaned J, Van Royen N. Intramyocardial haemorrhage after acute myocardial infarction. *Nat Rev Cardiol.* 2015;12(3):156–67.
258. Hirsch A, Nijveldt R, Van Der Vleuten PA, Tijssen JGP, Van Der Giessen WJ, Tio RA, et al. Intracoronary infusion of mononuclear cells from bone marrow or peripheral blood compared with standard therapy in patients after acute myocardial infarction treated by primary percutaneous coronary intervention: Results of the randomized controlled HEBE. *Eur Hear J.* 2011;32(14):1736–47.
259. Cuellas-Ramón C. Caracterización mediante resonancia magnética cardíaca de un modelo porcino de infarto agudo de miocardio a tórax cerrado. 2015;(1032401528).
260. Revilla A, López J, Arnold R, Sánchez PL, Villa A, Pinedo M, et al. Evolución a largo plazo de la función ventricular tras la terapia celular intracoronaria en el infarto agudo de miocardio. *Revi Esp Cardiol.* 2011;64(4):334–7.
261. Blázquez R, Sánchez-Margallo FM, Crisóstomo V, Báez C, Maestre J, Álvarez V, et al. Intrapericardial delivery of cardiosphere-derived cells: An immunological study in a clinically relevant large animal model. *PLoS One.* 2016;11(2):1–18.

262. Bartekova M, Radosinska J, Jelemensky M. Role of cytokines and inflammation in heart function during health and disease. *Hear Fail Rev.* 2018;23(5):733–58.
263. Opstad TB, Arnesen H, Pettersen AA, Seljeflot I. Combined Elevated Levels of the Proinflammatory Cytokines IL-18 and IL-12 Are Associated with Clinical Events in Patients with Coronary Artery Disease: An Observational Study. *Metab Syndr Relat Disord.* 2016 Jun;14(5):242–8.
264. Frangogiannis NG, Entman ML. Chemokines in myocardial ischemia. *Trends Cardiovasc Med.* 2005;15(5):163–9.
265. Zhao X, Zhang W, Xing D, Li P, Fu J, Gong K, et al. Endothelial cells overexpressing IL-8 receptor reduce cardiac remodeling and dysfunction following myocardial infarction. *Am J Physiol Hear Circ Physiol.* 2013;305(4):H590–8.
266. Kaur K. Significance of changes in TNF- and IL-10 levels in the progression of heart failure subsequent to myocardial infarction. *Am J Physiol Hear Circ Physiol.* 2006;291(1):H106–13.
267. Schuleri KH, Boyle AJ, Centola M, Amado LC, Evers R, Zimmet JM, et al. The adult gottingen minipig as a model for chronic heart failure after myocardial infarction: focus on cardiovascular imaging and regenerative therapies. *Comp Med.* 2008;58(6):568–79.

9. TRABAJOS DEL DOCTORANDO RELACIONADOS CON LA TEMÁTICA DE LA TESIS DOCTORAL

Artículos científicos

1. Crisóstomo V, Sun F, Maynar M, Báez-Díaz C, Blanco V, Garcia-Lindo M, Usón-Gargallo J, Sánchez-Margallo FM. Common swine models of cardiovascular disease for research and training. *Lab Anim.* 2016;45(2):67-74.

Comunicaciones a congresos

1. Báez-Díaz C, Crisóstomo V, Blázquez R, Blanco-Blázquez V, Sun F, Moreno B, Arenal A, Sánchez-Margallo FM. “Cardiosphere-derived cells for the treatment of myocardial infarction: Safety comparison of two minimally invasive cell delivery strategies”. XIII Congreso SECAL-III Congreso SPCAL. I Congreso Ibérico de Ciencias del Animal de Laboratorio. Cáceres. 18 Noviembre 2015.
2. Blanco-Blázquez V, Báez-Díaz C, Crisóstomo V, Climent A, Hernández I, Mangas T, Arenal A, Fernández-Avilés A, Sánchez-Margallo FM. “Validation of the Langendorff system in large animal’s infarcted hearts”. XIII Congreso SECAL-III Congreso SPCAL. I Congreso Ibérico de Ciencias del Animal de Laboratorio. Cáceres. 18 Noviembre 2015.
3. Crisóstomo V, Báez-Díaz C, Blanco-Blázquez V, Maestre J, Mangas T, Palacios I, Steendam R, Hiemstra C, Franssen O, Sánchez-Margallo FM. “Intracoronary Administration Of Microencapsulated Insulin-Like Growth Factor 1 Improves Cardiac Function In A Swine Model Of Acute Myocardial Infarction”. ACC 16. 65th Annual Scientific Session and Expo. Chicago. 2-4 Abril 2016.
4. Báez-Díaz C, Crisóstomo V, Blanco-Blázquez V, Maestre J, Garcia-Casado J, Steendam R, Franssen O, Sánchez-Margallo FM. “Microencapsulated Insulin-Like Growth Factor-1 is more effective than low-dose mesenchymal stem cells for the treatment of experimental acute myocardial infarction”. 13th International Symposium on Stem Cell Therapy and Cardiovascular Innovations. Madrid. 12-13 Mayo 2016.

5. Blanco-Blázquez V, Sánchez-Margallo FM, Báez-Díaz C, Maestre J, Mangas T, Palacios I, Crisóstomo V. "Intracoronary administration of microencapsulated Insulin-Like Growth Factor-1 improves cardiac function in a swine model of acute myocardial Infarction". 13th International Symposium on Stem Cell Therapy and Cardiovascular Innovations. Madrid. 12-13 Mayo 2016.
6. Blanco-Blázquez V, Blázquez R, Sánchez-Margallo FM, Báez-Díaz C, Maestre J, Mangas T, Palacios I, Steendam R, Hiemstra C, Franssen O, Crisóstomo V. "Microencapsulated Insulin-Like Growth Factor 1 improves cardiac function in a swine model of acute myocardial infarction". Lugano Stem Cell Meeting 2016. Lugano, Suiza. 20-21 Junio 2016.
7. Báez-Díaz C, Blázquez R, Moreno B, Crisóstomo V, Blanco-Blázquez V, Maestre J, Garcia-Casado J, Steendam R, Franssen O, Sánchez-Margallo FM. "Administration of microencapsulated insuline-like growth factor 1 or low dose mesenshymal stem cells in the treatment of acute myocardial infarction. Comparative experimental study". Lugano Stem Cell Meeting 2016. Lugano, Suiza. 20-21 Junio 2016.
8. Blanco-Blázquez V, Sánchez-Margallo FM, Báez-Díaz C, Maestre J, Mangas T, Palacios I, Steendam R, Hiemstra C, Franssen O, Crisóstomo V. "Mejora de la función cardíaca en modelo porcino de infarto agudo de miocardio: Inyección intracoronaria de IGF-1 microencapsulado". XXII Congreso de la Sociedad Española de Investigaciones Quirúrgicas 2016. Cáceres. 20-21 Octubre 2016.
9. Báez-Díaz C, Blázquez R, Moreno B, Crisóstomo V, Blanco-Blázquez V, Maestre J, Garcia-Casado J, Steendam R, Franssen O, Sánchez-Margallo FM. "Estudio comparativo del tratamiento del infarto agudo de miocardio en modelo porcino: IGF-1 microencapsulado o células madre mesenquimales a dosis bajas". XXII Congreso de la Sociedad Española de Investigaciones Quirúrgicas 2016. Cáceres. 20-21 Octubre 2016.
10. Báez-Díaz C, Sánchez-Margallo FM, Blanco-Blázquez V, Maestre J, Sánchez B, Rosado R, Mangas T, Garcia-Casado J, Bernard A, Crisóstomo V. "Impact of intracoronary allogeneic cardiac progenitor cell administration on myocardial edema and functional recovery in sub-acutely infarcted swine". Heart Failure 2017. París, Francia. 28 Abril- 2 Mayo 2017.

11. Báez-Díaz C, Sánchez-Margallo FM, Blanco-Blázquez V, Palacios I, Gálvez C, Maestre J, Mangas T, Steendam R, Hiemstra C, Franssen O, Bayes-Genis, Crisóstomo V. “Insulin like growth factor 1-improved cardiac function after experimental infarction in swine is not related to enhanced angiogenesis”. Heart Failure 2017. París, Francia. 28 Abril- 2 Mayo 2017.
12. Báez-Díaz C, Sánchez-Margallo FM, Moreno B, Blanco-Blázquez V, Maestre J, Mangas T, Garcia-Casado J, Hiemstra C, Steendam R, Franssen O, Díaz I, Crisóstomo V. “Microencapsulated insulin-like growth factor 1 improves cardiac function after experimental myocardial infarction in comparison to low-dose mesenchymal stem cells”. Heart Failure 2017. París, Francia. 28 Abril- 2 Mayo 2017.
13. Báez-Díaz C, Sánchez-Margallo FM, Blanco-Blázquez V, Alvarez V, Abad JL, Garcia-Casado J, Bernard A, Crisostomo V. “Impact of intracoronary allogeneic cardiac progenitor cell administration on myocardial edema and functional recovery in subacutely infarcted swine”. 14th International Symposium on Cardiovascular Regeneration and Repair. Madrid. 15-16 Junio 2017.
14. Blanco-Blázquez V, Sánchez-Margallo FM, Báez-Díaz C, Palacios I, Álvarez V, Mangas-Ballester MT, Steendam R, Hiemstra C, Franssen O, Crisóstomo V. Comparison of intracoronary administration of microspheres loaded with IGF-1 or HGF in a swine acute infarct model. 14th International Symposium on Cardiovascular Regeneration and Repair. Madrid. 15-16 Junio 2017.
15. Blanco-Blázquez V, Sánchez-Margallo FM, Báez-Díaz C, Palacios I, Álvarez V, Mangas-Ballester T, Martín H, Steendam R, Hiemstra C, Franssen O, Crisóstomo V. “Intracoronary administration of microspheres loaded with hgf in a swine acute infarct model” Basic Science Summer School. Niza (Francia). 18-22 Junio 2017.
16. Blanco-Blázquez V, Sánchez-Margallo FM, Báez-Díaz C, Palacios I, Álvarez V, Maestre J, Mangas-Ballester MT, Steendam R, Hiemstra C, Franssen O, Crisóstomo V. “Comparison of intracoronary administration of microspheres loaded with either insulin-like growth factor 1 or hepatocyte growth factor in a swine acute infarct model”. European Society of

- Cardiology Congress 2017.Barcelona. 26-30 Agosto 2017. *Publicación Meeting abstract: Eur Heart J. 2017 Aug; 38 (S1):384.*
17. Báez-Díaz C, Blanco-Blázquez V, Crisóstomo V, Palacios I, Gálvez C, Maestre J, Mangas T, Steendam R, Hiemstra C, Franssen O, Bayes-Genis A, Sánchez-Margallo FM. "Microencapsulated insulin like growth factor 1 improves cardiac function after experimental infarction in absence of angiogenesis". European Society of Cardiology Congress 2017.Barcelona. 26-30 Agosto 2017. Bests Posters in CAD. *Publicación Meeting abstract: Eur Heart J. 2017 Aug; 38 (S1):1069.*
 18. Blanco Blázquez V, Sánchez-Margallo FM, Báez Díaz C, Palacios I, Martín H, Steendam R, Franssen O, Crisóstomo V. "Comparación de la administración intracoronaria del factor de crecimiento insulínico 1 o factor de crecimiento de los hepatocitos microencapsulados en un modelo porcino de infarto agudo de miocardio". El Congreso de las Enfermedades Cardiovasculares, SEC 2017. Madrid. 26-28 Octubre 2017. *Publicación Meeting abstract:: Rev Esp Cardiol. 2017;70 (Supl 1):962.*
 19. Blanco-Blázquez V, Sánchez-Margallo FM, Blázquez R, Báez-Díaz C, Palacios I, Álvarez V, Steendam R, Hiemstra C, Franssen O, Crisóstomo V. "Intracoronary administration of microencapsulated IGF-1 or HGF in a swine acute infarct model: a comparative study". ESGCT XXV Anniversary Congress in Collaboration with the German Society for Gene Therapy. Berlin, Germany. 17-20 Octubre 2017. *Publicación Meeting abstract:: Hum Gen Ther. 2017 Oct; 28(12):A44.*
 20. De la Cruz J., Blanco-Blázquez V., Sánchez-Margallo FM., Báez-Díaz C., Palacios I., Crisóstomo V. Administración intracoronaria del factor de crecimiento insulínico 1 vs factor de crecimiento de los hepatocitos microencapsulados en un modelo porcino de infarto agudo de miocardio." XXIII Congreso de la Sociedad Española de Investigaciones Quirúrgicas (SEIQ). Madrid. 16-17 Noviembre 2017.
 21. López E, García-Casado J, Blázquez R, Báez-Díaz C, Blanco V, Moreno B, González I, Crisóstomo V, Sánchez-Margallo FM. "Correlation between peripheral blood leukocyte subsets and myocardial infarction severity in a closed-chest porcine model". 15th International Symposium on Cardiovascular Regeneration and Repair. Madrid. 10-11 Mayo 2018.

22. Gonzalez-Bueno I, Sánchez Margallo FM, Báez C, Blanco V, Abad A, Antequera Barroso JA, Maestre J, Crisóstomo V. "Angiographic predictors of experimental infarct size in a swine model of reperfused myocardial infarction". 15th International Symposium on Cardiovascular Regeneration and Repair. Madrid. 10-11 Mayo 2018.
23. Blanco-Blázquez V, Sánchez-Margallo FM, Báez-Díaz C, González-Bueno I, Abad-Cobo A, Palacios I, Steendam R, Franssen O, Crisóstomo V. "Intracoronary injection of monodisperse microspheres as therapeutic carriers: preliminary safety study in a swine model of acute myocardial infarction". 15th International Symposium on Cardiovascular Regeneration and Repair. Madrid. 10-11 Mayo 2018.
24. Crisóstomo V, Báez-Díaz C, Blanco-Blázquez V, Abad-Cobo A, González-Bueno I, Antequera Barroso JA, Maestre J, Sánchez-Margallo FM. "Angiographic predictors of experimental infarct size in a swine model of reperfused myocardial infarction". 52nd Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation (ESCI). Barcelona. 30 Mayo-1 Junio 2018. *Publicación Meeting abstract:: Eur J Clin Invest. 2018 May;48 (Suppl 1):136.*
25. García-Casado J, Blázquez R, Álvarez V, Antequera-Barroso JA, Báez-Díaz C, Blanco-Blázquez V, Maestre J, Moreno B, López E, Marinaro F, Crisóstomo V, Sánchez-Margallo FM. "Identification of early peripheral blood biomarkers to predict the severity of myocardial infarction in a porcine model". 52nd Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation (ESCI). Barcelona. 30 Mayo-1 Junio 2018. *Publicación Meeting abstract:: Eur J Clin Invest. 2018 May;48 (Suppl 1):138.*
26. Abad-Cobo A, Sánchez-Margallo FM, Báez-Díaz C, Blanco-Blázquez V, Lima-Rodríguez JR, Crisóstomo V. "Evaluación del valor del monitor PTA (Parasympathetic tone activity) como predictor de la fibrilación ventricular en cerdos". XIV Congreso de la Sociedad Española de Anestesia y Analgesia Veterinaria (SEAAV). Pamplona. 31 Mayo-2 Junio 2018.
27. E. López, V. Álvarez, R. Blázquez, F. Marinaro, V. Crisóstomo, C. Báez, V. Blanco, A. Abad, J. García-Casado, F. Sánchez-Margallo. "Identification of very early inflammatory markers in a porcine myocardial infarction model". 5th European Congress of Immunology. Amsterdam. 2-5 Septiembre 2018.

28. Báez-Díaz C, Sánchez-Margallo FM, Palacios I, Blanco-Blázquez V, Martín H, Casado JG, Bernad A, Crisóstomo V. “Impacto de la administración intracoronaria de células progenitoras cardíacas de origen alogénico sobre el edema miocárdico y la recuperación funcional en cerdos con infarto sub-agudo de miocardio”. El Congreso de las Enfermedades Cardiovasculares, SEC 2017. Sevilla 25-27 Octubre 2018.
29. C. Báez-Díaz, FM. Sánchez-Margallo, V. Blanco-Blázquez, I. Palacios, H. Martín, R. Steendam, O. Franssen, V. Crisóstomo. “Inyección intracoronaria de microesferas como medio portador de terapias: Estudio preliminar en un modelo porcino de infarto agudo de miocardio”. El Congreso de las Enfermedades Cardiovasculares, SEC 2017. Sevilla 25-27 Octubre 2018.

Participación en proyectos de investigación

- “Ablación del sustrato de las TVMS en un modelo porcino de cicatriz post-infarto mediante terapia celular”. PI13/02858. Instituto de Salud Carlos III. 01/01/2014-31/12/2016.
- “Aplicación temprana de terapias basadas en células madre cardíacas alogénicas tras el infarto agudo de miocardio. Estudio comparativo del impacto terapéutico en modelo porcino”. PI16/01172. Instituto de Salud Carlos III. 01/01/2017 - 31/12/2019.
- “Seguridad y eficacia de la aplicación temprana de terapias basadas en células madre cardíacas alogénicas o sus exosomas en modelo porcino de infarto agudo de miocardio”. IB16201. Consejería de Economía e Infraestructuras. Junta de Extremadura. 01/06/2017 - 31/05/2020.

Pertenencia a estructuras estables de investigación cooperativa

- Redes Temáticas de Investigación Cooperativa en Salud (RETICS) (RD12/0042/0025), Programa de arritmias.
- Centro de Investigación en Red en Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV) (CB16/11/00494).

