



Facultad de Medicina y Odontología
Departamento de Medicina
Programa de doctorado: 3139 Medicina

**Estudio de la obstrucción microvascular y el
proceso de fibrosis en el infarto de miocardio
reperfundido**

Tesis Doctoral presentada por:

Arantxa Hervás Lorente

Dirigida por:

Dr. Vicente Bodí Peris

Dra. Amparo Ruiz Saurí

Valencia, 2017

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGIA
DEPARTAMENT DE MEDICINA

Dr. Vicente Bodí Peris, Profesor Titular de la Universitat de València

Dra. Amparo Ruiz Saurí, Profesora Titular de la Universitat de València

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral titulada “Estudio de la obstrucción microvascular y el proceso de fibrosis en el infarto de miocardio reperfundido”, presentada por la Licenciada en Biotecnología **Arantxa Hervás Lorente**, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizamos la presentación y defensa de esta Tesis Doctoral.

Para que así conste a los efectos oportunos, se expide la presente certificación en Valencia, a 20 de octubre de 2017.

Dr. Vicente Bodí Peris

Dra. Amparo Ruiz Saurí

*A ma mare,
Als angelets de la meua vida**

Agradecimientos

En primer lugar me gustaría agradecer a mis directores Vicent Bodí y Amparo Ruiz. A Vicent por darme la oportunidad de realizar este trabajo. Gracias por tantas cosas que he aprendido durante estos años y que me han hecho crecer tanto profesional como personalmente. A Amparo por ser esa persona que siempre te escucha, te entiende y sabe darte el consejo que necesitas en cada momento.

A mis compis y amigos del Labo de Cardio. A Fabián, siempre tan atento y alegre. A M^aJosé, un ejemplo de constancia y de lo que significa amar la ciencia. A los compis del Hospital Clínico, del INCLIVA y de los departamentos de Cardio y de Anatomía Patológica de la Facultad, por tantos y tantos momentos. A Clara y a Nerea por todos los momentos que hemos compartido y por hacer todo mucho más fácil. A Elena, gràcies per estar al meu costat des del principi, gràcies per ensenyar-me tant i perquè sé que sempre puc confiar en tú. Jose, el último en llegar al equipo pero cómo supiste ganarnos a todos. No cambies nunca, gracias por estar siempre dispuesto a ayudar con una sonrisa.

Al pensar en las personas a las que quiero y debo agradecer la realización de este trabajo me doy cuenta de que este proceso ha sido como un círculo en el que la mayoría de ellas han estado al inicio y al final. El inicio de esta aventura se sitúa en los laboratorios de la Facultad de Medicina. Allí conocí justo cuando acababa de terminar la carrera a personas que acabarían marcando mi vida. Gracias a Carmen, Jessi, Horten, Mercedes, Bea y Lucía. Con vosotras aprendí lo que realmente significa trabajar en un laboratorio. Gracias a vosotras pude madurar y dar el primer paso para esto.

Gracias a Césss! Mi gran amigo y compañero. Eres una de esas personas que estabas al principio y que sigues estando ahora y siempre. Nos conocimos los primeros días de carrera, en esos en los que el Poli parecía inmenso y donde no sabíamos llegar a ningún sitio. Desde entonces aunque algunas temporadas hayamos estado distanciados físicamente en realidad nunca lo hemos estado. Qué suerte cuando volvimos a trabajar juntos en mis últimos meses en la Facultad. Gracias por ser esa persona tranquila que siempre sabe qué decirme. Y gracias por ser esa persona en la que siempre se puede confiar.

Hace poco aterricé en una empresa que se está convirtiendo en una familia para mí. Gracias a Lucia y a Bea, las mismas que me visteis empezar me veis ahora recoger los frutos de estos años. Gracias a las dos por confiar siempre en mí, por darme el apoyo y la fuerza en los momentos en que me ha hecho falta (que no han sido pocos). Me habéis visto crecer y aunque hayan pasado los años sigo siendo vuestra peque. Espero poder seguir siéndolo y que en esta nueva etapa sigamos disfrutando de muchas cosas, y más. Bea, gracias por confiar siempre en mí, por darme la oportunidad de cambiar mi vida y por ser esa persona cariñosa que sabes que nunca te va a fallar y que siempre está a tu lado. Lucía, gracias por cuidarme, comprenderme, darme fuerza y hacerme ver las cosas siempre desde otro punto de vista, eres un ejemplo para mí. Gracias a las dos por quererme tanto, habéis sido, sois y seréis un apoyo muy importante siempre.

No me puedo olvidar del grupo tan bueno en el que estoy ahora y en el que todos me habéis acogido y me habéis hecho sentir como en casa desde el primer momento: María, Eva, Jose, Noni, Ana, Julio, Claudia, Mariaje, Josan, Vicent, Mila, Maribel, Ana, Pere. Gracias por hacerme sentir como una más desde el primer día y porque sé que

puedo contar con vosotros siempre. Qué difícil es encontrar a personas tan buenas y especiales y encima a todas juntas. Gracias por estar a mi lado en la fase de escritura de este trabajo, porque siempre me habéis apoyado y aconsejado en esta etapa y porque me habéis querido desde el principio sin casi conocerme.

A Rosa, por ponerme los pies en la tierra. Gracias por ayudarme en el momento en el que más lo necesité. Sin tu ayuda posiblemente no estaría escribiendo estas líneas.

Als meus amics, als de sempre, als de tota la vida la passada, la present i la futura, Stelli, Maria Hervás, Maria Lorente, Elena, Marta, Susi, Cris, Neus, Laura, Carli, Vicent, Bernardo i Carles. Què dir-vos!!! Donen igual els anys que passen, sempre estem junts, som la SP. La veritat és que som molt diferents i ací està la gracia. Cadascú tenim el nostre lloc i el nostre "paper" dins del grup que a base de temps, bons moments i molt de carinyo hem anat formant. Gràcies perquè hem crescut junts i perquè sé que puc contar sempre amb vosaltres.

A Stelli, perquè som una i no cal que et diga com em sent, simplement ho saps i, encara millor, saps com fer que em trobe millor sempre. Sempre hem dit que enguany era l'any..i al final crec que en realitat teníem raó. Ha sigut un any de canvis en el que tot el que acabem és per alguna raó i tot el que comença estic segura de que ens va a portar molta felicitat. T'estime.

A mi peque, gracias porque me haces ver la vida con ilusión, porque solo con mirarme me haces sonreír y porque juntos formamos el mejor equipo del mundo. Sé que esto es el inicio de nuestra gran aventura porque no importa dónde nos lleve la vida, si estás tú allí todo será perfecto. Gracias por hacerme tan feliz.

A la meua família, a la mare, al pare, a la tia Tere, al tio Rich, al iaio i als meus germans Estela, Nadia i Rich. Gràcies per tot, perquè sense vosaltres no seria qui soc i perquè em feu falta al meu costat sempre. Cada pas que he pegat ha sigut fàcil perquè sé que no el pegue a soles. Sabeu que sou les persones més importants per a mí, i encara que no ens vegem tots els dies sempre esteu amb mi perquè vos duc al meu coret. Mare, gràcies per cuidar-me tant, per estar sempre al meu costat i per fer que siga la persona que hui soc. Saps que tots els meus èxits sempre seran gràcies a tú. Nadin i Rich, gràcies per cuidar-me i per deixar-me ser la vostra germaneta... i Estelita...què dir-te...des de que vingueres canviaves la meua vida, eres el millor regal que m'han fet mai.

ÍNDICE

| | |
|--|-----|
| ÍNDICE | III |
| ABREVIATURAS | VI |
| LISTA DE FIGURAS | X |
| RESUMEN | XIV |
| | |
| I.- INTRODUCCIÓN | 3 |
| 1.- Enfermedad cardiovascular | 3 |
| 1.1.- Cardiopatía isquémica | 3 |
| 2.- Infarto agudo de miocardio | 5 |
| 2.1.- Fisiopatología | 5 |
| 2.2.- Tratamiento | 6 |
| 3.- Daño isquemia-reperusión | 9 |
| 3.1.- Obstrucción microvascular | 10 |
| 4.- Reparación del infarto agudo de miocardio | 12 |
| 4.1.- Fase inflamatoria | 13 |
| 4.2.- Fase de proliferación | 16 |
| 4.3.- Fase de maduración: formación de la cicatriz fibrótica | 18 |
| 5.- Fibrosis miocárdica | 20 |
| 5.1.- Organización de las fibras de colágeno | 21 |
| 5.2.- Fibrosis remota | 23 |
| 6.- Resonancia magnética cardíaca y T1-mapping | 26 |
| 7.- Contribución original de la autora | 34 |
| | |
| II.- HIPÓTESIS | 39 |
| | |
| III.- OBJETIVOS | 43 |
| | |
| IV.- RESUMEN DE MANUSCRITOS | 47 |
| 1.- Intracoronary infusion of thioflavin-S to study microvascular obstruction in a model of myocardial infarction (Hervás A, et al. Rev Esp Cardiol. 2015;68:928-34)..... | 47 |

| | |
|---|----|
| 2.- Inhomogeneity of collagen organization within the fibrotic scar after myocardial infarction: results in a swine model and in human samples (Hervás A, et al. J Anat. 2016;228:47-58) | 53 |
| 3.- A multidisciplinary assessment of remote myocardial fibrosis after reperfused myocardial infarction in swine and patients (Hervás A, et al. J Cardiovasc Transl Res. 2016;9:321-33) | 59 |
| V.- DISCUSIÓN | 67 |
| 1.- Efecto del daño por isquemia-reperfusión sobre la aparición y dinámica de la obstrucción microvascular | 69 |
| 1.1.- Metodología usada para la infusión de tioflavina-S | 70 |
| 1.2.- Papel ejercido por el daño por isquemia-reperfusión en la aparición y dinámica de la obstrucción microvascular | 71 |
| 1.3.- Dinámica de la obstrucción microvascular | 73 |
| 2.- Determinación de la organización de las fibras de colágeno en la cicatriz fibrótica mediante la transformada de Fourier | 74 |
| 2.1.- Dinámica de la organización de las fibras de colágeno a lo largo del proceso de cicatrización de la herida | 75 |
| 2.2.- Cicatriz fibrótica | 77 |
| 2.3.- Organización de las fibras en la “zona gris” y sus implicaciones clínicas | 78 |
| 2.4.- Organización de las fibras de colágeno y función cardíaca | 79 |
| 3.- Estudio de la fibrosis remota tras un infarto agudo de miocardio | 80 |
| 3.1.- Estudio experimental | 82 |
| 3.2.- Estudio en pacientes | 84 |

| | |
|--|----|
| 3.2.1.- Estudio histológico en autopsias de pacientes con infarto crónico | 84 |
| 3.2.2.- Estudio en pacientes con infarto crónico mediante resonancia magnética cardiaca-T1 mapping | 85 |
| VI.- CONCLUSIONES | 91 |
| VII.- BIBLIOGRAFÍA | 95 |
| VIII.- ANEXOS | |
| Anexo I: Hervás A, et al. Rev Esp Cardiol. 2015;68:928-34 | |
| Anexo II: Hervás A, et al. J Anat. 2016;228:47-58 | |
| Anexo III: Hervás A, et al. J Cardiovasc Transl Res. 2016;9:321-33 | |
| Anexo IV: Otras publicaciones y trabajos derivados del desarrollo de la tesis | |
| Anexo V: Fuentes de financiación | |

ABREVIATURAS

ACTP: Angioplastia Coronaria Transluminal Percutánea

ADA: Arteria Descendente Anterior

DFT: Transformada Directa de Fourier

FFT: Transformada de Fourier

FVE: Fracción de Volumen Extracelular

IAM: Infarto Agudo de Miocardio

IC: Insuficiencia Cardíaca

MMP: Metaloproteinasa

MOLLI: Modified Look-Locker Inversion-recovery

OMV: Obstrucción Microvascular

RMC: Resonancia Magnética Cardíaca

TGF- β : Transforming Growth Factor- β

Th: Linfocitos T-helper

TIMP: Inhibidor de Metaloproteinasas de Tejido

Treg: Linfocitos T-reguladores

T-S: Tioflavina-S

VEC: Volumen Extracelular

VI: Ventrículo Izquierdo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Síndromes isquémicos agudos. Formación y tipos.

Figura 2. Coronariografía de un paciente con una arteria ocluida antes y después de practicar una angioplastia coronaria transluminal percutánea.

Figura 3. Esquema de los mecanismos fisiopatológicos involucrados tras un infarto agudo de miocardio.

Figura 4. Esquema y mecanismo de formación del trombo y mecanismos moleculares del daño por reperfusión.

Figura 5. Mecanismos moleculares que participan en la formación de la obstrucción microvascular.

Figura 6. Esquema de la metodología usada para la infusión de tioflavina-S.

Figura 7. Fases del proceso inflamatorio y formación de la cicatriz fibrótica tras un infarto agudo de miocardio.

Figura 8. Papel de los miofibroblastos tras un infarto de miocardio.

Figura 9. Mapas T1 pre contraste y post contraste a nivel basal, medial y apical.

Figura 10. Imágenes de captación tardía de gadolinio obtenidas de pacientes con infarto agudo de miocardio previo sometidos a resonancia magnética cardíaca y esquema de la clasificación en segmentos de acuerdo con el modelo de 16 segmentos.

Figura 11. Metodología utilizada para la infusión de tioflavina-S e imágenes representativas de la captación del colorante.

Figura 12. Efecto del daño por isquemia-reperfusión en la aparición de la obstrucción microvascular.

Figura 13. Dinámica de la obstrucción microvascular en el ventrículo izquierdo.

Figura 14. El método de la transformada de Fourier para la evaluación de la organización de las fibras de colágeno en las distintas partes de la cicatriz fibrótica.

Figura 15. Organización de las fibras de colágeno dentro de la cicatriz fibrótica tras un infarto teñidas con picosirius.

Figura 16. Organización de las fibras de colágeno determinada mediante inmunohistoquímica y microscopía electrónica.

Figura 17. Detección de fibrosis mediante microimagen por resonancia magnética.

Figura 18. Determinación del volumen extracelular mediante imágenes de T1-mapping.

Figura 19. Esquema del efecto de la reperfusión sobre la obstrucción microvascular a diferentes tiempos tras el proceso de isquemia-reperfusión.

Figura 20. Distribución de las fibras de colágeno a lo largo de la cicatriz fibrótica.

Figura 21. Estudio multidisciplinar para determinar la presencia de fibrosis en zonas remotas.

RESUMEN

El presente trabajo, que se dividió en tres partes, pretendió caracterizar dos aspectos importantes en la fisiopatología tras un infarto agudo de miocardio (IAM) como son la obstrucción microvascular (OMV) y la formación de la cicatriz fibrótica.

La principal estrategia tras un IAM es la reperfusión temprana de la arteria infartada. Sin embargo, mediante técnicas de imagen realizadas en pacientes con IAM, se ha comprobado que este procedimiento no asegura una correcta reperfusión a nivel microvascular dando lugar al fenómeno conocido como OMV. A pesar de que la reperfusión temprana es esencial para preservar la viabilidad del miocardio y el posterior pronóstico de los pacientes, también se ha relacionado con algunos efectos perjudiciales post-IAM. Sin embargo, hasta la fecha no se ha descrito de manera precisa la dinámica de aparición de la OMV en el contexto del daño por reperfusión. Por otra parte, el periodo de isquemia que ocurre durante la oclusión de la arteria, produce una muerte masiva de cardiomiocitos que promueve una respuesta rápida del sistema inmune para eliminar las células apoptóticas y la matriz extracelular dañada. A continuación, se activa el proceso de fibrosis con el fin de producir una cicatrización de la herida acontecida tras un IAM, fenómeno fundamental en la evolución posterior de los pacientes. Este proceso está directamente relacionado con el remodelado ventricular y con la posible formación de arritmias ventriculares tras un IAM. Es por esto que a lo largo de este estudio se abordaron aspectos fundamentales y novedosos relativos a estos dos procesos importantes que tienen lugar en el tejido infartado.

En la primera parte del trabajo, nos planteamos esclarecer el papel del daño por isquemia-reperfusión sobre la aparición y dinámica

de la OMV, así como optimizar la metodología para estudiar la aparición de este fenómeno. Los resultados obtenidos mostraron que la lesión por isquemia-reperfusión desempeña un papel fundamental en la aparición de la OMV. Además, el modelo establecido para su estudio permite la determinación exacta de la OMV tras un IAM.

En la segunda etapa, realizamos una caracterización exhaustiva de la organización de las fibras de colágeno en las distintas partes de la cicatriz fibrótica utilizando tanto muestras procedentes de un modelo porcino como muestras obtenidas a partir de autopsias de pacientes que habían sufrido un IAM previo. En este caso, los resultados mostraron que la organización de las fibras de colágeno no es homogénea a lo largo de la cicatriz fibrótica, sino que las zonas más externas presentan un patrón de organización mucho más desordenado que la zona central de la cicatriz.

Por último, pretendimos elucidar si el proceso de fibrosis es un proceso localizado que se produce en el área infartada o si, por el contrario, se trata de un proceso difuso que afecta a todo el tejido miocárdico. Este objetivo se abordó a través de una aproximación multidisciplinar a nivel macroscópico, microscópico y molecular en la que se utilizaron muestras obtenidas de un modelo experimental, muestras de autopsias de pacientes con infarto crónico y estudios de resonancia magnética cardíaca de pacientes con IAM crónico. Gracias a este análisis se pudo concluir que, en todos los escenarios estudiados, la región remota no mostró un incremento de colágeno en comparación con los controles. Por este motivo la relevancia del papel de la fibrosis remota en la fisiopatología del remodelado ventricular debería ser reconsiderada.

I.- INTRODUCCIÓN

1. Enfermedades cardiovasculares

Según datos de la Organización Mundial de la Salud las enfermedades cardiovasculares provocan millones de muertes al año en todo el mundo y son la causa de más de la mitad de todas las defunciones en la región europea (Atlas, 2014).

En España, la enfermedad coronaria, en general, y el síndrome coronario agudo en particular, han sido unas de las principales causas de mortalidad, morbilidad y coste sanitario durante los últimos 30 años (Dégano, 2013). Además se ha estimado que los casos de enfermedad coronaria aumentarán durante las próximas décadas debido a un envejecimiento de la población. Por tanto resulta de gran importancia el estudio de nuevas estrategias terapéuticas que permitan una disminución del número de eventos cardíacos y un aumento de la calidad de vida de los pacientes que los han sufrido.

1.1 Cardiopatía isquémica

En Estados Unidos casi la mitad de los varones y un tercio de las mujeres de mediana edad sufrirán alguna manifestación de cardiopatía isquémica. De igual manera, en Europa la enfermedad cardiovascular causa cada año unos 4 millones de fallecimientos, lo que supone un 47% de todas las muertes de Europa (Ferreira-González, 2014).

El término cardiopatía isquémica engloba un conjunto de trastornos que se caracterizan por un desequilibrio en el aporte de sangre al miocardio, con el consiguiente déficit de oxígeno y sustratos en las células que conforman el músculo cardíaco (Chorro et al., 2007). La isquemia miocárdica se manifiesta en diferentes síndromes

que se pueden clasificar en crónicos o estables y agudos o inestables.

El principal síndrome isquémico crónico es la angina de pecho estable que consiste en la formación de una placa ateromatosa y se presenta como un dolor torácico de duración no prolongada en situaciones de actividad o estrés (Jneid et al., 2012). La evolución de la placa está asociada a procesos de isquemia prolongada, pudiendo inducir el desarrollo de circulación colateral.

Dentro de los síndromes isquémicos agudos se pueden distinguir, entre otros, la angina inestable y el infarto agudo de miocardio (IAM) (Figura 1). La angina de pecho inestable se presenta como un dolor torácico agudo en situaciones de ejercicio o reposo. Se corresponde a procesos de rotura de placa y formación de trombosis coronaria en placas inestables pero sin que exista una oclusión completa de la arteria coronaria por el trombo. La angina inestable produce isquemia prolongada o necrosis parcial, pero nunca llegando a producir una necrosis total del territorio perfundido (Jneid et al., 2012).

Por su parte, el IAM se produce, al igual que la angina inestable, a partir de la rotura de placas inestables y formación de trombos en la luz arterial, pero a diferencia de lo que ocurre en la angina, en el escenario de un IAM, se produce una oclusión completa del vaso. Los síntomas que indican el inicio de infarto son dolor torácico fuerte que se irradia hacia el cuello, mandíbula, hombro y brazo izquierdo. A pesar de los grandes avances en el tratamiento del IAM, éste sigue suponiendo un tercio de la mortalidad de pacientes con enfermedad coronaria (Thygesen et al., 2012).

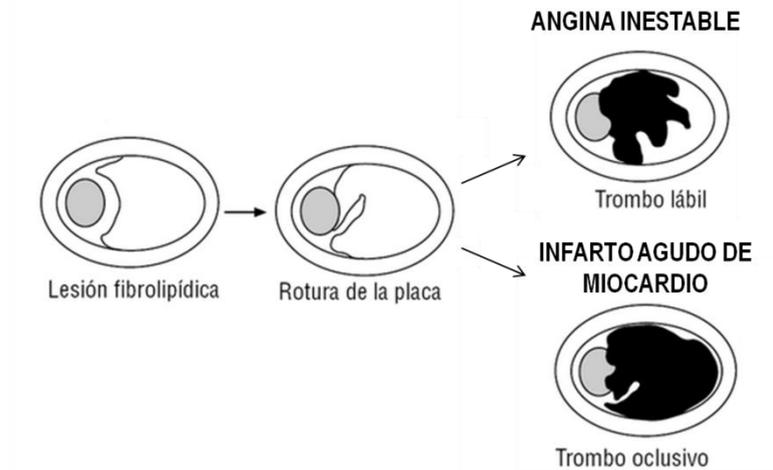


Figura 1. Síndromes isquémicos agudos. Formación y tipos. Adaptado de Vilariño et al., 2004.

Estas enfermedades afectan principalmente al ventrículo izquierdo (VI), provocando la disminución de la contractilidad en las zonas afectadas como consecuencia de la necrosis o muerte celular por la isquemia prolongada. Debido a la elevada prevalencia de estos síndromes en los países desarrollados, este trabajo se va a centrar en profundizar en el conocimiento de la fisiopatología de esta enfermedad para poder buscar nuevas vías terapéuticas que mejoren la calidad de vida de los pacientes.

2. El infarto agudo de miocardio

2.1 Fisiopatología

La aterosclerosis es un proceso inflamatorio crónico que afecta a las arterias de diferentes lechos vasculares y que se caracteriza por el engrosamiento de la capa íntima y media con pérdida de la elasticidad. Su lesión básica es la placa de ateroma compuesta fundamentalmente por lípidos, tejido fibroso y células inflamatorias, y

pasa por diferentes estadios (Lahoz & Mostaza, 2007). Con el tiempo, estas lesiones maduran y se endurecen. Al crecer la placa, la luz de las arterias se reduce limitando la cantidad de sangre que llega al miocardio. Esta reducción del volumen de sangre implica un aporte insuficiente de nutrientes y oxígeno que puede producir isquemia (Hanson & Libby, 2006).

La formación de las placas de ateroma tiene una relación directa con los llamados factores de riesgo que se clasifican en no modificables (edad, sexo, factores hereditarios) o modificables (tabaquismo, hipercolesterolemia, hipertensión arterial, obesidad, diabetes) (Ruff & Braunwald, 2011).

El IAM se desencadena por un bloqueo de la perfusión coronaria debido a la formación de un trombo liberado en la rotura de una placa inestable de ateroma en la luz de las arterias coronarias. El cese de la perfusión provoca una situación de hipoxia y falta de nutrientes lo que conduce a una situación de isquemia que, si se prolonga en el tiempo, produce una necrosis irreversible del tejido cardíaco perfundido por esta arteria. Además, se pueden producir otros eventos adversos como es la fibrilación auricular con la consiguiente muerte súbita.

2.2 Tratamiento

Según las guías clínicas, el principal objetivo en su tratamiento es la reperfusión temprana, completa y sostenida de la arteria responsable del infarto y, para ello, se lleva a cabo una recanalización de la arteria ocluida mediante métodos mecánicos como la angioplastia coronaria transluminal percutánea (ACTP) o mediante terapia trombolítica.

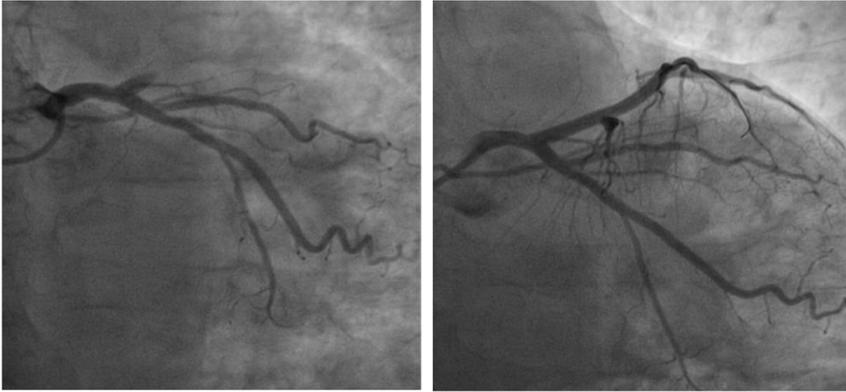


Figura 2. Coronariografía de un paciente con una arteria ocluida antes (izquierda) y después (derecha) de practicar una angioplastia coronaria transluminal percutánea.

La ACTP (Figura 2) consiste en la apertura de la arteria obstruida a través de la introducción de catéteres consiguiendo una mejor perfusión de la zona infartada y una menor incidencia de re-oclusión, por lo que se considera como la técnica de elección en la actualidad en el tratamiento de pacientes con IAM (Elízaga, 1998). Asimismo la terapia trombolítica tiene como objetivo la disolución del trombo y la restauración de la circulación coronaria (De Luca et al., 2009).

Por tanto, el desarrollo de las estrategias de reperfusión temprana, así como los avances en el tratamiento intervencional y farmacológico en la fase aguda tras un IAM y las medidas de prevención han supuesto una reducción de la mortalidad durante los últimos 40 años. Sin embargo, la mejora de las tasas de mortalidad ha conllevado un aumento de la prevalencia de la enfermedad coronaria y de sus complicaciones como es la insuficiencia cardiaca (IC) (Dégano et al., 2013; Ferreira-González, 2014; Frangogiannis, 2014). En la nueva era de la reperfusión, se han descrito dos fenómenos, el daño por isquemia-reperfusión y el mecanismo de reparación del miocardio infartado, que se consideran esenciales para

el pronóstico de los pacientes (Figura 3). Por ello, un mejor conocimiento de estos dos mecanismos fisiopatológicos involucrados tras un IAM va a ser esencial para mejorar el pronóstico de los pacientes y buscar nuevas oportunidades terapéuticas.

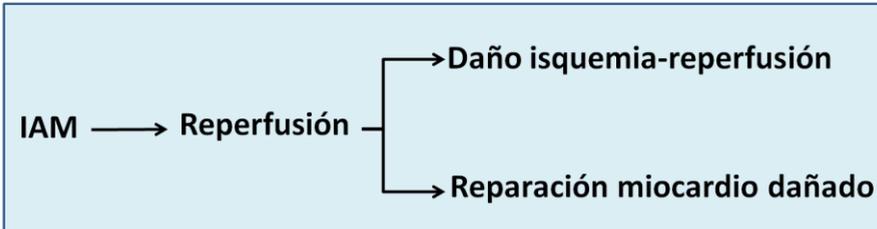


Figura 3. Esquema de los mecanismos fisiopatológicos involucrados tras un infarto agudo de miocardio.

IAM: infarto agudo de miocardio.

Por un lado, a pesar del restablecimiento del flujo coronario, en un número considerable de pacientes se ha observado una reperusión incompleta a nivel microvascular. Este fenómeno se conoce como obstrucción microvascular (OMV) y tiene una profunda repercusión negativa tras un IAM.

Por otro lado, el periodo de isquemia produce una muerte masiva de cardiomiocitos, lo que conlleva un deterioro estructural y funcional del miocardio que debe ser reparado mediante un proceso denominado fibrosis. Este fenómeno consiste en la síntesis y deposición de nuevo colágeno en el área infartada, sin embargo, esta deposición también se ve incrementada en el miocardio no infartado produciendo un remodelado ventricular adverso y un peor pronóstico de los pacientes (Cleutjens & Creemers, 2002; Khan & Sheppard, 2006).

3. Daño por isquemia-reperfusión

Durante un IAM se produce una situación de isquemia que comporta una falta de oxígeno y de nutrientes en el tejido miocárdico. En consecuencia, se hace necesaria la reperfusión temprana de la arteria infartada con el objetivo de evitar la necrosis de esa zona. Sin embargo, durante la reperfusión, se han descrito diferentes fenómenos dañinos para el tejido miocárdico (Figura 4). En primer lugar, se genera un ambiente pro-trombótico debido a que la cascada inflamatoria facilita que las células inmunes liberen mediadores pro-inflamatorios y activen el sistema del complemento lo que produce un daño miocárdico. Este ambiente es el que produce la activación exacerbada de plaquetas y neutrófilos dando como resultado el taponamiento de la microvasculatura. En segundo lugar, este proceso se ve agravado por el debris ateromatoso que se ha formado durante la intervención mecánica que va a producir una oclusión distal a nivel microvascular. Por último, al volver a aportar oxígeno en estas zonas se potencia la formación de especies reactivas de oxígeno y la acumulación de calcio, lo que produce un daño a nivel celular (Bailey & Armstrong, 2014). Con todo ello, y tal y como se puede ver en la figura 4, los mecanismos que hacen que aparezca el daño por isquemia-reperfusión son múltiples y tienen distintas consecuencias sobre la función celular (Bailey & Armstrong, 2014).

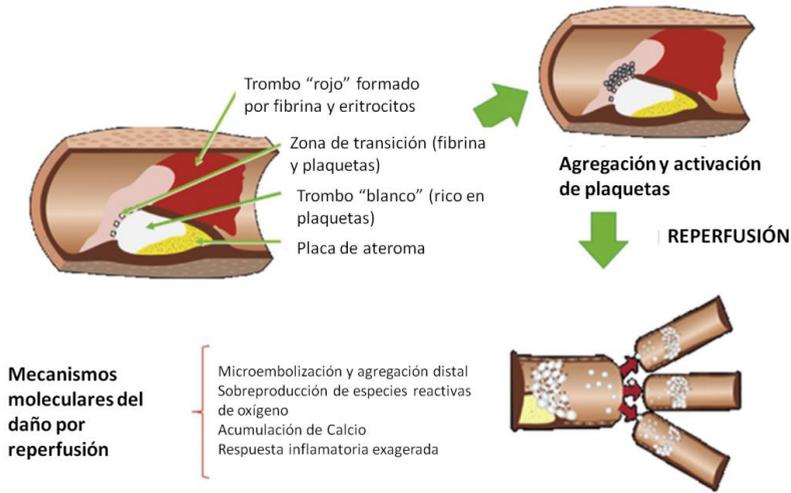


Figura 4. Esquema y mecanismo de formación del trombo y mecanismos moleculares del daño por reperfusión. Adaptado de Baaney & Armstrong, 2014.

Se han descrito distintos mecanismos para evitar el daño por reperfusión como terapias farmacológicas, el condicionamiento isquémico, terapias dirigidas a las mitocondrias, hiperoxoemia e hipotermia terapéutica y el post-condicionamiento isquémico, entre otros (Fröhlich et al., 2013; Baaney & Armstrong, 2014). A pesar de ello, no existen actualmente terapias efectivas para la prevención del daño miocárdico en pacientes reperfundidos tras un IAM (Bodí et al., 2014).

3.1 Obstrucción microvascular

A pesar del restablecimiento del flujo coronario, en un número considerable de pacientes se ha detectado mediante estudios experimentales y de imagen por resonancia magnética cardiaca (RMC) la presencia de una zona de hipoperfusión dentro de la zona infartada. A este fenómeno se le conoce como OMV y ocurre en aproximadamente un 55% de los casos (Figura 5). Además, se ha

considerado un predictor independiente de eventos cardiovasculares adversos y muerte cardiaca (van Kranenburg et al., 2014). Esto nos indica que, aunque la restauración del flujo coronario es el tratamiento de preferencia tras un IAM y resulta esencial en la supervivencia de los pacientes, en ocasiones la apertura de la arteria infartada puede exacerbar el daño producido por la propia isquemia y aumentarlo en la reperusión lo que se conoce como “daño por isquemia reperusión” (Jennings, 2013).

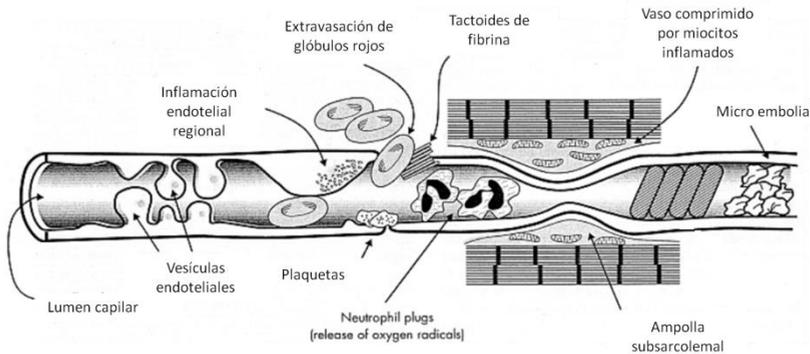


Figura 5. Mecanismos moleculares que participan en la formación de la obstrucción microvascular. Adaptado de Best et al., 2012.

Por tanto, aunque la lesión por isquemia-reperusión se ha estudiado ampliamente en el IAM (Ovize et al., 2010; Hausenloy & Yellow, 2013), no hay evidencias definitivas de una asociación directa entre la lesión por reperusión y la aparición de OMV en muestras de miocardio obtenidas inmediatamente después del restablecimiento del flujo coronario. Existe una urgente necesidad de conocer mejor la fisiopatología y la evolución temporal de este proceso lo que, a su vez, puede conducir a la exploración de nuevas posibilidades terapéuticas en condiciones controladas.

Por este motivo, en el presente trabajo se planteó, en primer lugar, el desarrollo de una metodología que permitiera la caracterización exacta de las zonas con OMV en un modelo experimental porcino mediante la infusión del colorante tioflavina-S (T-S) en diferentes puntos de la anatomía cardiaca (intra-ventricular, en aorta e intra-coronaria) (Figura 6). Empleando esta novedosa metodología, se procedió posteriormente a esclarecer el papel que ejerce la lesión por isquemia-reperfusión sobre la aparición y dinámica de la OMV.

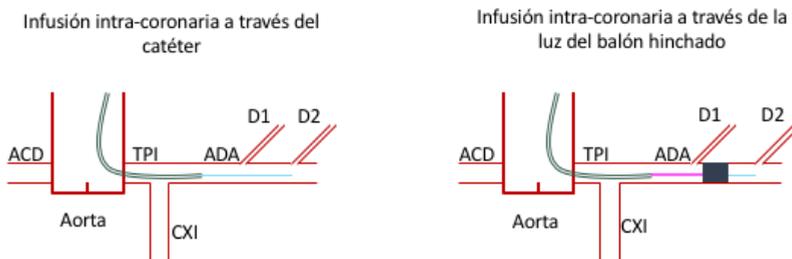


Figura 6. Esquema de la metodología usada para la infusión de tioflavina-S. La infusión intra-coronaria a través del catéter situado en la ADA proximal se utilizó en los grupos de reperfusión (1 minuto, 1 semana y 1 mes) y en el grupo control. La infusión intra-coronaria a través de la luz del balón de angioplastia hinchado y situado en la ADA media se utilizó en el grupo de no reperfusión. Adaptado de Hervás et al., 2015.

ACD: arteria coronaria derecha; ADA: arteria descendente anterior; CXI: arteria circunfleja izquierda; D: diagonal; TPI: tronco principal izquierdo.

4. Reparación tras un infarto agudo de miocardio

Tras un IAM se produce una reacción inflamatoria que tiene dos objetivos principales: i) la limpieza de la zona infartada de las células necróticas y restos de matriz extracelular dañada y ii) la activación de vías intracelulares para la correcta cicatrización del área infartada. El

proceso de cicatrización de la herida producida tras un IAM consiste en una cascada de eventos que implica una compleja interacción entre distintos tipos celulares: células inflamatorias, células endoteliales, fibroblastos y miofibroblastos. Se puede dividir en tres fases: la fase inflamatoria, la fase de proliferación y la fase de maduración (Figura 7).

4.1 Fase inflamatoria

Debido al ambiente de hipoxia causado por la oclusión coronaria, se produce una muerte de los cardiomiocitos que conlleva la activación del sistema inmune y el reclutamiento de células inflamatorias en el tejido infartado (van den Borne et al., 2010). Entre estas células participan secuencialmente los neutrófilos, monocitos y macrófagos y, por último, los linfocitos. Los neutrófilos son la primera línea de defensa que se encuentra en el tejido infartado durante los primeros 5 días tras un IAM. Su función radica en la secreción de enzimas proteolíticas, moléculas oxidantes y proteasas que participan en la apoptosis y la degradación del colágeno, así como de mediadores pro-inflamatorios que aumentan la respuesta inflamatoria. Por otra parte, los neutrófilos también refuerzan la respuesta inmune promoviendo el reclutamiento de monocitos.

Las células mieloides (monocitos y macrófagos) son un grupo heterogéneo de células que se infiltran en el tejido cardíaco entre el segundo y tercer día. En primer lugar, predominan los monocitos pro-inflamatorios cuyo objetivo es la eliminación de las células muertas y restos de matriz extracelular. Posteriormente, el fenotipo de los monocitos cambia hacia un carácter más anti-inflamatorio y su función se centra en estimular la síntesis y deposición de fibras de colágeno por parte de los fibroblastos y miofibroblastos contribuyendo de esta forma al desarrollo de la fibrosis miocárdica (González et al., 2011).

En paralelo a la respuesta inmune innata, se activa la respuesta inmune adaptativa debido al reconocimiento de antígenos por parte de los linfocitos T. Los linfocitos pueden diferenciarse en diversos subtipos como son linfocitos T helper (Th)1, Th2 y T reguladores (Treg). Los linfocitos Th1 liberan citoquinas pro-inflamatorias aumentando de esta manera la señal inflamatoria previa. Por su parte, los linfocitos Th2 liberan citoquinas cuya función es frenar la acción de Th1 para mitigar la reacción inflamatoria (Bodí et al., 2008; Zhou et al., 2009). En el IAM se ha observado un desbalance del ratio Th1/Th2 a favor de los primeros. Por último, las Treg son capaces de infiltrarse en la zona infartada y suprimir la respuesta inflamatoria liberada tras el IAM mediante la liberación de interleucina-10 y el transforming growth factor- β (TGF- β). Un correcto equilibrio de la respuesta inflamatoria es esencial para la correcta cicatrización del miocardio infartado. Por tanto, la resolución del proceso inflamatorio se considera esencial para el comienzo de la fase reparativa y de formación de la cicatriz. En este sentido, tiene importancia el reclutamiento de una serie de células y componentes anti-inflamatorios entre los que destacan los miofibroblastos y las células vasculares. Esto es lo que se conoce como fase de proliferación.

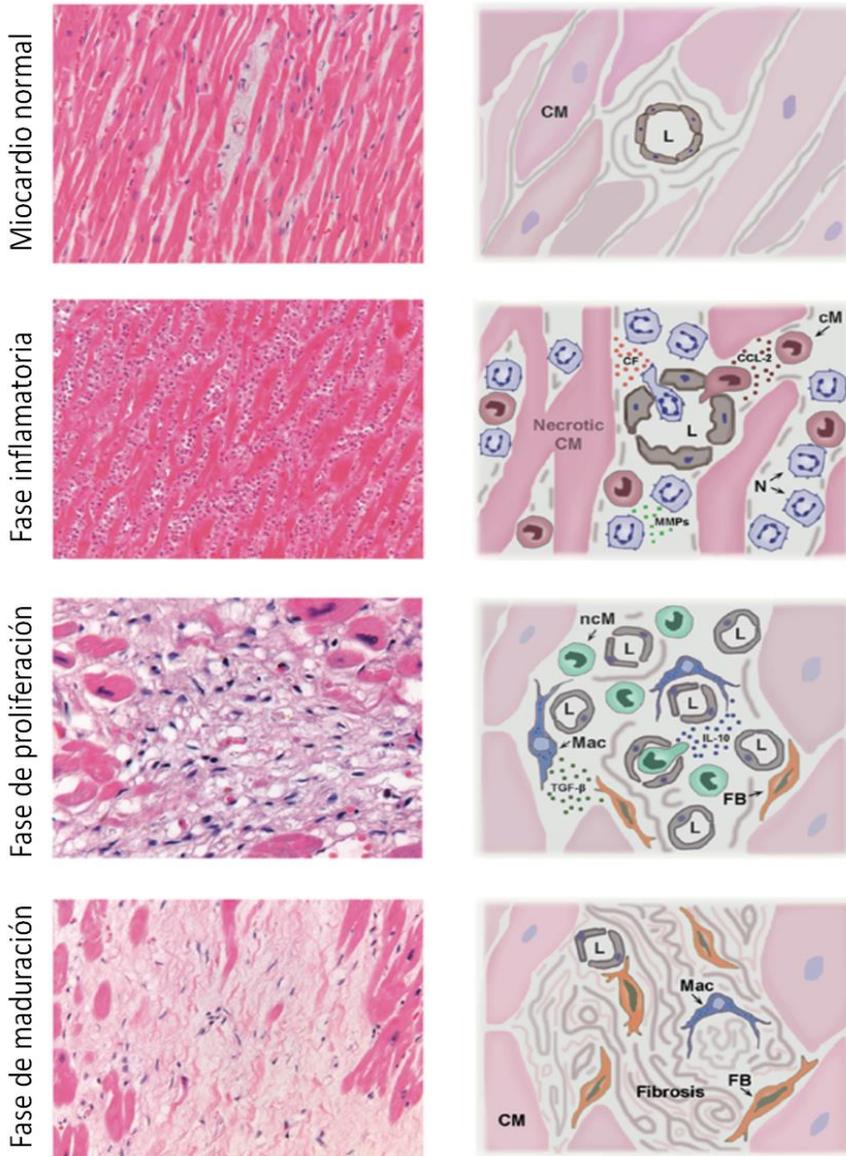


Figura 7. Fases del proceso inflamatorio y formación de la cicatriz fibrótica tras un infarto agudo de miocardio (cortes con tinción de hematoxilina-eosina izquierda y esquemas ilustrativos derecha). Adaptado de van der Laan et al., 2012.

CF: factor del complemento; CM: cardiomiocitos; cM: monocitos clásicos; FB: fibroblastos; IL-10: interleucina-10; L: lumen; Mac: macrófagos; MMP: metaloproteinasas; N: neutrófilos; ncM: monocitos no clásicos; TGF- β : transforming growth factor- β .

4.2 Fase de proliferación

En esta fase cobra especial importancia el TGF- β . Su activación resulta fundamental en la transición del proceso inflamatorio hacia la repuesta reparativa (Frangogiannis, 2014). El TGF- β es capaz de modular la actividad de los leucocitos tanto de forma inhibitoria como estimuladora promoviendo además la formación del tejido de granulación (Bujak & Frangogiannis, 2007). El tejido de granulación comienza a formarse alrededor del cuarto día tras el infarto y consiste en células inflamatorias, vasos sanguíneos recién formados y células de tipo fibroblástico que producen colágeno (van den Borne et al., 2010).

Además, en el corazón se cree que el desarrollo de la fibrosis está parcialmente mediado por TGF- β , citoquina pro-fibrótica que estimula la producción de proteínas de la matriz extracelular. TGF- β podría jugar un papel importante en el reclutamiento de monocitos anti-inflamatorios promoviendo de esta forma la formación del tejido de granulación. Además, su activación podría resultar importante en la supresión de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, resolviendo así el infiltrado inflamatorio. A su vez, TGF- β induce la diferenciación de los fibroblastos cardíacos a miofibroblastos y podría promover la preservación de la matriz extracelular incrementando la expresión de inhibidores de metaloproteinasas de tejido (TIMPs). En el tejido miocárdico, TGF- β es secretado de forma primaria por los fibroblastos cardíacos. Además de los fibroblastos, se ha propuesto que los macrófagos podrían servir como una fuente inicial o adicional de TGF- β en el corazón. Así mismo, existe un gran número de estudios tanto *in vitro* como *in vivo* que indican que TGF- β está regulado positivamente por angiotensina II en miofibroblastos y en fibroblastos cardíacos (Khan & Sheppard, 2006; Bujak & Frangogiannis, 2007). El sistema renina-angiotensina-aldosterona es

uno de los principales reguladores hormonales de la fibrosis. La elevación de la angiotensina II o de la aldosterona incrementa la deposición de colágeno tanto en el VI como en el ventrículo derecho (Cleutjens & Creemers, 2002).

Durante la fase de granulación también tiene lugar un proceso de fibrogénesis o fase de proliferación. El tejido de granulación, como se ha descrito, está formado por fibroblastos que se convierten en miofibroblastos. En condiciones normales, los fibroblastos que residen en el tejido cardíaco no presentan microfilamentos contráctiles ni expresan proteínas contráctiles como la actina. Pero, tras la pérdida de la arquitectura del tejido cardíaco debida a la necrosis, los fibroblastos sujetos a estrés mecánico se convierten en proto-miofibroblastos. Posteriormente, tras la exposición al TGF- β producido por macrófagos y fibroblastos, se producirá la diferenciación desde proto-fibroblastos a miofibroblastos (van den Borne et al., 2010; González et al., 2011).

Los miofibroblastos se diferencian de los fibroblastos en que éstos expresan proteínas contráctiles y exhiben propiedades migratorias, proliferativas y secretoras. Además responden a la extensión mecánica y a los factores autocrinos y paracrinos generados en el miocardio como por ejemplo péptidos vasoactivos como es angiotensina II y factores de crecimiento como TGF- β (Porter & Turner, 2009; van den Borne et al., 2010). Pese a que la mayoría de los miofibroblastos se diferencian a partir de los fibroblastos, también pueden derivar de las células musculares lisas, las células epiteliales, las células endoteliales, de fibrocitos procedentes de las células madre de la médula ósea y de pericitos (Filip et al., 1986; Bucala et al., 1994; van den Borne et al., 2010; Ruiz-Villalba et al., 2015).

4.3 Fase de maduración: formación de la cicatriz fibrótica

Finalmente, el tejido de granulación madura convirtiéndose en una cicatriz en la que no están presentes las células inflamatorias pero que es rica en tejido fibrótico (matriz extracelular, miofibroblastos y fibroblastos). En un principio, el tejido fibrótico se percibía como un reemplazamiento pasivo de los cardiomiocitos perdidos, pero este tejido cada vez más se reconoce como un sitio de actividad donde las células de tipo fibroblástico participan en el reemplazo del colágeno y en la contracción del tejido cicatrizado (van den Borne et al., 2010).

El balance entre la síntesis y degradación del colágeno durante el remodelado cardíaco determina su volumen y, en este escenario después de la lesión, este equilibrio está regulado predominantemente por los miofibroblastos. El colágeno es sintetizado y secretado como un precursor pro-colágeno y es convertido en colágeno maduro por un proceso de proteólisis catalizado por proteinasas específicas de pro-colágeno. La proteólisis consiste en la eliminación de péptidos terminales y está catalizada por dos grupos de proteínas específicas para cada tipo de pro-colágeno denominadas endopeptidasas. Durante la conversión del pro-colágeno de tipo I en colágeno tipo I se forma una molécula de péptido de pro-colágeno de tipo I que pasa a la sangre. De la misma forma, durante la conversión del pro-colágeno tipo III en colágeno tipo III se genera un péptido de pro-colágeno tipo III (Kalman et al., 2012; Swartz et al., 2012).

Una vez formadas las moléculas de colágeno éstas son rápidamente ensambladas a fibras de colágeno a través de reacciones químicas que ocurren de forma espontánea o son catalizadas por los enzimas lisil-oxidasas (van den Borne, et al., 2010), enzimas amino oxidasas que juegan un papel importante en la

formación de matrices de tejido conectivo. Los niveles de estas enzimas están aumentados en muchas enfermedades fibróticas y su expresión está modulada de forma sensible por citoquinas específicas, factores de crecimiento y mensajeros moleculares intercelulares como TGF- β (Smith-Mungo & Kagan, 1998).

Otro aspecto importante es el recambio del colágeno ya que la homeostasis de la matriz extracelular requiere un equilibrio entre la síntesis y la degradación de colágeno que se mantiene por la actividad coordinada de estimuladores e inhibidores. Tras un infarto se produce un remodelado de la matriz extracelular. La degradación del colágeno requiere la expresión y actividad de enzimas proteolíticas, las metaloproteinasas (MMPs) que incluyen colagenasas (MMP-1 y MMP-13) y gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) y que están reguladas por sus inhibidores denominados TIMPs. En el tejido cardíaco normal, MMPs y TIMPs están coexpresados y estrechamente regulados para mantener la estructura cardíaca. En una situación donde el ratio MMP/TIMP se desequilibra, se producen cambios en la actividad proteolítica neta y, por tanto, resultados perjudiciales (Porter & Turner, 2009). Las colagenasas hidrolizan las moléculas de colágeno fibrilar en dos fragmentos un telopéptido grande y otro pequeño que se denomina telopéptido del colágeno tipo I. Diversos estudios experimentales han mostrado que la determinación de las concentraciones séricas del péptido de pro-colágeno tipo I (liberado durante la síntesis de colágeno) y del telopéptido carboxiterminal de colágeno tipo I ofrece información sobre la síntesis y degradación sistémica de colágeno y podrían actuar como predictores del desarrollo de patologías cardíacas como la fibrilación auricular (Kalman et al., 2012; Swartz et al., 2012).

5. Fibrosis miocárdica

La importancia de la fibrosis en la patología y disfunción de distintos órganos parece ser cada vez más relevante en una variedad de enfermedades que parecen estar causadas por un proceso fibrótico común. La deposición del colágeno está controlada por factores hormonales, factores de crecimiento, citoquinas, proteínas reguladoras, y por factores hemodinámicos.

Existen varios tipos de fibrosis cardíaca que son la fibrosis intersticial reactiva, la fibrosis intersticial infiltrativa y la fibrosis de reemplazo. La fibrosis de reemplazo corresponde a la sustitución de los cardiomiocitos, que han sufrido un daño celular o necrosis como consecuencia del infarto, por colágeno de tipo I y tipo III que es sintetizado por fibroblastos y miofibroblastos (Mewton et al., 2011). En particular, la fibrosis miocárdica se caracteriza por un incremento en la deposición de fibras de colágeno de tipo I lo que muestra un mayor grado de entrecruzamiento a través del espacio intersticial también en áreas remotas a la lesión inicial (van den Borne, et al., 2010).

La correcta formación de la cicatriz en la zona infartada es el resultado de una correcta regulación de todos los componentes que participan en este proceso y es clave para la prevención de la remodelación adversa.

El proceso de fibrosis tiene un efecto dual en la estructura y función cardíaca ya que, por una parte, un incremento en la deposición de colágeno resulta necesario para la prevención de la dilatación del área infartada pero, por otra parte, una acumulación excesiva de colágeno en el miocardio provoca una rigidez del tejido, incrementa la incidencia de arritmias y también afecta a la elasticidad del miocardio. El proceso de acumulación excesiva de colágeno se conoce como remodelado cardíaco y ocurre en aproximadamente un

30% de los pacientes que han sufrido infarto, dando como resultado una disfunción ventricular y contribuyendo a la aparición de IC (Cleutjens & Creemers, 2002; Khan & Sheppard, 2006; Carrabba et al., 2012). Por tanto, a pesar de que la fibrosis reparativa es un proceso necesario tras un IAM, un desequilibrio entre el aumento de la síntesis de colágeno tipo I y III y una reducción de la degradación del mismo se asocian con un empeoramiento de la función sistólica ventricular, un remodelado cardíaco anormal y un incremento en la rigidez ventricular (González et al., 2011; Mewton et al., 2011).

La importancia es tal que se ha visto que en aquellos casos en los que tras un infarto existe presencia de miofibroblastos y síntesis de colágeno en el área infartada se obtiene como resultado un infarto bien cicatrizado en el que se preserva la geometría del corazón. Por otra parte, aquellos casos en los que se encuentran miofibroblastos y síntesis de colágeno en las regiones distantes al área infartada o un bajo número de miofibroblastos en el área infartada resultan en IAM mal cicatrizados con expansión del infarto y pudiendo dar lugar a una dilatación severa del corazón (van den Borne et al., 2010).

En resumen, la fibrosis excesiva post-infarto se asocia con un empeoramiento de la función sistólica ventricular, un remodelado cardíaco anormal y un incremento en la rigidez ventricular que afecta a un gran número de pacientes. Este hecho abre un gran campo de investigación en el contexto de las enfermedades cardiovasculares ya que el obtener estrategias que prevengan la aparición del remodelado cardíaco produciría una mejora en la calidad de vida de estos pacientes.

5.1 Organización de las fibras de colágeno

Además de proporcionar resistencia y rigidez al miocardio, la organización del colágeno en la cicatriz proporciona un soporte

estructural para los cardiomiocitos (Whittaker et al., 1991). Las fibras de colágeno juegan un papel clave en la preservación de la integridad estructural y la función tisular tras un IAM (Whittaker et al., 1991; Rich & Whittaker, 2005). La organización del colágeno está influenciada por la deformación del área isquémica que produce un estiramiento mecánico que condiciona la migración de los fibroblastos y, por tanto, la deposición de las fibras de colágeno (Zimmerman et al., 2000; Fomovsky et al., 2012).

No solo la cantidad de colágeno sino también el entrecruzamiento del mismo y la localización y dirección de las fibras de colágeno en el tejido determinarán la elasticidad del miocardio. Aunque las fibras de colágeno en la cicatriz que se forma tras un infarto están altamente organizadas, poco se sabe sobre los mecanismos que controlan esta organización. La matriz extracelular preexistente puede actuar como un andamio al que los fibroblastos migran (Zimmerman et al., 2000). Por otra parte, la deformación del área isquémica produce un estiramiento mecánico que influencia la migración y orientación de los fibroblastos y, por tanto, la deposición de las fibras de colágeno (Zimmerman et al., 2000; Fomovsky et al., 2012). Por tanto, el estudio no solo de la cantidad de fibras de colágeno sino de su localización y ordenación resulta especialmente interesante.

Se ha descrito, en estudios de RMC, que existe una región de tejido heterogéneo situada entre la zona infartada y la zona sana no infartada denominada "zona gris", debido al color que presenta en las imágenes de RMC. La importancia de esta región reside en que su presencia se ha correlacionado con la formación de arritmias ventriculares y con la mortalidad post-IAM (Schmidt et al., 2007; Mewton et al., 2011). A pesar de que la organización de las fibras de colágeno se ha descrito en trabajos previos (Whitakker et al., 1991;

Zimmerman et al., 2000; Holmes et al., 2005; Zhou et al., 2011; Fomovsky et al., 2012), no se ha realizado hasta el momento una caracterización en profundidad de este proceso a lo largo de todas las áreas de la cicatriz fibrótica utilizando muestras de miocardio infartado. Este aspecto podría tener implicaciones potenciales en la fisiopatología de la remodelación del VI así como en la génesis y la terapia invasiva mediante ablación de las arritmias ventriculares (Zipes et al., 2006).

Basándonos en lo descrito previamente, en este trabajo se planteó realizar una caracterización completa de la organización de las fibras de colágeno en las diferentes partes que conforman la cicatriz fibrótica (zona central, epicardio, endocardio y área periférica) tanto en muestras de miocardio obtenidas de un modelo experimental controlado como en muestras de pacientes con infarto crónico. Con este propósito, se llevó a cabo la tinción de las muestras con rojo picrosirius, que tiñe específicamente las fibras de colágeno tipo I y III, y se determinó el índice de organización mediante la aplicación del algoritmo de la transformada de Fourier (FFT). Este tipo de análisis ya se ha descrito en trabajos previos de otras especialidades, principalmente en el campo de la dermatología (van Zuijlen et al., 2002; Osman et al., 2013; Marcos-Garcés et al., 2014) y permite determinar la organización relativa de la textura de la imagen original. Por consiguiente, se propuso como un método adecuado para evaluar la organización de las fibras de colágeno tanto en la zona central como en las zonas más externas de la cicatriz fibrótica tras un IAM.

5.2 Fibrosis remota

Tras un IAM, el proceso del metabolismo del colágeno está regulado predominantemente por los miofibroblastos (van den Borne

et al., 2010). Como se ha explicado anteriormente, estas células se activan por estrés mecánico y por factores autocrinos y paracrinos teniendo como papel fundamental la formación de una matriz extracelular densa y compleja que refuerce el tejido infartado (van den Borne et al., 2010; Daskalopoulos et al., 2012). Idealmente, en aquellos pacientes con un IAM bien cicatrizado, la deposición de colágeno tiene lugar en el área infartada y su objetivo es preservar la geometría del corazón (van den Borne et al., 2010). Sin embargo, el depósito de colágeno en determinadas ocasiones tiene lugar en el miocardio no infartado dando lugar al proceso denominado fibrosis remota. La fibrosis remota se ha asociado con el deterioro de la función ventricular y la actividad eléctrica del corazón (Mewton et al., 2011; Weber et al., 2013). Esto se debe a que, como consecuencia de la deposición de colágeno en las zonas no infartadas, se obtiene un miocardio rígido, con un patrón de relajación alterado que podría llevar a la disfunción diastólica y contribuir al desarrollo de la IC (Figura 8) (van den Borne et al., 2010; Daskalopoulos et al., 2012).

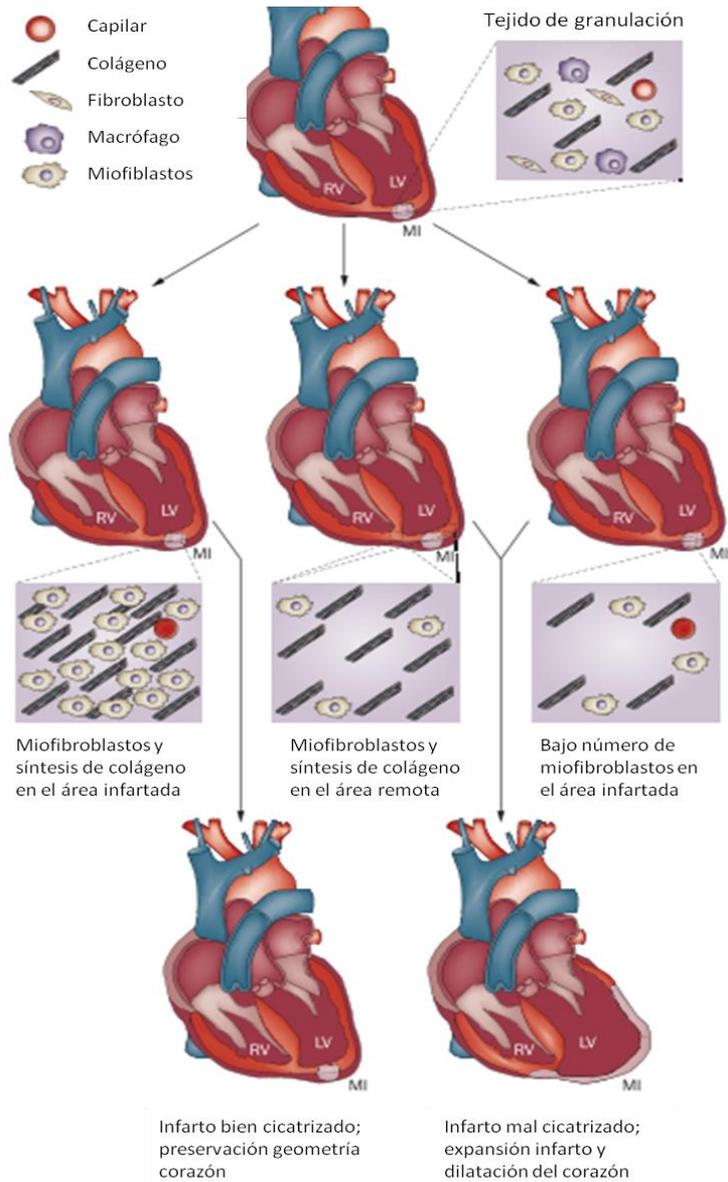


Figura 8. Papel de los miofibroblastos tras un infarto de miocardio. Los infartos bien cicatrizados presentan una geometría preservada mientras que los infartos mal cicatrizados (con menos miofibroblastos) muestran dilatación severa y expansión del infarto. Adaptado de van den Borne et al., 2010.

Actualmente existe cierta controversia sobre la aparición de la fibrosis remota tras un IAM. Por un lado, la fibrosis remota se ha documentado en diversos estudios tanto en pacientes (Beltrami et al., 1994) como en modelos animales (Cleutjens et al., 1995; Sun & Weber, 2000; Sun et al., 2000; Sun, 2009; dos Santos et al., 2013) en los que se obtuvieron infartos extensos no reperfundidos. En estos trabajos se observó un aumento de la cantidad de colágeno en el miocardio no infartado. Es por esto que se están llevando a cabo terapias dirigidas a frenar la aparición de la fibrosis remota mediante el uso, por ejemplo, de los inhibidores del sistema renina-angiotensina (van den Borne et al., 2010). Sin embargo, se debe tener en cuenta que existen otros estudios llevados a cabo tanto en modelos animales (Monreal et al., 2008; Tarkia et al., 2015) como a partir de muestras de pacientes en los que se observó que los niveles de colágeno en el miocardio remoto eran similares a los encontrados en controles.

En consecuencia, resulta fundamental determinar si realmente se produce un depósito de colágeno tras un IAM en todos los casos o si este hecho se produce solamente en aquellos casos en los que se obtienen tamaños de infarto muy extensos. Este conocimiento es fundamental para poder implantar terapias dirigidas a mejorar la supervivencia y calidad de vida de los pacientes tras un IAM. Por todo ello, en este trabajo se propuso un estudio multidisciplinar con el objetivo de determinar si la fibrosis realmente afecta o no a las zonas remotas al miocardio infartado.

6. Resonancia magnética cardíaca y T1-mapping

El método tradicional para la cuantificación del contenido de colágeno intersticial en el infarto es la biopsia endomiocárdica. Sin embargo, determinadas técnicas de imagen y biomarcadores de

colágeno en suero pueden ser utilizados como marcadores sustitutos (Martos et al., 2007). Estas herramientas pueden identificar a las personas en riesgo de disfunción cardíaca por fibrosis, lo que permite la implementación temprana de la terapia antifibrótica.

Dentro de las técnicas de imagen, la RMC es un método no invasivo de adquisición de imágenes que ha sido ampliamente utilizado para detectar y evaluar tanto la cicatriz como la perfusión miocárdica, siendo la técnica de referencia para la cuantificación de la fibrosis miocárdica focal.

Su fundamento radica en que las estructuras moleculares que conforman el cuerpo humano contienen una gran proporción de hidrógeno. Bajo un campo magnético, los protones de hidrógeno presentan un movimiento de precesión a una determinada frecuencia. Si se producen ondas electromagnéticas a la frecuencia de resonancia, las partículas absorben la energía y la liberan al medio generando una señal que se utiliza en combinación con otros campos magnéticos auxiliares para formar la imagen. La resonancia magnética permite obtener imágenes con excelente contraste entre tejidos blandos y una elevada resolución espacial en cualquier plano de corte. Las ondas electromagnéticas utilizadas tienen una baja energía y son seguras en condiciones normales de funcionamiento (Alberich-Bayari, 2010).

La RMC se basa en la infusión de contraste de gadolinio que permite diferenciar el tejido sano del fibrótico ya que las regiones de la cicatriz o fibrosis se observan como áreas de señal de intensidad alta (Dulce et al., 1993; Wu et al., 2001). Convencionalmente, este método se realiza utilizando secuencias de eco de gradiente de recuperación de inversión de 10 a 15 min después de la infusión de gadolinio. La retención de contraste dentro del espacio extracelular

produce un acortamiento del tiempo de inversión y realza dicha zona en relación con el miocardio normal. Los principales parámetros que influirán en esta variación debida al gadolinio van a ser: la perfusión local, el volumen extracelular de distribución, las tasas vasculares de intercambio de agua, los espacios intersticiales y celulares y la cinética de lavado del agente de contraste (Mewton et al., 2011).

La base fisiológica del realce tardío de gadolinio se basa en la combinación de un aumento del volumen de distribución del contraste y una disminución de la velocidad de lavado del agente debido a una disminución de la densidad capilar dentro del tejido fibroso miocárdico. Esta acumulación de gadolinio en el tejido fibroso provoca el acortamiento T1 que aparece como un aumento de la intensidad en la imagen de T1. Por tanto, la discriminación entre miocardio normal o fibroso se basa en contrastar las diferencias de concentración junto con la configuración adecuada de los parámetros de la secuencia escogida; de tal manera que el tejido normal aparezca con luminosidad nula, mientras que el tejido fibroso quede señalado por una señal luminosa (Mewton et al., 2011).

No obstante, esta técnica solo permite valoraciones cualitativas de la fibrosis miocárdica remplazada y está limitada para la evaluación cuantitativa de la fibrosis difusa debido a que, al basarse en la diferencia en la intensidad de la señal entre la zona con fibrosis y el miocardio "normal", tales diferencias pueden no existir si el proceso es difuso. Además, no existe un consenso a la hora de elegir un umbral de intensidad para calificar como fibrosis o no. Uno de los factores que afectan a esta falta de consenso es la variabilidad de la frecuencia de la fibrosis encontrada mediante el realce tardío en varias cardiomiopatías para diferentes estudios (Amado et al., 2004; Bondarenko et al., 2005; Hsu et al., 2006; Spiewak et al., 2010).

Esta variación en la intensidad luminosa percibida durante la adquisición de la imagen de T1 no solo se va a dar en el caso del tejido fibroso, sino que otros procesos patológicos como la inflamación o el edema van a provocar una variación en el volumen extracelular y captarán en consecuencia mayor cantidad de gadolinio que en condiciones normales.

Actualmente, las mejoras de las secuencias de adquisición nos permiten realizar la asignación T1 miocárdica con alta resolución espacial mediante el uso de escáneres de imagen de resonancia magnética de 1,5-Tesla dentro de una sola apnea (Messroghli et al., 2004).

En comparación con las imágenes de realce tardío, las técnicas RMC-T1 mapping nos permiten eliminar las influencias de ventanas y las variaciones de mejora de la señal midiendo directamente los tiempos de relajación T1 subyacentes. Por lo tanto, permite la cuantificación de la señal (en milisegundos) en una escala estandarizada de cada pixel para caracterizar el tejido miocárdico (Mewton et al., 2011).

La secuencia de adquisición de T1-mapping más utilizada fue descrita por Messroghli et al. y es la secuencia Modified Look-Locker Inversion-recovery (MOLLI) (Messroghli et al., 2003; 2004; 2006; 2007; 2007b). MOLLI proporciona una alta resolución en mapas de T1 con humanos dentro de una sola apnea.

El T1-mapping está basado en la inversión de la magnetización y adquiere imágenes en diferentes tiempos durante la recuperación de la magnetización. La adquisición de todas las imágenes es realizada en la misma fase cardiaca durante la diástole con ayuda del electrocardiograma usando MOLLI. Los métodos basados en la inversión de cine (Jerosch-Herold et al., 2008; Flett et al., 2010) que

adquieren las mediciones de varias fases cardiacas pueden usarse para medir el tiempo de relajación T1 en el miocardio, pero no son las adecuadas para el mapeo con resolución de pixeles.

Diferentes secuencias de adquisición pueden ser usadas para obtener los mapas miocárdicos de T1 por lo que es un punto esencial a tener en cuenta antes de obtener los mapas (Flacke et al., 2001; Messroghli et al., 2004; Maceira et al., 2005; Messroghli et al., 2007; Iles et al., 2008) ya que las medidas de estos mapas van a estar directamente relacionadas con la secuencia empleada.

Los mapas de T1 pueden ser obtenidos a diferentes niveles de corte con una duración de adquisición de 15 a 20 segundos (una apnea) por cada mapa T1 (Figura 9) (Messroghli et al., 2006). Además, muestran directamente la señal cuantificada en milisegundos. Esta es la mejor manera de caracterizar el tejido miocárdico tanto a nivel global como por regiones (Mewton et al., 2011).

Recientemente se ha desarrollado un método que permite evaluar la fibrosis difusa con ayuda de estos mapas de T1 utilizando una muestra de sangre del paciente para medir el volumen de la distribución (1-hematocrito). A partir de este dato se calcula el volumen miocárdico de la distribución o volumen extracelular (VEC) reflejando la fibrosis miocárdica difusa, ya que el colágeno es acuoso y el gadolinio es un trazador que se encuentra diseminado por el volumen extracelular (Sado et al., 2012). El VEC es un biomarcador clínico en un número muy amplio de enfermedades cardiacas de diversa fisiopatología.

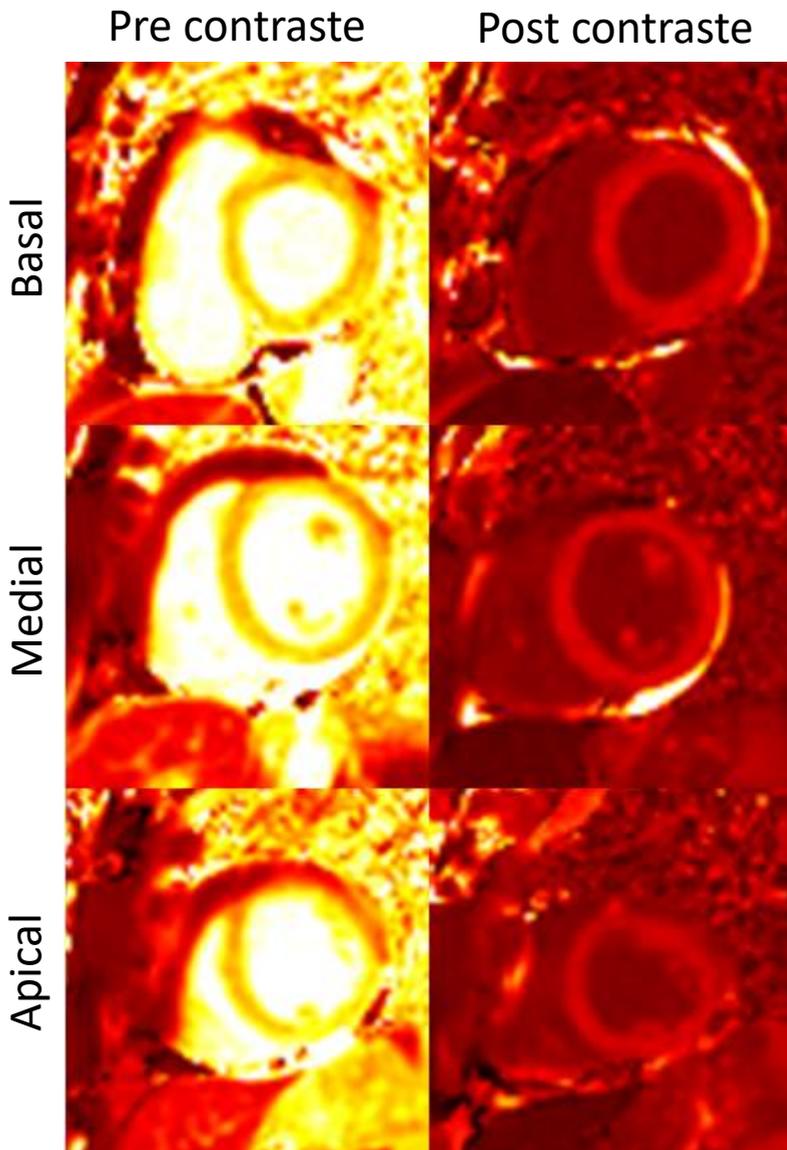


Figura 9. Mapas T1 pre contraste (izquierda) y post contraste (derecha) a nivel basal, medial y apical.

La proporción de células en el VEC es una propiedad de órganos y tejidos normales, la cual puede cambiar en el transcurso de una enfermedad debido a la hipertrofia de las células, hiperplasia y pérdida o expansión extracelular (Klima et al., 1990). La expansión extracelular consiste en un incremento del agua, asociado normalmente a un incremento de colágeno o fibrosis difusa (Wynn, 2008; Mewton et al., 2011), o deposición de material patológico como el caso de la amiloidosis (Pepys, 2006). Esta cuantificación proporciona un pronóstico sobre la función del órgano (Araya & Nishimura, 2010; Lewis & Mohanty, 2010) y sirve de guía terapéutica. En muchos casos esta información solo puede obtenerse mediante biopsia. La expansión extracelular miocárdica aparece en muchas enfermedades cardíacas, pero está limitada por el azar y el error de muestreo de la biopsia (Holzmann et al., 2008). Después de la administración intravenosa del bolo, éste se distribuye con una cinética más lenta y un mayor volumen de distribución generando diferencias relativas de señal con la fibrosis focal.

El tiempo de relajación T1 es medido directamente y mediante un modelo matemático puede eliminar los efectos del movimiento y obtener el VEC.

El VEC puede ser calculado en cada punto del miocardio mediante:

$$VEC = (1 - \text{hematocrito}) \frac{\left(\frac{1}{T1_{miocardio\ post}} - \frac{1}{T1_{miocardio\ pre}} \right)}{\left(\frac{1}{T1_{sangre\ post}} - \frac{1}{T1_{sangre\ pre}} \right)}$$

, donde los tiempos de relajación T1 son sacados de los mapas paramétricos obtenidos.

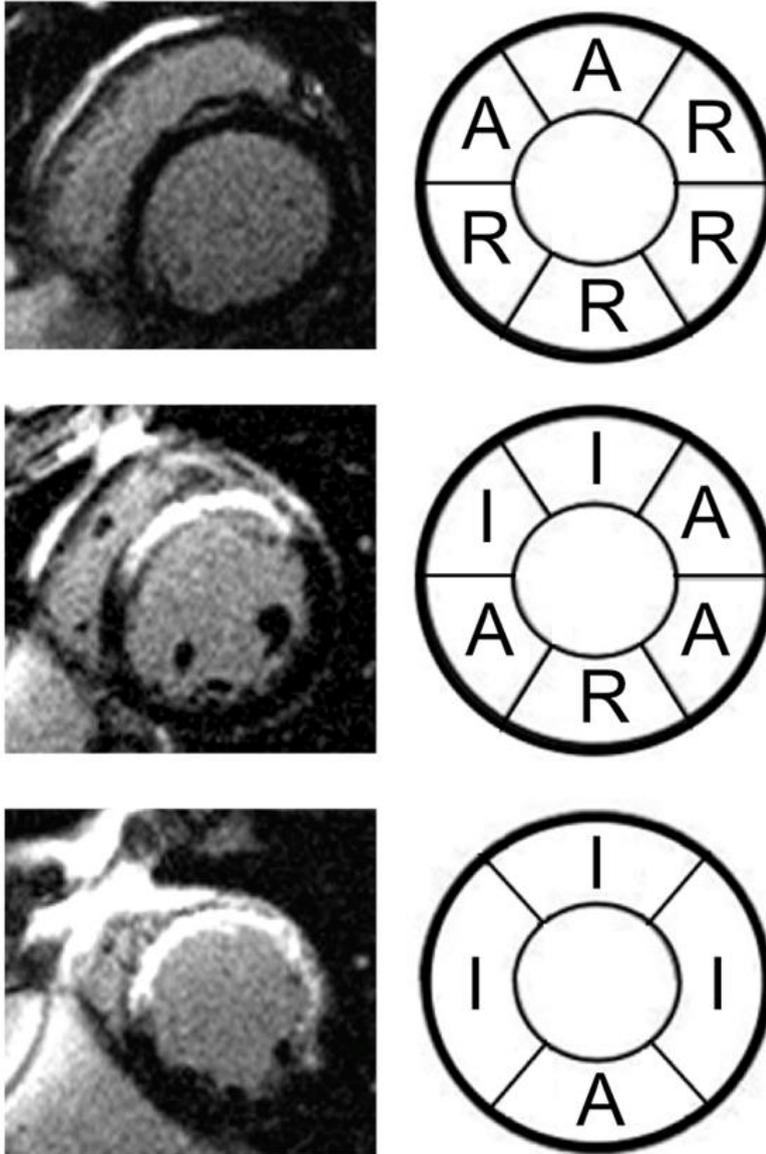


Figura 10. Imágenes de captación tardía de gadolinio obtenidas de pacientes con IAM previo sometidos a RMC y esquema de la clasificación en segmentos de acuerdo con el modelo de 16 segmentos. De esta forma las distintas partes de la imagen se dividen según correspondan a la zona infartada, adyacente o remota al infarto.

A: zona adyacente; I: zona de infarto; IAM: infarto agudo de miocardio; R: zona remota; RMC: resonancia magnética cardiaca.

De los diferentes estudios que se han realizado hasta el momento se pueden establecer valores de referencia, tanto de tiempos de T1 como de VEC para diversas enfermedades de interés. Estos estudios se han realizado siempre siguiendo el método descrito anteriormente.

Hasta el momento, los estudios llevados a cabo mediante las técnicas tradicionales de RMC no mostraron indicios de presencia de fibrosis en las zonas remotas al IAM (Figura 10). Es por esto que se planteó la hipótesis de que la fibrosis originada tras un IAM podría no ser un proceso global como se ha propuesto en estudios previos sino un proceso localizado que afecta solo al área infartada. Para comprobarlo, y debido al carácter novedoso de esta técnica, se propuso el estudio del VEC en las distintas regiones que conforman el miocardio en pacientes que habían sufrido un IAM y a los que se les había realizado RMC-T1 mapping como una de las aproximaciones para determinar si la fibrosis solo afecta el área infartada o si, por el contrario, afecta a todo el tejido miocárdico. Además, se planteó demostrar este hecho realizando un estudio en las muestras aisladas de un modelo animal porcino empleando la técnica microimagen de resonancia magnética. Para ello, se empleó un equipo de resonancia magnética de 14-Tesla donde se obtienen imágenes de una mayor resolución que en los equipos clínicos y, de esta manera, elucidar si la fibrosis está presente en la zona remota o se localiza únicamente en la región de infarto.

7. Contribución original de la autora

En consecuencia, y teniendo en cuenta las devastadoras consecuencias a nivel de mortalidad y uso de recursos que conlleva el IAM en nuestro medio, resulta necesario avanzar hacia nuevas terapias que complementen el tratamiento actual del IAM basado

fundamentalmente en la reperfusión de la arteria coronaria. Sin embargo, para poder diseñar opciones terapéuticas innovadoras que permitan reducir el tamaño del infarto y la aparición de eventos adversos, debemos partir de una comprensión sólida de las bases fisiopatológicas y avanzar desde la investigación experimental animal hacia la validación clínica en pacientes.

En este trabajo se ha querido profundizar en diversos aspectos que son claves en el proceso de recuperación de los pacientes y por tanto en su evolución tras el evento isquémico.

En primer lugar, se ha perfeccionado la metodología para definir y cuantificar el área afectada de OMV mediante la administración del colorante T-S en diferentes puntos de la anatomía cardiaca en un modelo porcino de IAM. A partir de este método se ha pretendido esclarecer el papel que ejercen los mecanismos de isquemia-reperfusión sobre la aparición y dinámica de la OMV. Además, se ha pretendido aportar evidencias como prueba de concepto del papel crucial que desempeña la lesión por isquemia-reperfusión sobre la OMV.

En segundo lugar, se ha querido abordar un aspecto novedoso como son las fluctuaciones en la orientación de las fibras de colágeno dentro de la cicatriz fibrótica formada en el miocardio infartado. Para ello se ha realizado una caracterización exhaustiva de la ordenación de las fibras de colágeno a lo largo de las diferentes partes que conforman la cicatriz fibrótica: tanto en la zona central de la cicatriz como en las zonas más externas. Este estudio se ha realizado en muestras miocárdicas obtenidas del modelo animal porcino y también a partir de muestras de autopsias de pacientes con infarto crónico.

Por último, se ha querido dar respuesta a la pregunta formulada durante años con relación a si el proceso de fibrosis aparece

solamente en el área infartada o si, por el contrario, afecta al área remota en IAM reperfundidos. Para este fin hemos utilizado una aproximación multidisciplinar que incluye un modelo animal y estudios en pacientes.

De todos estos conocimientos se puede derivar la exploración de nuevas opciones terapéuticas específicamente dirigidas a regular el proceso de fibrosis tras un IAM.

La autora de este trabajo ha llevado a cabo la adquisición y análisis de los datos estudiados. Las tres partes de esta tesis por artículos han sido publicadas en revistas científicas internacionales indexadas dentro de Journal of Citation Report. La autora de este trabajo ha escrito todos los artículos y ha desempeñado las funciones necesarias como primer autor.

II.- HIPÓTESIS

El desarrollo de un modelo experimental basado en la infusión intra-coronaria de T-S podría ser una plataforma para determinar con exactitud las zonas con OMV dentro del miocardio infartado. Ésta podría ser una herramienta para demostrar el papel fundamental de la isquemia-reperfusión sobre la aparición y dinámica de la OMV.

La organización que adoptan las fibras de colágeno durante el proceso de cicatrización de la herida tras un IAM puede no ser homogénea en las distintas partes de la cicatriz fibrótica.

El proceso de fibrosis tras un IAM reperfundido es un proceso localizado en el área infartada que no afecta de manera significativa al resto de zonas que conforman el miocardio.

III.- OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis doctoral es el estudio de los procesos de OMV y fibrosis en el IAM reperfundido en un modelo animal de IAM controlado y en pacientes que han sufrido un IAM con elevación del ST.

Los objetivos concretos son:

- Desarrollar una metodología que, aplicada a un modelo experimental de IAM, permita la determinación exacta de las zonas que presentan OMV dentro del miocardio infartado.
- Estudiar el papel que ejercen los mecanismos de isquemia-reperusión sobre la aparición y dinámica de la OMV en un modelo porcino de IAM.
- Caracterizar la organización de las fibras de colágeno a lo largo de las distintas partes de la cicatriz fibrótica en un modelo porcino de IAM.
- Analizar la organización de las fibras de colágeno a lo largo de las distintas partes de la cicatriz fibrótica en muestras obtenidas de autopsias de pacientes con un IAM crónico.
- Determinar si tras un IAM la fibrosis miocárdica se desarrolla como un proceso localizado en la zona infartada o si, por el contrario, se trata de un proceso difuso que afecta también a las regiones remotas en un modelo porcino de IAM.
- Evaluar si tras un IAM la fibrosis miocárdica se desarrolla como un proceso localizado en la zona infartada o si, por el contrario, se trata de un proceso difuso que afecta también a las regiones remotas en muestras de autopsias obtenidas de pacientes con infarto crónico.
- Comprobar si tras un IAM la fibrosis miocárdica se desarrolla como un proceso localizado en la zona infartada o si, por el

contrario, se trata de un proceso difuso que afecta también a las regiones remotas en pacientes con IAM crónico sometidos a RMC-T1 mapping.

IV.- RESUMEN DE MANUSCRITOS

1. Intracoronary infusion of thioflavin-S to study microvascular obstruction in a model of myocardial infarction. (Anexo I)

Hervás A, de Dios E, Forteza MJ, et al. Intracoronary Infusion of Thioflavin-S to Study Microvascular Obstruction in a Model of Myocardial Infarction. *Rev Esp Cardiol.* 2015;68:928-34.

Objetivo: En este trabajo se llevó a cabo un estudio metodológico que consistió en la investigación de la mejor vía de administración de la T-S para poder definir con exactitud la OMV en un modelo *in vivo*. Además, se analizó el papel del daño por isquemia-reperfusión sobre la aparición y dinámica de la OMV.

Métodos: Se llevó a cabo una serie de experimentos con el objetivo de comparar la infusión intra-ventricular e intra-aórtica con la infusión intra-coronaria de T-S. Para ello se indujo un IAM a través de una oclusión durante 90 minutos del segmento medio de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (ADA) mediante el empleo de un balón de angioplastia. Una semana después del IAM los animales se dividieron en 3 grupos y se infundió T-S en el ventrículo, en la aorta o en la ADA. A continuación, los corazones fueron detenidos y extirpados y se evaluó la precisión de la infusión intra-ventricular e intra-aórtica frente a la infusión intra-coronaria para la determinación de la OMV. Para ello se calculó el ratio de la intensidad de señal entre el área de OMV y la señal del área perfundida por la ADA negativa para la OMV (Figura 11).

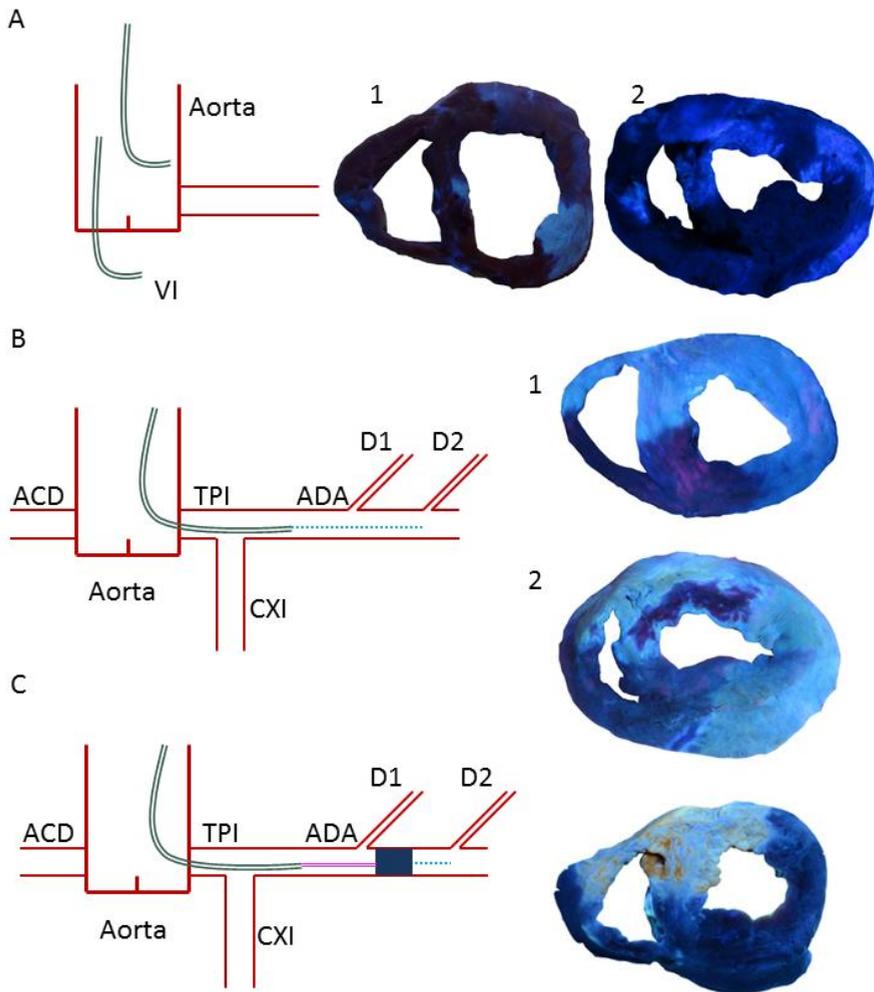


Figura 11. Metodología utilizada para la infusión de T-S e imágenes representativas de la captación de T-S. Los diagramas de la izquierda resumen los diferentes métodos utilizados para la infusión de T-S. A la derecha, se muestran cortes teñidos con T-S y observados bajo luz ultravioleta. **A:** La infusión en la aorta (1) o en el ventrículo izquierdo (2) resultó en una definición deficiente de la OMV. **B:** La infusión a través del catéter situado en la ADA proximal permitió una perfecta definición de la zona perfundida por la ADA y de la OMV. Este método se utilizó en el grupo control (1) y en los grupos de reperfusión 1 minuto, 1 semana (2) y 1 mes tras el IAM. **C:** La infusión de T-S en la ADA media a través de la luz del balón de angioplastia que se mantuvo hinchado durante todo el experimento resultó en una perfecta definición de la zona perfundida por la ADA. Adaptado de Hervás et al., 2015.

ACD: arteria coronaria derecha; ADA: arteria descendente anterior; CXI: arteria circunfleja izquierda; D: diagonal; OMV: obstrucción microvascular; T-S: tioflavina-S; TPI: tronco principal izquierdo.

A continuación, se utilizó el modelo animal porcino descrito (n=31) que se dividió en cinco grupos: grupo control, grupo sin reperfusión y grupos con reperfusión 1 minuto, 1 semana y 1 mes. En todos los grupos, a excepción del grupo control, se indujo un IAM a través de una oclusión durante 90 minutos del segmento medio de la ADA mediante el empleo de un balón de angioplastia. Tras un periodo de 90 minutos de isquemia se deshinchó el balón y se documentó la restauración del flujo coronario mediante angiografía. En el grupo de reperfusión 1 minuto se aplicó una infusión de T-S en la ADA proximal un minuto después de la reperfusión y a continuación los corazones fueron detenidos y extirpados. En los grupos de reperfusión 1 semana y un 1 mes los animales se recuperaron tras la inducción del IAM y tras 1 semana y 1 mes respectivamente se llevó a cabo el mismo protocolo descrito para el grupo de reperfusión 1 minuto (la solución de T-S se infundió en la ADA proximal a través de un catéter de angioplastia y a continuación los corazones se pararon y se escindieron). En el grupo sin reperfusión la administración de T-S se realizó a través de la luz de un balón montado sobre la guía que se mantuvo hinchado durante todo el procedimiento para evitar la reperfusión. En el grupo control se llevó a cabo el mismo procedimiento anterior con la excepción de que el balón de angioplastia no se hinchó y por tanto no se indujo el IAM. En cada grupo se cuantificó el área perfundida por la ADA y el área de OMV.

Resultados: El estudio preliminar mostró que la infusión intra-coronaria de T-S permite una evaluación mucho más clara tanto del área perfundida por la ADA como de la OMV en comparación con la administración intra-aórtica e intra-ventricular. Se comparó el ratio de la intensidad de la señal de las zonas con OMV frente a las zonas perfundidas por la ADA obteniéndose un ratio mayor en las muestras en las que se realizó una infusión intra-coronaria de T-S ($5 \pm 1,9$) en

comparación con las muestras obtenidas tras la infusión intra-aórtica ($1 \pm 0,5$) o intra-ventricular ($1 \pm 0,3$).

Por tanto, se decidió utilizar este abordaje para llevar a cabo los experimentos siguientes. La infusión intra-coronaria de T-S se llevó a cabo mediante el catéter introducido en la ADA proximal (una vez deshinchado y retirado el balón de angioplastia) o bien a través de la luz de un balón montado sobre la guía y colocado en la parte media de la ADA (que se mantuvo hinchado durante todo el experimento). La primera de estas estrategias resultó útil para evaluar la dinámica de la OMV en diferentes momentos de valoración del proceso de isquemia-reperfusión (grupo control, y perfusión de 1 minuto, de 1 semana y de 1 mes). El segundo modelo nos permitió explorar el estado de la microcirculación después de un periodo prolongado de isquemia, pero inmediatamente antes de los posibles efectos nocivos producidos por la lesión de perfusión (grupo de no perfusión).

La lesión de isquemia-reperfusión tuvo un papel decisivo en la aparición y la dinámica de la OMV (Figura 12).

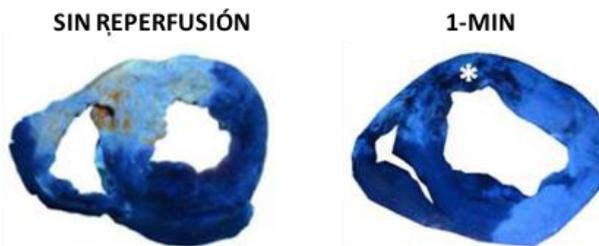


Figura 12. Efecto del daño por isquemia-reperfusión en la aparición de la OMV. Cortes del corazón del modelo experimental teñidos con tioflavina-S y observados bajo luz ultravioleta. En el grupo de no perfusión (imagen izquierda) se observa el área perfundida por la ADA pero no se observan indicios de OMV. Tras un minuto de perfusión (imagen derecha) ya se observa una zona de OMV dentro del área perfundida por la ADA.

ADA: arteria descendente anterior; OMV: obstrucción microvascular.

El grupo sin reperfusión presentó una perfusión completamente preservada aun en condiciones de isquemia severa. En cambio, en experimentos realizados bajo las mismas condiciones controladas y con la misma duración de la oclusión coronaria, la OMV se detectó ya en el grupo de 1 minuto de reperfusión ($14 \pm 7\%$), alcanzó un máximo tras una semana de reperfusión ($21 \pm 7\%$), y se redujo de forma significativa tras un mes ($4 \pm 3\%$, $p < 0,001$ vs grupo de 1 semana de reperfusión) (Figura 13).

Por último, se estudiaron las consecuencias estructurales de la OMV. Se determinó el grosor de la pared miocárdica en las áreas de OMV (zona infartada con presencia de OMV), de infarto (zona infartada sin presencia de OMV), adyacente (zona no infartada dentro del área perfundida por la ADA) y remota (zona no perfundida por la ADA). Los resultados obtenidos mostraron que transcurrido un mes de la reperfusión se producía un estrechamiento de la pared miocárdica en el área de OMV en comparación con las áreas infartada, adyacente y remota. Además, este estrechamiento era también significativo al comparar el grosor de la pared miocárdica en esta área con el área con OMV del grupo de una semana de reperfusión.

Todos estos estudios se realizaron además en el ventrículo derecho obteniéndose resultados similares a los presentados en el VI.

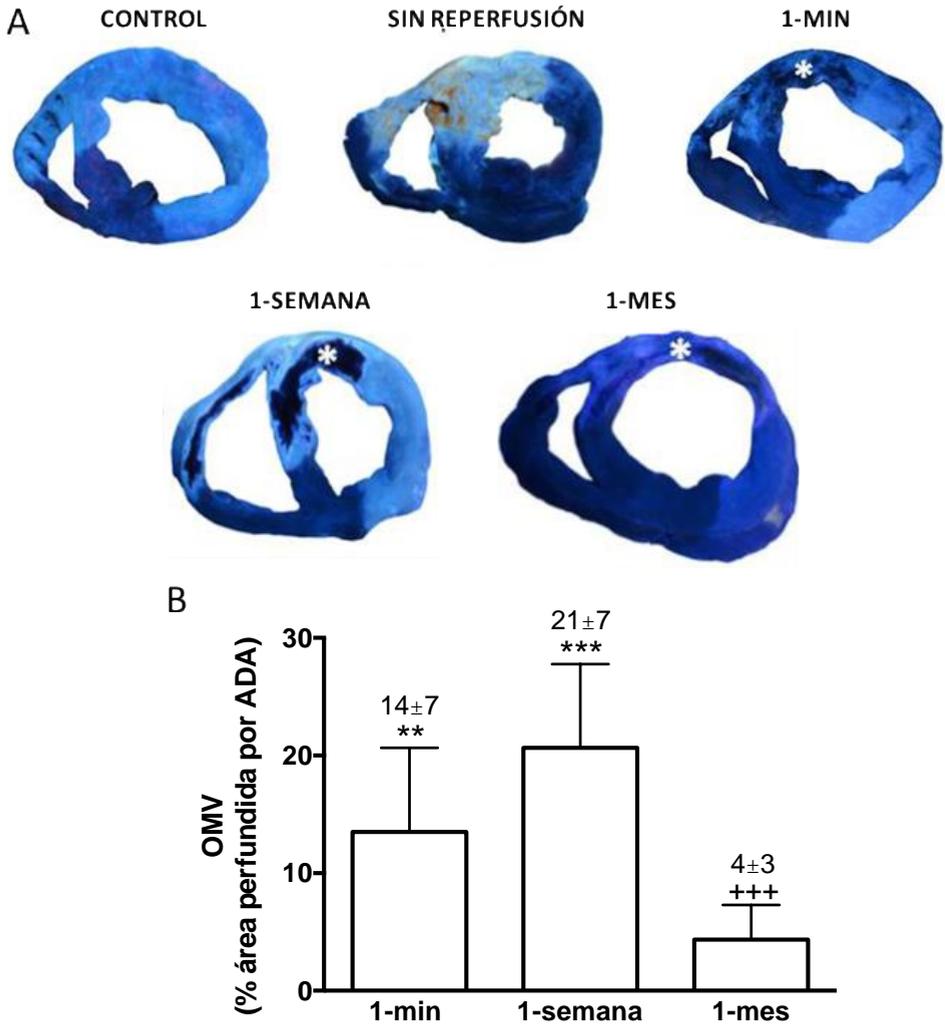


Figura 13. Dinámica de la OMV en el VI. **A:** Imágenes representativas de cortes del corazón del modelo experimental a diferentes tiempos del proceso de isquemia-reperusión tras un infarto. Las muestras fueron teñidas con T-S y observadas bajo luz ultravioleta. **B:** Cuantificación del porcentaje de OMV del área perfundida por la ADA. Cortes teñidos con T-S y observados bajo luz ultravioleta. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs control, +++ $p < 0,001$ vs 1-semana de reperusión. Adaptado de Hervás et al., 2015.

ADA: arteria descendente anterior; OMV: obstrucción microvascular; T-S: tioflavina-S; VI: ventrículo izquierdo.

2. Inhomogeneity of collagen organization within the fibrotic scar after myocardial infarction: results in a swine model and in human samples. (Anexo II)

Hervás A, Ruiz-Saurí A, de Dios E, et al. Inhomogeneity of collagen organization within the fibrotic scar after myocardial infarction: results in a swine model and in human samples. *J Anat.* 2016;228:47-58.

Objetivo: El objetivo del estudio fue la caracterización de la organización de las fibras de colágeno en la cicatriz fibrótica en un modelo porcino de IAM y en muestras humanas de autopsias de pacientes con IAM crónico.

Métodos: La inducción del IAM en los cerdos se realizó mediante la oclusión transitoria durante 90 minutos del segmento medio de la ADA izquierda empleando un balón de angioplastia seguido de un periodo de reperusión de 1 semana (grupo de IAM agudo) o 1 mes (grupo de IAM crónico). Tras un estudio macroscópico del área infartada se obtuvieron muestras del área central (zona central del tejido infartado), del endocardio, del epicardio y del área periférica (zona dentro del área infartada pero cerca del borde del tejido sano) (n=100) de los corazones porcinos. Para la determinación de la organización de las fibras de colágeno se empleó el algoritmo FFT (valores más elevados del índice de organización señalan una mayor desorganización) implementado en el software Image ProPlus (Figura 14). Además, se llevó a cabo una caracterización de la organización de las fibras de colágeno mediante microscopía electrónica de transmisión. Así como un estudio mediante inmunohistoquímica de la organización de los miofibroblastos a lo largo de la cicatriz.

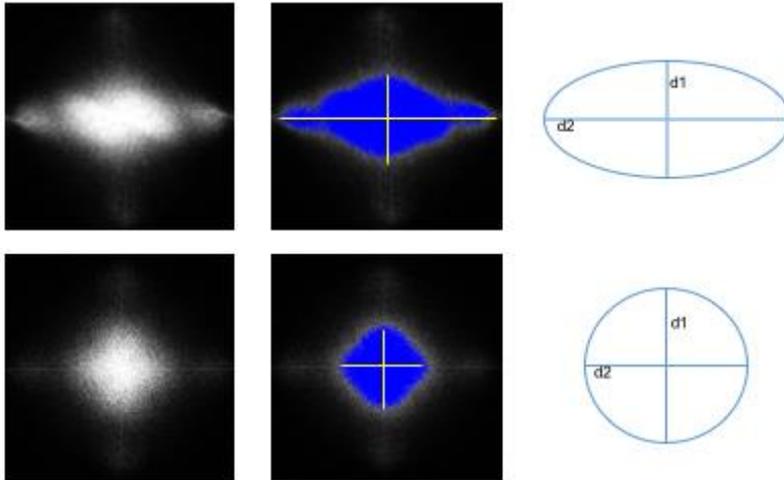


Figura 14. El método de transformada de Fourier para la evaluación de la organización de las fibras de colágeno en las distintas partes de la cicatriz fibrótica. En la figura se muestran ejemplos de espectros y un esquema de los mismos de una muestra de la zona central (imágenes superiores) y de una muestra del área periférica (imágenes inferiores).

Por otra parte, se obtuvieron muestras de tejido infartado procedente de autopsias de pacientes con un IAM crónico (n=95). En estas muestras se analizó la organización de las fibras de colágeno en el área central, en el endocardio, epicardio y en el área periférica de la cicatriz fibrótica. En este caso se realizó una tinción con rojo picrosirius de las muestras y un posterior análisis de la organización de las fibras mediante el algoritmo de la Transformada de Fourier.

Resultados: En el modelo animal se obtuvo un índice de organización del colágeno similar en el área central de la cicatriz en los grupos de infarto crónico [0,56 (0,45-0,64)] y agudo [0,56 (0,49-0,66)]. En el grupo crónico, se obtuvo una mayor desorganización de las fibras de colágeno en las zonas periféricas en comparación con la zona central ($p < 0,0001$). En la zona central la organización de las

fibras era casi paralela mientras que en las zonas periféricas se obtuvo una organización desordenada. Los índices de organización obtenidos fueron mucho mayores en el endocardio [0,90 (0,84-0,94)], epicardio [0,84 (0,79-0,91)] y el área periférica [0,73 (0,63-0,83)] mostrando un patrón más desorganizado en comparación con el área central [0,56 (0,45-0,64)] (Figura 15).

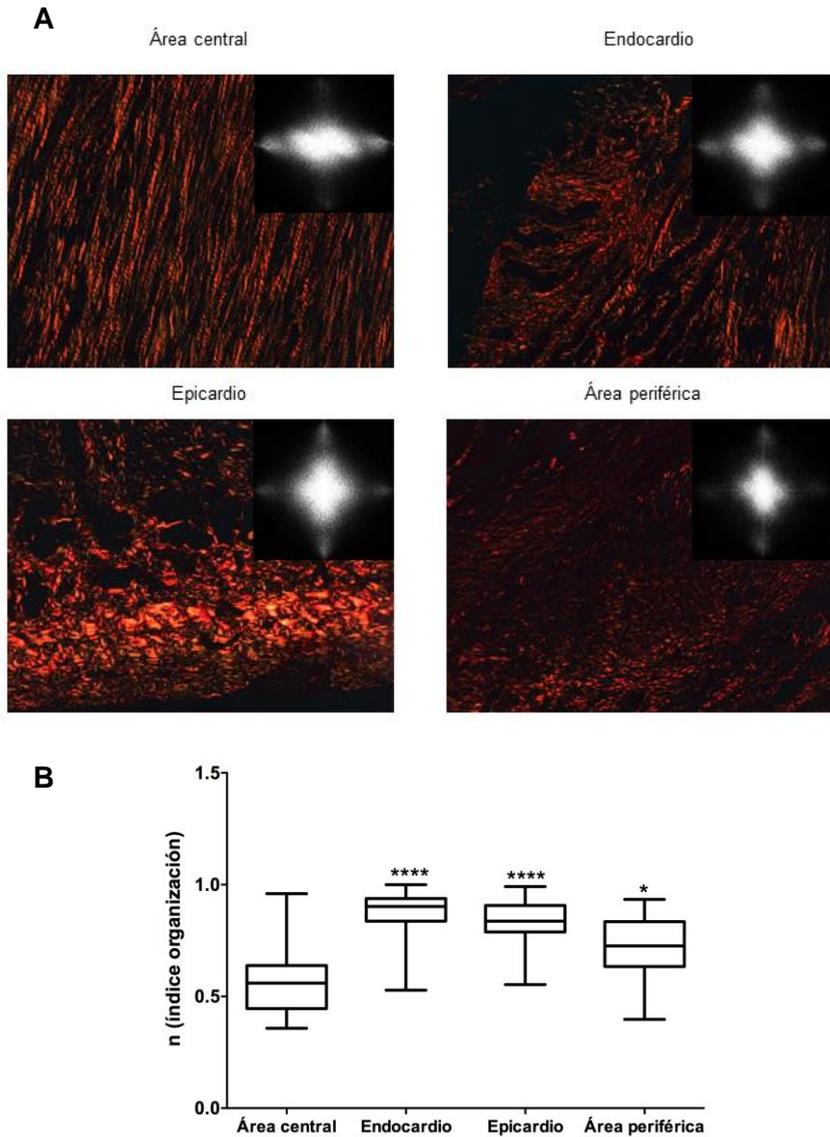


Figura 15. Organización de las fibras de colágeno dentro de la cicatriz fibrótica tras un infarto teñidas con picrosirius. **A:** Imágenes de distintas partes de la cicatriz fibrótica (área central, endocardio, epicardio y área periférica) obtenidas del modelo experimental teñidas con picrosirius (fotografiadas utilizando un filtro de polarización con un aumento de 20X) y los espectros de la transformada de Fourier obtenidos de estas imágenes. Los distintos espectros obtenidos ilustran las diferencias en la organización del colágeno entre las distintas áreas de la cicatriz fibrótica. Las fibras de colágeno en el área central se organizan de una forma casi paralela mientras que, en el endocardio, epicardio y el área periférica las fibras se organizan de una forma desordenada. **B:** Representación de los valores del índice de organización del colágeno calculado para cada una de las zonas estudiadas. * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$ vs zona central. Adaptado de Hervás et al., 2016.

Estos resultados se corroboraron mediante microscopía electrónica y mediante el estudio de la organización de los miofibroblastos en las distintas partes del área infartada. Los resultados obtenidos mostraron que los miofibroblastos estaban organizados de forma similar a las fibras de colágeno (Figura 16).

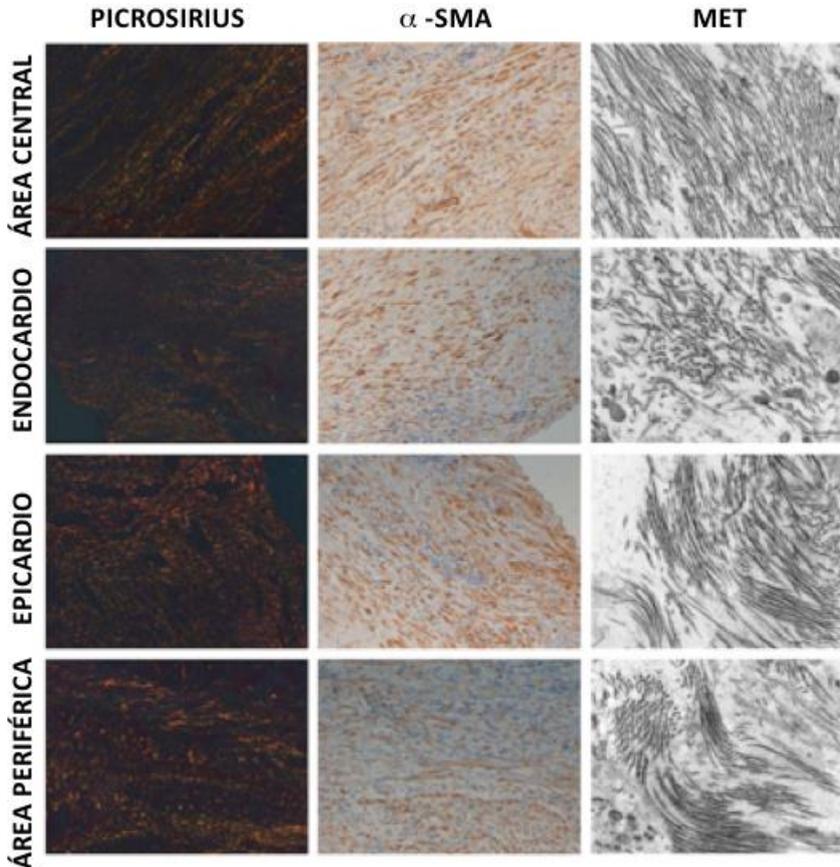


Figura 16. Organización de las fibras de colágeno determinada mediante inmunohistoquímica y microscopía electrónica. Imágenes de distintas partes de la cicatriz fibrótica (área central, endocardio, epicardio y área periférica) obtenidas del modelo experimental teñidas con picrosirius (izquierda), con inmunohistoquímica usando el anticuerpo anti- α -SMA (central) y por MET (derecha). Las fibras de colágeno en el área central se organizan de una forma casi paralela mientras que, en el endocardio, epicardio y el área periférica las fibras se organizan de una forma desordenada. Adaptado de Hervás et al., 2016.

α -SMA: α -actina de músculo liso; MET: microscopio electrónico de transmisión.

De forma paralela, en las muestras humanas de autopsias de pacientes con IAM crónico, las fibras de colágeno presentaban una organización más ordenada en el área central en comparación con el resto de zonas que conforman la cicatriz fibrótica ($p < 0,0001$). Además, del mismo modo que en el modelo animal, se llevaron a cabo comparaciones específicas entre la zona central [0,67 (0,56-0,76)] y el endocardio [0,83 (0,73-0,90)], epicardio [0,80 (0,74-0,87)] y el área periférica [0,83 (0,67-0,90)].

3. A multidisciplinary assessment of remote myocardial fibrosis after reperfused myocardial infarction in swine and patients (Anexo III)

Hervás A, Ruiz-Saurí A, Gavara J, et al. A Multidisciplinary Assessment of Remote Myocardial Fibrosis After Reperfused Myocardial Infarction in Swine and Patients. *J Cardiovasc Transl Res.* 2016;9:321-33.

Objetivo: El objetivo de este estudio fue dilucidar si el proceso de fibrosis tras un IAM es un proceso localizado o si por el contrario se trata de un proceso difuso que afecta también a las regiones remotas al área infartada. La evaluación se realizó en tres escenarios diferentes: en un modelo porcino de IAM crónico reperfundido, en muestras de miocardio obtenidas de pacientes con IAM crónico reperfundido y en pacientes con IAM crónico reperfundido sometidos a RMC-T1 mapping.

Métodos: En el modelo porcino se indujo el IAM por medio de la oclusión transitoria durante 90 minutos del segmento medio de la ADA izquierda seguida por una reperfusión de una semana (grupo de IAM agudo) o de un mes (grupo de IAM crónico). Se evaluó el contenido de colágeno en las áreas infartada, adyacente (zona no infartada dentro del área en riesgo) y remota a nivel macroscópico, microscópico y por técnicas de biología molecular.

A nivel microscópico se realizó una cuantificación del contenido de colágeno en las tres zonas estudiadas a través de una tinción rojo picrosirius y un posterior análisis utilizando el programa Image ProPlus. Además, se llevó a cabo la cuantificación de los miofibroblastos presentes en las zonas de infarto, adyacente y remota mediante estudios inmunohistoquímicos. Asimismo, se evaluó mediante microscopía electrónica de transmisión la presencia de

colágeno en las tres regiones a estudio. Por último, se realizó un estudio mediante microimagen por resonancia magnética utilizando un equipo de 14-Tesla mediante el que se obtuvieron imágenes de T1 y T2. Las imágenes de T1 se utilizaron para la descripción anatómica de las muestras mientras que las imágenes de T2 permitieron diferenciar el área infartada del tejido sano en las distintas regiones a estudio (Figura 17). A nivel molecular se evaluó la expresión génica de los marcadores de fibrosis TGF- β , COL1A1, COL1A2 y COL3A1 en las áreas infartada, adyacente y remota.

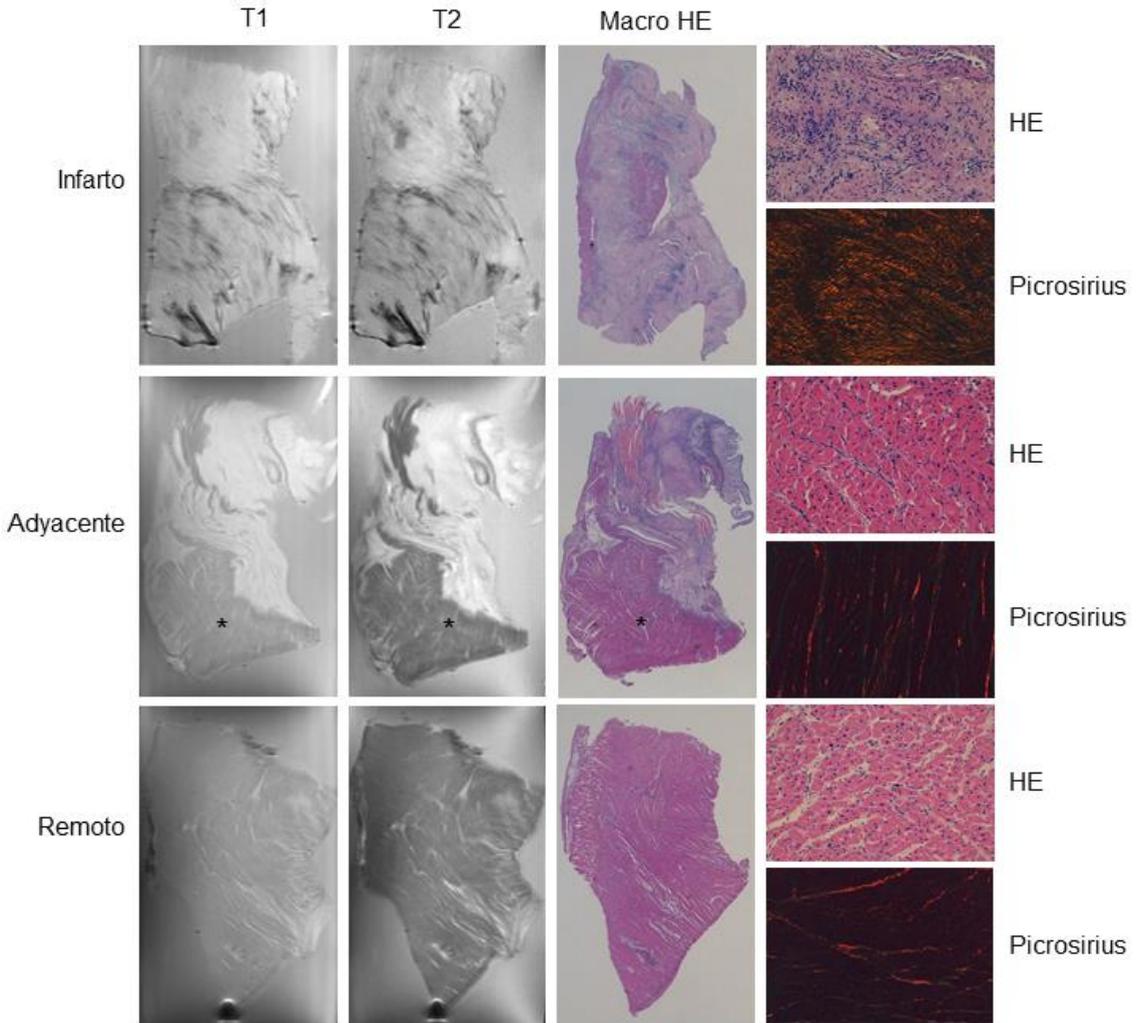


Figura 17. Detección de fibrosis mediante microimagen por resonancia magnética. Imágenes obtenidas a través de microimagen por resonancia magnética en un equipo de 14-Tesla en muestras del modelo experimental. Imágenes de T1 y T2 (primera y segunda columna, respectivamente) y teñidas con HE (tercera columna) de muestras de la zona de infarto, adyacente y remota del modelo de 1 mes de reperfusión. La cuarta columna ilustra las regiones de interés teñidas con HE y con picrosirius y posteriormente fotografiadas a 20X. Las imágenes de T1 se utilizaron para la descripción anatómica de las muestras. En las regiones adyacentes (panel medio) se observó una perfecta diferenciación entre el tejido infartado y el sano (asterisco). Adaptado de Hervás et al., 2016b.

HE: hematoxilina-eosina.

En muestras humanas obtenidas de autopsias de pacientes con infarto crónico se analizó el contenido de colágeno a nivel microscópico (tinción con rojo picrosirius para la cuantificación de colágeno e inmunohistoquímica para la evaluación de la cantidad de miofibroblastos). Por último, se determinó la fracción de volumen extracelular (FVE) mediante RMC-T1 mapping en pacientes con infarto como un parámetro de presencia de fibrosis (Figura 18).

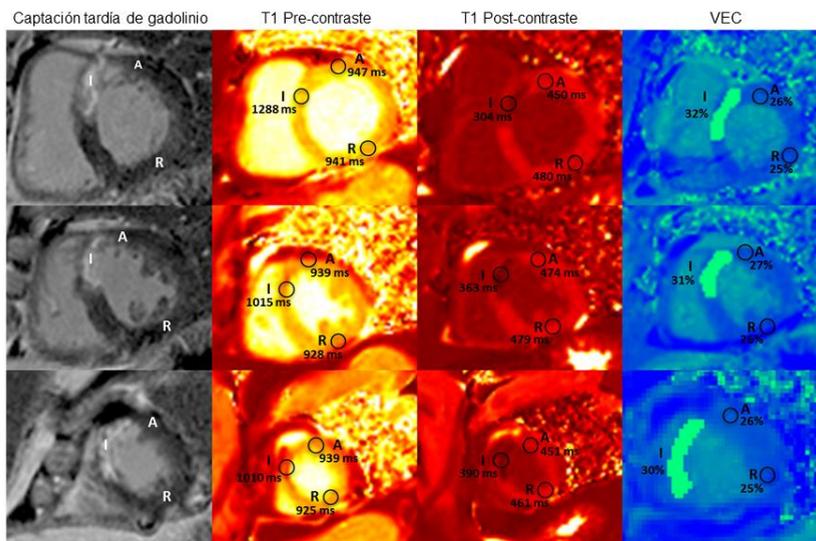


Figura 18. Determinación del volumen extracelular mediante imágenes de T1-mapping. La figura ilustra un ejemplo de imágenes de captación tardía de gadolinio (panel izquierdo), imágenes de T1-mapping antes y después de la infusión del contraste (paneles centrales) e imágenes del VEC (panel derecho) así como los valores obtenidos en la zona de infarto, adyacente y remota en un paciente con IAM previo. Adaptado de Hervás et al., 2016b.

IAM: infarto agudo de miocardio; VEC: volumen extracelular.

Resultados: A nivel macroscópico, solamente se detectó necrosis ($27,33 \pm 7,35\%$ del volumen VI) y fibrosis ($14,79 \pm 3,89\%$ del volumen VI) en el área infartada. En ninguno de los casos se observó fibrosis a nivel macroscópico en las zonas adyacente o remota. En el modelo porcino no se observaron diferencias en cuanto al contenido en colágeno en el área remota en comparación con los controles determinado tanto a nivel macroscópico, microscópico, molecular como por microimagen por resonancia magnética. En las muestras obtenidas de autopsias de pacientes, únicamente la región infartada presentó un incremento significativo en el contenido de colágeno. En pacientes con IAM crónico analizados por RMC-T1 mapping, los segmentos de la zona remota presentaban una FVE similar a las obtenidas en los controles.

V.- DISCUSIÓN

Las enfermedades cardiovasculares provocan millones de muertes al año en todo el mundo (Atlas 2014) y suponen un 47% de todas las muertes de Europa (Ferreira-González, 2014). Dentro de las enfermedades cardiovasculares, el síndrome coronario agudo es una de las principales causas de mortalidad, morbilidad y coste sanitario en España estimándose un aumento durante las próximas décadas debido al envejecimiento de la población (Dégano et al., 2013).

El objetivo principal tras un IAM es el restablecimiento rápido y completo de la perfusión del vaso ocluido mediante la realización de una ACTP. A través de este procedimiento se pretende la rápida reperusión del vaso infartado, así como la disminución del tamaño del infarto. Sin embargo, a pesar de que la reperusión temprana es necesaria, a su vez activa una serie de fenómenos que no siempre tienen un efecto beneficioso en el pronóstico de los pacientes. Entre ellos destaca la aparición de la OMV y el proceso de fibrosis necesario para la formación de una cicatriz sólida que evite el remodelado ventricular adverso, la aparición de IC y la formación de arritmias ventriculares. Actualmente todavía existe cierta controversia respecto a la fisiopatología de estos dos fenómenos y un mejor entendimiento de ambos podría ayudar a diseñar nuevas oportunidades terapéuticas tras un IAM. En consecuencia, el objetivo de la presente tesis doctoral es profundizar en el conocimiento de ambos fenómenos que juegan un papel tan decisivo en el pronóstico de los pacientes post-IAM.

Por un lado, a pesar de que el restablecimiento del flujo coronario resulte esencial en la supervivencia de los pacientes con IAM, como consecuencia del mismo se ha descrito el daño por isquemia-reperusión, que tiene un papel esencial sobre la aparición

de la OMV. Este fenómeno se ha descrito en un número considerable de pacientes y su origen se considera multifactorial debido a que interviene desde una hiperreactividad de plaquetas y neutrófilos hasta la embolización distal, factores genéticos y el daño por isquemia-reperusión. La contribución original del presente trabajo radica en que se ha comprobado en un modelo porcino de IAM anterior que realmente el daño que se ejerce tras la reperusión de la arteria coronaria infartada actúa sobre la aparición de la OMV.

Por otro lado, debido al periodo de isquemia se produce la muerte de células cardíacas y una pérdida de la estructura de la matriz extracelular que conlleva un deterioro estructural y funcional del miocardio (Frangogiannis, 2014). Es en este contexto donde cobra importancia el segundo de los procesos estudiados en este trabajo: el proceso de reparación del miocardio dañado, o proceso de fibrosis. El proceso de fibrosis post-IAM está ampliamente descrito y es necesario para mantener la integridad estructural y funcional del miocardio después del IAM. Sin embargo, diversos estudios tanto en modelos animales como en humanos apuntan a que una desregulación de este proceso está relacionada con un peor pronóstico de los pacientes (van den Borne et al., 2010; Daskalopoulos et al., 2012). Por tanto, en el marco de esta tesis doctoral se pretendía conocer mejor cómo ocurre el proceso de formación de la cicatriz fibrótica desde una aproximación traslacional: en un modelo animal porcino de IAM reperfundido y en pacientes con IAM. Este trabajo se ha centrado en el estudio, en muestras de miocardio del modelo de IAM porcino y en muestras obtenidas de autopsias de pacientes que han sufrido un IAM, de la organización de las fibras de colágeno en distintas partes de la cicatriz fibrótica. Por último, se ha llevado a cabo una evaluación de la fibrosis remota con el objetivo de determinar si el proceso de fibrosis afecta también a las

regiones remotas a la cicatriz o si por el contrario es un proceso localizado en la zona infartada.

La metodología utilizada para la infusión de la T-S en el modelo porcino con el empleo de la inyección intra-coronaria del colorante permite una caracterización exacta de la OMV después del infarto de miocardio. Además, los resultados obtenidos en el presente trabajo resultan novedosos debido a que, por primera vez, se presenta una evidencia que constituye una prueba de concepto del papel crucial que desempeña la lesión de isquemia-reperusión en la aparición y la dinámica de la OMV (Hervás et al., 2015). Por otra parte, la detallada descripción de la organización de las fibras de colágeno contribuye al conocimiento sobre el proceso de cicatrización de la herida y podría conllevar un mejor entendimiento de la génesis y el tratamiento de las arritmias tras un IAM (Hervás et al., 2016). Por último, la tercera parte del trabajo pone de manifiesto que, en la actual era de la reperusión, el papel de la fibrosis remota, en el que se basan incluso algunas terapias actuales, podría necesitar una reconsideración (Hervás et al., 2016b).

1. Efecto del daño por isquemia-reperusión sobre la aparición y dinámica de la obstrucción microvascular

El fenómeno de OMV se produce debido a que, a pesar de una rápida apertura del vaso infartado mediante las técnicas actuales de reperusión, la circulación no siempre se restablece en toda la microvasculatura fenómeno que tiene una gran repercusión negativa en el pronóstico posterior de pacientes tras un IAM (Bolognese et al., 2004; Brosh et al., 2007; Niccoli et al., 2009; Jaffe et al., 2010). La patogenia de la OMV es multifactorial e incluye la combinación de varios elementos (Niccoli et al., 2009; Jaffe et al., 2010). No obstante, a pesar de que la lesión por isquemia-reperusión podría producir

efectos deletéreos sobre la integridad microvascular no hay evidencias definitivas que relacionen la lesión por isquemia-reperfusión y la aparición de OMV.

En este trabajo se ha querido esclarecer el papel de la lesión por isquemia-reperfusión en la aparición y la dinámica de la OMV. Sin embargo, hasta el momento, las técnicas descritas para la evaluación de las regiones con la microvasculatura dañada no permitían determinar con exactitud las regiones afectas de OMV. Para ello se ha llevado a cabo un estudio metodológico preliminar con el objetivo de desarrollar un método de estudio experimental controlado de la OMV.

1.1 Metodología usada para la infusión de la tioflavina-S

En este trabajo no solamente se ha contribuido a esclarecer el papel decisivo del daño por isquemia reperfundida sobre la aparición de la OMV en el miocardio infartado, sino que para ello se ha desarrollado una metodología con la que se ha permitido una correcta delimitación de la zona con OMV y de la zona perfundida por la ADA. El modelo elegido fue el porcino ya que presenta muchas similitudes con el corazón humano tanto a nivel de fisiología cardíaca como de tamaño (Cuellas-Ramón et al., 2013; Elmadhun et al., 2013; Santos-Gallego et al., 2013). En este caso lo novedoso no fue el uso de un modelo porcino para el estudio del IAM (estos modelos han sido ampliamente descritos y utilizados) sino la optimización de una metodología utilizada para caracterizar la OMV tras un IAM.

Hasta el momento, los medios de contraste utilizados para el estudio de la perfusión en muestras miocárdicas obtenidas en modelos animales *in vivo* se han infundido en la aurícula izquierda (Kumar et al., 2011), en el VI (Wu et al., 1998) o por vía intravenosa (Kloner et al., 1974). Sin embargo, la amplia experiencia previa de

nuestro grupo en el campo de la ecocardiografía en pacientes permitió observar que la infusión intra-coronaria de contraste permitía una mejor definición de la perfusión miocárdica (Bodí et al., 2005). Esta observación inspiró este trabajo ya que permitió el desarrollo de un método aplicado sobre un modelo porcino de IAM en el que se obtenía una delimitación excelente del área perfundida por la ADA y de la OMV en muestras miocárdicas obtenidas inmediatamente después del sacrificio de los animales. Por el contrario, la infusión obtenida a través del ventrículo o de la aorta produjo una definición peor de la perfusión miocárdica tanto en el análisis visual como tras la cuantificación del cociente de intensidad.

Así pues, esta estrategia novedosa constituye un abordaje sencillo que permite una caracterización exacta de la perfusión miocárdica y de la OMV en un modelo porcino. El modelo experimental *in vivo* presentado podría ser útil como plataforma para nuevos estudios traslacionales centrados en un mejor conocimiento de la OMV y en explorar posibilidades terapéuticas alternativas en unas condiciones muy controladas.

1.2 Papel ejercido por el daño por isquemia-reperfusión en la aparición y dinámica de la obstrucción microvascular

El efecto del daño por isquemia-reperfusión sobre la aparición de la OMV en pacientes que han sufrido un IAM ha sido objeto de debate durante mucho tiempo (Ovize et al., 2010; Hausenloy et al., 2013). La patogénesis de la OMV es multifactorial e incluye la combinación de una variedad de componentes como son la embolización distal, la agregación de neutrófilos, así como factores genéticos (Niccoli et al., 2009; Jaffe et al., 2010). El papel que ejerce el daño por isquemia-reperfusión sobre la aparición de este proceso no está bien establecido.

Con el fin de elucidar si el daño por isquemia-reperfusión contribuye a la aparición de la OMV se diseñaron dos series de experimentos en las que se provocó un IAM anterior a grupos de animales con idénticas condiciones siendo el único factor diferenciante el permitir la reperfusión de la arteria coronaria ocluida. En el primer grupo no se permitió la reperfusión ya que el balón de angioplastia se mantuvo hinchado durante todo el experimento (90 minutos de isquemia) con el objetivo de explorar el estado de la microvasculatura inmediatamente antes de la reperfusión. La T-S en este caso se infundió a través de la luz del balón de angioplastia hinchado, montado sobre la guía y localizado en la ADA media. En el segundo grupo, tras el mismo tiempo de oclusión (90 minutos), el balón se deshinchó y se retiró de la arteria permitiendo de esta forma la reperfusión de la arteria coronaria. La T-S en este caso se infundió tras 1 minuto de reperfusión a través del catéter situado en la ADA. Los resultados obtenidos mostraron que en el grupo sin reperfusión la microcirculación estaba totalmente conservada mientras que tras solamente 1 minuto de reperfusión se observó, en todos los casos, áreas del miocardio que presentaban OMV.

Estos resultados contribuyen a otorgar un papel decisivo al daño por isquemia-reperfusión sobre la aparición de la OMV. Además, resultan relevantes debido a que, aunque ya existen aproximaciones invasivas que tienen como objetivo la reducción de la OMV en el IAM reperfundido, éstas han obtenido resultados controvertidos o no satisfactorios (Kaltoft et al., 2006; Bodí et al., 2014). Por tanto, se necesitan todavía muchos esfuerzos para un mejor entendimiento y manejo de los minutos posteriores a la reperfusión que resultan determinantes para la evolución posterior de los pacientes.

1.3 Dinámica de la obstrucción microvascular

Con el objetivo de explorar la dinámica de la OMV tras un IAM se llevaron a cabo experimentos con igual tiempo de isquemia (90 minutos) pero con distintos tiempos de reperfusión. Los resultados obtenidos mostraron que en el grupo sin reperfusión no se encontró OMV mientras que después de solamente 1 minuto de reperfusión ya existen zonas con OMV, observándose las mayores áreas de OMV tras una semana de reperfusión y resolviéndose casi por completo tras un mes (Figura 19). Diversos trabajos han concluido que el estado de la microvasculatura presenta un comportamiento dinámico tras la reperfusión (Niccoli et al., 2009; Jaffe et al., 2010). Además, imágenes de RMC realizadas en pacientes en fases crónicas post-IAM demuestran que la OMV se resuelve de manera espontánea (Galiuto et al., 2003; Bodí et al., 2007; Niccoli et al., 2009; Jaffe et al., 2010).

Hasta el momento no se ha llegado a un acuerdo sobre el momento más apropiado para la evaluación de la OMV en pacientes con IAM por lo que la correcta caracterización de la OMV resulta de gran importancia con respecto al diagnóstico y las terapias para minimizar este proceso. Según los resultados obtenidos en el presente estudio, podría sugerirse que el análisis mediante técnicas de imagen alrededor de una semana post-IAM podría ofrecer una estimación aproximada del daño total de la microvasculatura.

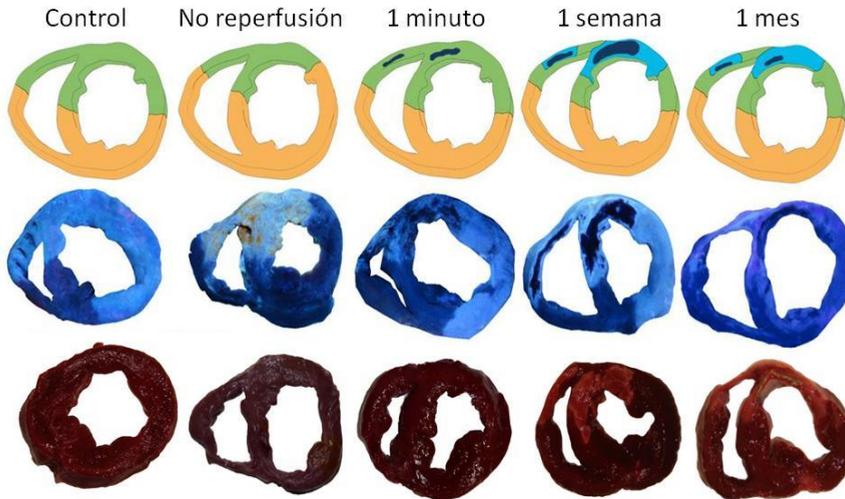


Figura 19. Esquema del efecto de la reperfusión sobre la obstrucción microvascular en diferentes tiempos del proceso de isquemia-reperfusión. Esquema representativo (panel superior), cortes teñidos con tioflavina-S fotografiados bajo luz ultravioleta (panel medio) y cortes teñidos con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (panel inferior) del grupo control, grupo de no reperfusión y grupos reperfundidos (1 minuto, 1 semana y 1 mes). El esquema representa el área en riesgo (verde), el área infartada (azul claro) y la zona con obstrucción microvascular (azul oscuro).

2. Determinación de la organización de las fibras de colágeno en la cicatriz fibrótica mediante la transformada de Fourier

La segunda parte del trabajo se centró en el estudio de la organización de las fibras de colágeno en todas las áreas que conforman la cicatriz fibrótica en el miocardio infartado. Para este propósito se evaluó la organización de las fibras de colágeno en un modelo animal de IAM reperfundido durante 1 semana y 1 mes y en muestras de pacientes con infarto crónico.

Para determinar el índice de organización se implementó el algoritmo FFT tras la tinción de las muestras con rojo picosirius. Este algoritmo se ha usado para la determinación morfométrica de la orientación de colágeno en otras especialidades como en estudios dermatológicos (van Zuijlen et al., 2002; Osman et al., 2013; Marcos-Garcés et al., 2014). Como se ha descrito en trabajos previos (Osman et al., 2013), el FFT es un algoritmo que se utiliza para calcular la Transformada Discreta de Fourier (DFT) de su señal y su inversa. La DFT de una imagen extrae la intensidad de las ondas de frecuencia que contribuye al valor de los píxeles que forman la imagen. La amplitud de los valores de la DFT para todos los pares de frecuencias forma el espectro de Fourier de la imagen. Todas las frecuencias presentes en la imagen quedan representadas en el espectro de frecuencias y los patrones que forma cada espectro se utilizan para determinar la organización relativa de la textura de la imagen original.

2.1 Dinámica de la organización de las fibras de colágeno a lo largo del proceso de cicatrización de la herida

Los miofibroblastos juegan un papel esencial tras un IAM ya que son las células encargadas de producir el colágeno necesario para estabilizar el tejido dañado (van den Borne et al., 2010). Durante el proceso de cicatrización del tejido infartado se produce un incremento del contenido de colágeno que aumenta la rigidez miocárdica (Gupta et al., 1994).

En cambio, no solamente el incremento en el contenido de colágeno influye sobre la rigidez y posterior funcionalidad miocárdica. En este sentido resulta de especial interés la organización de las fibras de colágeno a lo largo de la cicatriz fibrótica ya que se ha descrito que la deposición del colágeno tras un IAM juega un papel central en las propiedades mecánicas de la cicatriz (Holmes et al.,

2005). No obstante, a pesar de su importancia en la evolución de los pacientes tras un IAM, la distribución de las fibras de colágeno en los días y semanas tras un IAM no está bien definida. Desde hace más de 20 años la organización de las fibras de colágeno ha estado en la mente de muchos investigadores que observaron un incremento progresivo en la organización molecular del colágeno durante las primeras seis semanas tras un infarto (Whittaker et al., 1989). Sin embargo, estudios más recientes defienden que la orientación de las fibras de colágeno varía a lo largo de proceso de cicatrización de la herida pasando de un patrón bien organizado a los pocos días tras un infarto, a un patrón más desorganizado al cabo de una o dos semanas tras el infarto para volver de nuevo a un patrón organizado tras un mes (Zhou et al., 2011).

En el presente estudio no se encontraron cambios dinámicos en la organización de las fibras de colágeno en la zona central de la cicatriz fibrótica desde la fase aguda (1 semana tras el infarto) hasta la fase crónica (1 mes tras el infarto). Las fibras de colágeno se dispusieron de forma casi paralela en la zona central tanto en el área infartada con infiltrado inflamatorio (1 semana) como en la cicatriz fibrótica (1 mes).

Estos resultados indican que, a pesar de que en la zona central del área infartada se produce un incremento masivo en el contenido de colágeno, la organización de las fibras se mantiene. Sin embargo, no se ha estudiado todavía la organización de las fibras de colágeno en las zonas más externas de la cicatriz; fenómeno que podría ser relevante para un mejor entendimiento de la fisiopatología del remodelado del VI así como para la comprensión de la formación de arritmias ventriculares en pacientes que han sufrido un infarto.

2.2 Cicatriz fibrótica

Hasta la fecha, el estudio de la organización de las fibras de colágeno no ha sido descrito en pacientes. En el presente trabajo, a través del estudio de muestras aisladas de autopsias de pacientes con infarto crónico se pudo observar que la distribución homogénea y altamente ordenada de la zona central de la cicatriz fibrótica que se había observado en el modelo porcino, empleando la tinción rojo picosirius, microscopía electrónica e inmunohistoquímica, se encontraba también en los pacientes tiempo después del infarto.

Sin embargo, el principal hallazgo de este estudio fue la caracterización del patrón no homogéneo de organización de las fibras de colágeno en las distintas zonas que conforman la cicatriz fibrótica tanto en humanos como en el modelo porcino. En el endocardio, epicardio y en la zona periférica de la cicatriz el índice de organización mostró un patrón de organización mucho más desordenado en comparación con la zona central (Figura 20). Por tanto, nuestro estudio aporta por vez primera datos acerca de la distribución no-homogénea de las fibras de colágeno a lo largo de las distintas zonas de la cicatriz fibrótica tras un IAM.

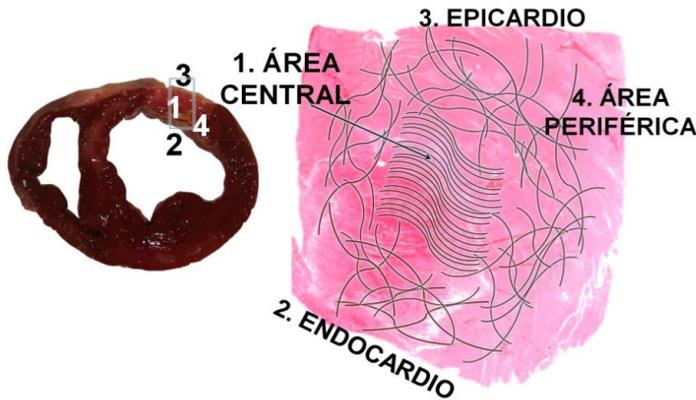


Figura 20. Distribución de las fibras de colágeno a lo largo de la cicatriz fibrótica. Las fibras del área central se distribuyen de forma casi paralela. Sin embargo, las fibras de colágeno se organizan de forma desordenada en las zonas más externas de la cicatriz. Hervás et al., 2016.

2.3 Organización de las fibras en la “zona gris” y sus implicaciones clínicas

Las principales implicaciones de este estudio recaen sobre la importancia a nivel clínico de la conocida como “zona gris”. Esta zona se ha descrito como una región de tejido heterogéneo gracias a las técnicas de RMC y se ha correlacionado con la formación de arritmias ventriculares y con la mortalidad tras un infarto (Schmidt et al., 2007; Roes et al., 2009; Mewton et al., 2011; Schuleri et al., 2012).

En este estudio se ha abordado el análisis histológico de la “zona gris” tanto en un modelo porcino altamente controlado como en muestras miocárdicas de pacientes. En ambos casos se observó una distribución desordenada de las fibras de colágeno en las zonas más externas de la cicatriz. En pacientes con fibrilación auricular se ha reportado un patrón similar de organización heterogénea de las fibras de colágeno en la zona auricular (Tsai et al., 2010). Por tanto, el patrón desorganizado que se encuentra en las zonas externas de la

cicatriz podría constituir la base fisiopatológica para la propensión al remodelado ventricular, al alto riesgo de génesis de arritmias y a la mortalidad observada en pacientes que presentan grandes áreas de “zona gris” caracterizadas mediante RMC (Schmidt et al., 2007; Mewton et al., 2011). En consecuencia, los resultados obtenidos en el presente estudio apoyan las actuales estrategias aplicadas en el tratamiento de las arritmias tras un IAM. Esto se debe a que si las zonas más externas son las que han presentado una mayor desorganización de las fibras de colágeno, estas zonas son también las más predispuestas al potencial desarrollo de arritmias. Por tanto, los actuales procedimientos de ablación percutánea son factibles ya que las consecuencias en términos de pérdida miocárdica son aceptables. Si se tuviera que llevar a cabo una ablación del área central de la cicatriz se induciría un daño transmural mucho más severo.

2.4 Organización de las fibras de colágeno y función cardíaca

La diferente disposición de las fibras de colágeno en las áreas del miocardio podría además tener efectos potenciales sobre la función cardíaca. Existen estudios en los que, a través de métodos matemáticos, se ha comprobado cómo la mecánica del tejido que conforma la cicatriz se ve afectada por la orientación de las fibras de colágeno. Estos autores concluyen que la deformación de la cicatriz se ve limitada si las fibras de colágeno se alinean de forma longitudinal. Este alineamiento optimiza además la fracción de eyección y el volumen sistólico (Voorhees & Han, 2014). Aplicando los resultados obtenidos en el estudio de Voorhees & Han a nuestro trabajo, se podría concluir que si el alineamiento paralelo detectado en el centro de la cicatriz fibrótica pudiera ser alcanzado en toda la zona infartada, se podrían obtener efectos beneficiosos en términos de la función sistólica y diastólica tras un IAM. En cambio, hay que

tener en cuenta que este planteamiento es solamente hipotético y que serían necesarios más estudios para justificar esta idea así como para desarrollar los métodos apropiados para conseguir este objetivo.

3. Estudio de la fibrosis remota tras un infarto agudo de miocardio

Después de IAM se desencadenan una serie de mecanismos centrados en la correcta cicatrización del miocardio infartado con el objetivo de mantener la función sistólica. En este sentido cobran especial importancia las células inflamatorias en primer lugar y posteriormente los miofibroblastos. Los leucocitos son los encargados de la eliminación de células necróticas y la matriz extracelular dañada mientras que la posterior función de los miofibroblastos consiste en la formación y deposición del colágeno (van den Borne et al., 2010).

Idealmente, la deposición de nuevas fibras de colágeno tiene lugar solamente en la región infartada dando lugar a una región bien cicatrizada. Sin embargo, en muchos casos se produce un remodelado ventricular que provoca la aparición de IC (van den Borne et al., 2010). Una de las principales etiologías que se han propuesto para este remodelado adverso es el desarrollo de la fibrosis remota o reactiva. Sin embargo, los trabajos que defienden la formación de fibrosis remota tras un IAM se han basado en estudios en los que no se llevaba a cabo reperfusión y en los que se obtenía, por tanto, infartos extensos (Beltrami et al., 1994; Cleutjens et al., 1995; Sun & Weber, 2000; Sun et al., 2000; Sun, 2009; dos Santos et al., 2013). Por ello, en la actual era de la reperfusión como método para disminuir el tamaño de infarto y aumentar el pronóstico, resulta relevante estudiar la fibrosis remota en modelos porcinos y de pacientes con IAM reperfundido.

Los trabajos previos han tenido una gran importancia a nivel de tratamiento de los pacientes tras un IAM ya que, basándose en estas observaciones, se ha hipotetizado que el efecto de algunas terapias tales como el uso de inhibidores de renina-angiotensina, podría ser mediado por el bloqueo de la aparición de la fibrosis reactiva (van den Borne., 2010).

No obstante, datos obtenidos a partir de estudios de muestras de pacientes (Marijjanowski et al., 1997) así como en datos recientes extraídos de experimentos porcinos a través de técnicas de imagen (Tarkia et al., 2015) han cuestionado el concepto de la fibrosis reactiva. Además, en la actualidad la reperfusión rápida y temprana de la arteria infartada (técnica estándar en el manejo de los pacientes con IAM) ha permitido una reducción significativa del tamaño de infarto.

Queda por tanto patente la necesidad de clarificar el significado de la fibrosis reactiva en las áreas más alejadas de la región infartada con el objetivo tanto de obtener una mayor comprensión del remodelado del VI como a nivel de las implicaciones terapéuticas derivadas de esta vía.

Para evaluar esto, se realizó una aproximación multidisciplinar con el objetivo de valorar la presencia y magnitud de la fibrosis en la región remota del miocardio infartado empleando un modelo porcino de IAM reperfundido controlado, estudios en autopsias de miocardio pacientes con IAM crónico reperfundido y estudios de RMC de pacientes que han sufrido un IAM (Figura 21).

3.1 Estudio experimental

La fibrosis remota ha sido objeto de estudio en muchos y muy diferentes trabajos experimentales obteniendo resultados diversos. Por una parte, algunos estudios han documentado que la acumulación del colágeno ocurre no solo en la región infartada, sino que se extiende al miocardio no infartado conformando la fibrosis remota o reactiva. Sin embargo, es importante destacar que estos estudios se llevaron a cabo en modelos de ligación coronaria permanente sin reperfusión obteniéndose como resultado áreas necróticas extensas (Cleutjens et al., 1995; Sun et al., 2000; van den Borne et al., 2008; Prat-Vidal et al., 2013). Por otra parte, no todos los estudios apoyan esta idea. Monreal et al. observaron que la fibrosis en el miocardio no infartado era similar a la encontrada en controles (Monreal et al., 2008). Para ello utilizaron un modelo ovino de IC post-IAM. Recientemente Tarkia et al. evaluaron un modelo porcino a través de estudios histológicos y diferentes técnicas de imagen. En este caso tampoco se detectó un incremento de fibrosis intersticial en los segmentos remotos al comparar con los controles (Tarkia et al., 2015).

El hallazgo más importante de nuestro estudio es que en un IAM reperfundido el contenido de colágeno y los marcadores fibróticos en la región remota no difieren significativamente de aquellos que se observan en la zona control. Estos resultados se obtuvieron a partir de un modelo porcino de IAM anterior tras un mes de la reperfusión, de autopsias de pacientes con un IAM previo y de estudios de RMC-T1 mapping en pacientes con un IAM previo.

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que en un modelo experimental tras un mes de reperfusión solamente se observó un aumento del contenido de colágeno tras un IAM en las

regiones infartadas a nivel macroscópico, microscópico y molecular. En las áreas remotas los resultados obtenidos fueron en todos los casos similares a los obtenidos en controles. Además, se estudió la dinámica de un factor de crecimiento fundamental en el proceso de fibrosis, el TGF- β . Este factor juega un papel fundamental en la transdiferenciación de los miofibroblastos y, por tanto, en el remodelado post-IAM (Frangogiannis, 2014). En la literatura no existe un consenso acerca de la dinámica de la expresión génica del TGF- β en las regiones miocárdicas no infartadas tras un IAM ya que mientras que algunos autores han detectado un incremento en la expresión génica de TGF- β en las zonas remotas poco tiempo después del IAM (Sun et al., 2000; Vilahur et al., 2011), nuestros resultados son paralelos a otros estudios en los que la expresión génica de TGF- β no se vio incrementada en las zonas no infartadas tiempo después del infarto (Hao et al., 1999). Además, mediante técnicas histológicas y moleculares se observó que únicamente había presencia de colágeno en la zona del infarto, siendo la cantidad de colágeno en las zonas remotas similares a las del control.

Se debe tener en cuenta que para determinar la fibrosis remota se empleó un modelo de IAM reperfundido el cual se evaluó mediante estudios histológicos, moleculares y también con una técnica novedosa como es la microimagen por resonancia magnética de 14-Tesla que permite obtener una resolución mucho mayor en comparación con técnicas de RMC usadas en clínicas. Esta técnica, que se había aplicado previamente con éxito para la evaluación de las características del tejido cerebral (González-Segura et al., 2011), no se había utilizado hasta el momento para el estudio de muestras miocárdicas. En las imágenes de resonancia obtenidas se pudo establecer una diferenciación perfecta entre el tejido sano y el fibrótico que correspondía con los análisis histológicos. Los resultados

obtenidos mostraron un gran incremento en la cantidad de colágeno detectado en el área infartada en el modelo de un mes de reperfusión mientras que en la zona remota los valores no difirieron significativamente con los controles. En conclusión, estos resultados están en consonancia con los obtenidos a nivel macroscópico, microscópico y molecular.

Para comprobar los resultados obtenidos en el modelo porcino en un modelo clínico de pacientes con IAM, se analizó la presencia y la extensión de la fibrosis en muestras de miocardio obtenidas tanto de autopsias de pacientes con IAM crónico previo como de estudios de RMC-T1 mapping de pacientes con IAM previo.

3.2 Estudio en pacientes

Con la finalidad de corroborar en pacientes los resultados obtenidos en el modelo experimental se llevaron a cabo dos estudios en los que se cuantificó la presencia de fibrosis en las distintas partes que conforman el miocardio. Los resultados obtenidos en ambos casos muestran como el grado de fibrosis en la zona remota al tejido infartado fue en todos los casos similar al encontrado en los controles.

3.2.1 Estudio histológico en autopsias de pacientes con infarto crónico

En el primero de los estudios se utilizaron muestras obtenidas de autopsias de pacientes con infarto crónico reperfundido. Nuestros resultados sugieren que la cantidad de colágeno es superior en la zona de infarto en comparación con la zona remota, que presenta niveles similares a los de control.

En este sentido, existen estudios en los que se obtuvieron resultados distintos a los presentados en el presente trabajo. En estas investigaciones, se encontraron múltiples sitios de fibrosis de

reemplazo en el tejido no infartado de pacientes sometidos a trasplante cardíaco. Sin embargo, se debe tener en cuenta que estos pacientes no fueron sometidos a una intervención coronaria y presentaban una IC avanzada derivada de una enfermedad coronaria severa y cardiomiopatía isquémica (Beltrami et al., 1994). Otros estudios, sin embargo, obtuvieron resultados similares a los descritos en el presente trabajo. Hace más de dos décadas, Marijianovski et al. observaron en 15 corazones humanos obtenidos de autopsias o explantes que el proceso de formación de la cicatriz fibrótica tras un IAM no se asocia a la fibrosis intersticial en el miocardio no infartado (Marijianovski et al., 1997).

3.2.2 Estudio en pacientes con infarto crónico mediante resonancia magnética cardíaca-T1 mapping

La fibrosis miocárdica se ha visto ligada a una disfunción miocárdica en una multitud de cardiomiopatías no isquémicas (White et al., 2013; Jellis & Kwon, 2014). El proceso de remodelación de la matriz extracelular tiene como resultado múltiples consecuencias funcionales (Jellis & Kwon, 2014). La técnica de T1-mapping permite una cuantificación precisa y no invasiva mediante RMC de la matriz extracelular siendo por tanto la técnica de referencia para la caracterización de la fibrosis miocárdica. En este estudio se excluyeron los pacientes con hipertrofia miocárdica secundaria a hipertensión o a una cardiomiopatía previa demostrada por ecocardiografía.

Para la evaluación de la cantidad de fibrosis en las áreas remotas se llevó a cabo un estudio de RMC-T1 mapping siguiendo una división del miocardio en 16 segmentos (Cerqueira et al., 2002). Esta metodología permitió diferenciar fácilmente cada una de las zonas del miocardio y así poder centrar el estudio en los valores de FVE en las

regiones claramente remotas del tejido infartado. Nuestros datos muestran que la FVE estaba claramente elevado en los segmentos pertenecientes a regiones infartadas, pero la FVE encontrada en las regiones remotas fue similar a la encontrada en los controles.

Hasta el momento, los estudios basados en estudio de la magnitud de la FVE a través de la técnica del T1-mapping y usando una base con una base segmental son escasos. El grupo de Ugander et al. utilizaron una metodología similar a la nuestra y, a pesar de que reportaron una correlación entre la FVE en segmentos no infartados y la fracción de eyección del VI, los valores de FVE en los segmentos no infartados fueron prácticamente idénticos a los encontrados en los segmentos control (Ugander et al., 2012).

En resumen, a pesar de que la fibrosis remota podría jugar un papel en los pacientes con IC severa y arterias coronarias no reperfundidas tal y como se ha observado en trabajos previos, nuestros resultados en pacientes son similares a los obtenidos con el modelo porcino y confirman que tras un infarto de miocardio reperfundido, la cantidad de marcadores de fibrosis en la zona remota al infarto es similar a la obtenida en controles.

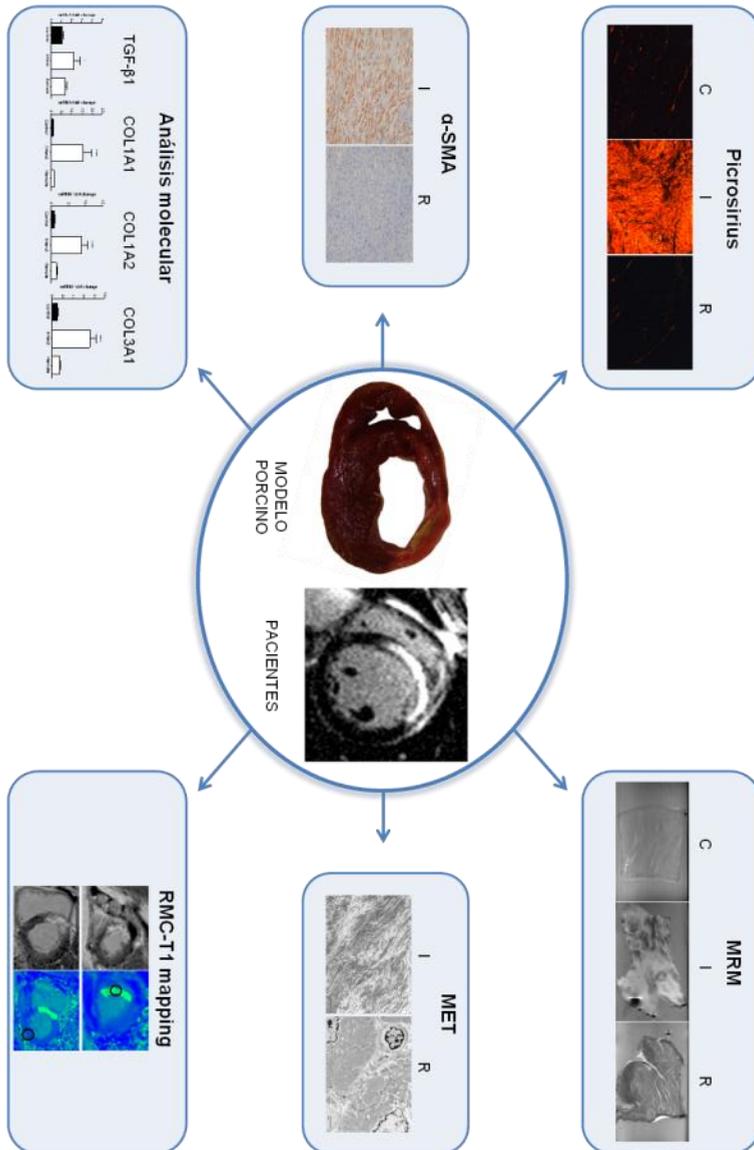


Figura 21. Estudio multidisciplinario para determinar la presencia de fibrosis en zonas remotas al infarto. Esquema de los resultados obtenidos utilizando diferentes técnicas en muestras del modelo porcino y muestras de autopsias y estudios de RMC-T1 mapping de pacientes con infarto agudo de miocardio crónico. Hervás et al., 2016b

α -SMA: α -actina de músculo liso; C: control; COL: colágeno; I: zona de infarto; MET: microscopio electrónico de transmisión; MRM: microimagen por resonancia magnética; R: zona remota; RMC: resonancia magnética cardíaca; TGF- β : transforming growth factor- β .

VI.- CONCLUSIONES

1. La metodología desarrollada en un modelo experimental porcino basada en la inyección intra-coronaria mediante catéter de T-S permite la determinación con exactitud de las zonas con OMV dentro del miocardio infartado. El modelo descrito podría utilizarse como una plataforma para futuros estudios traslacionales cuyo objetivo sea un mejor entendimiento de la OMV y para la exploración de nuevas oportunidades terapéuticas bajo condiciones altamente controladas.

2. En un modelo porcino de IAM reperfundido, la aparición de la OMV se inicia inmediatamente tras la reperfusión, poniendo de manifiesto el papel decisivo del daño por isquemia-reperfusión sobre la ocurrencia de este proceso, así como la importancia del manejo de este corto pero crítico período de tiempo en la revascularización de los pacientes tras un IAM.

3. En un modelo porcino de IAM anterior, las fibras de colágeno se organizan de forma homogénea en la zona central de la cicatriz fibrótica y de forma desorganizada en el endocardio, epicardio y área periférica.

4. En muestras obtenidas de autopsias de pacientes con infarto crónico se detectó una distribución de las fibras de colágeno organizada en la zona central de la cicatriz fibrótica y una distribución desorganizada en las zonas periféricas de la cicatriz.

5. En un modelo porcino de infarto crónico, la zona remota no mostró un aumento significativo de la cantidad de colágeno en comparación con los controles a nivel macroscópico, microscópico, molecular y mediante microimagen de resonancia magnética.

6. En muestras obtenidas de autopsias de pacientes con infarto crónico solamente se obtuvo un aumento significativo de la cantidad de colágeno en el área infartada, siendo los niveles en la zona remota similares a los del control.

7. En pacientes con infarto crónico sometidos a RMC-T1 mapping la fracción de volumen extracelular en los segmentos estudiados de las zonas remotas fue similar a la de los controles.

VII.- BIBLIOGRAFÍA

- Alberich-Bayarri, A. In vivo morphometric and mechanical characterization of trabecular bone from high resolution magnetic resonance imaging. Universitat Politècnica de València. 2010. doi:10.4995/Thesis/10251/8981.
- Amado LC, Gerber BL, Gupta SN, et al. Accurate and objective infarct sizing by contrast-enhanced magnetic resonance imaging in a canine myocardial infarction model. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44:2383-9.
- Araya J, Nishimura SL. Fibrogenic reactions in lung disease. *Annu Rev Pathol.* 2010;5:77-98.
- Atlas 2014. World Health Organization WHO. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control: Policies, strategies and interventions. 2011.
- Bainey KR, Armstrong PW. Clinical perspectives on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *Am Heart J.* 2014;167:637-45.
- Beltrami CA, Finato N, Rocco M, et al. Structural basis of end-stage failure in ischemic cardiomyopathy in humans. *Circulation.* 1994;89:151-63.
- Best BP. Vascular and neuronal ischemic damage in cryonics patients. *Rejuvenation Res.* 2012;
- Bodí V, Ruiz-Nodar JM, Feliu E, et al. Effect of ischemic postconditioning on microvascular obstruction in reperfused myocardial infarction. Results of a randomized study in patients

- and of an experimental model in swine. *Int J Cardiol.* 2014;175:138-46.
- Bodí V, Sanchis J, Lopez-Lereu MP, et al. Evolution of 5 cardiovascular magnetic resonance-derived viability indexes after reperfused myocardial infarction. *Am Heart J.* 2007;153:649-55.
- Bodí V, Sanchis J, Losada A, et al. Usefulness of quantitative intravenous myocardial contrast echocardiography to analyze microvasculature perfusion in patients with a recent myocardial infarction and an open infarct-related artery: comparison with intracoronary myocardial contrast echocardiography. *Eur J Echocardiography.* 2005;6:164-74.
- Bodí V, Sanchis J, Núñez J, et al. Uncontrolled immune response in acute myocardial infarction: unraveling the thread. *Am Heart J.* 2008;156:1065-73.
- Bolognese L, Carrabba N, Parodi G, et al. Impact of microvascular dysfunction on left ventricular remodeling and long-term clinical outcome after primary coronary angioplasty for acute myocardial infarction. *Circulation.* 2004;109:1121-6.
- Bondarenko O, Beek AM, Hofman MB, et al. Standardizing the definition of hyperenhancement in the quantitative assessment of infarct size and myocardial viability using delayed contrast-enhanced CMR. *J Cardiovasc Magn Reson.* 2005;7:481-5.

- Brosh D, Assali AR, Mager A, et al. Effect of no-reflow during primary percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction on six-month mortality. *Am J Cardiol.* 2007;99:442-5.
- Bujak M, Frangogiannis NG. The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovasc Res.* 2007;74:184-95.
- Carrabba N, Parodi G, Valenti R, et al. Prognostic value of reverse left ventricular remodeling after primary angioplasty for STEMI. *Atherosclerosis.* 2012;222:123-8.
- Cerqueira MD, Weissman NJ, Dilsizian V, et al. Standardized myocardial segmentation and nomenclature for tomographic imaging of the heart. A statement for healthcare professionals from the Cardiac Imaging Committee of the Council on Clinical Cardiology of the American Heart Association. *Circulation.* 2002;105:539-42.
- Chorro-Gascó FJ, García-Civera R, López-Merino V. *Cardiología clínica.* Publicaciones Universidad de Valencia. 2007. ISBN: 978-84-370-6715-5.
- Cleutjens JP, Creemers EE. Integration of concepts: cardiac extracellular matrix remodeling after myocardial infarction. *J Card Fail.* 2002;8:S344-8.

- Cleutjens JP, Verluyten MJ, Smiths JF, et al. Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart. *Am J Pathol.* 1995;147:325-38.
- Cuellas-Ramón C, Pérez de Prado A, Pérez-Martínez C, et al. Investigación traslacional en isquemia, infarto de miocardio y reperfusión. *Rev Esp Cardiol Supl.* 2013;13(E):57-63.
- Daskalopoulos EP, Janssen BJA, Blankesteyn WM. Myofibroblasts in the infarct area: concepts and challenges. *Microsc Microanal.* 2012;18:35-49.
- De Luca G, Casseti E, Marino P. Percutaneous coronary intervention-related time delay, patient's risk profile, and survival benefits of primary angioplasty vs lytic therapy in ST-segment elevation myocardial infarction. *Am J Emerg Med.* 2009;27:712-9.
- Dégano IR, Elosua R, Marrugat J. Epidemiología del síndrome coronario en España: estimación del número de casos y la tendencia de 2005 a 2049. *Rev Esp Cardiol.* 2013;66:472-81.
- dos Santos L, Gonçalves GA, Davel AP, et al. Cell therapy prevents structural, functional and molecular remodeling of remote non-infarcted myocardium. *Int J Cardiol.* 2013;168:3829-36.
- Dulce MC, Duerinckx AJ, Hartiala J, et al. MR imaging of the myocardium using nonionic contrast medium: signal-intensity changes in patients with subacute myocardial infarction. *AJR Am J Roentgenol.* 1993;160:963-70.

- Elízaga J. La angioplastia primaria es la terapéutica de reperfusión de elección en el tratamiento del infarto agudo de miocardio. Argumentos a favor. *Rev Esp Cardiol.* 1998;51:939-47.
- Elmadhun NY, Sabe AA, Robich MP, et al. The pig as a valuable model for testing the effect of resveratrol to prevent cardiovascular disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2013;1290:130-5.
- Ferreira-González I. Epidemiología de la enfermedad coronaria. *Rev Esp Cardiol.* 2014;67:139-44.
- Flacke SJ, Fischer SE, Lorenz CH. Measurement of the gadopentetate dimeglumine partition coefficient in human myocardium in vivo: normal distribution and elevation in acute and chronic infarction. *Radiology.* 2001;218:703-10.
- Flett AS, Hayward MP, Ashworth MT, et al. Equilibrium contrast cardiovascular magnetic resonance for the measurement of diffuse myocardial fibrosis: preliminary validation in humans. *Circulation.* 2010;122:138-44.
- Fomovsky GM, Rouillard AD, Holmes JW. Regional mechanics determine collagen fiber structure in healing myocardial infarcts. *J Mol Cell Cardiol.* 2012;52:1083-90.
- Frangogiannis NG. The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. *Nat Rev Cardiol.* 2014;11:255-65.
- Fröhlich GM, Meier P, White SK, et al. Myocardial reperfusion injury: looking beyond primary PCI. *Eur Heart J.* 2013;34:1714-24.

- Galiuto L, Lombardo A, Maseri A, et al. Temporal evolution and functional outcome of no reflow: sustained and spontaneously reversible patterns following successful coronary recanalisation. *Heart*. 2003;89:731-7.
- González A, Ravassa S, Beaumont J, et al. New targets to treat the structural remodeling of the myocardium. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58:1833-43.
- González-Segura A, Morales JM, González-Darder JM, et al. Magnetic resonance microscopy at 14 Tesla and correlative histopathology of human brain tumor tissue. *PLoS One*. 2011;6:e27442.
- Gupta KB, Ratcliffe MB, Fallert MA, et al. Changes in passive mechanical stiffness of myocardial tissue with aneurysm formation. *Circulation*. 1994;89:2315-26.
- Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:508-19.
- Hao J, Ju H, Zhao S, et al. Elevation of expression of Smads 2, 3, and 4, decorin and TGF-beta in the chronic phase of myocardial infarct scar healing. *J Mol Cell Cardiol*. 1999;31:667-78.
- Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest*. 2013;123:92-100.

- Hervás A, de Dios E, Forteza MJ, et al. Intracoronary infusion of thioflavin-S to study microvascular obstruction in a model of myocardial infarction. *Rev Esp Cardiol.* 2015;68:928-34.
- Hervás A, Ruiz-Saurí A, de Dios E, et al. Inhomogeneity of collagen organization within the fibrotic scar after myocardial infarction: results in a swine model and in human samples. *J Anat.* 2016;228:47-58.
- Hervás A, Ruiz-Saurí A, Gavara J, et al. A multidisciplinary assessment of remote myocardial fibrosis after reperfused myocardial infarction in swine and patients. *J Cardiovasc Transl Res.* 2016;9:321-33.
- Holmes JW, Borg TK, Covell JW. Structure and mechanics of healing myocardial infarcts. *Annu Rev Biomed Eng.* 2005;7:223-53.
- Holzmann M, Nicko A, Kuhl U, et al. Complication rate of right ventricular endomyocardial biopsy via the femoral approach: a retrospective and prospective study analyzing 3048 diagnostic procedures over an 11-year period. *Circulation.* 2008;118:1722-8.
- Hsu LY, Ingkanisorn WP, Kellman P, et al. Quantitative myocardial infarction on delayed enhancement MRI. Part II: Clinical application of an automated feature analysis and combined thresholding infarct sizing algorithm. *J Magn Reson Imaging.* 2006;23:309-14.

- Iles L, Pfluger H, Phrommintikul A, et al. Evaluation of diffuse myocardial fibrosis in heart failure with cardiac magnetic resonance contrast-enhanced T1 mapping. *J Am Coll Cardiol.* 2008;52:1574-80.
- Jaffe R, Dick A, Strauss BH. Prevention and treatment of microvascular obstruction-related myocardial injury and coronary no-reflow following percutaneous coronary intervention: a systematic approach. *JACC Cardiovasc Interv.* 2010;3:695-704.
- Jellis CL, Kwon DH. Myocardial T1 mapping: modalities and clinical applications. *Cardiovasc Diagn Ther.* 2014;4:126-37.
- Jennings RB. Historical perspective on the pathology of myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circ Res.* 2013;113:428-38.
- Jerosch-Herold M, Sheridan DC, Kushner JD, et al. Cardiac magnetic resonance imaging of myocardial contrast uptake and blood flow in patients affected with idiopathic or familial dilated cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;295:H1234-42.
- Jneid H, Anderson JL, Wright RS, et al. 2012 ACCF/AHA focused update of the guideline for the management of patients with unstable angina/Non-ST-elevation myocardial infarction (updating the 2007 guideline and replacing the 2011 focused update): a report of the American College of Cardiology

- Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines. *Circulation*. 2012;126:875-910.
- Kalman JM, Kumar S, Sanders P. Markers of collagen synthesis, atrial fibrosis, and the mechanisms underlying atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol*. 2012;60:1807-8.
- Kaltoft A, Bøttcher M, Nielsen SS, et al. Routine thrombectomy in percutaneous coronary intervention for acute ST-segment-elevation myocardial infarction: a randomized, controlled trial. *Circulation*. 2006;114:40-7.
- Khan R, Sheppard R. Fibrosis in heart disease: understanding the role of transforming growth factor-beta in cardiomyopathy, valvular disease and arrhythmia. *Immunology*. 2006;118:10-24.
- Klima M, Burns TR, Chopra A. Myocardial fibrosis in the elderly. *Arch Pathol Lab Med*. 1990;114:938-42.
- Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB. The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest*. 1974;54:1496-508.
- Kumar A, Green JD, Sykes JM, et al. Detection and quantification of myocardial reperfusion hemorrhage using T2*-weighted CMR. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2011;4:1274-83.
- Lahoz C, Mostaza JM. La aterosclerosis como enfermedad sistémica. *Rev Esp Cardiol*. 2007;60:184-95.

- Lewis JR, Mohanty SR. Nonalcoholic fatty liver disease: a review and update. *Dig Dis Sci*. 2010;55:560-78.
- Maceira AM, Joshi J, Prasad SK, et al. Cardiovascular magnetic resonance in cardiac amyloidosis. *Circulation*. 2005;111:186-93.
- Marcos-Garcés V, Molina-Aguilar P, Bea-Serrano C, et al. Age-related dermal collagen changes during development, maturation and ageing - a morphometric and comparative study. *J Anat*. 2014;225:98-108.
- Marijianowski MM, Teeling P, Becker AE. Remodeling after myocardial infarction in humans is not associated with interstitial fibrosis of noninfarcted myocardium. *J Am Coll Cardiol*. 1997;30:76-82.
- Martos R, Baugh J, Ledwidge M, et al. Diastolic heart failure: evidence of increased myocardial collagen turnover linked to diastolic dysfunction. *Circulation*. 2007;115:888-95.
- Messroghli DR, Greiser A, Frohlich M, et al. Optimization and validation of a fully-integrated pulse sequence for modified look-locker inversion-recovery (MOLLI) T1 mapping of the heart. *J Magn Reson Imaging*. 2007;26:1081-6.
- Messroghli DR, Niendorf T, Schulz-Menger J, et al. T1 mapping in patients with acute myocardial infarction. *J Cardiovasc Magn Reson*. 2003;5:353-9.

- Messroghli DR, Plein S, Higgins DM, et al. Human myocardium: single-breath-hold MR T1 mapping with high spatial resolution-reproducibility study. *Radiology*. 2006;238:1004-12.
- Messroghli DR, Radjenovic A, Kozerke S, et al. Modified Look-Locker inversion recovery (MOLLI) for high-resolution T1 mapping of the heart. *Magn Reson Med*. 2004;52:141-6.
- Messroghli DR, Walters K, Plein S, et al. Myocardial T1 mapping: application to patients with acute and chronic myocardial infarction. *Magn Reson Med*. 2007;58:34-40.
- Mewton N, Liu CY, Croisille P, et al. Assessment of myocardial fibrosis with cardiovascular magnetic resonance. *J Am Coll Cardiol*. 2011;57:891-903.
- Monreal G, Nicholson LM, Han B, et al. Cytoskeletal remodeling of desmin is a more accurate measure of cardiac dysfunction than fibrosis or myocyte hypertrophy. *Life Sci*. 2008;83:786-94.
- Niccoli G, Burzotta F, Galiuto L, et al. Myocardial no-reflow in humans. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54:281-92.
- Osman OS, Selway JL, Harikumar PE, et al. A novel method to assess collagen architecture in skin. *BMC Bioinformatics*. 2013;14:260.
- Ovize M, Baxter GF, Di Lisa F, et al. Postconditioning and protection from reperfusion injury: where do we stand? Position Paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the

- European Society of Cardiology. *Cardiovasc Res*. 2010;87:406-23.
- Pepys MB. Amyloidosis. *Annu Rev Med*. 2006;57:223-41.
- Porter KE, Turner NA. Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling. *Pharmacol Ther*. 2009;123:255-78.
- Prat-Vidal C, Gálvez-Montón C, Nonell L, et al. Identification of temporal and region-specific myocardial gene expression patterns in response to infarction in swine. *PLoS One*. 2013;8:e54785.
- Rich L, Whittaker P. Collagen and picrosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. *Braz J Morphol Sci*. 2005;22:97-104.
- Roes SD, Borleffs CJ, van der Geest RJ, et al. Infarct tissue heterogeneity assessed with contrast-enhanced MRI predicts spontaneous ventricular arrhythmia in patients with ischemic cardiomyopathy and implantable cardioverter-defibrillator. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2009;2:183-90.
- Ruff CT, Braunwald E. The evolving epidemiology of acute coronary syndromes. *Nat Rev Cardiol*. 2011;8:140-7.
- Sado DM, Flett AS, Banypersad SM, et al. Cardiovascular magnetic resonance measurement of myocardial extracellular volume in health and disease. *Heart*. 2012;98:1436-41.

- Santos-Gallego CG, Badimón JJ, Ibáñez B. Modelos experimentales de aterosclerosis. *Rev Esp Cardiol Supl.* 2013;13(E):3-12.
- Schmidt A, Azevedo CF, Cheng A, et al. Infarct tissue heterogeneity by magnetic resonance imaging identifies enhanced cardiac arrhythmia susceptibility in patients with left ventricular dysfunction. *Circulation.* 2007;115:2006-14.
- Schuleri KH, Centola M, Evers KS, et al. Cardiovascular magnetic resonance characterization of peri-infarct zone remodeling following myocardial infarction. *J Cardiovasc Magn Reson.* 2012;14:24.
- Smith-Mungo LI, Kagan HM. Lysyl oxidase: properties, regulation and multiple functions in biology. *Matrix Biol.* 1998;16:387-98.
- Spiewak M, Malek LA, Misko J, et al. Comparison of different quantification methods of late gadolinium enhancement in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Eur J Radiol.* 2010;74:e149-53.
- Sun Y. Myocardial repair/remodelling following infarction: roles of local factors. *Cardiovasc Res.* 2009;81:482-90.
- Sun Y, Weber KT. Infarct scar: a dynamic tissue. *Cardiovasc Res.* 2000;46:250-6.
- Sun Y, Zhang JQ, Zhang J, et al. Cardiac remodeling by fibrous tissue after infarction in rats. *J Lab Clin Med.* 2000;135:316-23.

- Swartz MF, Fink GW, Sarwar M, et al. Elevated pre-operative serum peptides for collagen I and III synthesis result in post-surgical atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol.* 2012;60:1799-806.
- Tarkia M, Stark C, Haavisto M, et al. Cardiac remodeling in a new pig model of chronic heart failure: Assessment of left ventricular functional, metabolic, and structural changes using PET, CT, and echocardiography. *J Nucl Cardiol.* 2015;22:655-65.
- Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Third universal definition of myocardial infarction. *Circulation.* 2012;126:2020-35.
- Tsai MR, Chiu YW, Lo MT, et al. Second-harmonic generation imaging of collagen fibers in myocardium for atrial fibrillation diagnosis. *J Biomed Opt.* 2010;15:026002.
- Ugander M, Oki AJ, Hsu LY, et al. Extracellular volume imaging by magnetic resonance imaging provides insights into overt and sub-clinical myocardial pathology. *Eur Heart J.* 2012;33:1268-78.
- van den Borne SW, Diez J, Blankesteyn WM, et al. Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts. *Nat Rev Cardiol.* 2010;7:30-7.
- van den Borne SW, Isobe S, Verjans JW, et al. Molecular imaging of interstitial alterations in remodeling myocardium after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2008;52:2017-28.

- van der Laan AM, Nahrendorf M, Piek JJ. Healing and adverse remodelling after acute myocardial infarction: role of the cellular immune response. *Heart*. 2012;98:1384-90.
- van Kranenburg M, Magro M, Thiele H, et al. Prognostic value of microvascular obstruction and infarct size, as measured by CMR in STEMI patients. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2014;7:930-9.
- van Zuijlen PP, de Vries HJ, Lamme EN, et al. Morphometry of dermal collagen orientation by Fourier analysis is superior to multi-observer assessment. *J Pathol*. 2002;198:284-91.
- Vilahur G, Juan-Babot O, Peña E, et al. Molecular and cellular mechanisms involved in cardiac remodeling after acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;50:522-33.
- Vilariño JO, Esper R, Badimón JJ. Fisiología de los síndromes coronarios agudos. Tres paradigmas para un nuevo dogma. *Rev Esp Cardiol Supl*. 2004;4(G):13-24.
- Voorhees AP, Han HC. A model to determine the effect of collagen fiber alignment on heart function post myocardial infarction. *Theor Biol Med Model*. 2014;11:6.
- Weber K, Sun Y, Bhattacharya S, et al. Myofibroblast-mediated mechanisms of pathological remodelling of the heart. *Nat Rev Cardiol*. 2013;10:15-26.

- Whittaker P, Boughner DR, Kloner RA. Analysis of healing after myocardial infarction using polarized light microscopy. *Am J Pathol.* 1989;134:879-93.
- Whittaker P, Boughner DR, Kloner RA. Role of collagen in acute myocardial infarct expansion. *Circulation.* 1991;84:2123-34.
- Wu E, Judd RM, Vargas JD, et al. Visualisation of presence, location, and transmural extent of healed Q-wave and non-Q-wave myocardial infarction. *Lancet.* 2001;357:21-8.
- Wu KC, Kim RJ, Bluemke DA, et al. Quantification and time course of microvascular obstruction by contrast-enhanced echocardiography and magnetic resonance imaging following acute myocardial infarction and reperfusion. *J Am Coll Cardiol.* 1998;32:1756-64.
- Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol.* 2008;214:199-210.
- Zhou L, Chong MM, Littman DR. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity.* 2009;30:646-55.
- Zhou X, Yun JL, Han ZQ, et al. Postinfarction healing dynamics in the mechanically unloaded rat left ventricle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;300:H1863-74.
- Zimmerman SD, Karlon WJ, Holmes JW, et al. Structural and mechanical factors influencing infarct scar collagen

organization. *Am J Physiol Heart Cir Physiol*. 2000;278:H194-200.

Zipes DP, Camm AJ, Borggrefe M, et al. ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force and the European Society of Cardiology committee for practice guidelines. *Circulation*. 2006;114:e385–e484.

VIII.- ANEXOS

Original article

Intracoronary Infusion of Thioflavin-S to Study Microvascular Obstruction in a Model of Myocardial Infarction



Arantxa Hervás,^a Elena de Dios,^a María J. Forteza,^a Gema Miñana,^a Julio Nuñez,^b Amparo Ruiz-Sauri,^c Clara Bonanad,^b Nerea Perez-Sole,^a Francisco J. Chorro,^b and Vicente Bodi^{b,*}

^aInstituto de Investigación Sanitaria, INCLIVA, Valencia, Spain

^bServicio de Cardiología, Hospital Clínico Universitario, Universitat de València, INCLIVA, Valencia, Spain

^cUniversitat de València, INCLIVA, Valencia, Spain

Article history:

Received 23 January 2015

Accepted 21 April 2015

Available online 5 August 2015

Keywords:

Myocardial infarction

Microcirculation

Swine model

ABSTRACT

Introduction and objectives: Microvascular obstruction exerts deleterious effects after myocardial infarction. To elucidate the role of ischemia-reperfusion injury on the occurrence and dynamics of microvascular obstruction, we performed a preliminary methodological study to accurately define this process in an in vivo model.

Methods: Myocardial infarction was induced in swine by means of 90-min of occlusion of the mid left anterior descending coronary artery using angioplasty balloons. Intracoronary infusion of thioflavin-S was applied and compared with traditional intra-aortic or intraventricular instillation. The left anterior descending coronary artery perfused area and microvascular obstruction were quantified in groups with no reperfusion (thioflavin-S administered through the lumen of an inflated over-the-wire balloon) and with 1-min, 1-week, and 1-month reperfusion (thioflavin-S administered from the intracoronary catheter after balloon deflation).

Results: In comparison with intra-aortic and intraventricular administration, intracoronary infusion of thioflavin-S permitted a much clearer assessment of the left anterior descending coronary artery perfused area and of microvascular obstruction. Ischemia-reperfusion injury exerted a decisive role on the occurrence and dynamics of microvascular obstruction. The no-reperfusion group displayed completely preserved perfusion. With the same duration of coronary occlusion, microvascular obstruction was already detected in the 1-min reperfusion group ($14\% \pm 7\%$), peaked in the 1-week reperfusion group ($21\% \pm 7\%$), and significantly decreased in the 1-month reperfusion group ($4\% \pm 3\%$; $P < .001$).

Conclusions: We present proof-of-concept evidence on the crucial role of ischemia-reperfusion injury on the occurrence and dynamics of microvascular obstruction. The described porcine model using intracoronary injection of thioflavin-S permits accurate characterization of microvascular obstruction after myocardial infarction.

© 2015 Sociedad Española de Cardiología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Infusión intracoronaria de tioflavina-S para el estudio de la obstrucción microvascular en un modelo de infarto de miocardio

RESUMEN

Introducción y objetivos: La obstrucción microvascular produce efectos nocivos después del infarto de miocardio. Con objeto de esclarecer el papel de la lesión por isquemia-reperusión en la aparición y la dinámica de la obstrucción microvascular, se llevó a cabo un estudio metodológico preliminar para definir con exactitud este proceso en un modelo *in vivo*.

Métodos: Se indujo un infarto de miocardio en cerdos mediante una oclusión de 90 min en la parte media de la arteria coronaria descendente anterior izquierda empleando balones de angioplastia. Se aplicó una infusión intracoronaria de tioflavina-S y se comparó con la instilación tradicional intraaórtica o intraventricular. Se cuantificó el área perfundida por la arteria coronaria descendente anterior izquierda y la obstrucción microvascular en los grupos sin reperusión (administración de tioflavina-S a través de la luz de un balón hinchado montado sobre la guía) y con reperusión de 1 min, 1 semana y 1 mes (administración de tioflavina-S mediante el catéter intracoronario después de deshinchar el balón).

Resultados: En comparación con la administración intraaórtica e intraventricular, la infusión intracoronaria de tioflavina-S permitió una evaluación mucho más clara del área perfundida por la arteria coronaria descendente anterior izquierda y de la obstrucción microvascular. La lesión por

Palabras clave:

Infarto de miocardio

Microcirculación

Modelo porcino

SEE RELATED ARTICLE:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rec.2015.06.022>, Rev Esp Cardiol. 2015;68:919-20.

* Corresponding author: Servicio de Cardiología, Hospital Clínico Universitario, Universitat de València, INCLIVA, Blasco Ibáñez 17, 46010 Valencia, Spain.

E-mail address: vicente.bodi@uv.es (V. Bodi).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rec.2015.04.016>

1885-5857/© 2015 Sociedad Española de Cardiología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

isquemia-reperusión tuvo un papel decisivo en la aparición y la dinámica de la obstrucción microvascular. El grupo sin reperusión presentó una perfusión completamente preservada. Con la misma duración de la oclusión coronaria, la obstrucción microvascular se detectó ya en el grupo de reperusión de 1 min ($14 \pm 7\%$), alcanzó un máximo en el grupo de reperusión de 1 semana ($21 \pm 7\%$) y se redujo significativamente en el grupo de reperusión de 1 mes ($4 \pm 3\%$; $p < 0,001$).

Conclusiones: Se presenta una prueba de concepto del papel crucial que desempeña la lesión por isquemia-reperusión en la aparición y la dinámica de la obstrucción microvascular. El modelo de cerdo descrito, que emplea inyección intracoronaria de tioflavina-S, permite una caracterización exacta de la obstrucción microvascular después del infarto de miocardio.

© 2015 Sociedad Española de Cardiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Abbreviations

AMI: acute myocardial infarction
LAD: left anterior descending coronary artery
LV: left ventricle
MVO: microvascular obstruction
RV: right ventricle
T-S: thioflavin-S

INTRODUCTION

Timely and complete restoration of infarct vessel patency is the main goal in patients with acute myocardial infarction (AMI).¹ Nevertheless, this approach does not ensure adequate reperfusion at the microvascular level, and impairment of perfusion persists in a significant number of patients.² This phenomenon is referred to as microvascular obstruction (MVO) and exerts a strong negative impact after AMI.³⁻⁵

Ischemia-reperfusion injury has been extensively discussed in AMI^{6,7} and it could exert deleterious effects on microvascular integrity.^{2,3} Nevertheless, there is no definitive evidence demonstrating a direct association between reperfusion injury and the occurrence of MVO in myocardial samples obtained immediately after coronary reflow. Accurate *in vivo* animal models mimicking the dynamics of MVO in humans are urgently needed. Such models would permit a better understanding of the pathophysiology and timing of this process and, in turn, the exploration of new therapeutic opportunities under controlled conditions.

In the present study, we aimed to contribute proof-of-concept evidence on the crucial role exerted by ischemia-reperfusion injury on the occurrence of MVO and on the dynamics of this process. Up to now, contrasts used for studying perfusion in myocardial samples obtained from *in vivo* animal models have been infused in the left atrium,⁸ in the left ventricle (LV)⁹ or intravenously.¹⁰ To effectively study MVO, we performed a preliminary methodological study, which consisted of investigating the best route to administer thioflavin-S (T-S) to accurately define MVO.

METHODS

Experimental Study

Thirty-one juvenile domestic pigs weighing 25 kg to 30 kg were used. The study protocol was approved by the local animal care and use committee and conforms to the current Spanish regulations (Royal Decree 53/2013, of February 1) and European Directive 2010/63/EC.

Further details on our study protocol can be consulted elsewhere.^{11,12} In summary, pigs were pretreated with intravenous

amiodarone (300 mg) and lidocaine (30 mg) to reduce life-threatening arrhythmias. A 7 Fr sheath was introduced into the right femoral artery to monitor blood pressure and to access the left anterior descending coronary artery (LAD). A 7 Fr Amplatz Left 0.75 catheter was used to selectively engage the proximal LAD and a standard hydrophilic angioplasty wire was advanced and placed in the distal LAD. A 2.5 mm x 15 mm angioplasty balloon was inflated at 6 atm in the mid LAD distal to the first diagonal branch. Coronary artery occlusion was confirmed by contrast injection and by electrocardiographic ST-segment elevation.

Three groups of experiments with reperfusion were carried out. The balloon was deflated after 90 min of coronary occlusion and restoration of normal coronary flow was documented by angiography. In the 1-min reperfusion group ($n = 5$), 20 mL of 4% T-S solution was selectively infused into the proximal LAD through the Amplatz Left 0.75 catheter 1 min after balloon deflation, and hearts were arrested with potassium chloride and excised (Figure 1). Animals in the 1-week and 1-month reperfusion groups were allowed to recover and after 1 week ($n = 5$) or 1 month ($n = 5$) respectively, the same study protocol was followed and 20 mL of 4% T-S solution was selectively infused into the proximal LAD through the Amplatz Left 0.75 catheter. Hearts were then arrested with potassium chloride and excised.

Afterwards, to evaluate the role exerted by reperfusion injury on the occurrence of MVO, the 1-min reperfusion group was compared with a no-reperfusion group ($n = 5$), which underwent an identical 90-min period of ischemia but without reperfusion. In this group of experiments, the balloon was not deflated and 20 mL of 4% T-S solution was selectively infused into the mid LAD after the first diagonal branch through the lumen of an over-the-wire balloon (Figure 1). Immediately after T-S administration, hearts were arrested using potassium chloride and then excised.

The control group was made up of 5 experiments. In this group we used the same study protocol described above, but the angioplasty balloon was not inflated and thus ischemia and infarction were not provoked. We selectively infused 20 mL of 4% T-S solution into the proximal LAD through the Amplatz Left 0.75 catheter. Hearts were then arrested with potassium chloride and excised.

A preliminary series of experiments was carried out to compare the transcatheter intraventricular and intra-aortic instillation with the methodology used in the present study (intracoronary infusion of T-S). The protocol described above was used to induce AMI in 6 pigs. Afterward, the angioplasty balloon was withdrawn and the pigs were allowed to recover. One week after infarction, the Amplatz Left 0.75 catheter was placed in the LV ($n = 3$) or in the aorta ($n = 3$), where 20 mL of 4% T-S solution was infused. Hearts were then arrested with potassium chloride and excised. The precision of intra-aortic and intraventricular vs intracoronary infusion of T-S for assessing the LAD-perfused area and MVO was compared (Figure 1).

Furthermore, to assess the best method of T-S administration for discriminating the MVO area and the LAD-perfused area, the ratio of signal intensity between the MVO area and the LAD-perfused area negative for MVO was quantified in samples obtained from intraventricular, intra-aortic and intracoronary infusion using the software package MATLAB 6.5 (The Mathworks, Inc.; Natick, Massachusetts, United States). This parameter was defined as the ratio between the signal obtained in LAD-perfused areas negative for MVO and the signal obtained in MVO areas. Higher values indicated better discrimination between these regions and, therefore, allowed better differentiation and quantification of MVO area.

Macroscopic Study of Myocardial Samples

Immediately after excision, the whole heart was viewed under ultraviolet light and photographed. Afterward, hearts were sectioned into 5-mm thick short-axis slices. To assess myocardial perfusion in the LV, each slice was viewed under ultraviolet light and photographed (Figure 1). The LAD-perfused area was defined as the percentage of the myocardial volume showing T-S staining.

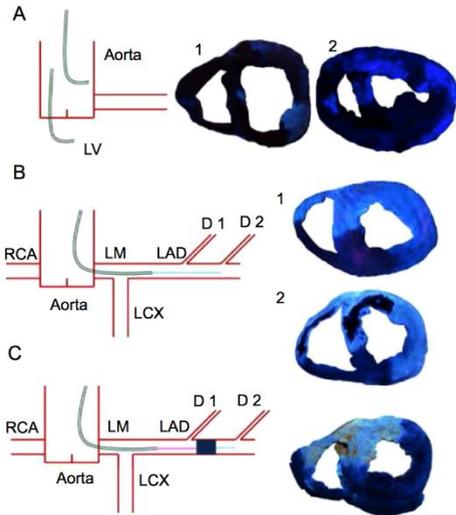


Figure 1. Methodology used for thioflavin-S infusion. Left, diagrams summarize the different methods used for thioflavin-S infusion. Right, pictures obtained under blue ultraviolet light. A: infusion in aorta (1) or in the left ventricle (2) resulted in a poor definition of the left anterior descending coronary artery-perfused area and microvascular obstruction. B: infusion into the catheter engaged in the proximal left anterior descending coronary artery resulted in a perfect definition of the left anterior descending coronary artery-perfused area and microvascular obstruction. This method was used in the control group (1) and in the 1-min, 1-week (2), and 1-month reperfusion groups. Light blue points represent the site of thioflavin-S infusion. C: infusion into the mid left anterior descending coronary artery through the lumen of an over-the-wire angioplasty balloon that was maintained inflated throughout the entire experiment resulted in a perfect definition of left anterior descending coronary artery-perfused area. This method was used in the no reperfusion group. D, diagonal; LAD, left anterior descending coronary artery; LCX, left circumflex artery; LM, left main stem; LV, left ventricle; RCA, right coronary artery.

Dark blue areas were the zones not perfused by LAD whereas light blue areas were the LAD-perfused zones. Microvascular obstruction was interpreted as a lack of T-S staining in the core of the LAD-perfused area (Figure 2), and is expressed as the percentage of the LAD-perfused area.

Thereafter, slices were incubated in 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride 2% solution for 20 min at 37 °C. Finally, they were viewed under room light and photographed. Infarcted tissue was defined as the myocardial area that did not stain with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride and is expressed as the percentage of the LAD-perfused area.

Myocardial wall thickness of the MVO, infarct, adjacent and remote areas was quantified in ultraviolet light images. The infarct area was defined as the area that did not stain with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride negative for MVO, the adjacent area was defined as the noninfarcted LAD-perfused area (with T-S and 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining) and the remote area as the non-LAD-perfused myocardium (without T-S staining).

A separate subanalysis of the LAD-perfused area, MVO, infarcted tissue, and wall thickness of the right ventricle (RV) was performed using the same methodology as that for these parameters in the LV.

Images were digitalized and manual quantification of all short-axis slices was carried out offline in a dedicated laboratory (Cardiac Imaging Unit, INCLIVA, Valencia, Spain) by an experienced

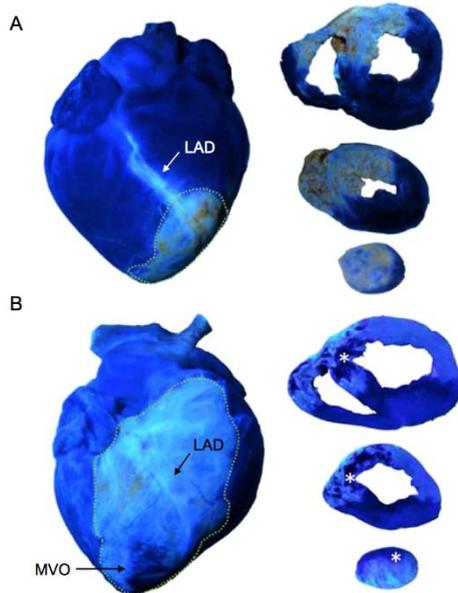


Figure 2. Effect of ischemia-reperfusion injury on the occurrence of microvascular obstruction. The images illustrate that under the same conditions and duration of coronary occlusion, perfusion was preserved in the no-reperfusion group whereas microvascular obstruction was detected as early as 1 min after reperfusion. Asterisks indicate the microvascular obstruction area. Points delimit left anterior descending coronary artery-perfused area. A: example of an entire heart and slices of the no reperfusion group. B: example of an entire heart and slices of the 1-min reperfusion group. LAD, left anterior descending coronary artery; MVO, microvascular obstruction.

observer unaware of the protocol applied in each experiment. The software package MATLAB 6.5 was used. A ruler was photographed beside myocardial slices in all images and was used as a reference for measurements. This, along with the predefined slice thickness (5 mm), permitted the calculation of LV and RV myocardial volumes.

Statistical Analysis

Continuous data are expressed as the mean ± standard deviation and were compared by the unpaired Student's *t* test. Percentages were compared by the chi-square statistic; the Fisher exact test was used when appropriate. Statistical significance was considered for two-tailed *P* < .05. SPSS 22.0 (SPSS Inc.; Chicago, Illinois, United States) was used throughout.

RESULTS

Three experiments were not completed: 2 due to refractory ventricular fibrillation and 1 due to technical problems in the radiology equipment. Electrical ventricular defibrillation was needed in 7 pigs during LAD occlusion and in 8 pigs during reperfusion. No significant complications were recorded over the reperfusion period.

Methodology Used for Thioflavin-S Infusion

Intracoronary infusion of T-S, either from the catheter engaged in the proximal LAD (in the reperfusion groups) or from the lumen of the over-the wire balloon placed at the mid LAD (in the no-reperfusion group) resulted in much clearer definition of the LAD-perfused area and MVO than intraventricular or intra-aortic injection (Figure 1). According to these observations, the ratio of signal intensity (comparing the intensities of MVO area and LAD-perfused area negative for MVO) showed higher values in samples obtained after intracoronary infusion of T-S (5 ± 1.9) than in samples obtained after intra-aortic (1 ± 0.5) or intraventricular (1 ± 0.3) infusion of T-S.

Dynamics of Microvascular Obstruction

Microvascular obstruction was detected in the LV myocardial samples from all reperfused experiments. Microvascular obstruction was detected as early as 1 min after reperfusion, peaked at 1 week, and decreased at 1 month. The extent of MVO detected in the 1-month reperfusion group was significantly lower than that observed in the 1-week reperfusion group (Figure 3 and Table). Similar results regarding the dynamics of MVO occurred in the RV (Figure 1 and Table 1 of the supplementary material).

Proof-of-concept Evidence of the Effect of Ischemia-reperfusion Injury on Microvascular Obstruction

In experiments performed under the same controlled conditions and duration of coronary occlusion, MVO only occurred in myocardial samples obtained from reperfused swine. Figure 2 depicts the crucial role of reperfusion injury on the occurrence of MVO. Whereas myocardial perfusion was completely preserved in myocardial samples obtained from all experiments in the no-reperfusion group, MVO was detected in all experiments in the 1-min reperfusion group.

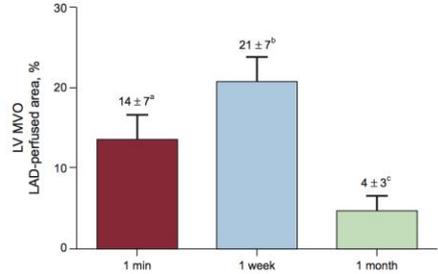


Figure 3. Dynamics of microvascular obstruction in the left ventricle. The extent of microvascular obstruction is represented as a percentage of the left anterior descending coronary artery-perfused area. Microvascular obstruction was already detected in 1-min group, peaked in the 1-week group, and partly resolved in the 1-month reperfusion group. LAD, left anterior descending coronary artery; LV, left ventricle; MVO, microvascular obstruction.

^a*P* < .01 vs control group.
^b*P* < .001 vs control group.
^c*P* < .001 vs 1-week reperfusion group.

Structural Consequences of Microvascular Obstruction

Infarct tissue (as derived from 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining) was detected in all cases in the 1-week and 1-month reperfusion groups (Table).

Left ventricle myocardial wall thinned in the MVO area in the 1-month reperfusion group compared with the infarct, adjacent and remote areas at the same time point (Table) and compared with the MVO area in the 1-week reperfusion group (Figure 4).

A similar tendency regarding the extent of the infarcted area and the association of MVO with progressive wall thinning occurred in the RV (Figure 2 and Table 1 of the supplementary material).

DISCUSSION

The main contribution of the present study is the description of the crucial effect exerted by ischemia-reperfusion injury on the occurrence and dynamics of MVO. To perform a precise

Table
 Left Anterior Descending Coronary Artery-perfused Area, Microvascular Obstruction, Infarct Area, and Myocardial Wall Thickness in the Left Ventricle in the 3 Series of Experiments

| LV | 1 min | 1 week | 1 month |
|--------------------------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|
| LAD-perfused area, % of LV | 65 ± 6 | 76 ± 8 | 66 ± 13 |
| MVO, % of LAD-perfused area | 14 ± 7 ^a | 21 ± 7 ^b | 4 ± 3 ^c |
| Infarct area, % of LAD-perfused area | 0 ± 0 | 34 ± 13 ^b | 26 ± 11 ^b |
| Myocardial wall thickness, mm | | | |
| MVO area | 10 ± 2.3 | 9 ± 2.7 | 7 ± 2.7 |
| Infarct area | | 10 ± 2.8 | 10 ± 2.7 ^d |
| Adjacent area | 11 ± 2.4 | 11 ± 2.7 | 11 ± 3.8 ^d |
| Remote area | 12 ± 2.6 | 11 ± 3.0 | 13 ± 4.2 ^d |

LAD, left anterior descending coronary artery; LV, left ventricle; MVO, microvascular obstruction.

^a *P* < .01 vs controls.
^b *P* < .001 vs controls.
^c *P* < .001 vs 1 week.
^d *P* < .001 vs microvascular obstruction area

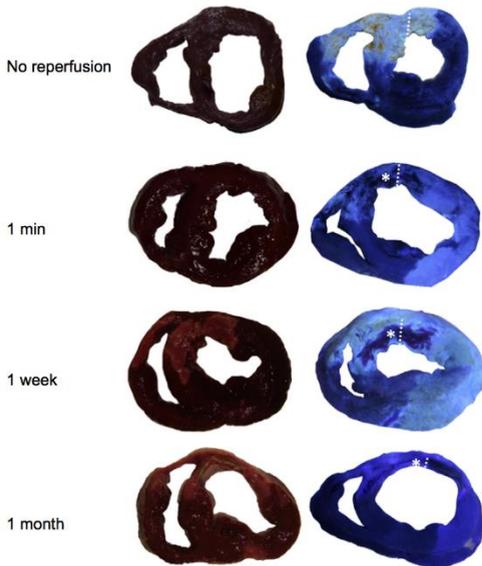


Figure 4. Consequences of microvascular obstruction on the left ventricular myocardial wall thickness. Slices of no reperfusion and 1-min, 1-week, and 1-month reperfusion groups stained with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (left panels) and thioflavin-S (right panels). Asterisks indicate the microvascular obstruction area in the reperfused groups. Points delimit left ventricle wall thickness in the microvascular obstruction area. A significant thinning of the left ventricle wall in the microvascular obstruction area took place 1 month after reperfusion.

characterization of MVO in myocardial samples, an experimental model of anterior AMI based on intracoronary infusion of T-S was defined.

Methodology Used for Thioflavin-S Infusion

Animal models recreate human disease and constitute an essential tool for a better understanding of the underlying mechanisms. Currently, due to the similar size and cardiac physiology of swine and human heart, pigs represent the preferred specie for experimental studies not only in ischemia-reperfusion injury, but also in other cardiovascular diseases such as atherosclerosis.^{13–15} Although swine models of acute AMI have been well defined and widely used, methodology specifically focused on the characterization of MVO after AMI has not been developed.

Thioflavin-S, a dye that stains perfused endothelium, was used to quantitatively measure MVO. Intra-atrial,⁸ intraventricular⁹ and intravenous¹⁰ infusion of a variety of contrasts for different purposes such as for analysis of perfusion, area at risk, or MVO has been previously reported (Table 2 of the supplementary material). However, as far as we know, a specific methodological description of the contribution of intracoronary dye administration has not been explored. From our previous experience using intracoronary contrast echocardiography in humans, we learnt that this route offered the highest definition of myocardial perfusion.¹⁶ This background inspired us to undertake the present study. In the described swine model of anterior AMI, intracoronary infusion of

T-S permitted excellent delineation of the LAD-perfused area and MVO in myocardial samples obtained immediately after sacrifice. Conversely, T-S infusion from intra-aortic and intraventricular routes resulted in a much poorer definition of myocardial perfusion. This observation was evident both by visual analysis of images and after quantification of the intensity ratio.

The intracoronary infusion of T-S was carried out either from the catheter engaged in the proximal LAD (once the angioplasty balloon had been deflated and removed) or through the lumen of an over-the-wire balloon placed at the mid LAD (which was maintained inflated during the entire experiment). The first strategy was helpful to evaluate the dynamics of MVO at different time points of the ischemia-reperfusion process. The second model allowed us to explore the state of microvasculature after a long period of ischemia but immediately before the potentially deleterious effect exerted by reperfusion injury.

Thus, this novel strategy using intracoronary infusion of T-S appears to be a simple and reliable approach that permits accurate characterization of myocardial perfusion and MVO in myocardial samples obtained from an *in vivo* swine model of anterior AMI. This methodology may be helpful in the future to achieve further progress in understanding of the mechanisms underlying MVO and to explore the effects of new therapeutic opportunities addressed to prevent or reverse this process.

Dynamics of Microvascular Obstruction

Over the early hours and days after reperfusion, changes occur in the state of microvasculature under the influence of multiple pathogenic components.^{2,3} We and others have demonstrated that, using imaging techniques in patients, there is a tendency toward spontaneous resolution of MVO during the weeks and months following reperfused AMI.^{2,3,17,18}

The *in vivo* model presented here represents an ideal platform to characterize the dynamics of this process. For this purpose, we undertook experiments at different post-reperfusion times: 1 min, 1 week, and 1 month after reperfusion. Important changes in the extent of MVO were observed: it was already detected immediately after reperfusion, reached its greatest extent at 1 week, and almost completely resolved at 1 month. Recent studies in a swine model have demonstrated other aspects of myocardial structural damage. They have observed that edema follows a bimodal pattern during the first week after AMI.¹⁹ Our results reveal that MVO also has a dynamic behavior characterized by an increment during the first week after AMI and a decrease at 1 month after AMI. These findings have potential implications in terms of diagnosis and therapy.

Firstly, there is no agreement regarding the most appropriate moment for evaluating MVO in patients with AMI. On the basis of our results, it could be suggested that analysis by imaging techniques before discharge (around 1 week after AMI) can provide an approximate estimation of the entire microvascular injury. Secondly, the dynamic behavior of MVO offers a therapeutic target beyond myocardial salvage. To date, apart from timely reperfusion within the very few first hours following coronary occlusion, approaches tested for reducing infarct size have been unsuccessful.²⁰ Therefore, acting upon the damaged myocardium remains difficult. However, although the deleterious effects of a larger extent of MVO on patient outcome and LV remodeling have been well documented, so far the efficacy of therapies addressed to reduce MVO have failed and future endeavors must prove their value in addition to timely coronary reperfusion in rigorous randomized trials.^{21–23}

As expected, infarcted tissue was not detected in controls, or in the no-reperfusion and 1-min reperfusion groups. The maximum

extent of infarct area occurred 1 week after reperfusion. At 1 month, as a consequence of the shrinking process, infarct size diminished.

We have previously demonstrated that RV structural damage is not exclusive of inferior AMI. In anterior AMI, both infarct tissue and MVO can be detected in the anterior territory of the RV.¹¹ The present study confirms the structural consequences of anterior AMI on the RV. The course of MVO in the RV paralleled that observed in the LV. This observation provides relevant information about the nature of MVO and reperfusion damage, but the clinical implications of these findings are uncertain.

Proof-of-concept Evidence of the Effect of Reperfusion on Microvascular Obstruction

The role exerted by ischemia-reperfusion injury in terms of myocardial damage has been largely debated. The pathogenesis of MVO is multifactorial and includes the combination of a variety of components.^{2,3} The significance of ischemia-reperfusion injury, if any, on this puzzle has not been totally understood. Controversy on the significance of ischemia-reperfusion injury has existed for years,^{6,7} but this mechanism has been suggested to play a role on MVO appearance.^{2,3}

In this study, beyond theoretical statements, we aimed to contribute proof-of-concept data on the decisive influence of ischemia-reperfusion injury on MVO. To specifically address this issue, we designed 2 series of experiments in which anterior AMI was provoked using identical conditions. The only differing factor was reperfusion. In the first series, at the end of the 90-minute LAD occlusion, T-S was injected through the lumen of the balloon, which was maintained inflated; thus, reperfusion was not allowed. In the second group, at the end of the 90-min LAD occlusion, the balloon was deflated and removed and T-S was infused through the catheter engaged in the proximal LAD after a 1-min reperfusion period. Striking differences in terms of MVO were observed when myocardial samples of both series were compared. Whereas myocardial perfusion was completely preserved in the no-reperfusion group, MVO was observed in all cases that underwent as short as 1-min reperfusion.

In our view, the data presented contribute convincing evidence on the decisive role of ischemia-reperfusion injury on MVO. Currently, promising treatments against reperfusion injury exist but are still experimental.²⁴ Furthermore, a number of medical or invasive approaches aimed at reducing MVO in reperfused AMI have been controversial or unsuccessful.^{21,22} Therefore, beyond the well-established effectiveness of timely primary percutaneous intervention, great efforts are still needed to better understand and manage the crucial peri-reperfusion minutes.

Study Limitations

First, the main limitation of the present study is the absence of a comparator technique to assess MVO in vivo, such as cardiac magnetic resonance imaging; a second technique confirming the results would have strengthened the conclusions obtained. Second, functional techniques evaluating the influence of MVO on cardiac function (such as strain by echocardiography or by intramyocardial crystals) could have provided some insight into the functional consequences of MVO, but these techniques are not available in our laboratory.

As usual in basic research, translation to clinical practice needs caution. Data obtained in the present work could inspire studies in humans both to replicate our results using imaging techniques and to encourage the design of trials aimed at obtaining

novel therapeutic tools to minimize the deleterious effect of reperfusion injury on microvascular perfusion.

CONCLUSIONS

The immediate onset of MVO following balloon deflation demonstrates the decisive role of ischemia-reperfusion injury on the occurrence of this process and demands awareness on the management of this short but critical time period in the revascularization of AMI patients. The in vivo experimental model presented could be helpful as a platform for further translational studies focused on a better understanding of MVO and on exploring alternative therapeutic opportunities under highly controlled conditions.

FUNDING

The present study was supported by the *Instituto de Salud Carlos III*, the European Regional Development Fund (P11400271 grant), and the *Generalitat Valenciana* (PROMETEO/2013/007 grant) and was awarded by the *Reial Acadèmia de Medicina de la Comunitat Valenciana*.

CONFLICTS OF INTEREST

None declared.

SUPPLEMENTARY MATERIAL



Supplementary material associated with this article can be found in the online version available at doi:10.1016/j.rec.2015.04.016.

REFERENCES

1. Steg G, James SK, Atar D, Badano LP, Blömmström-Lundqvist C, Borger MA, et al. ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Eur Heart J*. 2012;33:2569–619.
2. Jaffe R, Dick A, Strauss BH. Prevention and treatment of microvascular obstruction-related myocardial injury and coronary no-reflow following percutaneous coronary intervention: a systematic approach. *JACC Cardiovasc Interv*. 2010;3:695–704.
3. Niccoli G, Burzotta F, Galiuto L, Crea F. Myocardial no-reflow in humans. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54:281–92.
4. Bolognese L, Carrabba N, Parodi G, Santoro GM, Buonamici P, Cerisano G, et al. Impact of microvascular dysfunction on left ventricular remodeling and long-term clinical outcome after primary coronary angioplasty for acute myocardial infarction. *Circulation*. 2004;109:1121–6.
5. Brosh D, Assali AR, Mager A, Porter A, Hasdai D, Teplitsky I, et al. Effect of no-reflow during primary percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction on six-month mortality. *Am J Cardiol*. 2007;99:442–5.
6. Ovize M, Baxter GF, Di Lisa F, Ferdinandy P, Garcia-Dorado D, Hausenloy DJ, et al. Postconditioning and protection from reperfusion injury: where do we stand? Position Paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc Res*. 2010;87:406–23.
7. Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest*. 2013;123:92–100.
8. Kumar A, Green JD, Sykes JM, Ephrat P, Carson JJ, Mitchell AJ, et al. Detection and quantification of myocardial reperfusion hemorrhage using T2*-weighted CMR. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2011;4:1274–83.
9. Wu KC, Kim RJ, Bluemke DA, Rochitte CE, Zerhouni EA, Becker LC, et al. Quantification and time course of microvascular obstruction by contrast-enhanced echocardiography and magnetic resonance imaging following acute myocardial infarction and reperfusion. *J Am Coll Cardiol*. 1998;32:1756–64.
10. Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB. The 'no-reflow' phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest*. 1974;54:1496–508.
11. Bodi V, Sanchis J, Mainar L, Chorro FJ, Nunez J, Monmeneu JV, et al. Right ventricular involvement in anterior myocardial infarction: a translational approach. *Cardiovasc Res*. 2010;87:601–8.
12. Bodi V, Sanchis J, Morales JM, Marrachelli VG, Nunez J, Forteza MJ, et al. Metabolic profile of human myocardial ischemia by nuclear magnetic

- resonance spectroscopy of peripheral blood serum. A translational study based on transient coronary occlusion models. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59:1629-41.
13. Elmadhun NY, Sabe AA, Robich MP, Chu LM, Lassaletta AD, Sellke FW. The pig as a valuable model for testing the effect of resveratrol to prevent cardiovascular disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2013;1290:130-5.
 14. Cuellas-Ramón C, Pérez de Prado A, 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.
 15. Santos-Gallego CG, Badimon JJ, Ibáñez B. Modelos experimentales de aterosclerosis. *Rev Esp Cardiol Supl*. 2013;13(E):3-12.
 16. Bodí V, Sanchis J, Losada A, López-Lereu MP, García D, Pellicer M, et al. Usefulness of quantitative intravenous myocardial contrast echocardiography to analyze microvasculature perfusion in patients with a recent myocardial infarction and an open infarct-related artery: comparison with intracoronary myocardial contrast echocardiography. *Eur J Echocardiography*. 2005;6:164-74.
 17. Galiuto L, Lombardo A, Maseri A, Santoro L, Porto I, Cianflone D, et al. Temporal evolution and functional outcome of no reflow: sustained and spontaneously reversible patterns following successful coronary recanalisation. *Heart*. 2003;89:731-7.
 18. Bodí V, Sanchis J, López-Lereu MP, Nunez J, Mainar I, Pellicer M, et al. Evolution of 5 cardiovascular magnetic resonance-derived viability indexes after reperfused myocardial infarction. *Am Heart J*. 2007;153:649-55.
 19. 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;65:315-23.
 20. Buja LM. Myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc Pathol*. 2005;14:170-5.
 21. Bodí V, Ruiz-Nodar JM, Feliu E, Minana G, Nunez J, Husser O, et al. Effect of ischemic postconditioning on microvascular obstruction in reperfused myocardial infarction. Results of a randomized study in patients and of an experimental model in swine. *Int J Cardiol*. 2014;175:138-46.
 22. Kalltoft A, Böttcher M, Nielsen SS, Hansen HH, Terkelsen C, Maeng M, et al. Routine thrombectomy in percutaneous coronary intervention for acute ST-segment-elevation myocardial infarction: a randomized, controlled trial. *Circulation*. 2006;114:40-7.
 23. Niccoli G, Kharbada RK, Crea F, Banning AP. No-reflow: again prevention is better than treatment. *Eur Heart J*. 2010;31:2449-55.
 24. García-Dorado D, Rodríguez-Sinovas A, Ruiz-Meana M, Inseste J. Protección contra el daño miocárdico por isquemia-reperfusión en la práctica clínica. *Rev Esp Cardiol*. 2014;67:394-404.



Supplementary material

Intracoronary Infusion of Thioflavin-S to Study Microvascular Obstruction in a Model of Myocardial Infarction

Arantxa Hervas^a, Elena de Dios^a, María J. Forteza^a, Gema Miñana^a, Julio Núñez^b, Amparo Ruiz-Sauri^c, Clara Bonanad^b, Nerea Pérez^a, Francisco J. Chorro^b y Vicente Bodí^{b,*}

^a*Instituto de Investigación Sanitaria, INCLIVA, Valencia, España*

^b*Servicio de Cardiología, Hospital Clínico Universitario, Universitat de València, INCLIVA, Valencia, España*

^c*Universitat de València, INCLIVA, Valencia, España*

Table 1 of the supplementary material

Left Anterior Descending Artery-perfused Area, Microvascular Obstruction, Infarct Area and Myocardial Wall Thickness in the Right Ventricle in the 3 Series of Experiments

| <u>RIGHT VENTRICLE</u> | 1 min | 1 week | 1 month |
|--|---------------------|----------------------|----------------------|
| LAD-perfused area (% of RV) | 44 ± 13 | 45 ± 9 | 37 ± 12 |
| MVO (% of LAD-perfused area) | 11 ± 6 ^a | 12 ± 10 ^a | 5 ± 5 |
| Infarct area (% of LAD-perfused area) | 0 ± 0 | 31 ± 19 ^b | 21 ± 20 |
| <u>Myocardial wall thickness:</u> | | | |
| MVO area (mm) | 5 ± 0.6 | 5 ± 0.9 | 4 ± 0.8 ^c |
| Infarct area (mm) | | 5 ± 1.3 | 5 ± 1.8 |
| Adjacent area (mm) | 6 ± 1.7 | 5 ± 1.4 | 6 ± 1.8 |
| Remote area (mm) | 6 ± 1.7 | 5 ± 1.9 | 7 ± 2.4 |

^a $P < .05$ vs control; ^b $P < .01$ vs control; ^c $P < .01$ vs remote

LAD, left anterior descending artery; MVO, microvascular obstruction; RV, right ventricle.

Table 2 of the supplementary material

Routes, Animal Models and Parameters Evaluated in Experimental Studies Focused on the Analysis of Myocardial Perfusion After Myocardial Infarction.

| Thioflavin-S | Animal model | Parameter evaluated | References |
|-------------------|---------------|---------------------------|------------------------------|
| Intra-atrial | Mongrel dogs | Microvascular obstruction | Ambrosio et al ¹ |
| Intra-atrial | White rabbits | Microvascular obstruction | Hale et al ² |
| Intra-atrial | White rabbits | Microvascular obstruction | Hale et al ³ |
| Intra-atrial | Mongrel dogs | Microvascular obstruction | Kumar et al ⁴ |
| Intra-ventricular | Mongrel dogs | Microvascular obstruction | Rochitte et al ⁵ |
| Intra-ventricular | Mongrel dogs | Microvascular obstruction | Wu et al ⁶ |
| Intra-venous | Dogs | Flow distribution | Kloner et al ⁷ |
| Tail veins | Rats | Microvascular obstruction | Liu et al ⁸ |
| Microspheres | | | |
| Intra-atrial | Mongrel dogs | Myocardial blood flow | Dörge et al ⁹ |
| Intra-atrial | Pigs | Myocardial blood flow | Salminen et al ¹⁰ |
| Intra-ventricular | Mongrel dogs | Myocardial blood flow | Wu et al ⁶ |
| Intra-ventricular | Mongrel dogs | Myocardial blood flow | Rochitte et al ¹¹ |

| | | | |
|-------------------|---------------|-----------------------|--------------------------------|
| Intra-ventricular | Mongrel dogs | Myocardial blood flow | Amado et al ¹² |
| <hr/> | | | |
| Carbon black | | | |
| <hr/> | | | |
| Intra-atrial | Dogs | Flow distribution | Kloner et al ⁷ |
| <hr/> | | | |
| Evans Blue | | | |
| <hr/> | | | |
| Aortic root | Pigs | Area at risk | Sodha et al ¹³ |
| Aortic root | Pigs | Area at risk | Salminen et al ¹⁰ |
| Aorta | Green monkeys | Area at risk | Schumacher et al ¹⁴ |
| Intra-atrial | Mongrel dogs | Area at risk | Schmidt et al ¹⁵ |
| Intra-atrial | Pigs | Area at risk | Poulsen et al ¹⁶ |
| Tail veins | Rats | Area at risk | Liu et al ⁸ |
| <hr/> | | | |

REFERENCES

1. Ambrosio G, Weisman HF, Mannisi JA, Becker LC. Progressive impairment of regional myocardial perfusion after initial restoration of postischemic blood flow. *Circulation*. 1989;80:1846-61.
2. Hale SL, Dae MW, Kloner RA. Hypothermia during reperfusion limits 'no-reflow' injury in a rabbit model of acute myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2003;59:715-22.
3. Hale SL, Kloner RA. The antianginal agent, Ranolazine, reduces myocardial infarct size but does not alter anatomic no-reflow or regional myocardial blood flow in ischemia/reperfusion in the rabbit. *J Cardiovasc Pharmacol and Ther*. 2008;13:226-32.
4. Kumar A, Green JD, Sykes JM, Ephrat P, Carson JJ, Mitchell AJ, et al. Detection and quantification of myocardial reperfusion hemorrhage using T2*-weighted CMR. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2011;4:1274-83.
5. Rochitte CE, Lima JAC, Bluemke DA, Reeder SB, McVeigh ER, Furuta T, et al. Magnitude and Time Course of Microvascular Obstruction and Tissue Injury After Acute Myocardial Infarction. *Circulation*. 1998;98:1006-14.
6. Wu KC, Kim RJ, Bluemke DA, Rochitte CE, Zerhouni EA, Becker LC, et al. Quantification and time course of microvascular obstruction by contrast-enhanced echocardiography and magnetic resonance imaging following acute myocardial infarction and reperfusion. *J Am Coll Cardiol*. 1998;32:1756-64.
7. Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB. The 'No-Reflow' Phenomenon after Temporary Coronary Occlusion in the Dog. *J Clin Invest*. 1974;54:1496-508.
8. Liu X, Tao GZ. Effects of tirofiban on the reperfusion-related no-reflow in rats with acute myocardial infarction. *J Geriatr Cardiol*. 2013;10:52-8.
9. Dörge H, Neumann T, Behrends M, Skyschally A, Schulz R, Kasper C, et al. Perfusion-contraction mismatch with coronary microvascular obstruction: role of inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279:H2587-92.
10. Salminen PR, Dahle GO, Moen CA, Wergeland A, Jonassen AK, Haaverstad R, et al. Reperfusion Therapy with Low-Dose Insulin or Insulin-Like Growth Factor 2; Myocardial Function and Infarct Size in a Porcine Model of Ischaemia and Reperfusion. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2014 Apr 19 [E-pub ahead of print]; <http://dx.doi.org/10.1111/bcpt.12255>.
11. Rochitte CE, Kim RJ, Hillenbrand HB, Chen EI, Lima JAC. Microvascular Integrity and the Time Course of Myocardial Sodium Accumulation After Acute Infarction. *Circ Res*. 2000;87:648-55.
12. Amado LC, Kraitchman DL, Gerber BL, Castillo E, Boston RC, Grayzel J, et al. Reduction of 'no-reflow' phenomenon by intra-aortic balloon counterpulsation in a randomized magnetic resonance imaging experimental study. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43:1291-8.

13. Sodha NR, Clements RT, Feng J, Liu Y, Bianchi C, Horvath EM, et al. Hydrogen sulfide therapy attenuates the inflammatory response in a porcine model of myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2009;138:977-84.
14. Schumacher WA, Grover GJ. The thromboxane receptor antagonist SQ 30,741 reduces myocardial infarct size in monkeys when given during reperfusion at a threshold dose for improving reflow during thrombolysis. *J Am Coll Cardiol.* 1990;15:883-9.
15. Schmidt SB, Varghese PJ, Bloom S, Yackee JM, Ross AM. The influence of residual coronary stenosis on size of infarction after reperfusion in a canine preparation. *Circulation.* 1986;73:1354-9.
16. Poulsen RH, Rasmussen JT, Bøtker HE, Wachrens LS, Falborg L, Heegaard CW, et al. Imaging the myocardium at risk with ^{99m}Tc-lactadherin administered after reperfusion in a porcine model. *Nucl Med Biol.* 2014;41:114-9.

FIGURES LEGENDS

Figure 1 of the supplementary material. Dynamics of microvascular obstruction in the right ventricle. Microvascular obstruction was already detected in the 1-min, peaked in the 1-week and partly resolved in the 1-month reperfusion group. A, quantification of microvascular obstruction (represented as percentage of left anterior descending artery perfused area). * $P < .05$ vs control. B, illustrative slices of the 1-min, 1-week and 1-month reperfusion groups. Arrows indicate the microvascular obstruction area.

LAD, left anterior descending artery; MVO, microvascular obstruction; RV, right ventricle.

SUPPLEMENTARY FIGURE 1

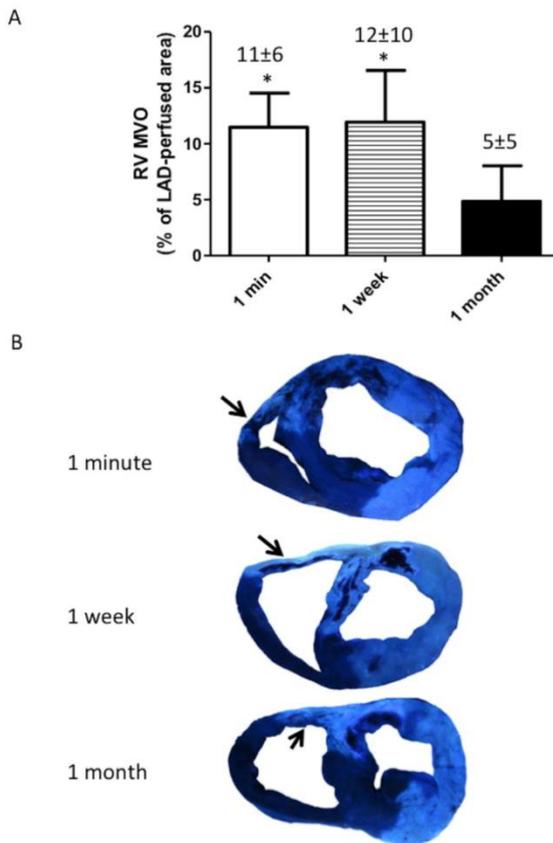


Figure 2 of the supplementary material. Consequences of microvascular obstruction on the right ventricular myocardial wall thickness. A significant thinning of the right ventricle myocardial wall in the microvascular obstruction area took place 1 month after reperfusion.

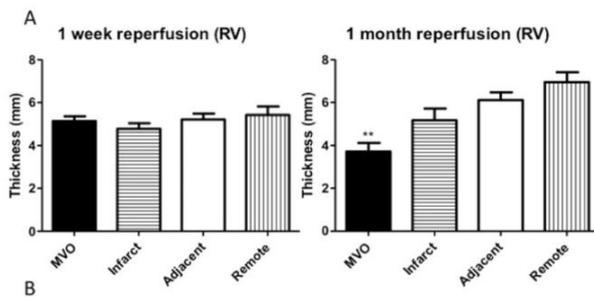
A, quantification of the right ventricular myocardial wall thickness in the microvascular obstruction, infarct, adjacent and remote areas in the 1-week and 1-month reperfusion groups.

** $P < .01$ vs remote area. B, illustrative slices of the 1-week and 1-month reperfusion groups.

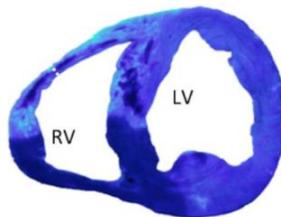
The white points line indicates the right ventricular myocardial wall thickness in the microvascular obstruction area.

LV, left ventricle; MVO, microvascular obstruction; RV, right ventricle.

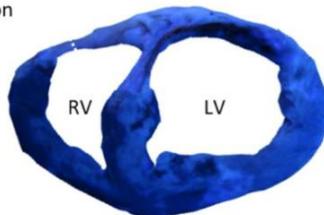
SUPPLEMENTARY FIGURE 2



B
1 week reperfusion



1 month reperfusion





Inhomogeneity of collagen organization within the fibrotic scar after myocardial infarction: results in a swine model and in human samples

Arantxa Hervás,¹ Amparo Ruiz-Sauri,² Elena de Dios,¹ María Jose Forteza,¹ Gema Minana,¹ Julio Nunez,¹ Cristina Gomez,¹ Clara Bonanad,¹ Nerea Perez-Sole,¹ Jose Gavara,¹ Francisco Javier Chorro¹ and Vicente Bodi¹

¹Cardiology Department, Hospital Clínico Universitario, INCLIVA, University of Valencia, Valencia, Spain

²INCLIVA, University of Valencia, Valencia, Spain

Abstract

We aimed to characterize the organization of collagen within a fibrotic scar in swine and human samples from patients with chronic infarctions. Swine were subjected to occlusion of the left anterior descending artery followed by reperfusion 1 week (acute myocardial infarction group) or 1 month (chronic myocardial infarction group) after infarction. The organization of the collagen fibers (Fast Fourier Transform of samples after picrosirius staining; higher values indicate more disorganization) was studied in 100 swine and 95 human samples. No differences in collagen organization were found between the acute and chronic groups in the core area of the scar in the experimental model. In the chronic group, the endocardium [0.90 (0.84–0.94); median (interquartile range)], epicardium [0.84 (0.79–0.91)] and peripheral area [0.73 (0.63–0.83)] displayed a much more disorganized pattern than the core area of the fibrotic scar [0.56 (0.45–0.64)]. Similarly, in human samples, the collagen fibers were more disorganized in all of the outer areas than in the core of the fibrotic scar ($P < 0.0001$). Both in a highly controlled experimental model and in patient samples, collagen fibers exhibited an organized pattern in the core of the infarction, whereas the outer areas displayed a high level of inhomogeneity. This finding contributes pathophysiological information regarding the healing process and may lead to a clearer understanding of the genesis and invasive treatment of arrhythmias after acute myocardial infarction.

Key words: fibrosis; myocardial infarction; swine model.

Introduction

The healing process following a myocardial infarction (MI) plays a key role in patient outcomes. It involves a cascade of events that includes different cell types; the aim of the healing process is to remove necrotic tissue, which leads to the synthesis and deposition of new collagen in the infarcted area (van den Borne et al. 2010; Mewton et al. 2011).

In addition to providing strength and stiffness to the myocardium, the organization of collagen in the scar provides a structural support for cardiomyocytes (Whittaker et al. 1991). Collagen fibers play a key role in preserving the structural integrity and tissue function after MI (Whittaker

et al. 1991; Rich & Whittaker, 2005). The organization of collagen is influenced by the deformation of the ischemic area, which produces mechanical stretching; this leads to the migration of fibroblasts and thereby the deposition of collagen fibers (Zimmerman et al. 2000; Fomovsky et al. 2012).

A 'gray zone', which consists of a region of heterogeneous tissue within the infarcted periphery and correlates with ventricular arrhythmias and post-MI mortality, has been described using cardiac magnetic resonance (CMR; Schmidt et al. 2007; Mewton et al. 2011). Although collagen fiber organization has been studied in previous papers (Whittaker et al. 1991; Zimmerman et al. 2000; Holmes et al. 2005; Zhou et al. 2011; Fomovsky et al. 2012), an in-depth pathological characterization of this process throughout all areas of the fibrotic scar using myocardial samples has not yet been performed. This issue may have potential implications for the pathophysiology of left ventricular (LV) remodeling as well as on the genesis and invasive therapy of ventricular arrhythmias by catheter ablation (Zipes et al. 2006).

Correspondence

Vicente Bodi, Cardiology Department, Hospital Clínico Universitario, INCLIVA, University of Valencia, Blasco Ibañez 17, 46010 Valencia, Spain. T: + 34 96 1973523; F: + 34 96 1973979; E: vicente.bodi@uv.es

Accepted for publication 14 September 2015

Article published online 29 October 2015

We aimed to carry out a comprehensive characterization of the organization of collagen fibers within the different zones of the fibrotic scar both in the core of the infarction and in the outer areas using myocardial samples obtained from an *in vivo* swine model of an anterior MI and in samples of patients with a chronic infarct.

Materials and methods

Experimental study

Seventeen juvenile domestic pigs weighing 25–30 kg were used. The local Animal Care and Use Committee approved the study; this study conforms to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1993) and to The ARRIVE guidelines (www.nc3rs.org.uk/ARRIVE).

Further details on our study protocol can be found elsewhere (Bodi et al. 2010, 2012). Pigs were sedated using intra-muscular 8 mg kg⁻¹ ketamine and 0.1 mg kg⁻¹ medetomidine. The right jugular vein was cannulated to administer drugs and to obtain blood samples. A 10 mg kg⁻¹ h⁻¹ continuous intra-venous infusion of 2% propofol was used as anesthesia. Pigs were pretreated with intra-venous amiodarone (300 mg) and lidocaine (30 mg) to diminish life-threatening arrhythmias, and with heparin (3000 U). Pigs were mechanically ventilated using a 50% oxygen gas mixture and a continuous electrocardiographic monitoring of heart rate, rhythm, and ST-segment changes was performed. A 7F sheath was introduced into the right femoral artery to monitor blood pressure and to access the left anterior descending coronary artery (LAD). A 7F Amplatz Left 0.75 catheter was used to engage selectively the proximal LAD, and a standard hydrophilic angioplasty wire was advanced and placed in the distal LAD. A 2.5 × 15 mm angioplasty balloon was inflated at 6 atm in the mid LAD. Coronary artery occlusion was confirmed by contrast injection and by electrocardiographic ST-segment elevation.

Two groups of experiments with reperfusion were carried out: the acute MI group and the chronic MI group. In both groups, the balloon was deflated after 90 min of coronary occlusion, and restoration of normal coronary flow was documented by angiography. Afterwards, the animals were allowed to recover, and after 1 week (*n* = 5, acute MI group) or 1 month (*n* = 5, chronic MI group), coronary angiography was repeated using the same methodology. No coronary occlusion or dissection was detected when the second catheterization was carried out. The hearts were arrested with potassium chloride and excised.

The control group consisted of five experiments. In this group we used the same study protocol described above, but the balloon angioplasty was not inflated and thus ischemia and infarction were not provoked. Hearts were then arrested with potassium chloride and excised.

Macroscopic study

Immediately after excision, the whole heart was photographed and sectioned into 5-mm-thick short-axis slices. Thereafter, the slices were incubated in a 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTZ; Merck Millipore, Billerica, MA, USA) 2% solution for 20 min at 37 °C. Finally, the slices were viewed under room light and photographed. Infarcted tissue was defined as the myocardial area that did not

stain with TTZ; it was expressed as the percentage of the LV volume.

The images were digitalized, and manual quantification of all of the short-axis slices was carried out offline in a core laboratory (Cardiac Imaging Unit, Incliva, Valencia, Spain) by an experienced observer unaware of the protocol used in each experiment. The software package MATLAB 6.5 (The Mathworks, Inc., Natick, MA, USA) was used. A ruler, which was used as a reference for measurement, was photographed next to myocardial slices in all images. This, combined with the predefined slice thickness (5 mm), permitted the calculation of LV myocardial volumes and infarcted areas (tissue not stained with TTZ) (Fig. 1A).

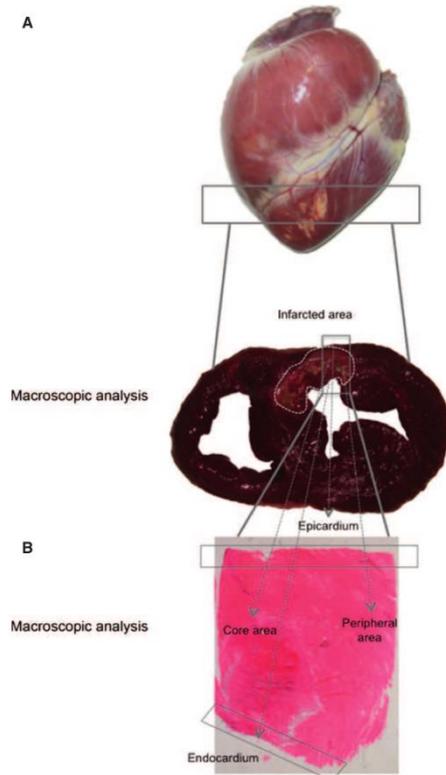


Fig. 1 Samples used to evaluate collagen organization within the fibrotic scar. (A) Images of the whole heart and TTZ stained section. Infarcted tissue was defined as the myocardial area that did not stain with TTZ (white points) and is expressed as the percentage of the LV volume. (B) Four different areas were studied within the fibrotic scar: the core area, endocardium, epicardium and peripheral area. LV, left ventricular; TTZ, 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride.

Microscopic study of myocardial samples

Picrosirius staining

Collagen quantification and fiber organization were studied using a picrosirius method. The specimens were embedded in paraffin and sectioned at 5 μm . The sections were stained in 0.1% Direct Red 80 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in saturated picric acid for 1 h. Afterwards, the sections were differentiated in 0.5% acetic acid, dehydrated, cleared and mounted (Osman et al. 2013). Images for each sample were captured in an optic microscope, Leica DMD 108 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), at 20 \times magnification using a polarizer filter. This filter permitted the differentiation of type I collagen (orange-red) and type III collagen (yellow-green).

The scar was divided into four areas: the core area (central core of infarcted tissue), endocardium, epicardium and peripheral area (zone within the infarcted tissue but near the edge with the healthy tissue) (Fig. 1B). Overall, 100 samples of the swine model were assessed and the results were obtained comparing the core area with the outer areas (including all samples collected from endocardium, epicardium and peripheral area). Additionally, the core area was separately compared with the endocardium, epicardium and peripheral area. Image processing was performed using IMAGE PROPLUS 6.0 software (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA). The quantity of type I collagen and type III collagen were calculated and expressed as a percentage per field.

Fourier transformation of cardiac images

The Fast Fourier Transform (FFT) algorithm was implemented in IMAGE PROPLUS 6.0 software to determine the organization of collagen fibers. As has been described by Osman et al. (2013) in their work regarding the collagen architecture in skin, FFT is an algorithm to compute the Discrete Fourier Transform (DFT) of a signal and its inverse. The DFT of an image extracts the strength of the frequency waveforms contributing to the pixel value of the entire image. The amplitude of the DFT values for all of the pairs of frequencies form the overall Fourier spectrum of the image. All of the frequencies present in an image are represented in the frequency spectrum, and the image patterns in the spectrum are used to determine the relative organization of the original image texture. In this way, the organization of an image is deducible and quantifiable from the spectrum of all of the present frequencies. For each spectrum, elliptical measurements of the scatter pattern were performed (Fig. 2). A collagen organization index (n) was generated as described in the following equation:

$$n (\text{organization index}) = \text{short axis/long axis.}$$

The organization index ranges between 0 and 1 (van Zuijlen et al. 2002; Osman et al. 2013; Marcos-Garcés et al. 2014). A completely random orientation, suggesting total disorganization, results in an organization index that approximates to 1, whereas a perfect organization results in an organization index that approximates to 0. Therefore, the n value ranges between 0 and 1, higher values indicating disorganization and lower values a more parallel organization (van Zuijlen et al. 2002).

Transmission electron microscopy

For visualization with transmission electron microscopy (TEM), samples from the infarct region were fixed in 2.5% glutaraldehyde and then in osmium tetroxide. Semi-thin and subsequently ultra-thin sections were prepared and images for each sample were captured

using a JEM-1010 (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) at 10 000 \times magnification.

Myofibroblast detection

Paraffin sections from the infarct region were used for myofibroblast detection. The primary antibody anti-alpha smooth muscle actin (α -SMA) (Abcam, Cambridge, UK) was applied and incubated overnight at 4 $^{\circ}\text{C}$. Amplification of the primary antibody signal was carried out by a 45-min incubation with secondary antibody polyclonal goat anti-rabbit immunoglobulins/HRP (Dako Denmark, Glostrup, Denmark). Photographs at 20 \times magnification were taken of each part (core area, endocardium, epicardium and peripheral area) using an optic microscope Leica DMD 108. An experienced observer assessed the arrangement of myofibroblasts.

Study of patient samples

Myocardial samples of five patients with a chronic infarct (more than 6 months after acute MI) were obtained from autopsies. Clinical and autopsy characteristics of patients included in the study group are displayed in Table 1. Overall, 95 samples were analyzed from the core area, endocardium, epicardium and peripheral area from the fibrotic scar.

A microscopic study of the myocardial samples was performed following the same protocol described for the experimental samples (staining with picrosirius and FFT analysis).

Endpoints

The endpoints of the present study were as follows:

First, we aimed to describe the organization of the collagen fibers in the core area, endocardium, epicardium and peripheral area of the fibrotic scar in myocardial samples obtained from a highly controlled swine model of reperfused anterior MIs.

Secondly, we intended to ascertain whether the organization pattern detected in the experimental model also occurred in patients with spontaneous chronic infarctions.

Statistical analyses

Non-parametric tests were used throughout. Data were expressed as the median with the interquartile range and compared using the Mann-Whitney U -test. The Kruskal-Wallis test was used for multiple comparisons. Statistical significance was considered for two-tailed $P < 0.05$. GRAPHPAD PRISM 6.0 (GraphPad, La Jolla, CA, USA) was used throughout.

Results

Experimental study

Seventeen juvenile domestic pigs weighing 25–30 kg were used. Two of them died during balloon inflation due to refractory ventricular fibrillation. Electrical ventricular defibrillation was needed in another seven pigs during LAD occlusion. No significant complications were recorded over the reperfusion period. Successful experiments were divided in three groups: the control group ($n = 5$), acute MI group ($n = 5$) and chronic MI group ($n = 5$).

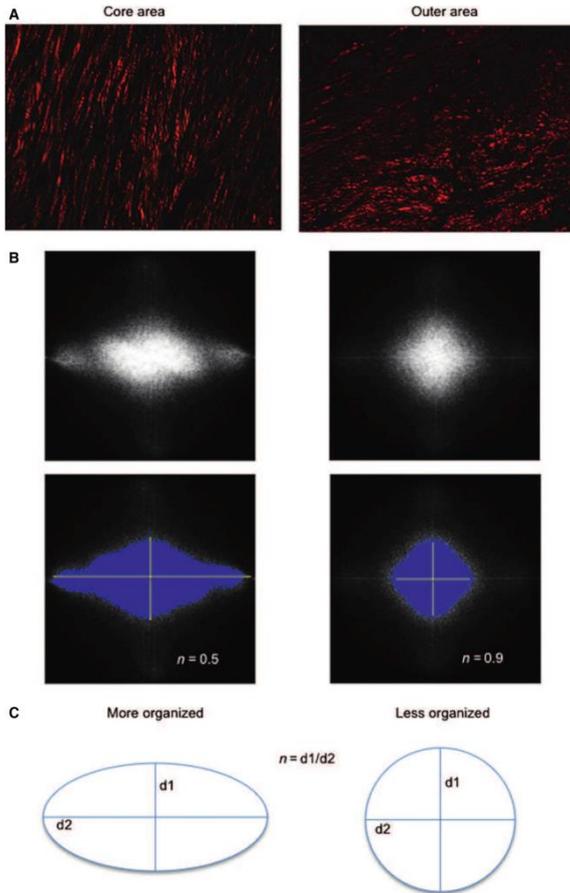


Fig. 2 The FFT method was used to assess the organization of collagen fibers in the different parts of the fibrotic scar. (A) Samples from the core (left) and the outer (right) areas stained with picrosirius and photographed using a polarizer filter at 20 \times magnification. (B) FFT spectra obtained from photographs in (A). Collagen fibers in the core area are organized in a parallel manner; therefore, the collagen organization index is 0.5. In contrast, in the outer area, collagen fibers present a disorganized arrangement; hence, the collagen organization index is near 1. (C) The scheme represents the Fourier transform pattern obtained in each photograph. The equation used to calculate the organization index is described. FFT, Fast Fourier transform.

In the acute MI group, the infarcted area occupied 27% of the LV volume. In the chronic MI group, the fibrotic area shrunk and occupied 15% of the LV volume.

The acute MI and the control groups displayed similar amounts of type I and type III collagen (Supporting Information Fig. S1A). Type I collagen predominated in both cases ($P < 0.0001$). A significant increase in the amount of type I and type III collagen was detected in the chronic MI group ($P < 0.0001$ vs. control and acute MI groups). Type I collagen was also more prevalent than type III in the chronic MI group ($P < 0.0001$) (Fig. S1B).

Collagen fiber organization in swine samples

When the organization of collagen fibers in the core of the infarcted area (acute MI group) and the core of the fibrotic scar (chronic MI group) were compared, no significant differences were detected: the collagen organization index was 0.56 (0.49–0.66) [median (interquartile range)] in the acute MI group and 0.56 (0.45–0.64) in the chronic MI group ($P = ns$) (Fig. 3).

In the chronic MI group, samples were collected from the core area, endocardium, epicardium and peripheral area for microscopic studies of the fibrotic scar (Fig. 1). A higher disorganization was found in the outer areas (including the

Table 1 Clinical data and autopsy results of patients.

| | Clinical data | Autopsy results |
|-----------|---|---|
| Patient 1 | Male, hypertension, ex-smoker, heart failure, ischemic cardiomyopathy EF by CMR: 15% Infarct: 2005, 70 years Death: heart failure, 2012, 77 years | Chronic infarcted area: 2 × 3 cm lateral wall of the left ventricle Chronic infarcted area: 2.5 × 0.7 cm interventricular septum Atherosclerosis |
| Patient 2 | Male, hypertension, dyslipidemia, diabetes mellitus, ischemic cardiomyopathy EF by Echo: 36% Infarct: 2002, 71 years Death: heart failure, 2013, 82 years | Chronic infarcted area: anterolateral wall of the left ventricle Atherosclerosis |
| Patient 3 | Male, hypertension, ex-smoker, hepatopathy, dyslipidemia, obesity, atrial septal defect, chronic alcoholism, ischemic cardiomyopathy EF by Echo: 32% Infarct: Unknown Death: re-infarct, 2014, 58 years | Chronic infarcted area: 6.5 × 7.5 cm anterior wall of the right ventricle |
| Patient 4 | Male, hypertension, chronic kidney disease, dyslipidemia, hypertrophic cardiomyopathy of the left ventricle, chronic obstructive pulmonary disease, achalasia, abdominal aortic aneurysm, supraglottic carcinoma EF by Echo: 56% Infarct: Unknown Death: cardiogenic shock, 2014, 78 years | Chronic infarcted area: intramyocardial patchy fibrosis in the interventricular septum and at subendocardial level of the left ventricle Atherosclerosis |
| Patient 5 | Male, smoking, dyslipidemia, obesity, chronic obstructive pulmonary disease, cardiomegaly Infarct: Unknown Death: stroke, 2012, 55 years | Chronic infarcted area: 2 × 2 cm interventricular septum Atherosclerosis |

CMR, cardiac magnetic resonance; Echo, echocardiography; EF, ejection fraction.

endocardium, epicardium and peripheral area) compared to the core of the fibrotic scar ($P < 0.0001$) (Fig. 4).

In the core of the scar, collagen fibers displayed an almost parallel arrangement; in the separately analyzed outer areas, a random distribution was detected (Fig. 4). The

organization index in the core area [0.56 (0.45–0.64)] was much lower than the endocardium [0.90 (0.84–0.94)], epicardium [0.84 (0.79–0.91)] and peripheral area [0.73 (0.63–0.83)], $P < 0.0001$, core area vs. endocardium and epicardium; $P < 0.05$, core area vs. peripheral area (Fig. 4). These figures suggest that in a highly controlled porcine model of chronic MI, collagen fibers display an almost perfect organization in the core of the scar. In contrast, the outer areas (including the endocardium, epicardium and peripheral area) exhibit a much more inhomogeneous pattern.

Transmission electron microscopy

In the TEM captions, in parallel with optical microscopy, the collagen fibers in the core area were well organized. In the endocardium, epicardium and peripheral area, collagen fibers were disposed in a random manner (Fig. 5).

Myofibroblast organization in swine samples

To ascertain whether the myofibroblasts arrangement was also different in the different parts of the fibrotic scar, we performed a staining using anti α -SMA antibody. The results showed that the myofibroblasts were arranged similarly to collagen fibers. In the core area, myofibroblasts were organized in a parallel manner, whereas in the endocardium, epicardium and peripheral areas they showed a more disorganized disposition (Fig. 5).

Study in patient samples

Myocardial samples obtained from five patients with chronic MIs were analyzed in the study. Their baseline characteristics and autopsy findings are listed in Table 1. All of the patients were male with a mean age of 70 ± 12 years. The autopsies revealed a fibrotic scar in all cases.

Type I and type III collagen were quantified and expressed as a percentage per field. Similar to the swine model, type I collagen predominated in all of the samples analyzed [28.4% (10.8–69.0) of type I collagen vs. 1.7% (0.9–2.8) of type III collagen, $P < 0.0001$] (Fig. 6).

Collagen fiber organization in human samples

In patients with chronic infarction, collagen fiber organization was determined in 95 myocardial samples obtained from the core area and the outer zones (endocardium, epicardium and peripheral area).

Similar to the animal model, when the core of the infarcted tissue was compared with the outer areas, the latter displayed a much more disorganized pattern of collagen fiber distribution ($P < 0.0001$) (Fig. 6). Furthermore, we performed specific comparisons between the core area [0.67 (0.56–0.76)] and endocardium [0.83 (0.73–0.90)], epicardium

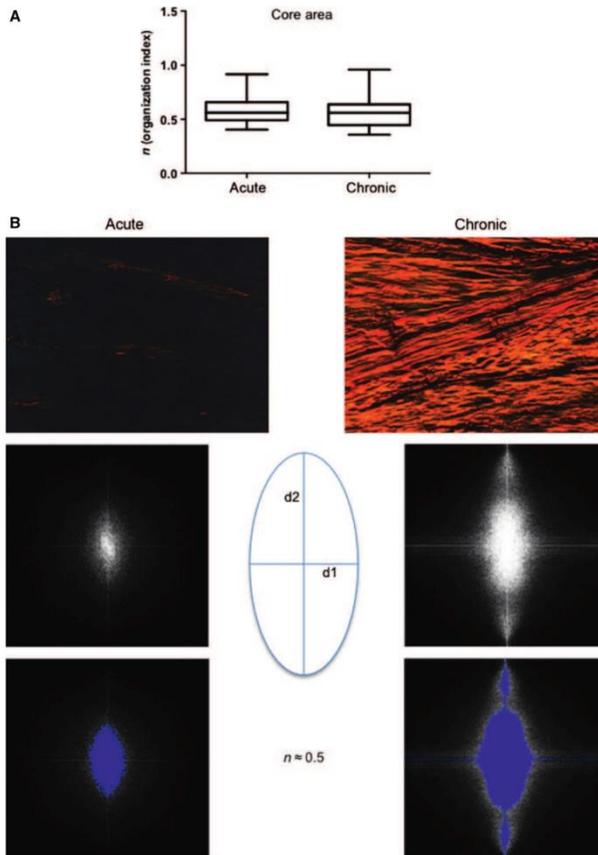


Fig. 3 Dynamics of collagen organization in the core area of the fibrotic scar. No differences existed between the acute and chronic MI groups when we compared the organization of collagen fibers in the core area of the infarcted tissue. (A) The collagen organization index was similar in the core area of the acute and chronic MI groups. Upper and lower lines of the boxes represent the 25th and 75th percentiles. The line in the middle of the box is plotted at the median. Whiskers represent 1 and 99 percentiles. (B) Images illustrate examples of the core area of the infarcted tissue from the acute and chronic MI groups stained with picrosirius and photographed using a polarizer filter at 20 \times magnification. Fourier transform spectra obtained from these images and their representative schemes are presented. A lower quantity of collagen is observed in the acute MI group than in the chronic MI group. Both groups present an organized arrangement of collagen fibers in the core area of the scar; hence the Fourier transform spectra show a directional pattern.

[0.80 (0.74–0.87)] and peripheral area [0.83 (0.67–0.90)]. In all cases, the organization index indicated more homogeneity in the arrangement of collagen fibers in the core area compared with the outer areas of the fibrotic scar ($P < 0.01$ for all comparisons) (Fig. 6).

In summary, the organizational pattern of the fibrotic scar found in the myocardial human samples of patients with chronic infarction mirrored that detected in the experiments; the pattern was characterized by a more organized distribution of collagen fibers in the core area and a much more random distribution in the outer areas of the scars.

Discussion

The main contribution of the present study is the characterization of collagen fiber organization in four areas of the

fibrotic scar: the core area, endocardium, epicardium and peripheral area. Our results show that collagen fibers are well organized in the core area but display a random distribution in the outer areas. This phenomenon occurs both in a highly controlled swine model and in patients with a spontaneous chronic infarction.

Collagen quantification

After MI, collagen is synthesized and secreted by myofibroblasts. These cells are involved in the scar formation after MI and produce collagen that is expected to stabilize the damaged tissue (van den Borne et al. 2010). During the healing process, the increase in collagen content occurs approximately 3 weeks post-MI and is correlated with infarction stiffness (Lerman et al. 1983; Gupta et al. 1994).

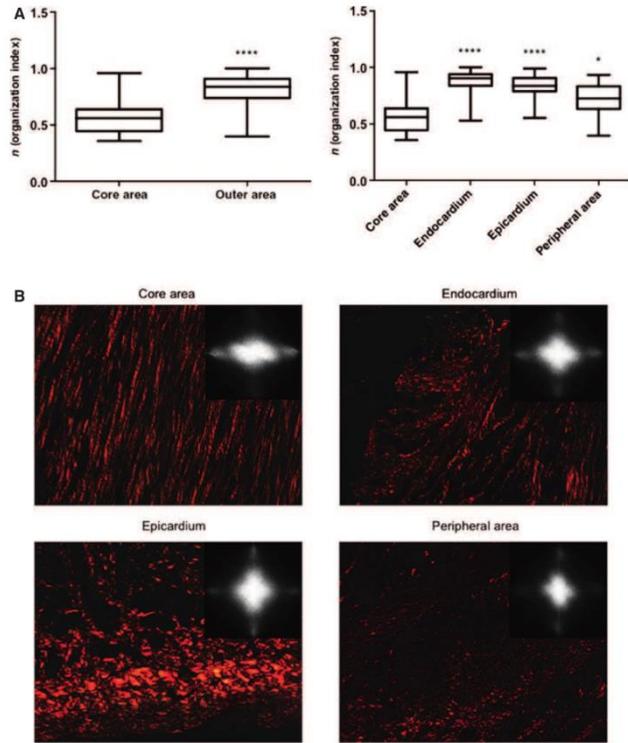


Fig. 4 Collagen fiber organization in different areas within the fibrotic scar of swine samples. (A) The collagen organization index was higher in the outer zones compared to the core area. Upper and lower lines of the boxes represent the 25th and 75th percentiles. The line in the middle of the box is plotted at the median. Whiskers represent 1 and 99 percentiles. **** $P < 0.0001$ vs. core area; * $P < 0.05$ vs. core area. (B) Images stained with picosirius (photographed using a polarizer filter at 20 \times magnification) and Fourier transform spectra obtained from these images illustrate the differences in collagen organization between the different areas of the fibrotic scar. Collagen fibers in the core area are organized almost in a parallel manner. In contrast, in the endocardium, epicardium and peripheral area, collagen fibers show a random arrangement.

In our study, we compared the collagen content after 1 week and after 1 month of MIs. In accordance with previous work (Lerman et al. 1983; Gupta et al. 1994), an increase in the total amount of collagen was detected. Furthermore, we analyzed both collagen type I and collagen type III separately; although an increment was observed in both types of collagen, type I collagen exhibited a much higher increase. Similar to previous studies (Whittaker et al. 1989), the observed scar in both swine and human samples was characterized by a high amount of collagen type I and a smaller amount of collagen type III fibers.

Fast Fourier method

The present investigation was designed to study the differences between the organization of collagen fibers in the core area of the infarcted tissue and in the outer zones. For this purpose, the organization of collagen fibers was assessed 1 week (acute MI group) and 1 month (chronic MI group) after infarction in swine as well as in human samples of patients with chronic infarction. To determine the organization index, the FFT algorithm was implemented after

staining the samples with picosirius. The FFT algorithm has been used to estimate the power spectrum of images in other specialties, such as dermal studies (van Zuijlen et al. 2002; Osman et al. 2013; Marcos-Garcés et al. 2014). Additionally, it has been proven that Fourier image analysis is suitable for determining the morphometry of the collagen orientation. Higher values in this index suggest more inhomogeneity in the collagen fiber distribution (van Zuijlen et al. 2002).

Dynamics of collagen fiber organization in swine

The dynamics of collagen fiber distribution in the days and weeks following acute MI tissue is controversial. Whittaker et al. (1989) demonstrated a progressive increase in the molecular organization of collagen in the first 6 weeks after infarction. Conversely, Zhou et al. (2011) suggested that as the collagen deposition increased, the fiber orientation changed from a well-organized pattern at 3 days post-infarction to a partially disorganized pattern at 7–14 days, and thereafter displayed a well-organized structure 1 month after infarction.

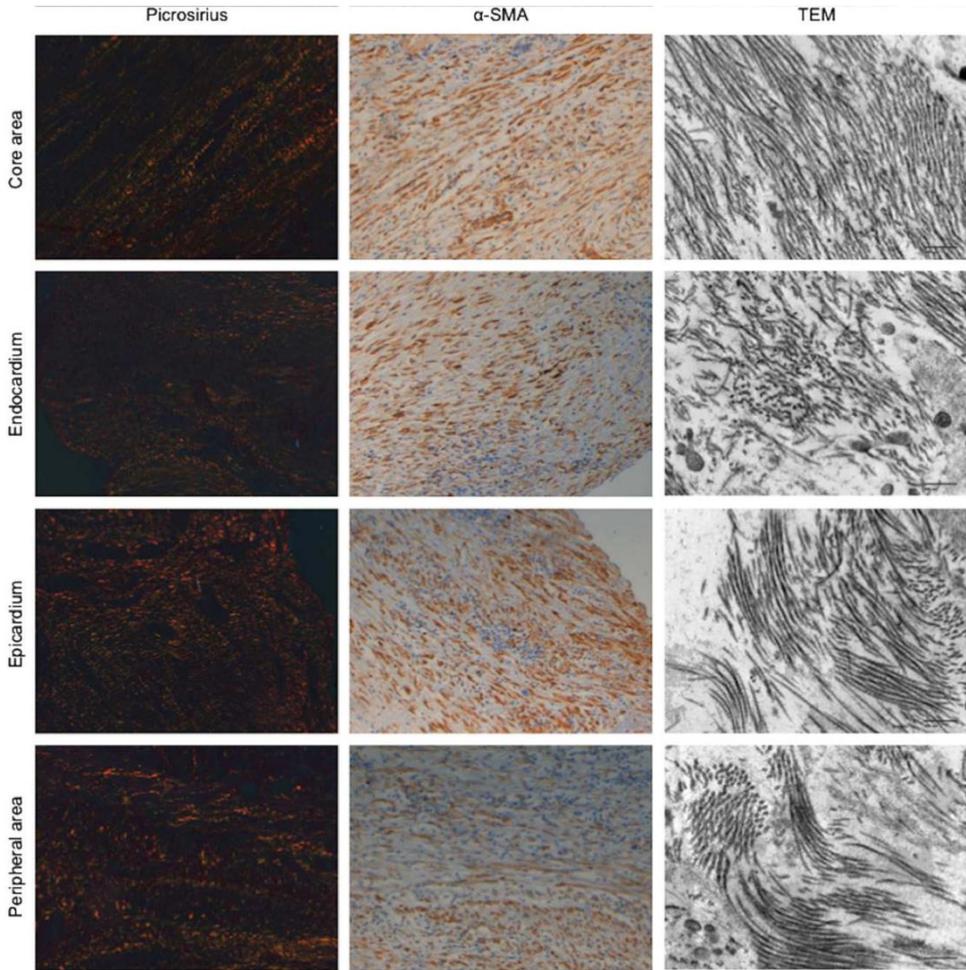


Fig. 5 Collagen fibers and myofibroblast arrangement in different areas of the fibrotic scar of swine samples. Left panels: Images stained with picrosirius photographed using a polarizer filter at 20× magnification. Middle panels: Images of alpha smooth muscle actin (α -SMA) immunohistochemistry photographed at 20× magnification. Right panels: Images of transmission electron microscopy (TEM) photographed at 10 000× magnification. Images exemplify the similarities between collagen and myofibroblasts arrangement in the different areas of the fibrotic scar. Upper panels correspond to the core area. In parallel with collagen fibers, myofibroblasts display a parallel disposition. TEM captions confirm the organized disposition of collagen fibers in the core area. Nevertheless, in the endocardium, epicardium and peripheral areas, collagen fibers stained by picrosirius display a disorganized disposition and myofibroblasts mirror this disorder. Finally, by TEM the collagen fibers are disposed in a disorganized manner. α -SMA, alpha smooth muscle actin; TEM, transmission electron microscopy.

We assessed the dynamic evolution of the distribution of collagen in the core area of the infarcted zone from the acute (1 week post-MI) to the chronic phase (1 month post-MI) in swine. No dynamic changes in the arrangement of collagen were detected; an almost parallel disposition of

fibers existed in the core area of both the infarcted zone and the fibrotic scar.

Our results indicate that despite a massive increase in collagen content, the organization of collagen fibers is maintained in the core of the infarction. However, the

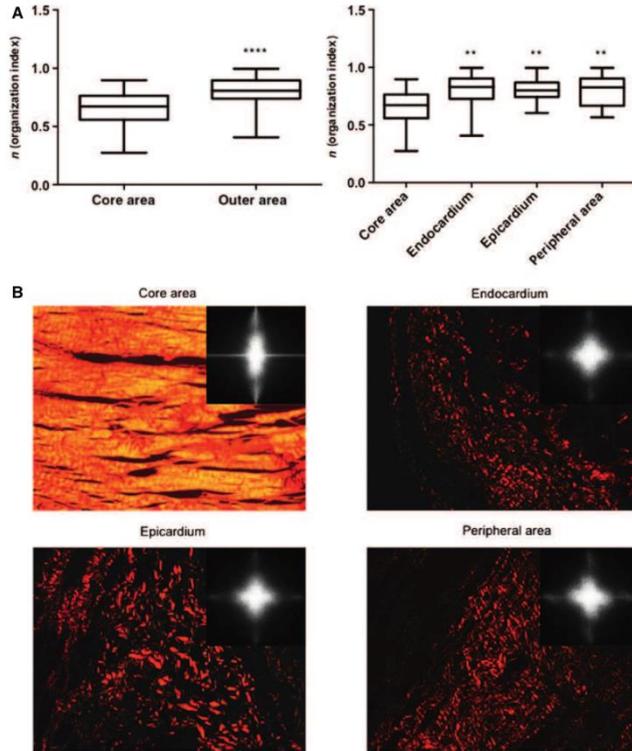


Fig. 6 Collagen fiber organization in different areas within the fibrotic scar of human samples. The organization pattern found in human samples paralleled those detected in swine. (A) As we observed in the animal model, the collagen organization index was higher in the outer zones than in the core area. Upper and lower lines of the boxes represent the 25th and 75th percentiles. The line in the middle of the box is plotted at the median. Whiskers represent 1 and 99 percentiles. **** $P < 0.0001$ vs. core area; ** $P < 0.01$ vs. core area. (B) Images stained with picrosirius (photographed using a polarizer filter at 20 \times magnification) and Fourier transform spectra obtained from these images are represented. Collagen fibers in the core area are organized almost in a parallel manner, whereas the fibers are disorganized in the endocardium, epicardium and peripheral area.

arrangement of fibers in the outer areas of the fibrotic scar once the deposition of collagen has been completed is unknown. Knowledge of this issue may be relevant for a better understanding of the pathophysiology of LV remodeling as well as for the comprehension of the genesis and management of life-threatening ventricular arrhythmias in patients with a chronic infarction.

Chronic scar

Similar to previous experimental studies (Whittaker et al. 1989; Zhou et al. 2011), in a controlled swine model of acute MI, a high level of organization of collagen fibers existed in the core of the fibrotic scar 1 month after MI.

To date, there are no data available regarding this issue in humans. In myocardial samples obtained from patients with a spontaneous chronic infarction, we observed that this homogeneous distribution of collagen fibers in the core of the scar also occurs in patients late after infarction.

Interestingly, the outer areas of the fibrotic scar exhibited a much more inhomogeneous pattern both in swine and in human samples; in the endocardium, epicardium and

peripheral areas, the organization index suggested a much more random distribution of fibers compared with the core area.

Thus, our study contributes original data regarding the organization of collagen fibers; we report the first-in-human information regarding the inhomogeneous distribution of collagen within different areas of the fibrotic scar after acute MI.

Clinical implications

The comprehensive description of the organization of collagen fibers performed in the present study yields novel information for a better understanding of the fibrotic process.

The clinical importance of the ‘gray zone’, which has been hypothesized to be a region of heterogeneous tissue within the infarct periphery, has been previously demonstrated (Schmidt et al. 2007; Mewton et al. 2011). The characteristics of this zone have mainly been described using CMR and have been associated with the genesis of ventricular arrhythmias and post-MI mortality (Schmidt et al. 2007; Roes et al. 2009; Mewton et al. 2011; Schuleri et al. 2012).

We have analyzed the pathology of areas corresponding to the 'gray zone' using histological samples from a highly controlled swine model. Moreover, our study provides the first-in-human information regarding the organization of collagen fibers in this territory using samples obtained from patients with a chronic infarct. The random arrangement of collagen in the endocardium, epicardium and peripheral area that was observed in swine and in patient samples (Fig. 7) may constitute the pathophysiological basis for the high arrhythmic risk and the propensity for LV remodeling and mortality observed in patients with large CMR-derived gray areas (Schmidt et al. 2007; Mewton et al. 2011). A similar pattern of a disorganized distribution of collagen fibers has been detected in the atria of patients with atrial fibrillation (Tsai et al. 2010).

The histological findings reported in the present study support current strategies applied in the invasive treatment of post-infarction ventricular arrhythmias using catheter ablation. The fact that from a histological point of view the triggers of these potentially life-threatening events are concentrated in the endocardium, epicardium and peripheral

area implies that percutaneous ablative procedures (using intravascular or trans-pericardial percutaneous ablation catheters) are feasible and the consequences in terms of myocardial loss are acceptable. Nevertheless, ablative treatment of the core area of the infarction would require a much more challenging procedure leading to the induction of severe transmural myocardial damage.

Beyond the potential implications in arrhythmias and for a better understanding of the 'gray zone', the different disposition of fibers in the myocardial areas could have potential effects on cardiac function and performance. Collagen deposition after MI plays has been described to play a key role in the mechanical properties of the scar (Holmes et al. 2005). Voorhees and Han have recently reported that not only collagen density but also collagen fiber orientation affects the scar tissue mechanics and therefore LV function. They observed, using a mathematical model, that longitudinal fiber alignment limits scar deformation and optimizes ejection fraction and stroke volume. In addition, they concluded that the better diastolic filling and systolic contraction is the result of

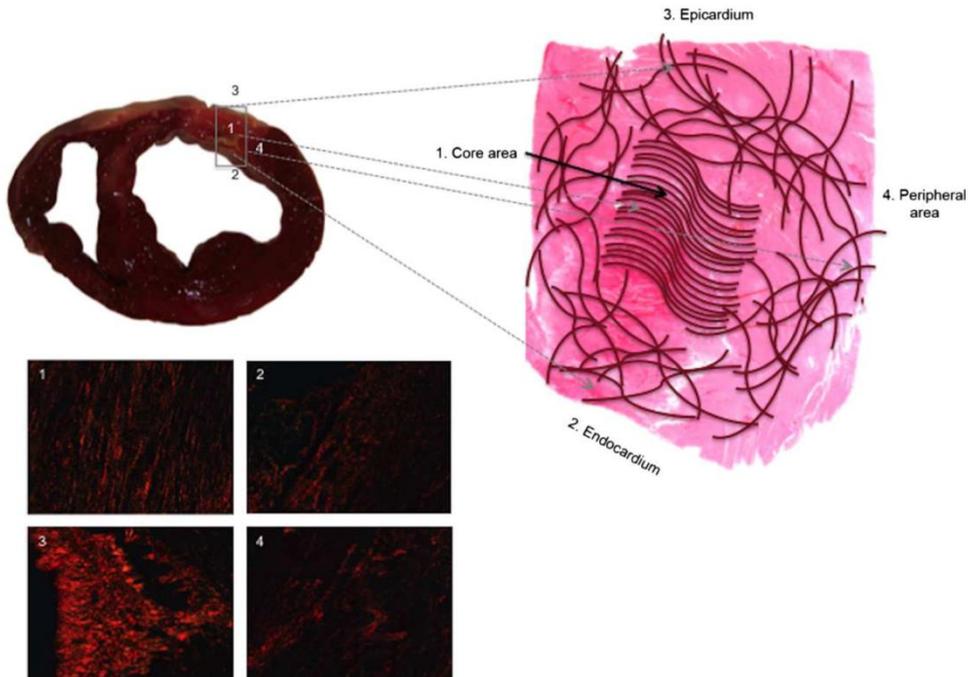
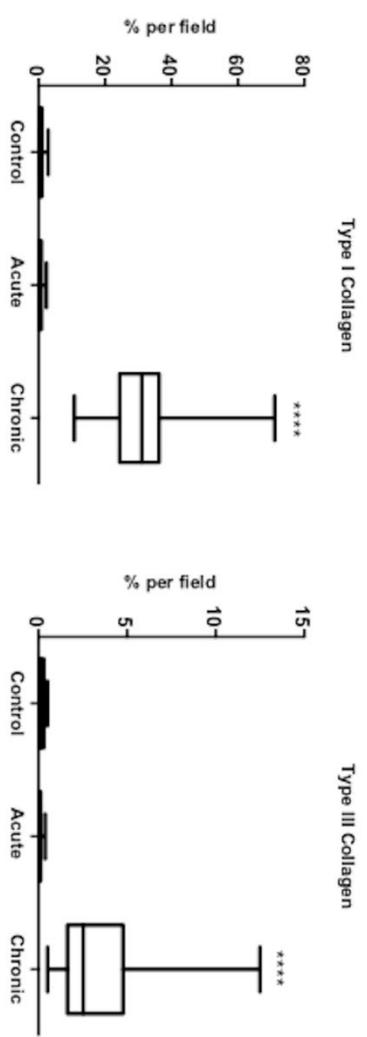
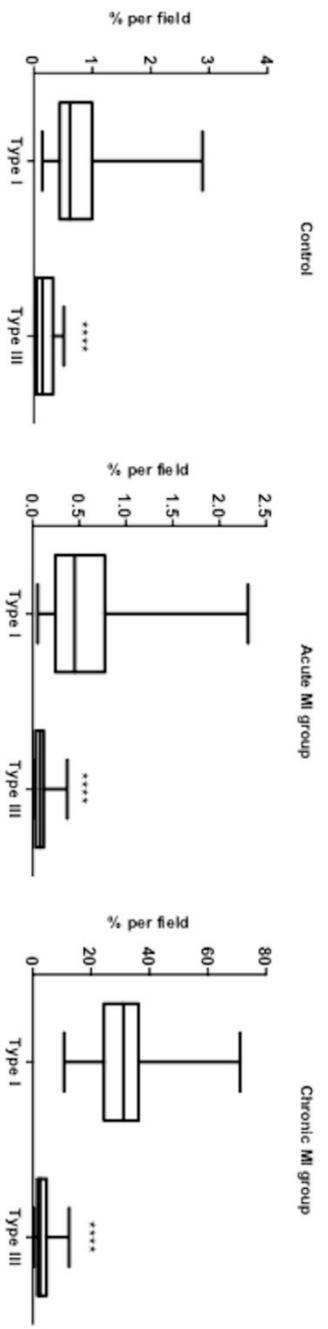


Fig. 7 Inhomogeneity in collagen organization within the fibrotic scar. The scheme represents the organization of collagen fibers within the fibrotic scar. The fibers in the core area are arranged in an almost parallel manner. However, the collagen fibers are randomly organized in the outer areas. Images stained with picrosirius and photographed using a polarizer filter at 20x magnification represent collagen organization in the core area (1), endocardium (2), epicardium (3) and peripheral area (4).

A



B





ORIGINAL ARTICLE

A Multidisciplinary Assessment of Remote Myocardial Fibrosis After Reperfused Myocardial Infarction in Swine and Patients

Arantxa Hervás¹ · Amparo Ruiz-Sauri² · Jose Gavara¹ · Jose V. Monmeneu³ · Elena de Dios¹ · Cesar Rios-Navarro¹ · Nerea Perez-Sole¹ · Itziar Perez⁴ · Daniel Monleon⁵ · Jose M. Morales^{5,6} · Gema Minana¹ · Julio Nunez¹ · Clara Bonanad¹ · Ana Diaz⁷ · Jose M. Vila⁸ · Francisco J. Chorro¹ · Vicente Bodi¹

Received: 16 March 2016 / Accepted: 16 May 2016 / Published online: 1 June 2016
© Springer Science+Business Media New York 2016

Abstract In extensive nonreperused myocardial infarction (MI), remote fibrosis has been documented. Early reperfusion by primary angioplasty represents the gold standard method to minimize the extension of the infarction. We aimed to ascertain whether fibrosis also affects remote regions in reperfused MI in swine and patients. Swine were subjected to a transient occlusion of the left anterior descending artery followed by 1-week or 1-month reperfusion. Collagen content in the remote area macroscopically, microscopically, by magnetic resonance microimaging, and at the molecular level was similar to controls. In patients with previous MI, samples from autopsies

displayed a significant increase in collagen content only in the infarct region. In patients with previous MI submitted to cardiac magnetic resonance-T1 mapping, the extracellular volume fraction in remote segments was similar to that for controls. In all scenarios, the remote region did not show a significant increase of collagen content in comparison with controls.

Keywords Myocardial infarction · Reperfusion · Remote fibrosis · Swine model

Associate Editor Enrique Lara-Pezzi oversaw the review of this article

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s12265-016-9698-9) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Amparo Ruiz-Sauri
amparo.ruiz-sauri@uv.es

✉ Vicente Bodi
vicente.bodi@uv.es

¹ Cardiology Department, Hospital Clinico Universitario, INCLIVA, University of Valencia, Blasco Ibanez 17, 46010 Valencia, Spain

² Pathology Department, School of Medicine, University of Valencia, Blasco Ibanez 17, 46010 Valencia, Spain

³ ERESA, Valencia, Spain

⁴ CBIT, Polytechnic University of Valencia, Valencia, Spain

⁵ Laboratory of Metabolomics, University of Valencia, INCLIVA, Valencia, Spain

⁶ UCIM, University of Valencia, Valencia, Spain

⁷ SCSIE, Universidad de Valencia, Valencia, Spain

⁸ Physiology Department, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain

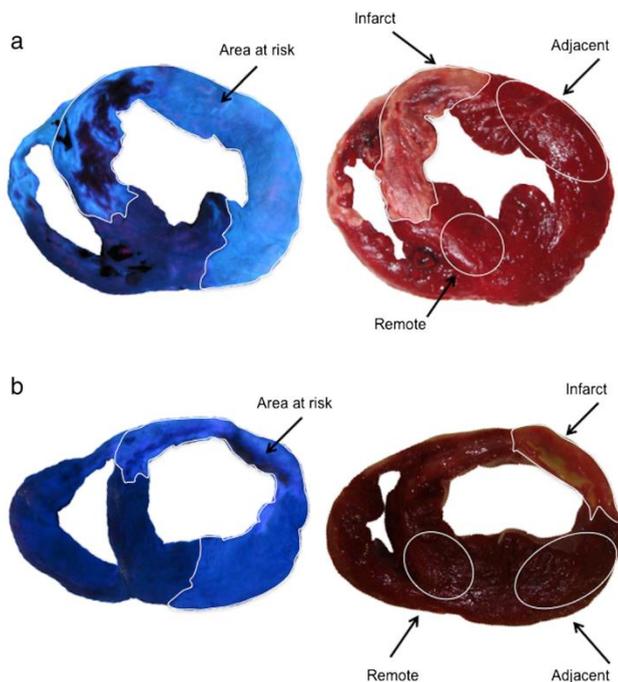
Abbreviations

| | |
|--------|-------------------------------------|
| α-SMA | Alpha-smooth muscle actin |
| CMR | Cardiac magnetic resonance |
| COL1A1 | Collagen type I alpha 1 |
| COL1A2 | Collagen type I alpha 2 |
| COL3A1 | Collagen type III alpha 1 |
| ECV | Extracellular volume fraction |
| MI | Myocardial infarction |
| TGF-β | Transforming growth factor-β |
| TS | Thioflavin-S |
| TTZ | 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride |

Introduction

Wound healing after myocardial infarction (MI) plays a key role in patient outcomes and consists of the replacement of necrotic tissue and the deposition of new collagen in the infarct area [1]. In the postinjury state, the collagen turnover is regulated predominantly by myofibroblasts [1]. These cells are activated by mechanical stress and autocrine and paracrine factors [1, 2], and their role is essential for the formation of a dense extracellular matrix

Fig. 1 Macroscopic study of myocardial fibrosis in samples obtained from the swine model. **a** Samples from the 1-week reperfusion group stained with Thioflavin-S (*left*) and 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (*right*). **b** Samples from the 1-month reperfusion group stained with Thioflavin-S (*left*) and 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (*right*). At the macroscopic level, no evidence of fibrosis was detected in the remote areas



that reinforces the infarcted tissue [2]. Ideally, in well-healed MI, collagen deposition takes place in the infarcted area in order to preserve heart geometry [1]. However, fibrosis at sites remote to the infarcted region, which has been associated with stiffness of the cardiac muscle and may contribute to the development of heart failure [1, 2], has been documented in extensive nonreperfused infarcts in patients [3] and in experimental models [4–8]. Nevertheless, in an era of the universal use of reperfusion therapies, the appearance of fibrosis in noninfarcted areas after reperfused MI has not been well addressed.

Given the potential implications of this issue, it is important to determine whether fibrosis appears only in the infarcted tissue or if it also affects the remote region in reperfused MI. We aimed to answer this question via a multidisciplinary approach using myocardial samples obtained from an *in vivo* swine model of anterior MI followed by 1-month reperfusion, from the myocardial samples taken during the autopsies of patients with a previous MI and from the extracellular volume fraction (ECV) studies of patients who had had a previous MI and subsequently underwent cardiac magnetic resonance (CMR)-T1 mapping.

Methods

Experimental Study

Eighteen female juvenile domestic pigs weighing 25–30 kg were used. Additional details on our experimental protocol can be consulted in previous works [9, 10]. A continuous electrocardiographic monitoring of heart rate, rhythm, and ST-segment changes was performed. Intramuscular ketamine (8 mg/kg) and medetomidine (0.1 mg/kg) were used for sedation. Pigs were anesthetized using a 10-mg/kg/h continuous intravenous infusion of 2 % propofol. They were pretreated with intravenous amiodarone (300 mg) and lidocaine (30 mg) to diminish life-threatening arrhythmias and with heparin (3000 U). To monitor blood pressure and to access the left anterior descending coronary artery (LAD), a 7F sheath was introduced into the right femoral artery. The proximal LAD was selectively engaged by a 7F Amplatz Left 0.75 catheter, and a standard hydrophilic angioplasty wire was advanced and placed in the distal LAD. An over-the-wire balloon was inflated at 6 atm in the mid LAD distal to the first diagonal branch. Coronary artery occlusion was confirmed by contrast injection and by electrocardiographic ST-segment elevation.

Three groups of experiments were performed: control group and 1-week and 1-month reperfusion groups. In the 1-week and 1-month reperfusion groups, after 90 min of coronary occlusion, the balloon was deflated, and the restoration of normal coronary flow was documented by angiography. Subsequently, animals were allowed to recover, and after 1 week ($n=5$) or 1 month ($n=5$), 20 ml of 4 % Thioflavin-S (TS) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) solution was infused into the mid left anterior descending coronary artery through the lumen of an inflated over-the-wire balloon. Hearts were then arrested using potassium chloride and excised.

The control group consisted of five experiments. In this group, the same study protocol was followed, but the angioplasty balloon was not inflated; thus, ischemia and infarction were not induced.

Macroscopic Study of Myocardial Samples

Hearts were excised and photographed. After sectioning the heart into 5-mm-thick short-axis slices, images were taken under ultraviolet light to assess the area at risk (showing TS staining). Afterwards, sections were incubated in 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTZ) (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) 2 % solution and photographed under room light.

Images were digitalized, and manual quantification of all short-axis slices was performed in a dedicated laboratory by an experienced observer unaware of the protocol applied in each experiment. The MATLAB 8.4 software package (The MathWorks, Inc., Natick, MA, USA) was used. In all images, a ruler was photographed beside the myocardial slices as a reference for measurements. This, along with the predefined slice thickness (5 mm), permitted the calculation of the left ventricle myocardial volume.

Infarct tissue (expressed as the percentage of the left ventricle) was defined as the myocardial area that did not stain with TTZ and was interpreted as necrosis in the 1-week reperfusion model and as fibrosis in the 1-month reperfusion model. Adjacent area was defined as the noninfarcted territory within the area at risk clearly out of the infarcted area (with TTZ and TS staining). Remote area was defined as the area out of the area at risk (without TS staining) (Fig. 1).

Microscopic Study of Myocardial Samples

Picrosirius Staining The protocol followed is detailed in Online Resource 1. The presence of fibrosis was analyzed in the infarct, adjacent, and remote areas using a polarized filter that permitted the measurement of total collagen content. Quantification of collagen was carried out using Image-Pro

Plus 6.0 software (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA) and was expressed as a percentage per field (Fig. 2).

Detection of Myofibroblasts The detection of myofibroblasts was determined in sections from the infarct, adjacent, and remote areas according to previously published methodology using alpha-smooth muscle actin (α -SMA) immunohistochemistry [5, 6] (Fig. 2). The protocol used is detailed in Online Resource 1. The quantification of myofibroblasts (expressed as a percentage of total cells) was assessed by image analysis using Image-Pro Plus 6.0 software.

Transmission Electron Microscopy Sections from the infarct, adjacent, and remote regions were visualized with transmission electron microscopy. Samples were fixed in 2.5 % glutaraldehyde and then in osmium tetroxide. Afterwards, semithin and then ultrathin sections were prepared, and images for each sample were captured using a JEM-1010 (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) at $\times 2000$ magnification (Fig. 2).

Magnetic Resonance Microimaging

High spatial resolution images were acquired at room temperature in a 14-T vertical axis magnet. The equipment used and the technical characteristics of the sequences are detailed in Online Resource 1.

Five regions of interest with an area of 1 cm² were selected from each slice from areas with infarct, adjacent, and remote tissue. The three different areas were sampled based on the same definitions as those above using TTZ and TS staining. T1-weighted images were used for the anatomical description of the samples (Fig. 3). T2-weighted values were calculated in MATLAB 8.4 and were normalized to the value of agarose.

Molecular Analysis

Samples from the infarct, adjacent, and remote areas, as previously defined, were obtained for molecular analyses. The gene expressions of the fibrosis markers transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), collagen type I alpha 1 (COL1A1), collagen type I alpha 2 (COL1A2), and collagen type III alpha 1 (COL3A1) were assessed as described in Online Resource 1 (Fig. 4).

Study in Patient Samples

Postmortem myocardial tissue was obtained from the autopsies of eight patients with a previous reperfused MI (more than 6 months after acute MI). Regions of interest were imaged from the infarct ($n=40$), adjacent ($n=40$),

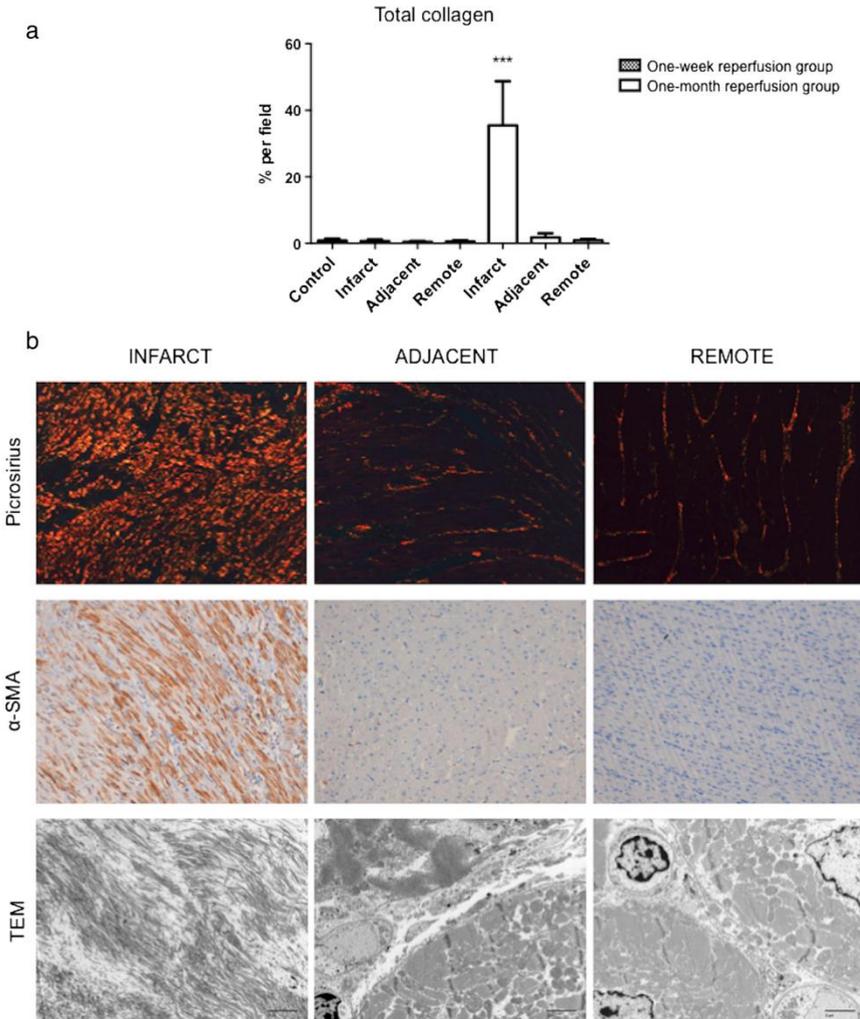


Fig. 2 Microscopic study of fibrosis in myocardial samples obtained from the swine model. **a** Total collagen quantification (expressed as a percentage per field) in the infarct, adjacent, and remote areas of the 1-week and 1-month reperfusion groups. The collagen content in the remote areas was similar to that for controls. A total of 120 fields from the infarct ($n=40$), adjacent ($n=40$), and remote ($n=40$) areas from five swine of the 1-week and 120 fields from five swine of the 1-month reperfusion groups were analyzed. Furthermore, 40 fields were analyzed from the control group. *** $p < 0.0001$. **b** Images of picrosirius staining

corresponding to fibrosis (*upper panels*), α -SMA immuno histochemistry corresponding to myofibroblasts (*middle panels*), and TEM images (*lower panels*) from the infarct, adjacent, and remote areas of the 1-month reperfusion group. An increase in collagen content was observed in the infarct region but not in the remote areas. In parallel to collagen accumulation, myofibroblasts were observed only in the infarct areas. TEM captions confirmed the increase in collagen fibers in the infarct area but not in the remote regions. α -SMA α -smooth muscle actin, TEM transmission electron microscopy

and remote areas ($n=32$). Additionally, myocardial samples of the autopsies of four patients with no evidence of MI or other structural cardiac abnormalities were used as

controls; 32 regions of interest were photographed in this case. The clinical data and autopsy results of patients are described in Table 1.

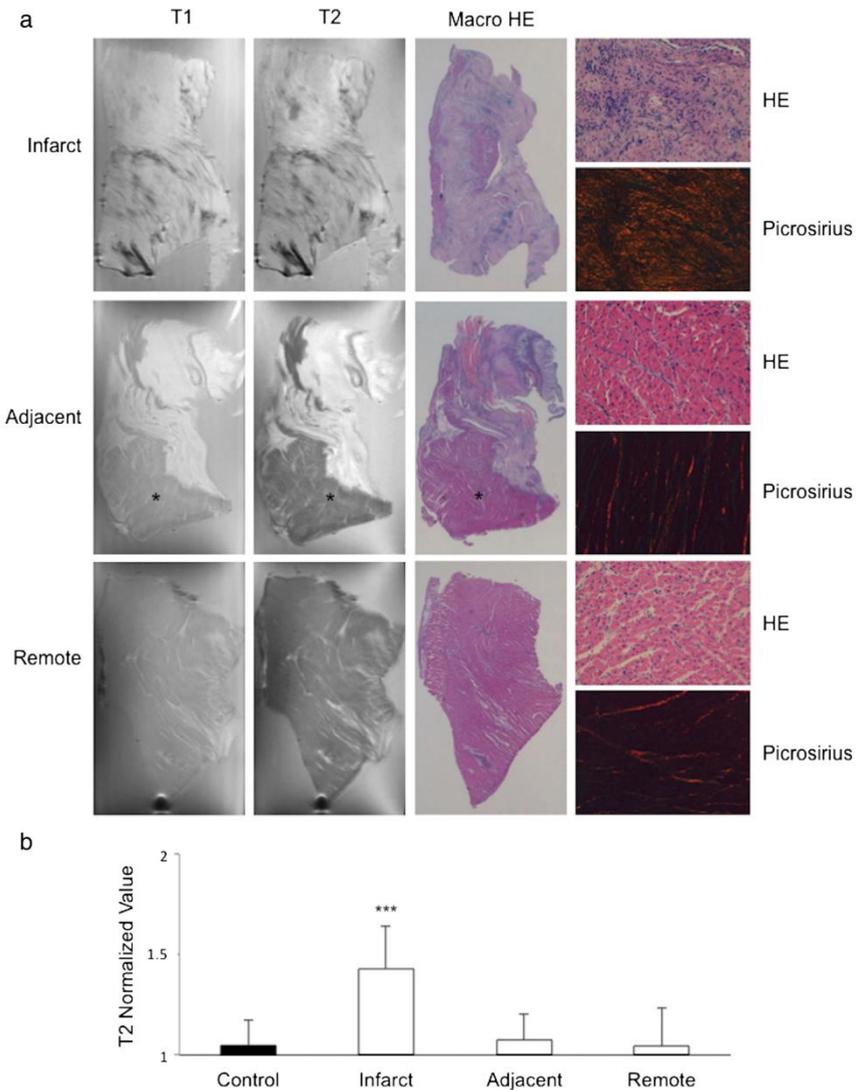


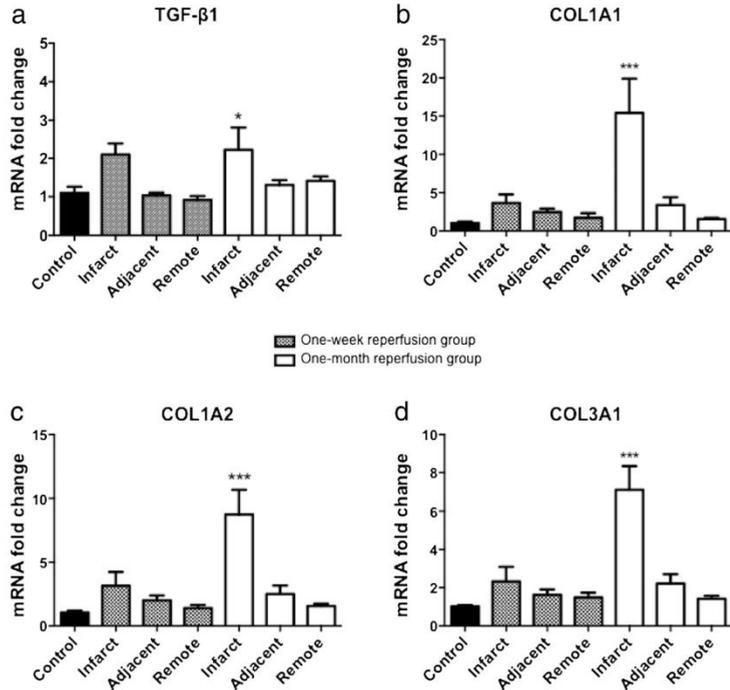
Fig. 3 Magnetic resonance microimaging in myocardial samples obtained from the swine model. **a** T1- and T2-weighted images (*first* and *second* columns, respectively) and HE staining (*third* column) of samples from the infarct, adjacent, and remote regions of the 1-month reperfusion model. The *fourth* column illustrates regions of interest stained with HE and picrosirius photographed at $\times 20$ magnification.

T1-weighted images were used for the anatomical description of the samples. In the adjacent areas (*middle panels*), a perfect differentiation between the infarcted and healthy tissue (*asterisk*) was observed. **b** T2 normalized values of control, infarct, adjacent, and remote regions. T2 values of remote areas were similar to those obtained in the control group. *** $p < 0.0001$. HE hematoxylin-eosin

A microscopic study of the myocardial samples was performed following the same protocol described for the

experimental samples (staining with picrosirius and α -SMA analysis, Fig. 5).

Fig. 4 Molecular study of fibrosis markers in myocardial samples of the swine model. Gene expression of fibrosis markers was higher than that for controls only in the infarct area of the 1-month reperfusion model. TGF- β 1 (a), COL1A1 (b), COL1A2 (c), and COL3A1 (d) gene expression in the infarct, adjacent, and remote areas from the 1-week ($n=5$) and 1-month ($n=5$) reperfusion groups and from the control group ($n=5$). * $p < 0.05$; *** $p < 0.0001$. COL1A1 collagen type I alpha 1, COL1A2 collagen type I alpha 2, COL3A1 collagen type III alpha 1, TGF- β 1 transforming growth factor- β 1



ECV in Patients Using CMR-T1 Mapping

The ECV was measured in 23 subjects submitted to CMR-T1 mapping: 14 patients with a previous reperfused MI (>6 months) and nine controls with no evidence of structural abnormalities in CMR. The baseline and CMR characteristics of patients and controls are displayed in Online Resource 2. Patients with a previous diagnosis of hypertrophic or hypertensive cardiomyopathy by echocardiography were excluded from the study. Additional information about CMR-T1 mapping data acquisition and processing and the technical characteristics of the equipment and sequences used are available in Online Resource 1.

Overall, the ECV was determined in 330 myocardial segments: control ($n=134$), infarct ($n=37$), adjacent ($n=75$), and remote ($n=84$) regions (Fig. 6a).

Statistical Analysis

Continuous data are expressed as the mean \pm standard deviation. A Student's t test was used when comparing two groups, and one-way ANOVA and Dunnett's test were used when comparing more than two groups. Percentages were compared

using the χ^2 test or Fisher's exact test when appropriate. Statistical significance for two-tailed was considered to be $p < 0.05$. GraphPad Prism 6.0 (GraphPad, La Jolla, CA, USA) was used throughout.

Results

Experimental Study

Three experiments were not completed: two due to refractory ventricular fibrillation and one due to technical problems with the radiology equipment. Fifteen experiments were successfully conducted. Electrical ventricular defibrillation was needed in seven pigs during left anterior descending coronary artery occlusion. No significant complications were recorded over the reperfusion period.

Macroscopic Study of Myocardial Samples

Necrosis (27.33 ± 7.35 % of left ventricular volume in the 1-week reperfusion group) and fibrosis (14.79 ± 3.89 % of left

Table 1 Clinical data and autopsy results of patients

| | Clinical data | Autopsy results |
|-----------|---|---|
| Patient 1 | 77-year-old male Time elapsed since infarction: 7 years Cause of death: heart failure | Infarct scar area: 2 × 3 cm lateral wall of the left ventricle Infarct scar area: 2.5 × 0.7 cm interventricular septum |
| Patient 2 | 82-year-old male Time elapsed since infarction: 11 years Cause of death: heart failure | Infarct scar area: anterolateral wall of the left ventricle ^a |
| Patient 3 | 58-year-old male Time elapsed since infarction: 1 year Cause of death: reinfarct | Infarct scar area: 6.5 × 7.5 cm anterior wall of the right ventricle |
| Patient 4 | 78-year-old male Time elapsed since infarction: 1 year Cause of death: cardiogenic shock | Infarct scar area: interventricular septum ^a |
| Patient 5 | 55-year-old male Time elapsed since infarction: 1 year Cause of death: stroke | Infarct scar area: 2 × 2 cm interventricular septum |
| Patient 6 | 56-year-old male Time elapsed since infarction: 1 year Cause of death: cardiac rupture | Infarct scar area: posterolateral wall of the left ventricle ^a |
| Patient 7 | 61-year-old female Time elapsed since infarction: 1 year Cause of death: heart failure | Infarct scar area: lateral wall and 7 cm of the interventricular septum |
| Patient 8 | 84-year-old male Time elapsed since infarction: 8 years Cause of death: reinfarct, acute pyelonephritis | Infarct scar area: posterior wall of the left ventricle ^a |

^a In patients 2, 4, 6, and 8, infarct size was not quantified but was visually described in the autopsy report

ventricular volume in the 1-month reperfusion group) were detected only in the infarct area. At the macroscopic level, myocardial fibrosis was not observed in the adjacent or remote areas in any case (Fig. 1).

Microscopic Study of Myocardial Samples

The infarct, adjacent, and remote areas of the 1-week reperfusion group displayed similar amounts of total collagen content compared with that for controls ($p > 0.05$) (Fig. 2a).

In the 1-month reperfusion group, in comparison with controls, collagen content dramatically increased only in the infarcted region ($p < 0.0001$). The quantity of total collagen content in the adjacent and remote regions of the 1-month reperfusion group was similar to that observed in the control group ($p > 0.05$) (Fig. 2a).

Myofibroblasts were observed only in the infarct area (52.36 % of total cells) of the 1-month reperfusion group (Fig. 2b).

Transmission Electron Microscopy Transmission electron microscopy captions mirrored the results obtained with optical microscopy: a substantial amount of collagen fibers was found

in the infarct region but not in the adjacent or remote areas (Fig. 2b).

Magnetic Resonance Microimaging

Samples obtained from the 1-month reperfusion model were studied using magnetic resonance microimaging. The magnetic resonance images were closely correlated to the histopathology findings (Fig. 3a). In T1 and T2 images, the infarct area appeared as a hyperintense region, and the remote noninfarcted area appeared as a dark gray region. In the sample obtained from the adjacent area, a very clear differentiation between infarcted and healthy tissue was visualized. These findings correlated to those obtained with hematoxylin-eosin where the remote and adjacent zones appeared as preserved tissue. Picrosirius staining confirmed the presence of the fibrotic scar in the infarcted tissue and the absence of structural damage in the adjacent and remote regions (Fig. 3a).

Significant differences in T2 values were found between the control group (1.05 ± 0.13) and the infarct region (1.43 ± 0.21 ; $p < 0.0001$). However, no differences were observed between the T2 values of the control

group and the adjacent (1.08 ± 0.12) and remote regions (1.04 ± 0.19) ($p > 0.05$) (Fig. 3b).

Molecular Analysis

Gene expression of fibrosis markers was higher than controls in the infarct area but not in the adjacent or remote areas. In the 1-month reperfusion group, TGF- β 1 mRNA levels were significantly augmented in the infarct tissue ($p < 0.05$) but not in the adjacent and remote regions when compared with those for controls ($p > 0.05$, Fig. 4).

Gene expression of all types of collagen (COL1A1, COL1A2, COL3A1) was higher than that for controls in the infarct area of the 1-month reperfusion group ($p < 0.0001$) but not so for the noninfarcted zones (adjacent and remote) nor for the samples obtained from the 1-week reperfusion group ($p > 0.05$) (Fig. 4).

Study in Patient Samples

Myocardial samples obtained from eight patients with a previous MI and four controls were analyzed. The baseline characteristics and autopsy results of patients are described in Table 1. In all patients, a previous history of MI had been documented, and autopsies revealed a fibrotic scar in all cases. In controls, MI and any other cardiac diseases had been ruled out both in the clinical records and in the autopsy analyses.

In parallel to experimental data, the amount of total collagen compared with that for controls increased only in the infarct area ($p < 0.0001$) and not in the noninfarcted zones ($p > 0.05$) (Fig. 5a, b). Myofibroblasts were identified in three patients. In all cases, myofibroblasts were detected only in the infarcted area (34.78 % of total cells) and not in the adjacent or remote regions (Fig. 5b).

ECV in Patients Using CMR-T1 Mapping

No significant differences were found among the myocardial ECV in control segments (26.5 ± 4.1 %) and adjacent (27.7 ± 4.4 %; $p > 0.05$) and remote myocardial segments (27.1 ± 3.7 %; $p > 0.05$). Segments located in the infarct area displayed significantly more ECV compared with those for controls (29.9 ± 5.7 %; $p < 0.0001$) (Fig. 6b).

Discussion

The main finding of the present study is that in reperfused MI, the collagen content and fibrotic markers in the remote region do not significantly differ from those observed in control samples. These results were obtained from a swine model of anterior MI followed by a 1-month reperfusion, from autopsy

samples of patients with a previous MI and from CMR-T1 mapping studies of patients with a previous MI.

Myocardial Fibrosis Paradigm

After MI, the wound-healing process consists of the removal of the necrotic tissue by inflammatory cells and the deposition of new collagen by myofibroblasts to produce strong scar tissue [1]. Ideally, the deposition of new collagen takes place only in the infarct zone leading to an adequately healed MI. Nevertheless, it has been observed that a phenomenon referred to as reactive fibrosis can also occur in noninfarcted areas. This phenomenon has been associated with left ventricular remodeling and heart failure [1].

The relevance of reactive fibrosis in the pathophysiology of left ventricular remodeling after MI has been documented in clinical and experimental scenarios where large nonreperfused infarctions were considered [3–8]. Based on this, it has been hypothesized that the effect of some therapies, such as renin-angiotensin inhibitors, would be mediated by the blockage of the appearance of reactive fibrosis [1]. Nevertheless, pathological data in human samples [11] and recent data derived from imaging techniques in swine experiments [12] have questioned the concept of reactive fibrosis. Furthermore, reperfusion therapy is nowadays the standard clinical management in patients with MI. Consequently, to a great extent, the myocardium is salvaged in most patients and infarct sizes are reduced.

Given the potential implications in terms of understanding both the pathophysiology of left ventricular remodeling, as well as the therapeutic implications derived from this pathway, it is of utmost importance to clarify the significance of reactive fibrosis in remote areas of reperfused infarcts. To assess this issue, we performed a multidisciplinary study to evaluate the presence and magnitude of fibrosis in the remote region of the infarcted heart. To accomplish this, we used myocardial samples from an experimental swine model with MI followed by 1-month reperfusion, samples from human autopsies, and CMR-T1 mapping studies of patients with a previous reperfused MI.

Experimental Study

Some studies have documented that collagen accumulation occurs not only in the infarct region but also in the remote noninfarcted myocardium. A detailed examination, however, reveals that these studies were performed in models of permanent coronary ligation without reperfusion, resulting in extensive necrotic areas [4, 6, 8, 13, 14]. Moreover, the presence of reactive fibrosis after MI has not been confirmed by all authors. Monreal et al., in a post-MI heart failure model in sheep, observed that fibrosis in noninfarcted myocardium 4 months

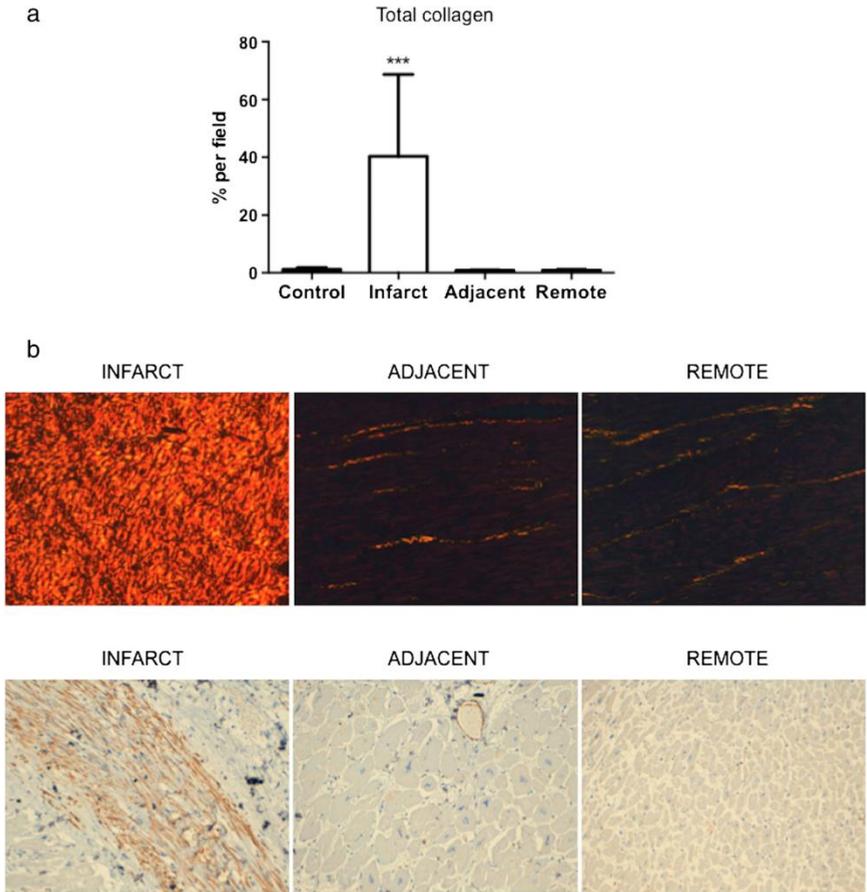


Fig. 5 Microscopic study of fibrosis in myocardial samples obtained from autopsies of patients with a previous MI. **a** Total collagen quantification (expressed as a percentage per field) in the infarct, adjacent, and remote areas. The collagen content in the remote areas was similar to that for controls. A total of 40 fields from the infarct, 40 from the adjacent, and 32 from the remote areas from eight patients were

analyzed. Furthermore, 32 fields were measured from four controls. $***p < 0.0001$. **b** Images of picrosirius staining (*upper panels*) and α -SMA immunohistochemistry (*lower panels*) from the infarct, adjacent, and remote areas. In parallel to collagen accumulation, myofibroblasts (as derived from α -SMA immunohistochemistry) were observed only in the infarct areas. α -SMA α -smooth muscle actin, MI myocardial infarction

postinfarction was similar to that for controls [15]. Recently, Tarkia et al. used different imaging techniques and histology to evaluate a pig model and did not detect an increase of interstitial fibrosis in the remote segments when compared with controls [12].

Our results show that in a reperfused model 1 month after MI, at the macroscopic and microscopic levels, a significant increase in collagen content was only observed in the infarct regions. In the remote areas, the results obtained were in all cases similar to those found in controls. In our study, COL1A1, COL1A2, and COL3A1 levels in the remote region were similar to those for controls. In parallel to the dynamics

of collagen, we only detected an increase of TGF- β in the infarct regions. TGF- β plays a central role in myofibroblast transdifferentiation and, thus, in post-MI remodeling [16]. Although some authors have detected an increase in TGF- β gene expression in the remote zones soon after MI [6, 17], our results paralleled other findings where TGF- β gene expression was not increased in the noninfarcted zones even later after MI [18].

Myofibroblasts are the crucial cell type in the fibrotic process. In accordance with previous results [6, 19], we only detected myofibroblasts in the infarcted area, not in the remote regions.

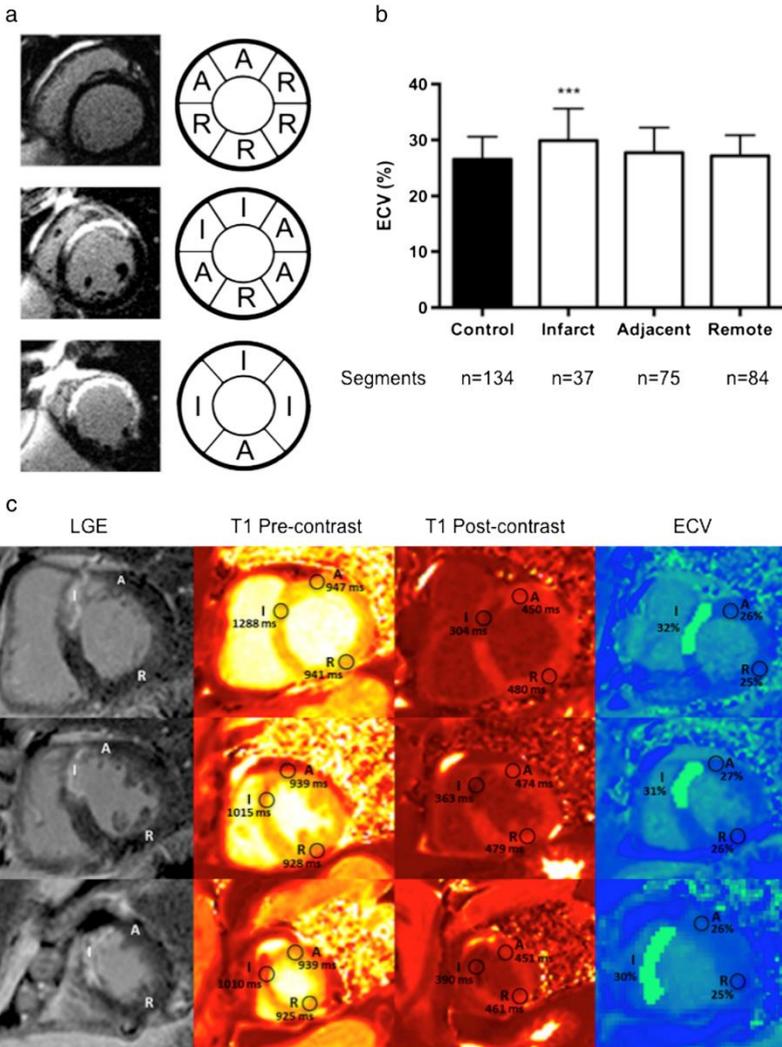


Fig. 6 ECV in patients with a previous MI submitted to CMR-T1 mapping. **a** Segment classification according to LGE images and the 16-segment model. **b** Percentage of ECV quantified in segments from the infarct ($n=37$), adjacent ($n=75$), and remote areas ($n=84$) from 14 patients and nine controls ($n=134$). ECV of segments located in the remote area were similar to that for controls. $***p<0.0001$. **c** The

panel illustrates an example of LGE images (*left panels*), T1 mapping pre- and postcontrast images (*middle panels*), and ECV images (*right panels*) and the values obtained in the infarct, adjacent, and remote areas of a patient with anterior MI. *A* adjacent, *CMR* cardiac magnetic resonance, *ECV* extracellular volume fraction, *I* infarct, *LGE* late gadolinium enhancement, *MI* myocardial infarction, *R* remote

Additionally, we carried out an original approach for assessing fibrosis in reperfused myocardial samples using

magnetic resonance microimaging. This technique has not been used in myocardial samples but has been successfully

applied to assessing tissue characteristics in brain samples [20]. In parallel to our findings at the macroscopic, microscopic, and molecular levels, a dramatic increase in fibrosis was detected in the infarct area in the 1-month reperfusion model, whereas in the remote zone, values did not significantly differ from those for controls. Interestingly, there was a very clear differentiation between healthy and fibrotic tissue within the infarct periphery that perfectly mirrored the histologic analyses (Fig. 3).

In summary, our study suggests that in a highly controlled swine model of reperfused MI, the extent of collagen content in the remote areas 1 month after reperfusion was not significantly higher than that observed in controls. To confirm these observations in patients, we analyzed the presence and extent of fibrosis in myocardial samples obtained from both the autopsies of patients with a previous MI, as well as from the CMR-T1 mapping studies of patients with a previous MI.

Study in Patients

The results obtained using human samples paralleled those observed in the experimental group: collagen content was higher than that for controls in the infarct area but not in the remote zones.

Data derived from human studies are scarce and controversial. Beltrami et al. found multiple sites of replacement fibrosis in noninfarcted tissue in hearts from patients who underwent cardiac transplantation for advanced heart failure secondary to severe coronary artery disease and ischemic cardiomyopathy. Those patients had not undergone a previous coronary intervention [3]. Nevertheless, Marijjanowski et al. studied the collagen content in 15 human hearts obtained from autopsies or explants and observed through biochemical and histochemical methods that the total collagen amount in noninfarcted myocardium remote from the infarct tissue did not differ from that in reference hearts. They concluded that the process of necrotic myocardium replacement leading to scar formation was not associated with the interstitial fibrosis of noninfarcted myocardium [11].

In general, myofibroblasts disappear a few weeks or months after MI. It has been reported, however, that they can persist for years after MI [1, 19]. We detected the presence of myofibroblasts only in the infarct region in three out of eight patients with MI.

T1 mapping has emerged as a gold standard technique for the quantification of myocardial fibrosis. The presence of fibrosis has been demonstrated in patients with hypertrophic cardiomyopathy, severe aortic stenosis, and cardiac amyloidosis [21]. Patients with myocardial hypertrophy secondary to hypertension or to a previous cardiomyopathy demonstrated by echocardiography were excluded from our study group.

To assess the amount of fibrosis in remote areas, we conducted a CMR-T1 mapping study on a segmental basis. This methodology allowed us to focus on the values of ECV in regions clearly remote from the infarcted tissue. Our data showed that ECV was clearly elevated in infarct segments, but the myocardial ECV found in the remote regions was similar to that found in controls. Thus far, studies focusing on the magnitude of ECV using T1 mapping in patients with a previous MI on a segmental basis have been scarce. Ugander et al. reported a correlation between ECV in noninfarcted segments and left ventricular ejection fraction. However, when looked at in detail and in parallel to our findings, ECV values in noninfarcted segments were almost identical to those for control segments [22].

Although we have justified the differences between our studies and others to be the result of reperfusion and infarct expansion, we cannot exclude the effects of aging. A relationship between age and collagen content has been demonstrated in several works [22, 23]. The increase in collagen content can be explained by a loss of cardiomyocytes leading to a hypertrophy of the remaining cardiomyocytes [24] and to replacement fibrosis [25]. Even though the mean age from other studies [3, 11, 22] is similar to that for our group of patients, it is important to consider age-dependent mechanisms when new therapeutic strategies are identified [25].

In summary, although fibrosis could play a role in patients with severe heart failure and nonreperfused coronary arteries, our results in patients mirror our experimental data and confirm that after MI, the amount of fibrotic markers in the remote area does not significantly differ from that for controls.

Study Limitations

The main limitation of the present study is the duration of the experimental model in pigs since it is possible that distal fibrosis could occur posterior to 1 month. However, including patients with a previous MI allowed the study of fibrosis at a time even later after MI. Based on our results, we can only infer that in a highly controlled reperfused swine model, collagen content at remote regions is similar to that for controls. In order to be able to confidently declare that it is reperfusion that prevents remote fibrosis, an experimental model without reperfusion and randomized trials in patients are necessary.

Conclusions

In an experimental model of 1-month reperfused anterior MI, in myocardial samples of autopsies of patients with a previous MI and in ECV studies of patients with a previous MI submitted to CMR-T1 mapping, the remote zone did not show a significant increase in fibrosis content when compared with that for controls. The relevance of the role of remote myocardial fibrosis in the pathophysiology of left ventricular

remodeling in the current era of universal reperfusion may need reconsideration.

Compliance with Ethical Standards

Human Subjects Statement All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and national research committees and conform to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki as revised in 2000.

Animal Studies Statement The local Animal Care and Use Committee approved the study, and it conforms to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1993).

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflicts of interest.

Informed Consent Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

Sources of Funding This work was supported by the ‘Instituto de Salud Carlos III’ and co-funded by ‘FEDER’ [grant numbers PI14/00271, PI15/00013] and by the ‘Generalitat Valenciana’ [grant number PROMETEO/2013/007].

References

- van den Borne, S. W. M., Diez, J., Blankesteijn, W. M., Verjans, J., Hofstra, L., & Narula, J. (2010). Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts. *Nature Reviews Cardiology*, 7, 30–37.
- Daskalopoulos, E. P., Janssen, B. J. A., & Blankesteijn, W. M. (2012). Myofibroblasts in the infarct area: concepts and challenges. *Microscopy and Microanalysis*, 18, 35–49.
- Beltrami, C. A., Finato, N., Rocco, M., Feruglio, G. A., Puricelli, C., Cigola, E., Quaini, F., Sonnenblick, E. H., Olivetti, G., & Anversa, P. (1994). Structural basis of end-stage failure in ischemic cardiomyopathy in humans. *Circulation*, 89, 151–163.
- Cleutjens, J. P. M., Verluyten, M. J. A., Smiths, J. F. M., & Daemen, M. J. A. P. (1995). Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart. *American Journal of Pathology*, 147, 325–338.
- Sun, Y., & Weber, K. T. (2000). Infarct scar: a dynamic tissue. *Cardiovascular Research*, 46, 250–256.
- Sun, Y., Zhang, J. Q., Zhang, J., & Lamparter, S. (2000). Cardiac remodeling by fibrous tissue after infarction in rats. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 135, 316–323.
- Sun, Y. (2009). Myocardial repair/remodeling following infarction: roles of local factors. *Cardiovascular Research*, 81, 482–490.
- dos Santos, L., Gonçalves, G. A., Davel, A. P., Santos, A. A., Krieger, J. E., Rossoni, L. V., & Tucci, P. J. (2013). Cell therapy prevents structural, functional and molecular remodeling of remote non-infarcted myocardium. *International Journal of Cardiology*, 168, 3829–3836.
- Hervas, A., de Dios, E., Forteza, M. J., Miñana, G., Nuñez, J., Ruiz-Sauri, A., Bonanad, C., Perez-Sole, N., Chorro, F. J., & Bodi, V. (2015). Intracoronary infusion of thioflavin-S to study microvascular obstruction in a model of myocardial infarction. *Revista Española de Cardiología*, 68, 928–934.
- Hervas, A., Ruiz-Sauri, A., de Dios, E., Forteza, M. J., Minana, G., Nunez, J., Gomez, C., Bonanad, C., Perez-Sole, N., Gavara, J., Chorro, F. J., & Bodi, V. (2016). Inhomogeneity of collagen organization within the fibrotic scar after myocardial infarction: results in a swine model and in human samples. *Journal of Anatomy*, 228, 47–58.
- Marijjanowski, M. M. H., Teeling, P., & Becker, A. E. (1997). Remodeling after myocardial infarction in humans is not associated with interstitial fibrosis of noninfarcted myocardium. *Journal of the American College of Cardiology*, 30, 76–82.
- Tarkia, M., Stark, C., Haavisto, M., Kentala, R., Vähäsilta, T., Savunen, T., Strandberg, M., Hynninen, V. V., Saunavaara, V., Tolvanen, T., Teräs, M., Rokka, J., Pietilä, M., Saukko, P., Roivainen, A., Saraste, A., & Knuuti, J. (2015). Cardiac remodeling in a new pig model of chronic heart failure: assessment of left ventricular functional, metabolic, and structural changes using PET, CT, and echocardiography. *Journal of Nuclear Cardiology*, 22, 655–665.
- van den Borne, S. W. M., Isobe, S., Verjans, J. W., Petrov, A., Lovhaug, D., Li, P., Zandbergen, H. R., Ni, Y., Frederik, P., Zhou, J., Arbo, B., Rogstad, A., Cuthbertson, A., Chettibi, S., Reutelingsperger, C., Blankesteijn, W. M., Smits, J. F., Daemen, M. J., Zannad, F., Vannan, M. A., Narula, N., Pitt, B., Hofstra, L., & Narula, J. (2008). Molecular imaging of interstitial alterations in remodeling myocardium after myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, 52, 2017–2028.
- Prat-Vidal, C., Gálvez-Montón, C., Nonell, L., Puigdecenet, E., Astier, L., Solé, F., & Bayes-Genis, A. (2013). Identification of temporal and region-specific myocardial gene expression patterns in response to infarction in swine. *PLoS ONE*, 8, e54785.
- Monreal, G., Nicholson, L. M., Han, B., Joshi, M. S., Phillips, A. B., Wold, L. E., Bauer, J. A., & Gerhardt, M. A. (2008). Cytoskeletal remodeling of desmin is a more accurate measure of cardiac dysfunction than fibrosis or myocyte hypertrophy. *Life Sciences*, 83, 786–794.
- Frangogiannis, N. G. (2014). The inflammatory response in myocardial injury, repair and remodeling. *Nature Reviews Cardiology*, 11, 255–265.
- Vilahir, G., Juan-Babot, O., Peña, E., Oñate, B., Casani, L., & Badimon, L. (2011). Molecular and cellular mechanisms involved in cardiac remodeling after acute myocardial infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 50, 522–533.
- Hao, J., Ju, H., Zhao, S., Junaid, A., Scammell-La Fleur, T., & Dixon, I. M. C. (1999). Elevation of expression of Smads 2, 3, and 4, decorin and TGF-beta in the chronic phase of myocardial infarct scar healing. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 31, 667–678.
- Willems, I. E. M. G., Havenith, M. G., De Mey, J. G. R., & Daemen, M. J. A. P. (1994). The alpha-smooth muscle actin-positive cells in healing human myocardial scars. *American Journal of Pathology*, 145, 868–875.
- Gonzalez-Segura, A., Morales, J. M., Gonzalez-Darder, J. M., Cardona-Marsal, R., Lopez-Gines, C., Cerda-Nicolas, M., & Monleon, D. (2011). Magnetic resonance microscopy at 14 Tesla and correlative histopathology of human brain tumor tissue. *PLoS One*, 6, e27442.
- White, S. K., Sado, D. M., Fontana, M., Banyersad, S. M., Maestrini, V., Flett, A. S., Piechnik, S. K., Robson, M. D., Hausenloy, D. J., Sheikh, A. M., Hawkins, P. N., & Moon, J. C. (2013). T1 mapping for myocardial extracellular volume measurement by CMR: bolus only versus primed infusion technique. *JACC Cardiovascular Imaging*, 6, 955–962.
- Ugander, M., Oki, A. J., Hsu, L. Y., Kellman, P., Greiser, A., Aletras, A. H., Sibley, C. T., Chen, M. Y., Bandettini,

- W. P., & Arai, A. E. (2012). Extracellular volume imaging by magnetic resonance imaging provides insights into overt and sub-clinical myocardial pathology. *European Heart Journal*, 33, 1268–1278.
23. de Souza, R. R. (2002). Aging of myocardial collagen. *Biogerontology*, 3, 325–335.
24. Olivetti, G., Melissari, M., Capasso, J. M., & Anversa, P. (1991). Cardiomyopathy of the aging human heart. Myocyte loss and reactive cellular hypertrophy. *Circulation Research*, 68, 1560–1568.
25. Horn, M. A., & Trafford, A. W. (2015). Aging and the cardiac collagen matrix: novel mediators of fibrotic remodelling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. doi:10.1016/j.yjmcc.2015.11.005.

Title: A multidisciplinary assessment of remote myocardial fibrosis after reperfused myocardial infarction in swine and patients

Journal of Cardiovascular Translational Research

Authors:

Arantxa Hervás MSc, Amparo Ruiz-Sauri MD PhD, Jose Gavara MSc, Jose V. Monmeneu MD PhD, Elena de Dios MSc, Cesar Rios-Navarro MSc, Nerea Perez-Sole BSc, Itziar Perez MSc, Daniel Monleon PhD, Jose M. Morales PhD, Gema Minana MD PhD, Julio Nunez MD PhD, Clara Bonanad MD PhD, Ana Diaz PhD, Jose M. Vila MD PhD, Francisco J. Chorro MD PhD, Vicente Bodi MD PhD.

Corresponding authors:

- Prof. Vicente Bodi MD, PhD, FESC, FACC. Cardiology Department. Hospital Clinico Universitario. University of Valencia. INCLIVA. Blasco Ibanez 17, 46010, Valencia (Spain). Fax: +34-96-1973979 Telephone: +34-96-1973523 E-mail: vicente.bodi@uv.es

- Prof. Amparo Ruiz-Sauri MD, PhD. Pathology Department. University of Valencia. Blasco Ibanez 17, 46010, Valencia (Spain). Telephone: +34-96-3983952 E-mail: amparo.ruiz-sauri@uv.es

Online Resource 1. Expanded methodology used in the study

Abbreviations

α -SMA = alpha-smooth muscle actin

CMR = cardiac magnetic resonance

COL1A1 = Collagen Type I alpha 1

COL1A2 = Collagen Type I alpha 2

COL3A1 = Collagen Type III alpha 1

ECV = extracellular volume fraction

FISP = True Fast Imaging with Steady State Precession

MOLLI = Modified Look-Locker Inversion Recovery

TE = echo time

TGF- β 1 = transforming growth factor- β 1

TR = repetition time

METHODS

Microscopic study of myocardial samples

Picrosirius staining

Samples were embedded in paraffin and sectioned at 5 μm . Sections were stained in 0.1% Direct Red 80 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) in saturated picric acid [1] and examined with an optic microscope, Leica DMD 108 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Eight photographs at 20X magnification were taken from the different parts of each sample (infarct, adjacent and remote areas) and were measured by a single investigator using Image Pro Plus 6.0 software (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA).

Detection of myofibroblasts

The primary antibody anti alpha-smooth muscle Actin (α -SMA) (Abcam, Cambridge, UK) was incubated overnight at 4°C. Afterwards, a 45 min incubation with secondary antibody Polyclonal Goat Anti-rabbit Immunoglobulins/HRP (Dako Denmark, Glostrup, Denmark) was performed to amplify the primary antibody signal. Eight photographs at 20X magnification were taken from the different parts of each sample using an optic microscope, Leica DMD 108. The α -SMA positive cells in blood vessel walls (smooth muscle cells) were manually excluded.

Magnetic Resonance Microimaging

High spatial resolution images were acquired at room temperature in a 14-T vertical axis magnet Bruker-AVANCE 600 system at a proton frequency of 600 MHz (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Germany) equipped with a 10 mm microimaging ^1H coil tuned to the appropriate proton frequency. Maximal gradient strength was 210 gauss cm^{-1} .

Two-dimensional multislice spin-echo images were acquired using ParaVision software (Bruker BioSpin MRI GmbH, Ettlingen, Germany) with different combinations of repetition time (TR) and echo time (TE) in order to obtain different image contrasts. For T2-weighted images, a TurboRare-T2 sequence was used (TR, 4000 msec; TE, 38.4 msec; average, 64; flip angle, 180 deg). For T1-weighted images, a Rare-T1 sequence was utilized (TR, 1500 msec; TE, 9.3 msec; average, 128; flip angle, 180 deg). Matrix resolution was 256 x 256 pixels.

The measurement system allowed for a nearly free choice of slice selection and orientation. We selected the slice orientation that provided the largest slice image area. Five regions of interest with an area of 1 cm² were selected for each slice from infarct, adjacent and remote areas. The presence of fibrosis was confirmed or discarded through the microscopic analysis of samples.

Sixteen TEs were taken and adjusted to a decreasing exponential function, which gave the value TR of T2. Regions of interest were selected, and an average value of T2 for all regions of interest was obtained. T2-weighted values were calculated in MATLAB 8.4 (The MathWorks, Inc., Natick, MA, USA) and were normalized to the value of agarose.

Molecular analysis

Samples were deep frozen with liquid nitrogen. RNA was extracted using an RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Gene expression of fibrosis markers was assessed by real time Polymerase Chain Reaction using a 7900HT Fast Real-Time Polymerase Chain Reaction System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in the infarct, adjacent and remote areas. The primers used are specified in Supplementary Table 1. The values of the threshold cycle (Ct) were determined and normalized to the housekeeping gene 18S ribosomal RNA.

Supplementary Table 1. Polymerase Chain Reaction primers used in the present study.

| Gene | Reference from Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific |
|-------------------------------|--|
| COL1A1 | Ss03373340_m1 |
| COL1A2 | Ss03375009_u1 |
| COL3A1 | Ss04323771_m1 |
| TGF-β | Ss03382325_u1 |
| 18S | 4319413E |

Extracellular volume fraction (ECV) in patients using cardiac magnetic resonance (CMR)-T1 mapping

A conventional cardiac-enabled magnetic resonance imaging scanner 1.5-T Avanto (Siemens Medical Solutions, Erlangen, Germany) was used. An expert observer blinded to all patient data quantified all studies. Traditional CMR parameters were obtained in cine sequences using the protocol previously described by our group [2].

Cine images were acquired in two-, three-, four-chamber and short axis views using a steady-state free precession sequence (TR msec/TE msec, 25/1.6; flip angle, 61°; matrix, 256 x 256; field of view, 320 x 270 mm; section thickness, 7 mm). Left ventricular ejection fraction, left ventricular end diastolic volume index, left ventricular end systolic volume index and left ventricular mass were calculated with manual planimetry of endocardial and epicardial borders on short-axis cine images.

Late gadolinium enhancement imaging was performed 10–15 minutes after administering 0.1 mmol/kg of gadolinium diethylenetriamine pentaacetic acid (Magnograf; Juste S.A.Q.F., Madrid, Spain) in the same locations as in cine imaging.

For this purpose, we used a segmented inversion recovery steady-state free precession sequence (TR msec/TE msec 750/1.26; flip angle, 45°; matrix resolution, 256 x 184; field of view, 340 x 235 mm; section thickness, 7 mm). Inversion time was adjusted to nullify healthy myocardium. These images were utilized to identify the different regions of interest, namely infarct, adjacent and remote territories.

The infarct region was considered as the zone displaying late gadolinium enhancement. Typically, in this region the signal intensity was higher than five standard deviations above that of a remote non-infarcted area in the same section. Subsequently, areas with late gadolinium enhancement were visually revised and quantified with manual planimetry. Infarct size was assessed as the percentage of left ventricular mass with late gadolinium enhancement. The adjacent region was defined as the segments next to the infarct region. The remote region was described as those segments that were separated by at least one segment from the infarct region (Figure 6). The 16-segment model was used for all purposes [3].

T1 Mapping was performed using electrocardiogram-triggered Modified Look-Locker Inversion Recovery (MOLLI). The 3(3)3(3)5 T1 mapping acquisition with a single-shot True Fast Imaging with Steady-State Precession (FISP) sequence was used (inversion time, 100 msec; TR msec/TE msec, 736/1.15; flip angle, 35°; matrix resolution, 270 x 360 pixels; section thickness, 8 mm; bandwidth, 930 Hz/pixel).

The T1 maps were acquired before the contrast injection (pre-contrast images) and 15 min after contrast agent bolus administration (post-contrast images). For each subject, three different slices were obtained (basal, medial and apical). ECV calculation was derived from the concentration of extracellular contrast agent in the myocardium relative to the blood in dynamic steady-state according to the previously described equation (Figure 6) [4-6]:

$$ECV = (1 - \text{hematocrit}) \frac{\left(\frac{1}{T1_{\text{myocardium post-contrast}}} - \frac{1}{T1_{\text{myocardium pre-contrast}}} \right)}{\left(\frac{1}{T1_{\text{blood post-contrast}}} - \frac{1}{T1_{\text{blood pre-contrast}}} \right)}$$

References

1. Osman OS, Selway JL, Harikumar PE, Stocker CJ, Wargent ET, Cawthorne MA, Jassim S, Langlands K (2013) A novel method to assess collagen architecture in skin. *BMC Bioinformatics* 14:260.
2. Bodi V, Monmeneu JV, Ortiz-Perez JT, et al (2016) Prediction of Reverse Remodeling at Cardiac MR Imaging Soon after First ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction: Results of a Large Prospective Registry. *Radiology* 278:54-63.
3. Cerqueira MD, Weissman NJ, Dilsizian V, et al (2002) Standardized myocardial segmentation and nomenclature for tomographic imaging of the heart. A statement for healthcare professionals from the cardiac imaging committee of the council on clinical cardiology of the American Heart Association. *Circulation* 105:539-542.
4. Arheden H, Saeed M, Higgins CB, Gao DW, Bremerich J, Wytenbach R, Dae MW, Wendland MF (1999) Measurement of the distribution volume of gadopentetate dimeglumine at echo-planar MR imaging to quantify myocardial infarction: comparison with ^{99m}Tc-DTPA autoradiography in rats. *Radiology* 211:698-708.
5. Flett AS, Hayward MP, Ashworth MT, Hansen MS, Taylor AM, Elliott PM, McGregor C, Moon JC (2010) Equilibrium contrast Cardiovascular Magnetic Resonance for the measurement of diffuse myocardial fibrosis: Preliminary validation in humans. *Circulation* 122:138-144.
6. Ugander M, Oki AJ, Hsu LY, et al (2012) Extracellular volume imaging by magnetic resonance imaging provides insights into overt and sub-clinical myocardial pathology. *Eur Heart J* 33:1268-1278.

Title: A multidisciplinary assessment of remote myocardial fibrosis after reperfused myocardial infarction in swine and patients

Journal of Cardiovascular Translational Research

Authors:

Arantxa Hervas MSc, Amparo Ruiz-Sauri MD PhD, Jose Gavara MSc, Jose V. Monmeneu MD PhD, Elena de Dios MSc, Cesar Rios-Navarro MSc, Nerea Perez-Sole BSc, Itziar Perez MSc, Daniel Monleon PhD, Jose M. Morales PhD, Gema Minana MD PhD, Julio Nunez MD PhD, Clara Bonanad MD PhD, Ana Diaz PhD, Jose M. Vila MD PhD, Francisco J. Chorro MD PhD, Vicente Bodi MD PhD.

Corresponding authors:

- Prof. Vicente Bodi MD, PhD, FESC, FACC. Cardiology Department. Hospital Clinico Universitario. University of Valencia. INCLIVA. Blasco Ibanez 17, 46010, Valencia (Spain). Fax: +34-96-1973979 and telephone number: +34-96-1973523. vicente.bodi@uv.es

- Prof. Amparo Ruiz-Sauri MD, PhD. Pathology Department. University of Valencia. Blasco Ibanez 17, 46010, Valencia (Spain). Telephone number: +34-96-3983952. amparo.ruiz-sauri@uv.es

Online Resource 2. Risk factors and baseline characteristics of controls and patients with a previous myocardial infarction submitted to cardiac magnetic resonance-T1 mapping.

| | Controls | Previous Infarct | p |
|---|-----------------|-------------------------|----------|
| | n = 9 | n = 14 | |
| Age (years) | 52 ± 18 | 62 ± 15 | 0.175 |
| Male (%) | 3 (33) | 8 (57) | 0.285 |
| Diabetes (%) | 0 (0) | 3 (21) | 0.149 |
| Arterial hypertension (%) | 0 (0) | 10 (71) | <0.001 |
| Dyslipidemia (%) | 3 (33) | 8 (57) | 0.285 |
| Smoker (%) | 1 (11) | 4 (29) | 0.344 |
| LV ejection fraction (%) | 70 ± 6 | 49 ± 22 | 0.011 |
| LV end diastolic volume index (ml/m²) | 81 ± 24 | 106 ± 39 | 0.111 |
| LV end systolic volume index (ml/m²) | 25 ± 11 | 61 ± 47 | 0.037 |
| LV mass index (g/m²) | 59 ± 16 | 77 ± 24 | 0.066 |
| Infarct size | 0 ± 0 | 20 ± 10 | <0.001 |
| Number of segments with LGE | 0 | 4 ± 2 | <0.001 |

Abbreviations: LGE=late gadolinium enhancement; LV=left ventricle

ANEXO IV: Otras publicaciones y trabajos derivados del desarrollo de la tesis

Publicaciones

1. Ríos-Navarro C, Piqueras L, **Hervás A**, de Dios E, Ruiz-Saurí A, Gavara J, Pérez-Solé N, Miñana G, Chorro FJ, Bodí V. La neoangiogénesis inducida por suero es paralela a la dinámica de la obstrucción microvascular tras un infarto agudo de miocardio reperfundido. *Latido*. 2017;3:29-36.

2. Bonanad C, Monmeneu JV, López-Lereu MP, **Hervás A**, de Dios E, Gavara J, Núñez J, Miñana G, Husser O, Payá A, Racugno P, García-Blas S, Chorro FJ, Bodí V. Prediction of long-term major events soon after a first ST-segment elevation myocardial infarction by cardiovascular magnetic resonance. *Eur J Radiol*. 2016;85:585-92.

3. Bodí V, Monmeneu JV, Ortiz-Pérez JT, López-Lereu MP, Bonanad C, Husser O, Miñana G, Gómez C, Núñez J, Forteza MJ, **Hervás A**, de Dios E, Moratal D, Bosch X, Chorro FJ. Prediction of reverse remodeling by cardiac MR imaging soon after a first ST-segment-elevation myocardial infarction: Results of a large prospective registry. *Radiology*. 2016;278:54-63.

4. Forteza MJ, **Hervás A**, de Dios E, Trapero I, Ruiz-Saurí A, Miñana G, Bonanad C, Gómez C, Husser O, Núñez J, Chorro FJ, Bodí V. Programmed death-1 (PD-1): a novel mechanism for understanding the acute immune deregulation in ST-segment elevation myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 2014;177:8-10.

5. Bodí V, Ruiz-Nodar JM, Feliu E, Miñana G, Núñez J, Husser O, Martínez-Elvira J, Ruiz A, Bonanad C, Monmeneu JV, López-Lereu MP, Forteza MJ, de Dios E, **Hervás A**, Moratal D, Gómez C, Mainar L, Sanchís J, Mainar V, Valencia J, Díaz A, Noguera I, Chaustre F,

Chorro FJ. Effect of ischemic postconditioning on microvascular obstruction in reperfused myocardial infarction. Results of a randomized study in patients and of an experimental model in swine. *Int J Cardiol.* 2014;175:138-46.

Presentaciones en congresos

Nacionales:

1. XIX Congreso de la Sociedad Española de Histología e Ingeniería Tisular, III Congreso Iberoamericano de Histología. Santiago de Compostela 2017. Ruiz-Saurí A, Ríos-Navarro C, Gavara J, **Hervás A**, Perez-Sole N, de Dios E, Daghbouche-Rubio N, Chorro FJ, Bodí V. Implications and mechanistic role of eosinophils after reperfused myocardial infarction. Study in patients and in vivo.

2. XIX Congreso de la Sociedad Española de Histología e Ingeniería Tisular, III Congreso Iberoamericano de Histología. Santiago de Compostela 2017. Ruiz-Saurí A, **Hervás A**, Ríos-Navarro C, de Dios E, Gavara J, Perez-Sole N, Chorro FJ, Bodí V. Inhomogeneous organization of collagen within the fibrotic scar after myocardial infarction. Results in a swine model and in patients.

3. I Congreso de Jóvenes Investigadores en Biomedicina, III Congreso Biomedicina Predocs. Valencia 2016. Perez-Terol I, Morales JM, **Hervás A**, Ríos-Navarro C, Ruiz-Saurí A, Bodí V, Monleon D. Predictive model of the chronic myocardial infarction based on magnetic resonance microscopy and correlative histopathology.

4. XXXIII de la Societat Valenciana de Cardiologia. Benidorm 2016. **Hervás A**, Ríos-Navarro C, Ruiz-Saurí A, de Dios E, Gavara J, Perez-Sole N, Bonanad C, Miñana G, Chorro FJ, Bodí V. La cicatrización fibrótica tras un infarto de miocardio muestra una organización heterogénea de las fibras de colágeno.

5. XXXIII de la Societat Valenciana de Cardiologia. Benidorm 2016. **Hervás A**, Ríos-Navarro C, Ruiz A, Gavara J, de Dios E, Miñana G, Chorro FJ, Bodí V. Estudio multidisciplinar de la fibrosis

remota tras un infarto de miocardio en un modelo porcino y en muestras humanas.

6. XXXIII de la Societat Valenciana de Cardiologia. Benidorm 2016. Ríos-Navarro C, Piqueras L, **Hervás A**, de Dios E, Ruiz-Saurí A, Gavara J, Perez-Sole N, Miñana G, Chorro FJ, Bodí V. La neoangiogenesis inducida por suero es paralela a la dinamica de la obstrucción microvascular tras un infarto de miocardio reperfundido.

7. Congreso de las Enfermedades Cardiovasculares. Zaragoza 2016. **Hervás A**, Ríos-Navarro C, Ruiz-Saurí A, Gavara J, de Dios E, Miñana G, Chorro FJ, Bodí V. Estudio multidisciplinar de la fibrosis remota tras un infarto agudo de miocardio reperfundido en un modelo porcino y en muestras humanas.

8. Congreso de las Enfermedades Cardiovasculares. Zaragoza 2016. Ríos-Navarro C, **Hervás A**, Piqueras L, de Dios E, Ruiz-Saurí A, Gavara J, Chorro FJ, Bodí V. La neoangiogenesis inducida por el suero se correlaciona con la resolución de la obstrucción microvascular en un modelo animal de infarto de miocardio.

9. Congreso de las Enfermedades Cardiovasculares. Zaragoza 2016. **Hervás A**, Ríos-Navarro C, Ruiz-Saurí A, de Dios E, Gavara J, Bonanad C, Chorro FJ, Bodí V. Las fibras de colágeno presentan una organización heterogénea en la cicatriz fibrótica tras un infarto de miocardio.

10. Congreso de las Enfermedades Cardiovasculares. Santiago de Compostela 2014. **Hervás A**, Forteza MJ, de Dios E, Ruiz-Saurí A, Bonanad C, Miñana G, Chorro FJ, Bodí V. Caracterización macroscópica, microscópica y molecular de la fibrosis miocárdica en un modelo porcino de infarto de miocardio.

11. Congreso de las Enfermedades Cardiovasculares. Santiago de Compostela 2014. **Hervás A**, Forteza MJ, de Dios E, Ruiz-Saurí A, Bonanad C, Miñana G, Chorro FJ, Bodí V. Dinámica de la obstrucción microvascular en un modelo in vivo de isquemia-reperusión.

12. Congreso de las Enfermedades Cardiovasculares. Santiago de Compostela 2014. Forteza MJ, de Dios E, **Hervás A**, Ruiz-Saurí A, Miñana G, Gomez C, Chorro FJ, Bodí V. Nuevos mecanismos inmunoreguladores en el infarto agudo de miocardio. Implicación de PD-1 y de linfocitos T reguladores.

13. Congreso de las Enfermedades Cardiovasculares. Santiago de Compostela 2014. Forteza MJ, Zaragoza R, **Hervás A**, de Dios E, Bonanad C, Viña J, Chorro FJ, Bodí V. Implicación de la vía de PGC-1 alfa en la desregulación metabólica tras un infarto agudo de miocardio.

14. Congreso de las Enfermedades Cardiovasculares. Santiago de Compostela 2014. Forteza MJ, Trapero I, **Hervás A**, de Dios E, Bonanad C, Ruiz-Saurí A, Gomez C, Bodí V. Dinámica de la respuesta inmune adaptativa tras un infarto agudo de miocardio con elevación del ST y su asociación con el tamaño del infarto.

15. Congreso de las Enfermedades Cardiovasculares. Santiago de Compostela 2014. de Dios E, Forteza MJ, **Hervás A**, Ruiz-Saurí A, Bonanad C, Miñana G, Chorro FJ, Bodí V. Caracterización in vivo del proceso de obstrucción microvascular en un modelo porcino de isquemia-reperusión.

Internacionales:

1. European Society of Cardiology Congress. Roma 2016. **Hervás A**, Ríos-Navarro C, Ruiz-Saurí A, de Dios E, Gavara J, Miñana G, Chorro FJ, Bodí V. Fibrotic scar after myocardial infarction presents a inhomogeneous organization of collagen. Results in a swine model and in patients.

2. European Society of Cardiology Congress. Roma 2016. Ríos-Navarro C, Piqueras L, **Hervás A**, de Dios E, Ruiz-Saurí A, Gavara J, Miñana G, Chorro FJ, Bodí V. Serum-induced neoangiogenesis parallels the dynamics of MVO after reperfused MI in an in vivo model.

3. European Society of Cardiology Congress. Londres 2015. Bonanad C, Monmeneu JV, López-Lereu MP, Paya A, Escribano D, Racugno P, **Hervás A**, Chorro FJ, Bodí V. Detection and dynamics of ventricular thrombus by CMR after reperfused ST-segment elevation myocardial infarction.

4. European Society of Cardiology Congress. Barcelona 2014. **Hervás A**, Ruiz-Saurí A, de Dios E, Forteza MJ, Bonanad C, Chaustre F, Gómez C, Miñana G, Chorro FJ, Bodí V. Macroscopic, microscopic and molecular characterization of myocardial fibrosis in a swine model of reperfused myocardial infarction.

5. European Society of Cardiology Congress. Barcelona 2014. Forteza MJ, Trapero I, de Dios E, **Hervás A**, Bonanad C, Chaustre F, Miñana G, Chorro FJ, Bodí V. Impairment of PD-1 pathway is related with infarct size in ST elevation myocardial infarction.

6. European Society of Cardiology Congress. Barcelona 2014. Forteza MJ, Zaragoza R, de Dios E, **Hervás A**, Bonanad C, Miñana G, Díaz A, Chorro FJ, Viña JR, Bodí V. PGC-1 alpha pathway

regulates cardiac metabolic changes in porcine model of ST segment myocardial infarction.

7. European Society of Cardiology Congress - Frontiers in Cardiovascular Biology. Barcelona 2014. **Hervás A**, Ruiz-Saurí A, de Dios E, Forteza MJ, Bonanad C, Chaustre F, Gómez C, Miñana G, Chorro FJ, Bodí V. Myocardial fibrosis after acute myocardial infarction, a diffuse or a localized process? Results in a swine model of reperfused anterior myocardial infarction.

8. European Society of Cardiology Congress - Frontiers in Cardiovascular Biology. Barcelona 2014. de Dios E, Ruiz-Saurí A, **Hervás A**, Forteza MJ, Bonanad C, Chaustre F, Gómez C, Miñana G, Chorro FJ, Bodí V. In vivo characterization of microvascular obstruction resolution after reperfused myocardial infarction.

9. European Society of Cardiology Congress - Frontiers in Cardiovascular Biology. Barcelona 2014. Forteza MJ, de Dios E, **Hervás A**, Ruiz-Saurí A, Bonanad C, Chaustre F, Trapero I, Miñana G, Chorro FJ, Bodí V. PD-1/PD-L1 axis contributes to infarct size in ST elevation myocardial infarction.

10. European Society of Cardiology Congress - Frontiers in Cardiovascular Biology. Barcelona 2014. Forteza MJ, Zaragoza R, de Dios E, **Hervás A**, Bonanad C, Chaustre F, Miñana G, Ruiz-Saurí A, Viña JR, Bodí V. Metabolic deregulation in myocardial infarction is mediated by PGC-1 alpha pathway.

Capítulos libro

1. Bosch Campos MJ, **Hervás Lorente A**, Bodí Peris V. Técnicas de imagen no invasivas de la enfermedad coronaria. En Bodí Peris V, Chorro Gascó FJ (eds.). Imagen Cardíaca. Publicaciones Universidad de Valencia. 2015. ISBN: 978-84-370-9711-4.

2. Merlos Díaz P, Peset Cubero A, Navarro Aguilar V, Bosch Campos MJ, **Hervás Lorente A**, Bodí Peris V. Cardiopatías congénitas de los adultos. En Bodí Peris V, Chorro Gascó FJ (eds.). Imagen Cardíaca. Publicaciones Universidad de Valencia. 2015. ISBN: 978-84-370-9711-4.

ANEXO V: Fuentes de financiación

La presente tesis doctoral ha sido realizada bajo los siguientes proyectos de investigación públicos:

1. Proyecto Prometeo para Grupos de Excelencia de la Comunidad Valenciana PROMETEO/2013/007 “Inmunidad y metabolismo: exploración de nuevas vías fisiopatológicas y oportunidades terapéuticas en el infarto agudo de miocardio”. Financiado por la Consellería d’Educació, Generalitat Valenciana. IP: Vicente Bodí Peris

2. Proyecto FIS14/00271 “Fibrosis miocárdica tras un infarto de miocardio. Estudio traslacional para la innovación diagnóstica con resonancia magnética y para el entendimiento de los mecanismos reguladores”. Financiado por el Instituto de Salud Carlos III y cofinanciado por los fondos FEDER. IP: Vicente Bodí Peris

Asimismo, la licenciada Arantxa Hervás Lorente ha realizado el presente trabajo con una beca como investigador predoctoral asociada al proyecto PROMETEO/2013/007.