



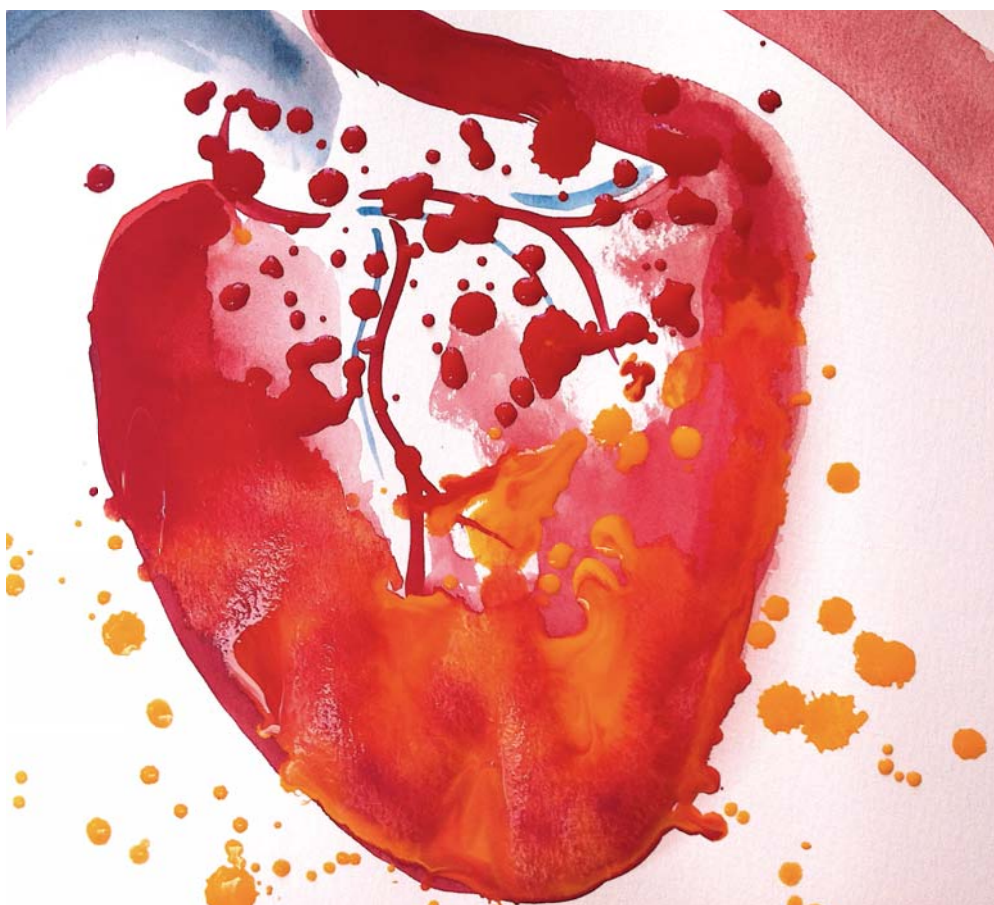
Transposició d'un pedicle adipós pericardíac sobre el miocardi: una nova opció terapèutica per a limitar la cicatriu postinfart

Carolina Gálvez Montón

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Transposició d'un pedicle adipós
pericardíac sobre el miocardi:
una nova opció terapèutica
per a limitar la cicatriu postinfart

Carolina Gàlvez Montón
Barcelona, 26 de juny de 2012



Facultat de Medicina

**Departament de Biopatologia i Bioenginyeria Respiratòria,
Cardiovascular i Renal**

Carolina Gàlvez Montón

Barcelona, 26 de juny de 2012

**Programa de Doctorat en Medicina
Tesi per optar al grau de Doctor per la
Universitat de Barcelona**



Facultat de Medicina

Departament de Biopatologia i Bioenginyeria Respiratòria, Cardiovascular i Renal

Memòria presentada per Carolina Gàlvez Montón per a optar al grau de Doctor per la Universitat de Barcelona.

Aquest treball ha estat realitzat al grup de recerca ICREC (Insuficiència Cardíaca i Regeneració Cardíaca) de la Fundació Institut de Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, sota la direcció dels Doctors Antoni Bayés Genís i Cristina Prat Vidal.

Director

Co-director

Antoni Bayés Genís

Cristina Prat Vidal

Tutor

L'interessat

M^aMagdalena Heras Fortuny

Carolina Gàlvez Montón

Barcelona, 26 de juny de 2012

Agraiments

Buf! Per ser honesta aquest apartat hauria de ser el més extens d'aquest treball. M'agradaria incloure a tothom que hi hagi participat d'alguna manera, ja sigui física o moralment.

Evidentment començaré agraint al Toni i la Cris com a directores de tesi tot el que m'han aguantat, el meu pessimisme, la meva inquietud, la tossuderia i sobretot el meu punt tant crític de visió. A tu Toni moltes gràcies pel teu constant recolzament, el positivisme que tant m'has inculcat en els moments més complicats (que han estat pocs, la veritat) i les estirades d'orelles que de tant en tant saps que tant necessito. A tu Cris per tot, pel dia a dia, per tot el que m'has ensenyat i la paciència amb que ho has fet. Per haver treballat colze a colze (literalment) en aquest treball i sentir-lo com una part teva. No podré mai oblidar-me dels dijous a la tarda que han estat senzillament espectaculars, on la nostra ciència desbordava humor pels quatre cantons. Sempre recordaré les estades a Cáceres i els sopars a la llum de la lluna amb un bon ibèric, somiant que algun dia farem quelcom important. En fi, a tots dos perquè no he pogut tenir dos directores millors, us ho ben asseguro. M'heu fet gaudir de cada segon de la meva feina des de que us vaig trobar i això passa ben poques vegades a la vida.

També m'agradaria tenir unes paraules d'agraïment per la Dra. Heras, per assentir a ser tutora d'aquesta tesi confiant plenament en ella.

Al Rizos, com no, per introduir-me a l'apassionant món de cultius i dels westerns; perquè entre riures i discussions crec que hem estat l'estranya parella. Gràcies per empapar-me de la teva serenitat que de vegades tant de polleguera em treia i alhora, tant la necessitava. Pel teu humor en els moments idonis i per donar-me a conèixer un angle de la ciència on la lògica és el factor predominant: échale un poco durante un rato.

A la Càrol perquè si en un principi érem tant diferents, al final ens hem conegut i seguim sent tan diferents, però alhora, en certs aspectes, complementàries. Has estat com un llibre de consulta quan hi havia un dubte perquè després rigorositat i has estat una bona companya quan t'he necessitat. Crec que ets la veu científica de l'experiència en silenci.

A la Laura, per ser tal com ets i transmetre una calidesa gairebé maternal; sens dubte quan estàs aixafada no hi ha res com anar a parlar

amb la Laura. Et reconforta ràpidament fent un repàs de les teves virtuts i t'ajuda incondicionalment en tots els terrenys. Val la pena comptar amb ella perquè si ho fas, de segur que dormiràs tranquil.

A l'Aida, gràcies per la teva innocència i joventut. Des que vas arribar m'has fet sentir com la germana gran que mai he pogut ser. Gràcies per riure en tot moment i aguantar les meves batalletes; per ser tant generosa i tant modesta, massa inclús! Però ja t'anirem adobant.....

Palomita! Qué decir de ti? Pues aunque tarde me ha encantao conocerte porque sin lugar a dudas tú ves cosas que yo no logro alcanzar y lo digo en cualquier sentido. Me has enseñado a ser práctica y más directa; a decir lo que piensas cuando el nudo en el estómago ya no te deja respirar. Y sobretodo a trabajar y escribir artículos a una velocidad de vértigo. Vamos, en una palabra, a matar temas!!!

Gràcies Josep Maria per ajudar-me en l'apassionant món del word i les seves inestimables eines.

Y como no, agradecer la inestimable ayuda del Dr. Arís, gracias Alejandro (ya ves que al final te tuteo) por acompañarme en las cirugías de los viernes y enseñarme a llevar a cabo esta técnica. Y sobretodo muchas gracias por hacerme sentir como una residente de cirugía cardíaca, aunque sólo fuera por un ratito.

Durant aquest llarg camí he trobat gent tant solidària com l'Anna Llach, tant pragmàtica com el Leif Hove, tant treballadora com la Idoïa i la Lupe, tant emprenedora com l'Ariadna, tant assenyada com el Dr. Cinca i tant sorprenent com el Jordi. Però sens dubte no podria oblidar a dues persones molt importants que em van obrir les portes de la recerca cardiovascular com la Montse Rigol i la Núria Solanes; gràcies per haver-me llençat a aquest món que és la meva passió.

Gràcies al Carles, el nostre estudiant, per donar frescor a les àrdues tardes d'estiu i al Juli i tot el seu grup per ensenyar-me que hi ha gent molt valuosa i desinteressada traspasant les fronteres del propi laboratori.

Agrair a la Laia Anglí per la seva companyia en els meus inicis i ensenyar-me a ser una persona justa i discreta. I la Núria Ribas, ex

companya de taula, per posar-me al dia d'anècdotes mèdiques que tant m'agradava escoltar.

Agradecer también al Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón por acogerme como un miembro más del equipo y tratarme como si fuera una invitada especial. Muchas gracias por vuestra hospitalidad y cariño.

Gràcies Natàlia per les tardes al taller, que entre pinzellada i pinzellada t'explicava com anava aquest treball i em donaves ànims incondicionals. Tu m'has ensenyat, a part del que és la verdadera amistat, a treballar de valent quan vols quelcom, l'esforç i voluntat que cal posar-hi i, sobretot, la il·lusió i els somnis.

Gracias a ti, mama, por ayudarme y apoyarme en todo. Por aconsejarme y escucharme aunque algunas palabras de este trabajo no aparezcan en tus libros. Y porque sé de sobras que me acompañarías donde fuera necesario.

Gracias Pili por cuidarme todavía como tu hermana pequeña y admirarme como si fuera 20 años mayor que tú. Creo que eres la persona que mayor confianza ha depositado en mí desde mis inicios y eso, te aseguro, ha sido mi gran estímulo. Y a ti Cris, gracias por enseñarme que había algo más allá de la medicina, la veterinaria, que ha sido la base de este trabajo.

I no em podria oblidar de tu, gràcies Pep per aguantar i compartir cirurgies, resultats, escriptures, problemes, submissions, alegries i penes. M'has ensenyat a compartir i a escoltar als demés; a respectar i valorar; i sobretot a reconèixer els errors. Amb tu al costat, sens dubte, tot ha estat molt més fàcil i divertit.

Y a ti papa, porqué aunque un poco tarde, al final lo he conseguido. Espero que estés orgulloso de mí. Un beso.

**Al meu pare
i al Nic**

Índex

Abreviacions	21
Introducció	27
1. Un segle d'infart	29
1.1. L'era de l'observació clínica	30
1.2. L'era de les unitats coronàries	33
1.3. L'era de la cardiologia intervencionista	35
2. L'infart de miocardi en l'actualitat	36
2.1. Definició i epidemiologia de l'IM	36
3. Teràpia actual de l'IM	37
3.1 Teràpia clínica	37
3.1.1. <i>Antiagregació plaquetària</i>	38
3.1.2. <i>Trombólisi</i>	38
3.1.3. <i>Intervencionisme coronari percutani</i>	38
3.2. Teràpia quirúrgica	41
3.2.1. <i>Bypass aortocoronari</i>	41
3.2.2. <i>Trasplantament cardíac</i>	41
4. Línies actuals de recerca cardiovascular en el marc de l'IM	42
4.1. Teràpia cel·lular	43
4.1.1. <i>Tipus cel·lulars emprats en teràpia cel·lular</i>	45
4.2. Enginyeria tissular	48
4.3. Teràpia gènica	50
5. Home is where the heart is	51
5.1. El cor	51
5.2. El pericardi	52
5.2.1. <i>Estructura del pericardi</i>	52
5.2.2. <i>Vascularització i innervació pericardíaca</i>	53
5.2.3. <i>Contingut pericardíac</i>	54
5.2.4. <i>Teixit adipós pericardíac</i>	54

Hipòtesi i Objectius	57
Hipòtesi	59
Objectius	59
Material i Mètodes	61
Anàlisi de l'evolució de l'expressió gènica de l'IM	63
1. Obtenció de mostres de teixit cardíac	63
2. Extracció d'ARN i anàlisi de qualitat	63
2.1. Extracció d'ARN	63
2.2. Anàlisi de qualitat	64
3. Creació dels perfils de l'expressió gènica	64
4. Anàlisi funcional de l'expressió gènica mitjançant <i>Ingenuity Pathway Analysis (IPA)</i>	65
4.1. Expressió gènica respecte el miocardi sa	65
4.2. Perfils temporals de l'expressió gènica	65
5. Validació per PCR quantitativa a temps real	66
5.1. Transcripció inversa	66
5.2. RT-qPCR	67
6. Anàlisi estadística	68
Experimentació <i>in vitro</i>	69
1. Aïllament i cultiu cel·lular	69
1.1. Aïllament de cèl·lules progenitores derivades de teixit adipós epicardíac i pericardíac	69
1.2. Cultiu de cèl·lules progenitores derivades de teixit adipós epicardíac i pericardíac	69
2. Citometria de flux	70

3. Anàlisi de l'expressió basal de marcadors cardíacs en les cèl·lules progenitores al teixit adipós epicardíac i pericardíac	72
3.1. Anàlisi de l'expressió proteica	72
4. Assajos de diferenciació cel·lular	73
4.1. Diferenciació adipogènica	73
4.2. Diferenciació osteogènica	74
4.3. Diferenciació condrogènica	74
Experimentació <i>in vivo</i>	76
1. Animals	76
2. Disseny experimental	76
3. Anestèsia, analgèsia i monitorització	77
4. Inducció de l'IM	78
4.1. Model agut	78
4.2. Model crònic	79
5. Anàlisi funcional: ressonància magnètica cardíaca	80
6. Sacrifici	81
7. Anàlisi morfològica: càlcul de la mida de la cicatriu postinfart	82
8. Obtenció i inclusió de teixit per al estudi histològic	83
8.1. Processament de les mostres	83
9. Anàlisi histològica	84
9.1. Tinció histològica tricròmica de Masson	84
9.2. Tinció histològica Picro-sirius Red	85
10. Anàlisi immunohistoquímica	86
10.1. Anàlisi de l'àrea vascular	86
10.2. Anàlisi d'apoptosi cel·lular mitjançant la tècnica de TUNEL	88
10.3. Anàlisi de proliferació cel·lular i endotelial	89
11. <i>Microarrays</i>: anàlisi de l'expressió gènica	90

11.1. Extracció d'ARN, anàlisi de qualitat i creació dels perfils de l'expressió gènica	90
11.2. Anàlisi funcional de l'expressió gènica mitjançant <i>Ingenuity Pathway Analysis</i> (IPA)	91
12. Anàlisi estadística	92
Resultats	93
1. Estudi dels patrons temporals de l'expressió gènica de l'IM	95
1.1. L'IM altera l'expressió gènica en tot el cor	95
1.2. Anàlisi dels gens diferencialment expressats en el miocardi infartat	96
1.3. Patrons temporals de l'expressió gènica	103
1.4. Validació dels resultats obtinguts per <i>microarray</i> mitjançant RT-qPCR	106
2. Caracterització de les cèl·lules progenitores residents al teixit adipós epicardíac (epiATDPCs) i pericardíac (periATDPCs) porcí	107
2.1. Aïllament i cultiu cel·lular	107
2.2. Anàlisi dels marcadors de superfície mitjançant citometria de flux	107
2.3. Anàlisi de l'expressió basal de marcadors cardíacs en les epiATDPCs i periATDSCs	108
2.4. Anàlisi de la pluripotencialitat de les epiATDPCs i periATDPCs	109
2.4.1. <i>Diferenciació adipogènica</i>	109
2.4.2. <i>Diferenciació osteogènica</i>	110
2.4.3. <i>Diferenciació condrogènica</i>	111
3. Transposició d'un pedicle adipós d'origen pericardíac sobre l'IAM en el model porcí	112
3.1. Supervivència del model d'IAM	112
3.2. Tractament quirúrgic: transposició del pedicle adipós pericardíac en l'IAM	112
3.3. Supervivència i viabilitat del tractament quirúrgic	114
3.4. Anàlisi de la funció ventricular amb RM cardíaca	114
3.5. Anàlisi morfomètrica	117
3.6. Fibrosi cicatricial i contingut de col·lagen	118
3.6.1. <i>Fibrosi cicatricial</i>	118

3.6.2. <i>Contingut de col·lagen</i>	119
3.7. Connexions vasculares entre el pedicle pericardíac i el miocardi infartat	121
3.8. Àrea vascular del teixit miocardiàc i del pedicle adipós	121
3.9. Apoptosi miocardiàca	123
3.10. Anàlisi de l'expressió gènica del miocardi i el pedicle adipós	125
4. Transposició d'un pedicle adipós d'origen pericardíac sobre l'ICM en el model porcí	137
4.1. Supervivència del model d'ICM	137
4.2. Tractament quirúrgic de la transposició del pedicle adipós pericardíac en l'ICM	137
4.3. Supervivència i viabilitat del nou tractament quirúrgic	138
4.4. Anàlisi de la funció ventricular amb RM cardíaca	138
4.5. Anàlisi morfològica	139
4.6. Fibrosi cicatricial i contingut de col·lagen	141
4.6.1. <i>Fibrosi cicatricial</i>	142
4.6.2. <i>Contingut de col·lagen</i>	142
4.7. Connexions vasculares entre el pedicle pericardíac i el miocardi infartat	142
4.8. Àrea vascular miocardiàca i del pedicle adipós	143
4.9. Anàlisi de proliferació cel·lular i endotelial	145
Discussió	147
1. Estudi dels patrons temporals d'expressió gènica de l'IM	149
2. Anàlisi de la pluripotencialitat de les cèl·lules progenitores derivades de teixit adipós d'origen pericardíac	151
3. Transposició d'un pedicle adipós d'origen pericardíac sobre l'IAM	153
4. Transposició d'un pedicle adipós d'origen pericardíac sobre l'ICM	156
Conclusions	159
Bibliografia	163

Annex

185

Publicacions

189

Abreviaciones

α-MEM	<i>α-minimum essential medium</i>
ACD	Aterectomia coronària direccional
ACTP	Angioplàstia coronària transluminal percutània
ADN	Àcid desoxiribonucleic
ADNc	Àcid desoxiribonucleic citoplasmàtic
AE	Aurícula esquerra
AET	Aterectomia amb extracció transluminal
AR	Aterectomia rotacional
ARN	Àcid ribonucleic
ARNm	Àcid ribonucleic citoplasmàtic
ARNm	Àcid ribonucleic missatger
ATDPCs	Cèl·lules progenitores derivades de teixit adipós
BCL2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
bFGF	Factor de creixement fibroblàstic bàsic
BSA	Albúmina sèrica bovina
β-MHC	Cadena pesada de la β -miosina
BMP2	Proteïna de morfogènesi òssia 2
BMPR1A	Receptor de la proteïna de morfogènesi òssia 2 tipus IA
CA	Grup agut control
CC	Grup crònic control
CD	Grup de diferenciació
Col I	Col·lagen tipus I
Col III	Col·lagen tipus III
CRC	Cirurgia de revascularització d'urgència
CS	Grup subagut control
CTC	Contingut total de col·lagen
cTnI	Troponina I cardíaca

Cx43	Connexina 43
FBS	Sèrum fetal boví
FDR	<i>False discovery rates</i>
FEVE	Fracció d'ejecció del ventricle esquerre
GAPDH	Gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa
GOT	Glutamil oxaloacètic transaminasa
GUSB	Glucoronidasa β
HGNC	Comitè HUGO de nomenclatura de gens
IAM	Infart agut de miocardi
IAMEST	Infart agut de miocardi amb elevació del segment ST
ICP	Intervencionisme coronari percutani
IL6	Interleuquina 6
IM	Infart de miocardi
IPA	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>
LIMMA	Models lineals per <i>microarray</i>
LMNA	Laminina A/C
logFC	Logaritme del canvi relatiu
NTPs	Ribonucleòsids trifosfat
PBS	<i>Phosphate buffer solution</i>
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PGK1	Fosfoglicerat quinasa 1
PLGF	Factor de creixement placentari
PLN	Perilipina
Ratio I/III	Ratio entre col·lagen tipus I i III
RM	Ressonància magnètica
RMA	Mitjana robusta multi-xip
Rpm	Revolucions per minut

RT-qPCR	PCR a temps real
S1	Secció 1
S2	Secció 2
S3	Secció 3
SCASEST	Síndrome coronari agut sense elevació del segment ST
SD	Desviació estàndard
SEM	Error típic de la mitjana
SERCA2	ATPasa 2 del calci del reticle sarco/endoplasmàtic
SMAD1	Membre de la família SMAD
TA	Grup tractament agut
TC	Grup crònic tractament
TS	Grup subagut tractament
TBX5	T-box 5
TGFβ3	Factor transformador β3
TNF-α	Factor de necrosi tumoral alfa
TNFRSF1A	Receptor del factor de necrosi tumoral membre 1A
TSE	<i>Turbo Spin Echo</i>
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick End Labeling</i>
VD	Volum diastòlic
VE	Ventricle esquerre
VEGF	Factor de creixement de l'endoteli vascular
VS	Volum sistòlic

Introducció

1. Un segle d'infart

Al 1698, quan la Guerra de Successió Espanyola era imminent, Petri Chirac, metge del duc d'Orleans, va ser el primer investigador que va realitzar una lligadura experimental d'una artèria coronària a un gos (Chirac. 1698). Al 1761, mentre a Lyon es fundava la primera Escola de Veterinària del món, Morgagni, deixeble de Valsalva, va fer la primera descripció dels canvis ateroscleròtics coronaris (Morgagni. 1761) (Figura 1.a.) i Rougnon al 1801 va descriure l'angina de pit que posteriorment es va assignar com una malaltia derivada de l'aterotrombosi per part de Jenner i Parry (Parry. 1799).

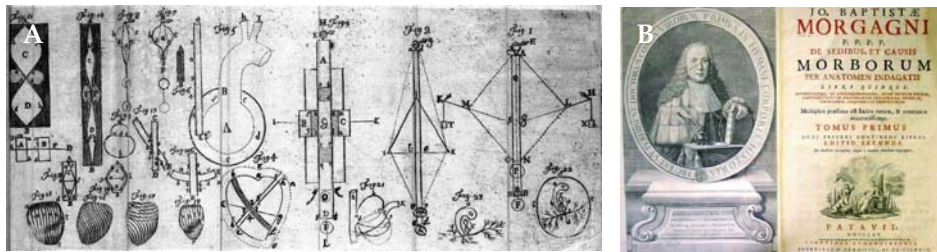


Figura 1. Documents històrics sobre l'infart de miocardi. (A) *De motu cordis, adversaria analytica*. Detall del funcionament del cor dissenyat l'any 1698 per Petri Chirac. (B) Portada i contraportada del llibre *De sedibus et causis morborum, per anatomen indagatis* de Jean Baptiste Morgagni, 1761.

Però l'estudi sistemàtic experimental sobre la influència de la interrupció de la circulació coronària va ser iniciat per Erichsen al 1841 (Erichsen. 1842), seguit de Panum embolitzant les artèries coronàries d'un gos amb una barreja de sèu, cera, petroli i fum negre (Panum. 1862). Bezold i Breymann van ser pioners en produir fibril·lació ventricular mitjançant la lligadura de l'artèria coronària esquerra (coronària magna) (Bezold *et al.* 1862); i al 1881 Samuelson va demostrar amb èxit la primera reperfusió després d'una lligadura coronària de 4 minuts. Al mateix any, Cohnheim i von Schulthess-Rechberg van presentar el primer model experimental d'arítmies induïdes per reperfusió (Cohnheim *et al.* 1881). A nivell clínic, no va ser fins 1878 que Hammer va diagnosticar per primera vegada una oclusió coronària que va poder ser confirmada per la posterior autòpsia (Gasser *et al.* 1994).

1.1. L'era de l'observació clínica (1900-1950)

Malgrat els estudis anteriorment anomenats, la primera descripció de l'infart de miocardi (IM) va ser atribuïda fa un centenar d'anys a James B. Herrick (Herrick. 1912). Mentre el Dr. Carrel, pare de la medicina vascular i del trasplantament quirúrgic rebia el Premi Nobel de Medicina i Fisiologia, Herrick va descriure l'IM com a conseqüència de l'oclusió per trombosi d'una artèria coronària que fins aleshores havia estat un diagnòstic poc freqüent. Transcorreguts 6 anys, juntament amb el seu col·lega Fred Smith, va determinar l'existència de correlacions electrocardiogràfiques amb l'IM (Smith. 1918). És en aquest moment quan aquesta patologia va passar a considerar-se com una de les primeres causes de mort a molts països.



Figura 1.1.a. James Bryan Herrick. Fotografia de James Herrick, metge americà que va descriure per primera vegada l'IM i la seva causa, l'oclusió arterial, al 1912.

Arrel de dites troballes, altres investigadors van començar a realitzar estudis experimentals seriatos en el model caní per a caracteritzar l'IM a nivell histològic (Karsner *et al.* 1916). Aquests estudis, més enllà de la descripció microscòpica, postulaven quin era el procés de cicatrització miocardiàica i ja confrontaven opinions coetànies sobre l'existència de la regeneració miocardiàica. Mentre que la gran majoria de col·legues recolzaven que el cor era un òrgan sense capacitat regenerativa, Heller era defensor de la regeneració cardíaca, sobretot en les degeneracions miocardiàiques per toxicitat (Heller. 1915).

Al 1920 Pardee va constatar els primers signes electrocardiogràfics davant d'una obstrucció coronària com a criteris pel diagnòstic gràfic de l'IM:

menor amplitud dels complexos ventriculars, màxima amplitud de l'ona T invertida amb un arqueig peculiar en forma de V (primera descripció de l'actualment coneguda com elevació del segment ST), increment de la conducció auriculoventricular i un desenvolupament prominent de l'ona Q en la tercera derivació (Pardee. 1920). Aquestes descripcions van ser corroborades per molts altres investigadors, tot i que es va arribar a la

conclusió que si bé l'electrocardiograma (ECG) era una eina pel diagnòstic, la història clínica i, inclús, el tractament eren els criteris més destacats per a pronosticar correctament.

Durant aquesta dècada hi va haver escasses publicacions sobre l'IM i no va ser fins l'any 1928 que es va reprendre la recerca dels estudis electrocardiogràfics (Parkinson *et al.* 1928) i de l'anatomia coronària (Wearn. 1928). A partir d'aquest moment, si va ser fet de l'atzar o fet constatat, després del crack del 29 van començar a aflorar múltiples publicacions de casos aïllats d'IM que aportaven noves dades sobre aquesta patologia. Al 1935 Smith va redactar una nova eina pronòstica de l'IM basant-se en els recomptes de cèl·lules blanques (Smith *et al.* 1935), com ja s'havia postulat l'any anterior (White. 1931). Es va determinar que l'augment en sang de leucòcits i neutròfils no segmentats i l'eosinopènia eren signes evidents d'IM massiu i de mal pronòstic. Pocs anys després Laufer va descriure un nou tipus d'IM, diferenciant-lo de l'infart agut de miocardi (IAM) típic i atípic; era "l'IM subagut o necrosi" (Laufer. 1941). Aquest nou concepte clínic responia a la descripció de trombosi coronària sense dolor i el seu descobriment *post-mortem* va ser de forma accidental per N. Smith Davis.

Paral·lelament a aquests descobriments, el món de la cirurgia



Figura 1.1.b. Claude Beck. (A) Prototip del primer desfibril·lador dissenyat per Claude Beck al 1947. (B) Claude Beck, cirurgià cardíac pioner en la revascularització miocardiaca quirúrgica.

cardiovascular obria les seves portes a l'IM i va ser un grup de cirurgians que van començar a desenvolupar tècniques experimentals per a poder aportar vascularització externa o millorar la coronària del miocardi lesionat. Va ser Claude Beck al 1943, 4 anys abans de dissenyar i emprar el primer desfibril·lador (Beck. 1947), que va

postular que es formaven nous vasos que irrigaven el miocardi lesionat, en el model caní d'IM (Beck. 1943), però altres cirurgians no van obtenir el mateix resultat i la tècnica quirúrgica va quedar oblidada. Fou un

moment de reflexió científica que va dur als investigadors a comprendre la malaltia isquèmica des del punt de vista anatomopatològic (Lowe. 1944) i fisiopatològic (Selzer. 1948), on es postulava que la insuficiència cardíaca podia ser causa i conseqüència d'un IM. Mercès aquests estudis i al descobriment del dicumarol com a potent agent anticoagulant, el tractament que fins aleshores es basava en repòs i dieta hiposòdica va fer un pas endavant afegint l'anticoagulació (Article d'autoria anònima. 1950, veure secció final de referències bibliogràfiques). En poc temps, es va estendre l'ús de la warfarina i àcids polisulfúrics com el Paritol® (Sorenson *et al.* 1950) o compostos sintètics derivats de la cumarina com el Tromexan® (Burke *et al.* 1950), fins que l'heparina (McLean. 1959) es va convertir en un compost econòmicament assequible i va ser l'opció més acceptada. Mentre els antiagregants disminuïen els índexs de mortalitat, els facultatius van dedicar-se a l'estudi exhaustiu de l'epidemiologia de la malaltia isquèmica on ja incloïen quins eren els factors pronòstic i els estudis s'avaluaven amb anàlisis estadístiques (Smith *et al.* 1951). Cal destacar que un dels estudis nascuts al 1948, el Framingham, resta vigent actualment i es basa en la identificació dels factors comuns o característiques que contribueixen al desenvolupament de les malalties cardiovasculars, al llarg de generacions familiars.

La dècada dels 50 va destacar pel gran nombre de publicacions d'estudis clínics i entre ells es va iniciar l'anàlisi dels nivells de lipoproteïnes en sang (Lyon *et al.* 1956) i de la glutamil oxaloacètic transaminasa (GOT) (LaDue *et al.* 1954) com a factors pronòstic de l'IM. En el marc de l'experimentació animal, dos cirurgians de Maryland van crear el model d'IM en petits animals i en el porc i, en comparar-los amb el model caní, que fins aleshores era l'emprat, van descobrir que aquest darrer a nivell coronari presentava múltiples artèries col·laterals i que, per tant, s'havia de descartar com a model animal per a l'estudi comparatiu de l'IM amb humans (Johns *et al.* 1954). La darrera aportació clínica de rellevància va ser la implantació del primer marcapàs en un pacient amb bloqueig complet l'any 1958 per Rune Elmqvist (Nicholls. 2007).

1.2. L'era de les unitats coronàries (1960-1980)

La dècada dels 60 va ser una etapa d'estudis clínics aleatoritzats i prospectius, basats en l'estudi de factors de risc i la recerca de nous factors predictius.

Al 1965, James Black va descriure el propranolol i les seves propietats com a β -bloquejant (Black *et al.* 1965). Treballant conjuntament amb George Smith, cirurgià cardíac col·lega de Claude Beck, va determinar experimentalment que reduint la demanda cardíaca d'oxigen mitjançant la disminució del ritme cardíac es prevenia la fibril·lació ventricular. El primer fàrmac que va oferir va ésser el pronetanol però en veure els seus efectes adversos immediatament va ser substituït pel propranolol (10 vegades més potent).

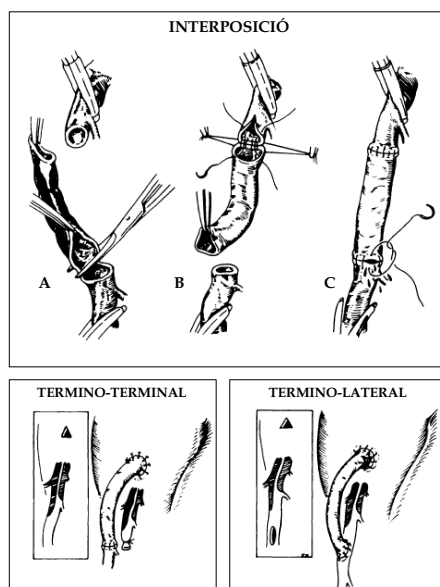


Figura 1.2. Dibuix representatiu de la tècnica quirúrgica del bypass coronari amb empelt de vena safena. (A) Segment amb obstrucció severa: es resseca el segment i es realitzen dues anastomosis terminoterminals. (B i C) bypass amb vena safena des de l'aorta on es realitza una anastomosi terminolateral; la porció distal de l'empelt pot anastomosar-se terminoterminal (inferior esquerra) o terminolateralment (inferior dreta). Dibuix extret de la publicació original (Favaloro. 1968).

Mentre els tractaments farmacològics anaven avançant, un grup de cirurgians pioners va mostrar a la comunitat científica que el trasplantament de cor era factible entre dos humans. Aquesta idea va néixer inicialment al 1964 quan el Dr. Hardy va realitzar un trasplantament de cor de ximpanzé a un pacient moribund, el qual va morir hores més tard perquè el volum cardíac era inferior a les seves necessitats hemodinàmiques. Va ser al 1967 quan Christiaan Barnard va realitzar el primer trasplantament cardíac humà (Barnard. 1967; Toledo-

Pereyra. 2010). L'èxit de la cirurgia va estendre's 18 dies fins que una pneumònia va acabar amb la vida del pacient. Tot i així, a partir d'aquell moment, el trasplantament cardíac va ser considerat com un tractament electiu i amb el pas del temps i les millores en els tractaments immunosupressors, ha arribat als nostres dies com a una cirurgia gairebé convencional.

Uns anys després, al 1971, John Robert Vane, farmacòleg anglès, va descobrir els efectes antiagregants de l'aspirina demostrant que suprimia la producció de prostaglandines i tromboxans (Vane. 1971). Aquesta troballa va afavorir notablement la millora de la teràpia mèdica de l'IM, i des de llavors fins als nostres dies, l'aspirina s'ha convertit en un dels pilars de la teràpia antiagregant en l'IM. Paral·lelament s'estava desenvolupant un nou fàrmac que inhibís la funció de l'enzim de conversió de l'angiotensina (ECA), conegut com a responsable de la regulació de la pressió arterial. Al 1981, va aparèixer el captopril (Chalmers. 1981) a nivell clínic i va començar a emprar-se com a hipotensor en pacients amb insuficiència cardíaca severa.

Però si aquesta etapa va ser rellevant va ser degut a l'aparició d'una nova tècnica quirúrgica que va oferir una gran millora en el pronòstic de l'IM. Es tractava del bypass coronari dissenyat per Favalaro i que consistia en comunicar una artèria sana amb la coronària que havia quedat closa per poder retornar la irrigació sanguínia (Figura 1.2.; Favalaro. 1968).

Fins aleshores el tractament es basava només en la fibrinòlisi i repòs, i quedava a expenses de la condició física del pacient per a garantir una bona recuperació. Amb aquesta nova tècnica quirúrgica es van aconseguir grans millores en el pronòstic després de l'IM i els pacients van guanyar en qualitat de vida notablement a més de veure's augmentada la seva esperança de vida.

També l'any 1968, es va incloure un nou dispositiu que va afavorir la distribució de la sang sistèmica i del flux coronari en pacients amb mala funció ventricular; es tractava del baló de contrapulsació intraaòrtica (Kantrowitz *et al.* 1968). Aquesta nova pròtesi intraluminal va permetre incrementar la perfusió coronària i, alhora, disminuir la demanda d'oxigen per part del miocardi. Addicionalment, es va introduir el catèter Swan-Ganz per a monitoritzar de forma invasiva els paràmetres hemodinàmics (Julian. 1987). Els pacients que rebien aquesta

atenció havien d'estar en constant seguiment i, per tant, les unitats coronàries van començar a estendre's i a convertir-se en imprescindibles.

1.3. L'era de la cardiologia intervencionista (1990-2000)

Per donar lloc a l'era de la revascularització, inicialment hauríem de remuntar-nos a l'any 1929 quan Forssmann, un resident de cirurgia, es va introduir una via perifèrica per on va fer transcorre un catèter fins arribar a l'aurícula dreta. Aquest nou procediment, juntament amb la utilització dels raigs X (Spiers. 1986) i l'administració de medi de contrast va donar lloc a l'angiografia coronària (Abrams. 1964). Aquesta tècnica invasiva va donar pas, inicialment a nivell experimental, a l'angioplàstia coronària transluminal percutània (ACTP) (Grüntzig *et al.* 1977) i posteriorment va implantar-se en l'àmbit hospitalari (Hall *et al.* 1984). L'ACTP és un procediment propi de la cardiologia intervencionista on s'empra un catèter amb un baló al seu extrem que, prèviament col·locat a nivell de la placa ateromatosa, s'infla i permet restablir el flux coronari. Donat els bons i immediats resultats obtinguts amb l'ACTP, amb el pas del temps, aquesta tècnica va anar instaurant-se com a part imprescindible del tractament de l'IM i l'angina de pit. Després de múltiples estudis comparatius amb d'altres tècniques, l'ACTP es va convertir en el tractament d'elecció davant d'aquestes patologies (Michels *et al.* 1995; Grines *et al.* 1994).

En la dècada dels 90 l'alta tecnologia ja imperava en l'àmbit mèdic i aquest fet va donar fruit a la implantació dels *stents* coronaris (Schatz *et al.* 1991). L'*stent* és un dispositiu metàl·lic (d'acer, cromocobalt, d'entre altres) que es disposa intraluminalment a nivell d'una artèria coronària closa o amb estenosi severa per restaurar el flux coronari. Mercès al mateix procediment de l'ACTP, els catèters baló van incorporar aquest nou dispositiu, de manera que en inflar-se el baló, l'*stent* es dilatava i quedava ancorat a les parets de l'artèria malmesa. D'aquesta manera, l'*stent* restablí el calibre arterial i afavoria el pas de la sang a nivell coronari.

Paral·lelament, aquesta etapa també ha donat lloc a altres troballes de caire tecnològic com el desfibril·lador implantable (Mirowski *et al.* 1984) La implantació d'aquest nou dispositiu va reduir significativament la mortalitat d'aquells pacients que després d'un IM presentaven un alt risc de patir fibril·lació ventricular.

2. L'IM en l'actualitat

2.1. Definició i epidemiologia de l'IM

L'IM és la manifestació clínica derivada de la necrosi d'una porció de múscul cardíac a conseqüència de l'oclusió completa d'una artèria coronària. L'artèria s'oclou de manera aguda després del trencament d'una placa d'ateroma responsable de l'activació plaquetària i de la conseqüent formació del trombe. Com a resultat hi ha un transport ineficaç d'oxigen i nutrients a la zona del miocardi depenent de l'artèria malmesa i, per tant, hi ha necrosi i pèrdua de la funció contràctil. Progressivament, s'esdevé el remodelat ventricular, conegut com un procés fisiològic d'adaptació on la paret miocardiaca necròtica pateix un aprimament i dilatació (Figura 2.1.). Finalment, la cavitat ventricular dilatada se sotmet a un sobre esforç sistòlic amb major consum d'oxigen donant lloc a la insuficiència cardíaca.

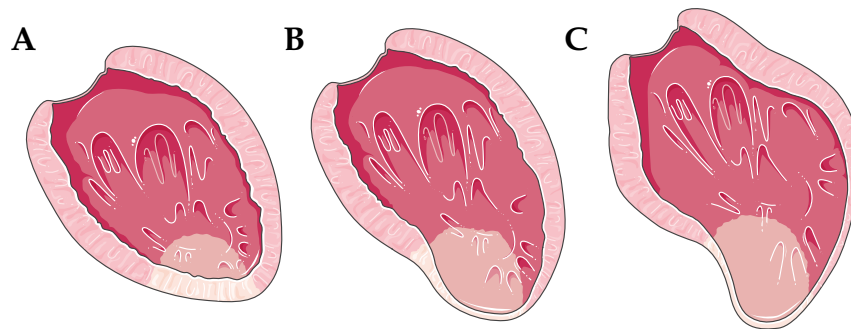


Figura 2.1. Dibuixos representatius de l'evolució de l'IM en la paret del ventricle esquerre. (A) correspon a la instauració de l'IM on hi ha canvi de coloració del miocardi afectat però no hi ha alteració del seu gruix. (B) El mateix IM transcorregudes unes hores després del seu inici, on ja es pot observar cert aprimament de la paret miocardiaca. (C) Resultat de l'IM al cap d'uns dies de la seva instauració; en aquest moment ja ha començat a tenir lloc el remodelat ventricular advers amb un grau d'aprimament miocardiàc evident. (La figura ha estat dissenyada usant els dibuixos de Servier Medical Art).

La definició d'IM ha anat variant al llarg del temps a expenses dels nous coneixements adquirits sobre aquesta patologia. Actualment, des del 2007, el terme d'IM ha de ser emprat quan hi ha evidència de necrosi miocardiaca davant d'un marc clínic d'isquèmia miocardiaca donada per l'oclusió d'una artèria coronària. Sota aquestes condicions es poden trobar diferents criteris per al diagnòstic de l'IM (elevació de marcadors cardíacs, elevació del segment ST, bloqueig de branca

esquerra). Addicionalment, també han quedat establerts criteris per detectar l'IM previ com són l'aparició d'ones Q patològiques, imatges de miocardi aprimat i amb pèrdua de contractilitat, i troballes patològiques d'IM antic o en cicatrització (Thygesen *et al.* 2007).

A dia d'avui, malgrat els innumbrables avenços, l'IM segueix essent la major causa de mort i discapacitat a nivell mundial i es caracteritza per ser la presentació més freqüent de cardiopatia isquèmica. L'Organització Mundial de la Salut (OMS) va estimar l'any 2002 que el 12,6% de les morts a nivell mundial es van donar per cardiopatia isquèmica, que és la principal causa de mort als països desenvolupats i la tercera, després de la SIDA i les infeccions respiratòries, als països en desenvolupament (OMS. 2004).

3. Teràpia actual de l'IM

Encara que la taxa de mortalitat de l'IM ha disminuït un 30% aquesta darrera dècada, l'elevada mortalitat associada al desenvolupament de l'IM ve determinada per la primera hora d'evolució, donat que el 50% de les morts transcorren entre el domicili i l'hospital degut a arítmies malignes, sobretot la fibril·lació ventricular (Braunwald *et al.* 2004).

Actualment, a nivell clínic, la teràpia de l'IM es pot desglossar en dos àmbits, clínic o intervencionista i quirúrgic. D'altra banda, aquests tractaments sempre van acompanyats de l'administració de fàrmacs de forma continuada per a estabilitzar el pacient i garantir major qualitat de vida.

3.1. Teràpia clínic

En la teràpia clínic actual de l'IM hi participen dos procediments descrits anteriorment. Un d'ells es coneix com a fibrinòlisi que consisteix en l'administració de fàrmacs trombolítics la funció dels quals es basa en el trencament o lisi del coàgul sanguini responsable de l'oclusió coronària. Una segona opció terapèutica que actualment està ben establerta és l'angioplàstia primària. Tal i com s'ha esmentat en l'apartat 1.3., aquest procediment de caràcter intervencionista es basa en la

col·locació d'*stents* (implant intraluminal tubular per a mantenir la permeabilitat vascular) a nivell coronari per a poder obrir l'artèria closa i revascularitzar el miocardi depenent.

3.1.1. Antiagregació plaquetària

Com a tractament antiagregant plaquetari per a disminuir la formació de trombus sanguinis, el fàrmac més emprat és l'àcid acetilsalicílic. L'aspirina, a dosis baixes, bloqueja l'efecte agregant plaquetari dels tromboxans A2 i estimula la vasodilatació alliberant òxid nítric. També s'utilitza l'heparina que inactiva diferents factors de la cascada de la coagulació. Aquests tractaments farmacològics s'administren a nivell perifèric.

3.1.2. Trombólisi

La teràpia basada en la trombólisi té com a objectiu canalitzar l'artèria closa per restablir el flux coronari mitjançant fàrmacs capaços de lisar la placa trombòtica. Inicialment es va emprar l'estreptoquinasa que augmentava la producció de la plasmina, component necessari per a la degradació dels coàguls sanguinis. Actualment, d'entre d'altres, el fàrmac d'elecció és la reteplasa, un activador del plasminogen tissular, que via endovenosa s'administra per a convertir el plasminogen en plasmina, proteïna fibrinolítica que afavoreix la dissolució del trombe responsable de l'IM.

3.1.3. Intervencionisme coronari percutani

L'intervencionisme coronari percutani (ICP) engloba un conjunt de tècniques transluminals que tenen com a finalitat la revascularització inicial dels pacients amb cardiopatia isquèmica, de tots els pacients amb isquèmia important documentada i en presència de pràcticament tot tipus de lesions, amb una única excepció: les oclusions totals cròniques que no poden ser creuades (Silber *et al.* 2005).

Els pacients que presenten síndrome coronària aguda sense elevació del segment ST (SCASEST) (angina de pit o IAM sense elevació del ST) han de ser, en primer lloc, estratificats pel risc de complicacions trombòtiques agudes. En canvi, pels pacients amb IAM amb elevació del

segment ST (IAMEST) l'ICP primari es considera el tractament electiu (Silber *et al.* 2005).

Actualment l'ICP inclou cinc procediments diferents la indicació del quals depèn, en gran mesura, del tipus de lesió vascular que presenta el pacient. A continuació s'ofereix una breu descripció de les diferents opcions terapèutiques transluminals.

- *Angioplàstia coronària transluminal percutània (ACTP) amb baló*: el baló té la finalitat d'expandir la llum coronària i estripar la placa d'ateroma al

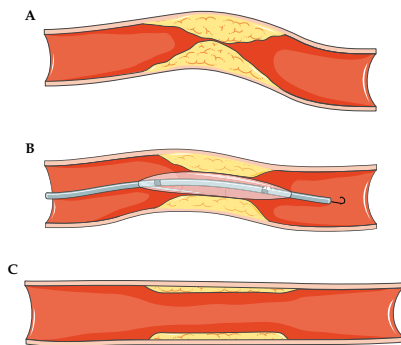


Figura 3.1.3.a. Esquema dels passos de l'ACTP. (A) Dibuix de la llum d'una artèria coronària amb una placa d'ateroma en groc amb la llum closa. (B) Implantació del catèter baló que un cop inflat obre la llum arterial. (C) Resultat de l'artèria coronària després de l'ACTP. (La figura ha estat dissenyada usant els dibuixos de Servier Medical Art).

llarg del seu eix longitudinal. Amb aquesta tècnica menys del 25% dels pacients presenten un resultat angiogràfic òptim i per aquest motiu està considerada com a una estratègia inicial o provisional que sol completar-se amb la col·locació d'un *stent* coronari.

- *Aterectomia coronària*: és una tècnica que es basa en l'ablació i eliminació a nivell intraluminal de la placa d'ateroma com a alternativa a l'ACTP amb baló. Aquest procediment inclou tres mètodes que es diferencien segons els tipus d'instrumental utilitzat:

- *Aterectomia coronària direccional (ACD)*: és un sistema de tall i extracció de l'ateroma format per un catèter amb una caixa cilíndrica de metall, una ganiveta circular interna amb una finestra de tall lateral i una càmera distal que emmagatzema les porcions escindides de l'ateroma.
- *Aterectomia rotacional (AR)*: es tracta d'un sistema que, mitjançant una microfresadora, ablaciona el teixit inelàstic, la placa calcificada i les reestenosi intra-*stent*. Està indicat en lesions calcificades i les no dilatables amb baló.
- *Aterectomia amb extracció transluminal (AET)*: el catèter d'aterectomia amb extracció transluminal té dues fulles rotacionals al seu extrem i

una ampolla de buit que recull el material aspirat (restes de la placa d'ateroma o del trombe).

Les complicacions de l'aterectomia coronària, independentment del mètode emprat, són IM amb ona Q, cirurgia de revascularització coronària (CRC) d'urgència i, en darrera instància, la mort. Cal destacar que el grau de reestenosi als 6 mesos d'evolució, segons l'estudi ERBAC, tant a l'AR (57%), com l'AET (59%) i l'ACTP amb baló (47%) és molt similar i resulta massa elevat (Reifart *et al.* 1997). Per aquest motiu han estat dissenyades noves alternatives terapèutiques dins el marc de l'ICP:

- *Angioplàstia ablativa mitjançant làser*: aquest procediment està reservat per pacients amb lesions de morfologia complexa que no poden ser tractats amb altres procediments o en casos de reestenosi intra-stent. Actualment s'empren dos tipus de làser per a dur a terme aquesta tècnica: làser *excimer* XeCl i el làser holmi. Però en la majoria dels casos, tot i que la intervenció hagi estat exitosa, cal realitzar addicionalment la teràpia amb ACTP amb baló per a reduir l'índex de reestenosi (Bittl *et al.* 1994). Per aquest motiu es tracta d'una tècnica en desús.

- *Stents coronaris*: la implantació dels *stents* en l'ICP ha disminuït considerablement les complicacions precoces i ha millorat els resultats clínics a llarg termini (Braunwald *et al.* 2004). En l'actualitat existeix un gran nombre d'implants de diferents tipus segons la seva estructura, el material del què estan compostos, mida, radioopacitat, recobriment, disseny i, en última instància, si són o no portadors de fàrmacs immunosupressors. Aquest nou concepte ha estat introduït recentment (2002) per a reduir el mecanisme de la reestenosi (proliferació neointimal) provocat per la implantació de l'*stent* (Hoffmann *et al.* 1996). Inicialment, el fàrmac d'elecció va ser el sirolimus però amb el temps i fruit de constants estudis també han quedat inclosos el paclitaxel i l'everolimus (Serruys *et al.* 2006). Amb l'alliberament local dels fàrmacs antiproliferants, la implantació dels dispositius ha reduït en un 46% el risc de reestenosi durant el primer any (Kirtane *et al.* 2009). Tot i així, en certs casos, el procés proliferant neointimal encara es produeix i els pacients han de ser sotmesos a reintervencions d'ICP o cirurgia de bypass coronari.

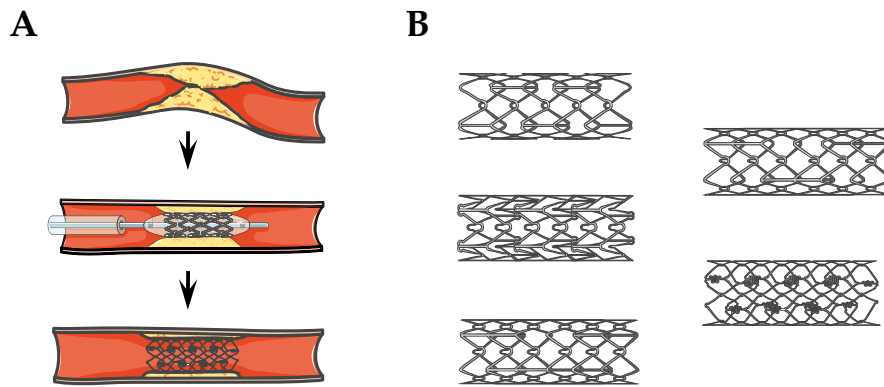


Figura 3.1.3.b. Implantació d'un stent coronari. (A) Dibuix de la llum d'una artèria coronària amb una placa d'ateroma en groc amb la llum closa. Col·locació d'un catèter baló amb *stent* a la zona de l'oclusió arterial. Finalment, resultat de la col·locació de l'*stent* intraluminal. (B) Dibuixos representatius de diferents tipus d'*stents*. (La figura ha estat dissenyada usant els dibuixos de Servier Medical Art).

3.2. Teràpia quirúrgica

3.2.1. Bypass aortocoronari

El bypass aortocoronari és la intervenció quirúrgica destinada a salvar les lesions coronàries, desviant el flux sanguini mitjançant l'implant d'empelts entre l'aorta i la part distal de l'artèria coronària lesionada. L'empelt aortocoronari és format a partir de la vena safena, tot i que es poden utilitzar altres mètodes de derivació coronària, com l'empelt d'artèria mamària (Miller *et al.* 1977).

3.2.2. Trasplantament cardíac

Els malalts amb infarts molt extensos que evolucionen a xoc cardiogènic o insuficiència cardíaca refractària tenen com a opció terapèutica el trasplantament cardíac. Tot i així, aquesta vessant quirúrgica, malgrat ésser una teràpia resoluciva, no està exempta d'inconvenients. En primer lloc, cal destacar que els pacients que se sotmeten al trasplantament han de rebre teràpia immunosupressora la resta de la seva vida. Això fa que augmenti el risc d'adquirir patologies infeccioses que, de vegades, poden ser letals. Malgrat aquests fàrmacs, en alguns pacients es pot originar un rebuig agut de l'òrgan que pot acabar amb la vida del malalt trasplantat (Iyer *et al.* 2011).

Un altre gran inconvenient és el nombre limitat de cors útils per a ésser trasplantats. Actualment, tot i que residim en un dels països amb major oferta, les llistes d'espera per a rebre un cor són molt elevades respecte la disponibilitat d'òrgans. Per aquest motiu, hi ha un gran nombre de pacients amb insuficiència cardíaca terminal, deguda a un IM previ, que moren abans de poder rebre un cor sa.

4. Línies actuals de recerca cardiovascular en el marc de l'IM

Malgrat l'ICP i el bypass, en ocasions, la revascularització arterial coronària no és sinònim d'una correcta perfusió miocardiàca. L'oclusió de la microvasculatura distal de l'artèria implicada en l'IM és deguda a la formació de microèmbols o trombes plaquetaris derivats, en gran mesura, de porcions de l'èmbol responsable de l'IM (Davies *et al.* 1998). També s'ha descrit que la perfusió miocardiàca pot veure's alterada per la lesió de reperfusió a causa de la formació d'edema cel·lular, radicals lliures i saturació del calci (Kloner *et al.* 1974). Així doncs, tot i aconseguir la revascularització coronària, és possible que el procés de necrosi cel·lular segueixi evolucionant com a conseqüència d'una insuficient perfusió miocardiàca. Davant d'aquest escenari s'inicia un procés de remodelat ventricular advers (Figura 2.1.), comportant la dilatació de les cambres cardíques, disfunció contràctil i, eventualment, el xoc cardiogènic. Aquesta darrera conseqüència apareix en un 7-10% dels casos d'IM i s'associa a un 70-80% de la taxa de mortalitat per IM. Per aquest motiu, actualment s'estan cercant noves aproximacions terapèutiques.

Durant dècades, el cor ha estat descrit com un òrgan terminalment diferenciat i amb nul·la capacitat regenerativa. Recentment, aquest concepte ha estat modificat donat que diferents investigadors han pogut evidenciar l'existència de proliferació de cardiomiòcits en malalts amb insuficiència cardíaca terminal (Kajstura *et al.* 1998) o després d'haver patit un IM (Beltrami *et al.* 2001). Posteriorment a aquests estudis, el fenomen de quimerisme cardíac va ser descrit en dos escenaris diferents: pacients masculins trasplantats amb cors de donants femenins presentaven al nou òrgan cèl·lules XY (Bayes-Genis *et al.* 2002) i pacients sotmesos a trasplantament perifèric de cèl·lules derivades de moll d'ós presentaven dites cèl·lules al seu cor

(Bayes-Genis *et al.* 2004). Addicionalment, el concepte de microquimerisme fetal es va incloure en detectar cèl·lules masculines procedents del fetus al cor de la mare (Bayes-Genis *et al.* 2005). Aquestes noves troballes han demostrat que el cor té certa capacitat regenerativa però alhora, insuficient per a restablir-lo davant d'un IM.

Les línies de recerca cardiovascular en l'àmbit de l'IM es basen, fonamentalment, en la regeneració del miocardi, ja sigui mitjançant teràpia cel·lular o enginyeria tissular. Molts han estat els estudis experimentals en models animals que s'han basat en l'administració de diferents tipus cel·lulars i vies d'administració per desembocar en un denominador comú: la regeneració cardíaca. Dins d'aquest concepte tan ampli s'inclou com a principals objectius la revascularització del miocardi infartat, pal·liar el remodelat ventricular, reduir l'apoptosi dels cardiomiòcits i, en darrera instància, millorar la funció electromecànica (Jezierska-Wozniak *et al.* 2011).

Actualment, la gran majoria dels estudis experimentals només han estat testats ens models animals de petita o mitjana mida i pocs han estat els que s'han aplicat a nivell clínic.

4.1. Teràpia cel·lular

La teràpia cel·lular, també coneguda com a medicina regenerativa, es descriu com un grup de noves tècniques que es basen en l'administració de cèl·lules viables per reemplaçar aquelles que són disfuncionals dins d'un òrgan o teixit. En el camp de l'IM, la teràpia cel·lular té com a principal objectiu incrementar el nombre de cèl·lules contràctils en el miocardi lesionat i, conseqüentment, millorar la funció cardíaca (Vunjak-Novakovic *et al.* 2011). La medicina regenerativa cardíaca s'estima com a un tractament potencial donat les evidències obtingudes en els estudis animals de trasplantament cel·lular on es millora la perfusió i la funció cardíaca (Wu *et al.* 2011). La variabilitat d'aquests resultats depèn inicialment del tipus cel·lular utilitzat i, en darrera instància, de la via d'administració.

Tal com queda reflectit a la Figura 4.1., a nivell cardíac, les rutes d'administració més emprades han estat la via intramiocardiàica o transendocardiàica i la via intracoronària. L'administració intramiocardiàica generalment es realitza en estudis experimentals que

impliquen cirurgia de tòrax obert i es realitza amb agulles hipodèrmiques (en model murí) o de major calibre (en models animals grans). Per contra, l'administració transendocàrdica es realitza mitjançant tècniques de cateterisme per on s'introdueix un catèter a nivell intraventricular (catèter NOGA o sistema CARTO) que al seu extrem està connectat amb una agulla. En darrer terme, mitjançant també tècniques d'angioplàstia, existeix la via intracoronària que permet administrar les cèl·lules a nivell coronari amb catèter baló. A més, altres vies, com l'endovenosa perifèrica també han estat testades (Wolf *et al.* 2009; van Dijk *et al.* 2011) aportant resultats modestos però positius.

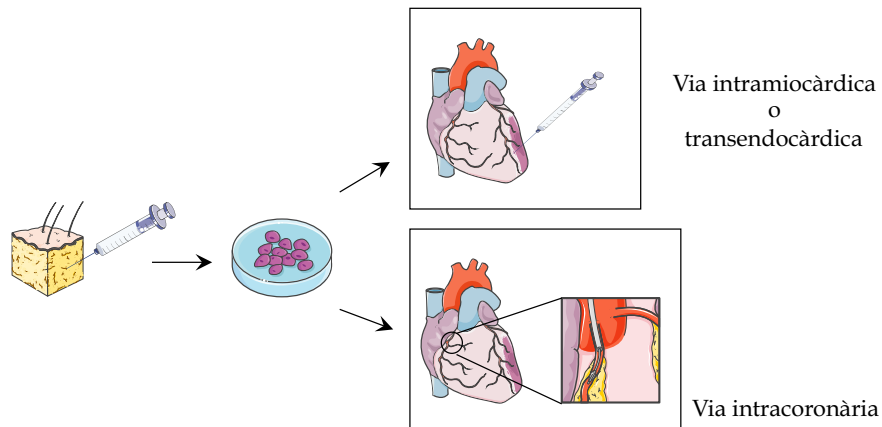


Figura 4.1. Esquema de la teràpia tissular. L'esquema representa el procés de la teràpia cel·lular des de l'obtenció de cèl·lules a partir d'un teixit adult, el seu cultiu cel·lular i la posterior administració a la cicatriu derivada de l'IM. (La figura ha estat dissenyada usant els dibuixos de Servier Medical Art).

Com s'ha descrit anteriorment, l'altre punt clau on recau l'èxit de la teràpia cel·lular cardíaca queda a expenses de la població cel·lular administrada. A continuació es detallen els tipus cel·lulars emprats en els diferents estudis de teràpia cel·lular per l'IM i els seus resultats en l'àmbit experimental.

4.1.1. Tipus cel·lulars emprats en teràpia cel·lular

En el marc de la cardiologia, diferents precursors cel·lulars han estat estudiats i caracteritzats amb l'objectiu d'aconseguir la seva diferenciació cardiomiogènica i ésser emprats com a teràpia cel·lular en l'infart crònic de miocardi (ICM). Els més coneguts són:

- Cèl·lules mare embrionàries: són una excel·lent font cel·lular quant al seu alt potencial proliferat i de diferenciació. Per contra, es tracta d'una població cel·lular al·logènica que requereix de tractament immunosupressor, posseeix la capacitat de desenvolupar teratocarcinomes (Nussbaum *et al.* 2007) i el seu ús no està aprovat èticament en gran nombre de països (de Wert *et al.* 2003).
- Cèl·lules mare pluripotents induïdes (iPS): les iPS deriven de la reprogramació de cèl·lules somàtiques adultes (Takahashi *et al.* 2007) i com a resultat poden diferenciar-se en teixits originaris de qualsevol de les tres capes germinals. Concretament, aquestes cèl·lules han estat genèticament modificades per expressar els gens necessaris (Oct3/4, Sox2, Klf4 i c-Myc) per ser transformades en cèl·lules pluripotents. Tot i així, s'ha demostrat que tenen potencial teratogènic i immunogenicitat (Okita *et al.* 2007).
- Cèl·lules mare adultes: dintre d'aquest grup s'inclouen cèl·lules de diferents orígens tissulars. Les més estudiades han estat:
 - Mioblasts esquelètics: es tracta d'una població cel·lular amb característiques similars a les dels cardiomiòcits que poden aïllar-se fàcilment de biòpsies musculars. El seu ús pot ser autòleg i en alguns estudis animals s'ha demostrat una millora nivell hemodinàmic del miocardi infartat a, augmentant el gruix de la paret miocardiàica i disminuint l'aparició del remodelat ventricular (Taylor *et al.* 1998). Per contra, són cèl·lules amb gran potencial aritmogènic donat que són incapaces d'integrar-se entre els cardiomiòcits residents (Menasché *et al.* 2008).
 - Cèl·lules mare cardíques: estan presents en el cor adult. Són cèl·lules clonogèniques, multipotents i tenen capacitat d'autorenovació. S'ha demostrat que poden diferenciar-se en cardiomiòcits, cèl·lules musculars llises i endotelials i que la seva activació respon a estímuls paracrins (Bearzi *et al.* 2007). Tot i així, hi ha diferents subpoblacions

i no està clar quines diferències hi ha entre elles envers el desenvolupament embrionari del cor i, per tant, han d'estar caracteritzades de manera que es pugui determinar quines són les electes per al tractament de les patologies miocardiàques.

- *Cèl·lules progenitores endotelials*: aquest tipus cel·lular ha estat aïllat a partir de moll d'os (Shintani *et al.* 2001), de sang perifèrica (Roura *et al.* 2007; Roura *et al.* 2009), de sang de cordó umbilical (Ingram *et al.* 2004) i dels propis vasos (Ingram *et al.* 2005). Amb aquestes cèl·lules s'han publicat estudis que han demostrat la capacitat de neovascularitzar el miocardi quan han estat administrades via intravenosa perifèrica (Kocher *et al.* 2001). A nivell clínic, es va realitzar l'estudi TOPCARE-AMI (Assmus *et al.* 2002; Schächinger *et al.* 2004) on es va constatar la millora de la funció ventricular en els pacients que rebien aquestes cèl·lules. Actualment els progenitors endotelials no s'empren en el marc hospitalari degut a la seva baixa disponibilitat (Heeschen *et al.* 2004).
- *Cèl·lules mare derivades de moll d'os*: s'ha descrit que el moll d'os conté diferents tipus de poblacions cel·lulars amb capacitat migratòria i de transdiferenciació. A més, ha estat descrit que presenten certs trets cardiomiogènics (Bayes-Genis *et al.* 2005; Roura *et al.* 2006; Farré *et al.* 2007). Entre aquestes trobem les cèl·lules mare hematopoiètiques, cèl·lules mare mesenquimals i cèl·lules progenitores endotelials. Totes tenen la capacitat de formar nous vasos en el teixit diana, però només les cèl·lules d'origen mesenquimal presenten la capacitat de diferenciar-se en cardiomiòcits (Orlic *et al.* 2001) a més d'adipòcits, condrocits, osteòcits i cèl·lules musculars. Els estudis clínics derivats més rellevants han estat el BOOST (Wollert *et al.* 2004), ASTAMI (Lunde *et al.* 2006) i REPAIR-AMI (Schächinger *et al.* 2006), els quals s'han basat en l'administració de dites cèl·lules en pacients amb IM sotmesos a PCI. Els resultats a nivell funcional no han estat favorables i en alguns casos, discrets (Schächinger *et al.* 2006). Dins del marc de la regeneració cardíaca, actualment han deixat de ser emprades perquè alguns estudis han demostrat que són capaces de formar os o cartílag dins del propi miocardi (Breitbach *et al.* 2007).
- *Cèl·lules mare derivades de sang de cordó umbilical*: aquest tipus cel·lular ha estat aïllat de la sang obtinguda del cordó umbilical i s'ha descrit que té capacitat de pròpia renovació i diferenciació cap a múltiples llinatges cel·lulars. En medicina regenerativa l'ús d'aquestes

cèl·lules, criopreservades en bancs cel·lulars públics o privats, s'està estudiant en previsió, entre d'altres, d'un potencial cardiovascular molt prometedor (Prat-Vidal *et al.* 2007; Roura *et al.* 2010).

- *Cèl·lules mare derivades de teixit adipós (ATDSC)*: el teixit adipós és una font abundant i accessible de cèl·lules mesenquimals adultes amb capacitat de diferenciació cap a múltiples llinatges (Gimble *et al.* 2007). Les ATDSC s'estan revelant com una font alternativa per a l'obtenció de cèl·lules pluripotencials amb capacitat regenerativa. Inicialment, als anys 60 Rodbell va ser un dels pioners en l'aïllament d'aquest tipus cel·lular a partir de mostres de teixit adipós de rata mitjançant la digestió amb col·lagenasa (Rodbell. 1966a, b; Rodbell *et al.* 1966b). Posteriorment, aquest processament es va realitzar amb teixit adipós humà (Van *et al.* 1976) i es va poder determinar la seva capacitat de diferenciació cap a múltiples llinatges cel·lulars, incloent teixit adipós (Gimble *et al.* 2003), cartílag (Erickson *et al.* 2002), os (Gimble *et al.* 2003), múscul esquelètic (Zuk *et al.* 2001; Gimble *et al.* 2003), cèl·lules neuronals (Safford *et al.* 2002), cèl·lules endotelials (Planat-Benard *et al.* 2004a; Martínez-Estrada *et al.* 2004) i cèl·lules de musculatura llisa (Di Rocco *et al.* 2006). Addicionalment també s'ha establert el seu immunofenotipatge com a cèl·lules mesenquimals i el seu potencial cardiomiogènic (Gaustad *et al.* 2004; Planat-Bénard *et al.* 2004b; Rangappa *et al.* 2003). Aquest potencial ha estat descrit degut a l'adquisició de batec espontani i a l'expressió d' α -actinina, β -miosina de cadena pesada (β -MHC), troponina I cardíaca (cTnI) i connexina-43 (Cx43) quan es cultiven amb 5-azacitidina, en co-cultius amb cardiomiòcits neonatals o espontàniament en condicions de cultiu concretes. Com a conseqüència d'aquestes troballes, les ATDSC s'han començat a utilitzar com a base de la cardiomioplàstia cel·lular en estudis d'experimentació animal. Els principals treballs realitzats en model murí d'IM han revelat que aquest nou tipus cel·lular preserva la funció cardíaca (Bayes-Genis *et al.* 2010; Léobon *et al.* 2009) i expressa *de novo* marcadors cardíacs dues setmanes post-administració (Strem *et al.* 2005). Aquests estudis també han estat confirmats en el model porcí (Rigol *et al.* 2010; Matthias *et al.* 2006; Valina *et al.* 2007) on es detecta que els animals que reben les ATDSC via intracoronària després d'un IM milloren la seva funció cardíaca augmentant la densitat vascular en la zona periinfart, respecte els animals control.

A nivell clínic, els assaigs amb grups reduïts de pacients han començat a iniciar-se i per aquest motiu encara no hi ha resultats concloents. L'estudi APOLLO (*AdiPOse-derived stem ceLLs in the treatment of patients with ST-elevation myOcardial infarction*), el primer assaig en humans amb ATDSC, es basa en l'anàlisi prospectiva de 4 cohorts de 12 pacients amb IM sotmesos a una PCI com a tractament electiu. A aquests pacients se'ls realitza una liposucció per extraure les ATDSC autòlogues i administrar-les via intracoronària 24 hores després de la PCI (al grup tractament) (Meliga *et al.* 2007). Recentment, s'han publicat els resultats d'aquest estudi on es demostra que la teràpia cel·lular millora la fracció d'ejecció en un 4%, la mida de l'IM es redueix en un 50% als 6 mesos de seguiment i també millora el defecte de perfusió dels malalts isquèmics (Houtgraaf *et al.* 2012).

Malgrat administrar les cèl·lules en el teixit diana, assegurant la seva localització a nivell de l'àrea isquèmica, la retenció, supervivència i integració cel·lular són termes encara controvertits i difícils d'assolir.

Tot i l'existència de diferents poblacions amb capacitat cardiomiogènica, dels resultats obtinguts en els assaigs clínics amb casuística reduïda que s'han realitzat fins ara, es conclou que segueixen obertes moltes qüestions referents al tipus cel·lular ideal, les vies d'administració, el *timing* òptim i la seguretat pel pacient receptor.

4.2. Enginyeria tissular

Paral·lelament a la teràpia cel·lular, l'enginyeria tissular és una nova alternativa emergent de caire experimental en el camp de la regeneració cardíaca. Aquesta tecnologia pertany a la branca de la bioenginyeria que emprava la combinació de cèl·lules, mètodes d'enginyeria de materials, bioquímica i fisicoquímica amb la finalitat de millorar o reemplaçar parcial o totalment un òrgan o teixit.

Per dur a terme l'enginyeria tissular cardíaca és necessari seleccionar una bona font cel·lular humana, generar matrius de teixit cardíac, assegurar l'acoblament cel·lular electromecànic, afavorir una funció contràctil estable i establir una vascularització funcional (Vunjak-Novakovic. 2011).

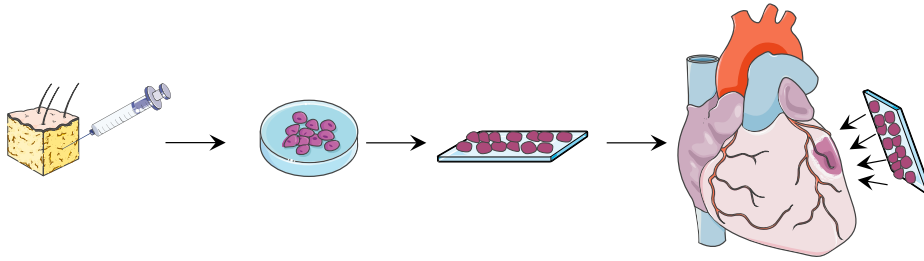


Figura 4.2. Enginyeria tissular. Es representa el procés de l'enginyeria tissular des de l'obtenció de cèl·lules a partir d'un teixit adult, el seu cultiu cel·lular i la posterior administració a la cicatriu post infart mitjançant una matriu biocompatible. (La figura ha estat dissenyada usant els dibuixos de Servier Medical Art).

Actualment, un altre punt crític, a part de la correcta elecció del tipus cel·lular reparador, és l'obtenció d'una matriu cel·lular amb característiques similars al miocardi. De la cerca d'aquestes matrius biocompatibles han sorgit estudis rellevants com és aconseguir matrius de miocardi descel·lularitzat que posteriorment es repoblen amb cèl·lules cardiomiogèniques (Ott *et al.* 2008) per a la seva aplicació i integració en la zona d'IM. Altres estudis es basen en la creació d'una matriu que ofereixi les mateixes propietats estructurals i electromecàniques que el cor mitjançant elastòmers que permeten incorporar un hidrogel on s'embeu la població cel·lular electa (Radisic *et al.* 2004; Radisic *et al.* 2008). Altres alternatives es basen en el cultiu cel·lular en contacte amb l'hidrogel per a que les mateixes cèl·lules creïn la seva pròpia matriu (Eschenhagen *et al.* 1997) o directament injectar-les embegudes amb l'hidrogel i esperar que s'ordenin formant matrius capaces d'acoblar-se amb el miocardi sa (Dawson *et al.* 2008).

Una altra idea més senzilla però de mateixa efectivitat ha estat cultivar les cèl·lules mesenquimals afavorint la formació de monocapes que posteriorment s'implanten sobre la cicatriu miocardiaca (Miyahara *et al.* 2006).

Darrerament s'ha estat investigant la manera d'administrar factors de creixement, citocines o fàrmacs capaços d'arribar a l'òrgan diana mitjançant la via d'administració intravenosa perifèrica. D'aquesta manera s'eviten les estratègies que impliquen abordatges quirúrgics invasius i s'assegura que el component administrat assoleixi exclusivament el teixit diana. Dels darrers treballs més destacats podem anomenar el del grup de Kohane (Dvir *et al.* 2011), on mitjançant

liposomes que inclouen la droga a administrar, són capaços de reconèixer únicament el receptor de l'angiotensina I, que en condicions d'IM es veu elevat (Molavi *et al.* 2006) i administrar el producte transportat en el miocardi lesionat.

4.3. Teràpia gènica

La teràpia gènica és una nova tècnica de caire experimental que es basa en la inserció de còpies funcionals absents en el genoma d'un individu. Actualment, la seva aplicació és a nivell cel·lular i tissular amb l'objectiu clau de tractar una malaltia. La teràpia gènica pel tractament de la insuficiència cardíaca derivada de l'IM es tracta d'un camp emergent de caràcter multidisciplinari on s'estan identificant les vies claus de senyalització, la creació de vectors modernitzats i de noves tecnologies d'administració (Ishikawa *et al.* 2011). Molt recentment, fruit d'aquestes investigacions, han aparegut estudis a nivell clínic amb resultats esperançadors, mitjançant la injecció intracoronària de vectors virals transportadors de gens deficients en pacients amb insuficiència cardíaca greu (Yang ZJ *et al.* 2009; Jessup *et al.* 2011).

Els canvis patològics derivats de l'IM que donen lloc a la insuficiència cardíaca, com la necrosi cel·lular, la disfunció contràctil i el remodelat ventricular, estan governats per mecanismes moleculars i cel·lulars encara desconeguts. Per esbrinar-los seria necessari conèixer les alteracions en l'expressió gènica del miocardi sotmès a un procés d'infart i valorar els seus canvis al llarg del temps. Després de tot, l'augment del coneixement dels mecanismes cel·lulars i moleculars subjacents en l'IM millorarà l'èxit de noves teràpies alternatives contra el desenvolupament de la insuficiència cardíaca.

Avenços tècnics recents en la producció de *microarrays* de cDNA han fet possible la creació de perfils d'expressió gènica de desenes de milers de gens simultàniament. Per aquest motiu, seria del tot estimable crear un mapa genètic mitjançant un estudi de *microarray* per aportar una nova eina bàsica per la teràpia gènica de l'IM.

5. *Home is where the heart is*

Malgrat els grans avenços anteriorment descrits, en el marc de la recerca cardiovascular per a restablir el miocardi després d'un infart, queden encara moltes incògnites per resoldre. Actualment, les millores que ofereixen les teràpies experimentals no són suficients per a garantir la completa restauració del teixit malmès. Els resultats obtinguts en estudis de teràpia cel·lular són encara molt confosos, doncs resta per determinar quin o quins tipus de poblacions cel·lulars són les idònies, quina és la via d'administració més adequada i en quin moment hauria de ser aplicada. Pel que fa a l'enginyeria tissular, a banda de no haver-se trobat la cèl·lula electa, tampoc s'ha pogut establir quina matriu biocompatible és capaç de garantir una bona adhesió cel·lular, de fàcil producció, sense efectes adversos, assegurant l'acoblament cel·lular electromecànic i afavorint una funció contràctil estable. Teràpies alternatives com la gènica encara estan en una fase molt incipient i els resultats obtinguts són encara molt preliminars.

Així doncs, davant d'aquest escenari és necessari obrir noves portes que puguin ampliar les fronteres de les línies experimentals actuals. Hauríem d'aturar-nos i pensar per un moment quins són els elements amb els què podem comptar per arrencar noves idees: "...les cèl·lules mesenquimals d'origen adipós són una bona font cel·lular...", "...les vies d'administració actuals no asseguren la retenció cel·lular en el teixit diana...", "...necessitem una matriu biocompatible amb bona adhesió cel·lular, sense efectes adversos..." i en darrera instància: per què no mirem al nostre voltant?

5.1. El cor

El cor és l'òrgan principal del sistema circulatori que pot definir-se com un conjunt de dues bombes que treballen en sèrie i que proveeixen la força necessària per impel·lir sang venosa (carboxigenada) dins el circuit pulmonar i sang oxigenada cap a la circulació sistèmica. Es compon essencialment per teixit muscular i, en menor proporció, per teixit connectiu i fibrós, i es divideix en quatre cavitats: 2 aurícules i 2 ventricles. Les aurícules reben la sang i actuen com a reservoris fins que aquesta sang és enviada als ventricles, els quals tenen la funció d'expulsar-la fora del cor. Respecte les aurícules, els ventricles són molt

més gruixuts per a poder garantir la força cardíaca i, entre sí, la paret del ventricle esquerre és de major gruix que la del dret, donat que la sang oxigenada ha d'assolir la totalitat del cos.

El cor està format pels cardiomiòcits, cèl·lules musculars exclusives d'aquest òrgan, cèl·lules endotelials i cèl·lules de musculatura llisa. Els cardiomiòcits formen un sincici tridimensional capaç de propagar senyals elèctriques a través d'unions intracel·lulars específiques per a produir contraccions mecàniques i expulsar la sang.

5.2. El pericardi

5.2.1. Estructura del pericardi

El pericardi, localitzat al mediastí mig, és una membrana fibroserosa de dues capes que envolta el cor i als grans vasos, separant-los de les estructures veïnes. Forma una bossa o sac que cobreix completament el cor i s'estén fins a les arrels dels grans vasos. S'uneix al diafragma mitjançant el lligament pericardiofrènic i en la seva cara externa presenta illots adiposos vascularitzats mentre que la interna es correspon a la làmina parietal del pericardi serós. La funció del pericardi és la de protegir al cor de lesions externes formant una barrera de manera que el preserva d'infeccions, mantenint-lo en una posició correcta evitant possibles torsions cardíques i, alhora, evitant l'excessiva dilatació ventricular.

El pericardi està dividit en dos capes ben diferenciades: el pericardi fibrós i el pericardi serós.

- *Pericardi fibrós*: correspon a la capa més externa del pericardi, és resistent inextensible i cobreix la làmina parietal del pericardi serós. Es tracta d'una bossa de forma cònica amb la base al diafragma unida amb el tendó central del diafragma. Està formada per capes de fibres de col·lagen disposades en diferents direccions dins d'una matriu de teixit connectiu que també conté fibres d'elastina. Anteriorment, el pericardi fibrós s'uneix a la part posterior de l'estèrnum mitjançant els lligaments esternopericardíacs, mantenint així la posició del cor en la cavitat toràcica. La seva funció és la de limitar la distensió cardíaca.

- *Pericardi serós*: format per una monocapa de cèl·lules mesotelials està dividit en dos capes ben diferenciades donada la seva localització; el pericardi parietal queda en contacte íntim amb el pericardi fibrós, mentre que el pericardi visceral o epicardi està adjacent al miocardi del qual se separa a nivell dels vasos coronaris. Aquestes dues capes resten separades per la cavitat pericardíaca i estan en contacte amb el líquid pericardíac. S'uneixen en dos reflexions: una superior, rodejant artèries, aorta i tronc pulmonar i una posterior rodejant les venes cava i pulmonars, en forma de J donant lloc al si oblic del pericardi, posterior a l'aurícula esquerra.

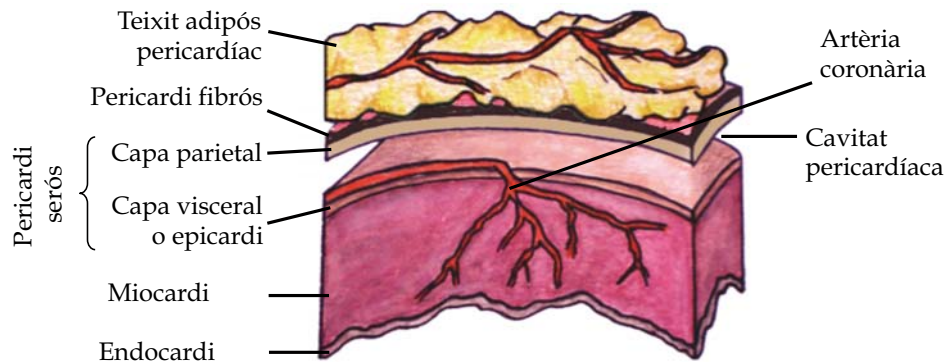


Figura 5.2.1. Estructura del pericardi. Dibuix esquemàtic de les diferents parts en què es divideix el pericardi i la seva localització respecte el miocardi.

5.2.2. Vascularització i innervació pericardíaca

El pericardi, en tot el seu gruix, està vascularitzat per diferents branques de l'artèria toràcica interna, la pericardiofrènica, la frènica inferior, l'aorta toràcica i arterioles de les artèries bronquials, tiroïdal, imoesofàgica i de la mediastínica. Les venes del pericardi entren al sistema àcigos: venes posteriors, venes frèniques superiors i vena cava superior o braquiocefàlica. Pel que fa referència al drenatge limfàtic, hi participen les cadenes frèniques, traqueobronquials inferiors i ganglis infradiafragmàtics. Finalment, la innervació del pericardi depèn del nervi frènic a nivell parasimpàtic (transcorrent pel pericardi fibrós) i de les branques coronàries del plexe coronari a nivell simpàtic.

5.2.3. Contingut pericardíac

Entre les dues capes del pericardi serós, a la cavitat pericardíaca pròpiament dita, hi ha un espai mínim o virtual que conté líquid pericardíac en un volum de 15-50 ml, distribuït com una fina capa que envolta el cor i la sortida dels grans vasos. És un líquid clar, serós i lubricant, format per les cèl·lules mesotelials del pericardi serós, les quals intervenen en la seva producció i en l'intercanvi de fluids i electròlits amb el sistema vascular. Té la funció de lubricar i evitar el freg del cor amb les estructures adjacents, mercès al seu alt contingut en fosfolípids.

5.2.4. Teixit adipós pericardíac

Al voltant del pericardi hi ha cúmuls de greix d'origen mediastínic distribuït en dues localitzacions: el teixit adipós epicardíac situat al voltant dels grans vasos i les artèries coronàries ocupant el 80% de la superfície cardíaca i responsable del 20% del pes del cor, i el teixit adipós pericardíac ubicat a la superfície externa del pericardi fibrós en contacte amb la cavitat mediastínica.

Recentment, el greix epicardíac s'ha revelat com a una nova font de cèl·lules mare mesenquimals amb trets diferencials de les cèl·lules mare residents al teixit adipós d'origen subcutani (Bayes-Genis et al. 2010). Les cèl·lules mare de greix epicardíac (cardiacATDSC) expressen un perfil de marcadors de superfície propis de cèl·lules de caràcter mesenquimal (molt positives per CD105, CD44, CD166, CD29 i CD90) i tenen capacitat immunosupressora. Addicionalment, mostren un fenotip similar als cardiomiòcits donat que tenen la capacitat d'expressar *de novo* marcadors miocardiàcs com la cTnI i *in vitro* no es diferencien cap a adipòcits. *In vivo*, aquesta nova població cel·lular administrada via intramiocardiàca després de la inducció d'IM en el model murí, ha estat la responsable de la reducció de la mida de l'IM, l'augment de la vascularització miocardiàca i la millora de la funció ventricular. A més, s'ha pogut comprovar que un cop implantades a nivell miocardiàc, aquestes cèl·lules adquireixen una elevada expressió constitutiva de proteïnes cardíques com GATA-4, Cx43, β -MHC i α -actinina sarcomèrica, a més del marcador endotelial CD31. Un altre tret diferencial d'aquest nou tipus de cèl·lula mare resideix en la capacitat de secretar factors proangiogènics sota condicions d'hipòxia *in vitro*, suggerint un possible efecte paracrí afavorint la vascularització local.

Com s'ha descrit anteriorment, la part externa del pericardi fibrós està recoberta per illots de teixit adipós vascularitzat. Aquest greix és una prolongació del teixit adipós mediastínic que a nivell del diafragma s'invagina i acompanya al pericardi. Aquest greix vascularitzat pot ésser dissecat i aïllat fàcilment sense malmetre la seva aportació sanguínia, obtenint un pedicle adipós vascular que pot ésser transposat.

Donat que el teixit adipós epicardíac és una font de cèl·lules mesenquimals amb marcada capacitat cardiodiferenciadora, l'objectiu d'aquesta tesi doctoral ha estat: comprovar que les cèl·lules mesenquimals del teixit adipós pericardíac es comporten com les d'origen epicardíac i, conseqüentment, transposar un pedicle adipós vascularitzat d'origen pericardíac sobre la superfície miocardiaca isquèmica després de la inducció de l'IM en el model porcí. Aquest pedicle es comportaria doncs, com una biomembrana amb cèl·lules mesenquimals combinant la teràpia cel·lular i l'enginyeria tissular cardíaca.

Hipòtesi i Objectius

Hipòtesi

Recentment ha estat demostrada l'existència de cèl·lules progenitores en el greix que envolta el cor. Aquesta nova font cel·lular ha esdevingut una bona alternativa per a regenerar el miocardi infartat. Per aquest motiu, és possible que posant en contacte el teixit adipós cardíac en forma de biomembrana amb la zona infartada es pugui limitar l'extensió de l'infart de miocardi.

Objectius

- 1) Generar els perfils genètics de l'evolució de l'IM en el model porcí.
- 2) Determinar l'existència de cèl·lules mesenquimals al teixit adipós d'origen pericardíac i caracteritzar-les.
- 3) Avaluar l'efecte de la transposició d'un pedicle adipós pericardíac vascularitzat sobre:
 - a. l'IAM en el model porcí per a valorar els possibles efectes beneficiosos sobre la mida de l'infart i la funció ventricular.
 - b. l'ICM en el model porcí per a valorar els possibles efectes beneficiosos sobre la mida de l'infart i la funció ventricular.

Material i Mètodes

Anàlisi de l'evolució de l'expressió gènica de l'IM

1. Obtenció de mostres de teixit cardíac

Per a l'estudi de l'evolució de l'expressió gènica de l'IM en el temps es processen 18 mostres aparellades procedents de miocardi distal (septe interventricular) i de miocardi infartat de 3 animals de 6 (n=6), de 30 (n=6) i de 45 dies (n=6) d'evolució. Addicionalment, també es processa teixit miocardiàc procedent de 3 animals sans com a control endogen de l'expressió gènica.

Les mostres s'obtenen seguidament a l'extracció del cor un cop sacrificats els animals. Cada mostra es recull en un tub *ependorf* amb 1 ml de solució estabilitzadora d'ADN i ARN (Allprotect Tissue Reagent®, Qiagen Iberia). Seguidament totes les mostres es congelen amb nitrogen líquid i conserven a -80°C per a preservar la seva qualitat.

2. Extracció d'ARN i anàlisi de qualitat

2.1. Extracció d'ARN

Per a l'extracció de l'ARN total s'ha utilitzat el kit *RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit* (Qiagen Iberia) seguint el protocol de la casa comercial. Breument es descriu el protocol realitzat:

- Pesar la mostra sense excedir els 30 mg de pes.
- Escindir el teixit amb bisturí i afegir 590 µl de *RNAse free-water* i 10 µl de proteïnasa K.
- Homogeneïtzar el teixit amb el *TissueRuptor*.
- Incubar a 55°C durant 10 minuts.
- Centrifugar a temperatura ambient 3 minuts (10000 x g).
- Extreure el sobrenedant (900 µl aproximadament) i passar-ho a un nou *ependorf*.

- Afegir 450 µl d'etanol absolut i barrejar pipetejant.
- Transferir 700 µl de la mostra a una columna facilitada en el kit, centrifugar ($\geq 8000 \times g$) durant 15 segons. Eliminar la part líquida.
- Repetir el mateix pas amb la resta de mostra.
- Afegir 350 µl de tampó RW1 a la columna i centrifugar durant 15 segons ($\geq 8000 \times g$) i extreure el líquid sobrant.
- Afegir 10 µl de solució d'estoc de *DNAse* I en 70 µl de tampó RDD. Afegir la barreja a la columna i deixar-ho 15 minuts a temperatura ambient.
- Afegir 350 µl de tampó RW1 i centrifugar durant 15 segons ($\geq 8000 \times g$). Extreure el líquid sobrant.
- Afegir 500 µl de tampó RPE i centrifugar durant 15 segons ($\geq 8000 \times g$). Extreure el líquid sobrant.
- Col·locar la columna en un nou *eppendorf* i afegir 30 µl de *RNAse free water* per eluir l'ARN. Centrifugar a temperatura ambient durant 1 minut ($\geq 8000 \times g$).

2.2. Anàlisi de qualitat

Un cop obtingut l'ARN de les mostres de teixit es procedeix a analitzar la integritat i la puresa per espectrometria i nanoelectroforesi, usant l'espectòmetre NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington) i l'assaig Nano *lab-on-a-chip* per l'ARN total eucariota amb el *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies), respectivament. Per a l'estudi de *microarrays* només s'empren les mostres d'alta puresa ($A_{260}/_{280} > 1.9$; $A_{260}/_{230} > 1.6$) i d'elevada integritat (*RNA integrity number* (RIN) > 6.9).

3. Creació dels perfils de l'expressió gènica

Els perfils d'expressió gènica s'obtenen usant *GeneChip® Porcine Genome Array* (Affymetrix) el qual inclou 23.937 sondes fixes que interroguen aproximadament 23.256 transcrits de 20.201 gens porcins. Breument, es processen 200 ng d'ARN de cada mostra, marcada i hibridada amb el *GeneChip® Porcine Genome Array* segons el manual d'usuari d'*Affymetrix GeneChip® 3' IVT Express Kit*. Inicialment, es retrotranscriuen 200 ng d'ADNc amb l'encebador T7 oligo (dT) per sintetitzar la primera cadena que conté la seqüència del promotor T7.

Seguidament, aquest ADNc es converteix a doble cadena d'ADN i s'usa com a motlle per a produir múltiples còpies d'ARNc biotinitat mitjançant una reacció de transcripció *in vitro*. L'ARNc resultant es purifica per extreure els ribonucleòsids trifosfat (NTPs) no incorporats, sals, enzims i fosfats inorgànics, i posteriorment es fragmenta. Finalment, s'afegeixen 10 µg d'ARNc biotinitat fragmentat al còctel d'hibridació, es carrega a un *GeneChip® Porcine Genome Array* i s'hibrida durant 16 hores a 45°C i 60 rpm en un *Affymetrix GeneChip® Oven 645*. Després de la hibridació, es neteja l'*array* i es tenyeix a l'*Affymetrix GeneChip® Fluidics Station 450*. L'*array* tenyit és finalment escanejat usant l'*Affymetrix GeneChip® Scanner 3000 7G*, generant arxius amb extensió.CEL per cada *array*.

4. Anàlisi funcional de l'expressió gènica mitjançant Ingenuity Pathway Analysis (IPA)

4.1. Expressió gènica respecte el miocardi sa

Per analitzar els canvis en l'expressió gènica causats després d'un IM, cada condició i combinació temporal (6, 30 i 45 dies) de les mostres es compara amb les mostres de miocardi sa, obtenint com a resultat un total de 6 llistes de gens diferencialment expressats. Addicionalment, s'estudien quines són les vies que presenten un major nombre de gens alterats.

4.2. Perfils temporals de l'expressió gènica

Després d'estudiar l'expressió gènica a les zones distals i d'infart respecte els controls sans, es procedeix a l'estudi en detall dels diferents perfils temporals (6, 30 o 45 dies) de les zones distals i d'infart. Aquesta anàlisi només es realitza en aquells gens que presenten prèviament diferències significatives d'expressió respecte els controls sans. Els perfils temporals es generen comparant les mostres aparellades d'infart i de zona distal, en cada temps d'estudi. Un cop realitzades totes les comparatives, s'obtenen 4 patrons dependent de la sobreexpressió o inhibició dels gens a 6, 30 i 45 dies:

- Patró 1:
 - Patró 1.1.: gens sobreexpressats en els 3 temps d'estudi.

- Patró 1.2.: gens inhibits en els 3 temps d'estudi.
- Patró 2:
 - Patró 2.1.: gens sobreexpressats a 6 dies i inhibits a 30 i 45 dies.
 - Patró 2.2.: gens inhibits a 6 dies i sobreexpressats a 30 i 45 dies.
- Patró 3:
 - Patró 3.1.: gens sobreexpressats a 6 i 30 dies i inhibits a 45 dies.
 - Patró 3.2.: gens inhibits a 6 i 30 dies i sobreexpressats a 45 dies.
- Patró 4:
 - Patró 4.1.: gens sobreexpressats a 6 i 45 dies i inhibits a 30 dies.
 - Patró 4.2.: gens inhibits a 6 i 45 dies i sobreexpressats a 30 dies.

Per a dur a terme les dues anàlisis funcionals anteriorment descrites, es pugen les llistes resultants dels gens diferencialment regulats a l'eina en línia anomenada *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA versió 8.0, Ingenuity System Inc.; www.ingenuity.com). Per interpretar les dades en el context dels processos biològics, vies i xarxes s'empra la funció de "Core Analysis" de l'IPA.

5. Validació per PCR quantitativa a temps real

Després de l'estudi de l'expressió gènica mitjançant *microarrays* és necessari realitzar una validació de les dades obtingudes amb la tècnica de PCR quantitativa a temps real (RT-qPCR).

5.1. Transcripció inversa

La retrotranscripció o transcripció inversa es realitza per sintetitzar ADNc a partir de l'ARN total obtingut per cada mostra.

A partir de les mostres d'ARN obtingudes anteriorment per a l'estudi de *microarrays*, es calcula la concentració de cada mostra mitjançant l'espectòmetre NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies)

es porta a terme la transcripció inversa. A partir de 2 µg d'ARN total de cada mostra s'afegeix:

- 25 µl de tampó de reacció per la retrotranscripció
- 2,5 µl d'hexàmers aleatoris (50 µM) (Qiagen Iberia)
- 1 µl de transcriptasa reversa *iScript* (50X)
- aigua lliure de nucleases fins a un volum final de 50 µl

Cada mostra obtinguda se sotmet al següent protocol en un termociclador (Bio-Rad):

- 10 minuts a 25°C (anellament d'hexàmers)
- 10 minuts a 50°C (síntesi d'ADNc)
- 5 minuts a 95°C (inactivació de la transcriptasa reversa)

5.2. RT-qPCR

Les amplificacions es porten a terme a partir de 2 µl d'ADNc i en un volum final de 50 µl contenint:

- 21 µl d'aigua estèril
- 25 µl *TaqMan 2X Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems)
- 2 µl d'ADNc
- 2 µl de sondes *Taqman* (encebadors específics pel gen que es vol amplificar)

Les sondes emprades en aquest anàlisi van ser les següents:

- Gens d'expressió constitutiva (endògens):

- Gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (GAPDH): Ss03375435_u1
- Glucoronidasa β (GUSB): Ss03387751_u1
- Fosfoglicerat quinasa 1 (PGK1): Ss03389144_m1

- Gens d'expressió diferencial obtinguts amb l'anàlisi de *microarrays* que es volen validar:

- Proteïna de morfogènesi òssia 2 (BMP2): Ss03373798_g1
- Receptor de la proteïna de morfogènesi òssia 2 tipus IA (BMPRI1A): Ss04248558_m1
- Membre de la família SMAD (mediadors del senyal de transducció) (SMAD1): Ss03391094_m1
- T-box 5 (TBX5): Ss03376195_g1
- Factor transformador β 3 (TGF β 3): Ss03394350_m1
- *B-cell lymphoma 2* (BCL2): Ss03375167_s1
- Laminina A/C (LMNA): Ss03389729_m1
- Receptor del factor de necrosi tumoral membre 1A (TNFRSF1A): Ss03391125_m1

Les dades obtingudes s'analitzen amb el programa *ABI Prism 7000 Sequence Detection System*. La quantitat relativa obtinguda de cada gen diana es calcula amb el mètode de la corba estàndard usant el gen GUSB com a control d'expressió endògena (gen endogen més estable dels analitzats). Així, les comparacions dels nivells d'expressió relativa es realitza amb el mètode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak *et al.* 2001).

6. Anàlisi estadística

L'anàlisi de les dades obtingudes per *microarray* es realitza de la següent manera: després del control de qualitat de les dades en brut, es corregeixen, normalitzen per quartils i resumeixen a nivell gènic usant la mitjana robusta multi-xip (RMA) (Irizarry *et al.* 2003) obtenint un total de 24.123 sondes fixes amb intensitat normalitzada per sobre de 3 com a mínim en 10 mostres. Els models lineals per *microarray* (LIMMA) (Smyth. 2004) són un model t-estadístic moderat que s'utilitza per a la detecció dels gens expressats diferencialment entre les diferents condicions d'estudi. Addicionalment, es realitza una correcció per a les comparacions múltiples usant la taxa de descobriments falsos (FDR). Només se seleccionen com a significatius els gens que mostren un p-valor ajustat inferior a 0.05.

També es realitza l'anàlisi dels *clusters* jeràrquics per veure com s'agrupen les dades. Totes les dades resultants de l'anàlisi de *microarrays* són analitzades amb R (versió 2.11.1) amb els paquets estàndards *Bioconductor* i *aroma.affymetrix* (Bengtsson *et al.* 2008).

Experimentació *in vitro*

1. Aïllament i cultiu cel·lular

1.1. Aïllament de cèl·lules progenitores derivades de teixit adipós epicardíac i pericardíac

Les mostres de teixit adipós epicardíac i pericardíac han estat obtingudes de porcs procedents dels grups control dels models agut i subagut, abans de ser sotmesos a la inducció de l'IM. S'ha seguit el següent protocol:

- Rentar el teixit amb PBS i dissecció dels capil·lars per evitar al màxim la contaminació d'origen sanguini.
- Tallar en fragments petits el teixit i digerir-los durant 30 minuts en 10 ml de solució de medi de cultiu *α-minimum essential medium* (α -MEM) (Sigma-Aldrich Química) amb 0,05% de col·lagenasa tipus II (210 U/mg, GIBCO, Invitrogen).
- Afegir 10 ml de medi complet (α -MEM + 10% de sèrum fetal boví (FBS) + 1% de penicil·lina (GIBCO, Invitrogen)+ 1% de glutamina (GIBCO, Invitrogen)+ 100 μ l de plasmocin (InvivoGen, IBIAN Technologies).
- Centrifugar durant 10 minuts a 1200 x g.
- Treure el sobrenedant i resuspendre el pèl·let amb 5 ml de medi complet.
- Sembrar-ho a un flascó de 25 cm² i incubar-ho a 37°C amb atmosfera de 5% de CO₂.

1.2. Cultiu de cèl·lules progenitores derivades de teixit adipós epicardíac i pericardíac

Tots els tipus cel·lulars es cultiven amb medi α -MEM complet, realitzant canvis de medi cada 3-4 dies. Quan la població cel·lular arriba a una confluència aproximadament d'un 80%, les cèl·lules es replaquejen mitjançant tripsinització (Trypsina 2X EDTA 0.05%, GIBCO, Invitrogen) i

es resembren a una densitat de 1000 cèl·lules viables/cm². El cultiu cel·lular es manté fins a passatge 5-7.

2. Citometria de flux

La citometria de flux és una tècnica que permet l'anàlisi de les característiques fisicoquímiques de les cèl·lules a través d'un aparell electrònic de detecció òptica, el citòmetre de flux (Fulwyler. 1974). En aquesta tesi s'utilitza aquesta metodologia per a caracteritzar fenotípicament les poblacions cel·lulars d'estudi mitjançant la detecció de les proteïnes de superfície de membrana cel·lular. S'identifica la presència o absència d'aquestes proteïnes de superfície mitjançant anticossos específics units a molècules fluorescents.

Per a poder determinar si les cèl·lules d'origen adipós estudiades comparteixen fenotip amb les mesenquimals humanes s'estudien els següents marcadors de superfície específics: CD14, CD29, CD34, CD44, CD45, CD90, CD105 i CD106. Els anticossos utilitzats, així com els volums i isotips queden resumits a la taula 9.

Antigen	Marcatge	Isotip	Volum (µl)	Casa comercial
CD14	FITC	IgG ₂ b	10	AbD Serotec
CD29	FITC	IgG ₁ , κ	20	BD Biosciences
CD34	PE	IgG ₁ , κ	20	BD Biosciences
CD44	FITC	IgG ₁	20	AbD Serotec
CD45	FITC	IgG ₁	10	AbD Serotec
CD90	PE	IgG ₁ , κ	20	BD Biosciences
CD105	FITC	IgG ₂ a	20	Abcam
CD106	FITC	IgG ₁ , κ	20	BD Biosciences

Taula 9. Anticossos específics utilitzats per a la caracterització de les cèl·lules d'origen adipós porcí mitjançant citometria de flux.

El protocol emprat per a la caracterització fenotípica cel·lular és el següent:

- Afegir 2 ml de PBS-1%BSA a cada tub.
- Afegir el volum de suspensió cel·lular per tub, corresponent a les 350.000 cèl·lules necessàries per cada mostra.
- Agitar en vòrtex suaument durant 5 segons.
- Centrifugar a 1100 rpm durant 7 minuts.
- Treure el sobrenedant fins deixar 100 µl. Afegir en aquest volum 10 o 20 µl de l'anticòs o del control d'isotip corresponent (resguardat de la llum).
- Agitar en vòrtex suaument durant 5 segons.
- Incubar a temperatura ambient resguardat de la llum durant 30 minuts.
- Afegir 2 ml de PBS-1%BSA a cada tub.
- Agitar en vòrtex suaument durant 5 segons.
- Centrifugar a 1100 rpm durant 7 minuts.
- Treure el sobrenedant fins deixar 100 µl.
- Afegir 2 ml de PBS-1%BSA a cada tub.
- Agitar en vòrtex suaument durant 5 segons.
- Centrifugar a 1100 rpm durant 7 minuts.
- Treure el sobrenedant procurant deixar 400 µl per tub.
- Agitar en vòrtex suaument durant 5 segons.
- Lectura al citòmetre de flux.

3. Anàlisi de l'expressió basal de marcadors cardíacs en les cèl·lules progenitores al teixit adipós epicardíac i pericardíac

3.1. Anàlisi de l'expressió proteica

Mitjançant la tècnica d'immunocitofluorescència s'estudia si les cèl·lules progenitores expressen a nivell basal proteïnes específiques dels cardiomiòcits. Concretament, s'estudia l'expressió dels següents marcadors cardíacs: Cx43 (1:250) (0.69 mg/ml; Sigma-Aldrich), α -actinina (1:100) (Sigma-Aldrich) GATA4 (1:100) (200 μ g/ml; Santa Cruz) i cTnI (1:100) (200 μ g/ml; Santa Cruz). Les cèl·lules se sembren en plaques de cultiu específiques amb base de plàstic (μ -Dish 35mm, low, *IbiTreat* (Ibidi®) per a poder capturar imatges amb microscopi invertit de fluorescència (Axio Observer Z1, Zeiss). Per a dur a terme aquests marcatges se segueix el següent protocol:

- Retirar el medi de cultiu de la placa.
- Rentar amb PBS cada placa: 3 rentats.
- Fixar amb 1 ml de paraformaldehid al 4% durant 15 minuts a temperatura ambient.
- Rentar amb PBS: 2 rentats.
- Incubar les mostres durant 10 minuts amb PBS i Tritó al 0.25% (v/v) (Sigma-Aldrich), per a permeabilitzar les membranes.
- Rentar durant 5 minuts amb PBS: 3 rentats.
- Bloquejar les unions inespecífiques amb PBS-BSA a l'1% (p/v) durant 30 minuts.
- Incubar els anticossos primaris diluïts en PBS-BSA a l'1% durant tota la nit a 4°C en cambra humida.
- Rentar durant 5 minuts amb PBS: 3 rentats.
- Incubar amb anticòs secundari en PBS-BSA a l'1%: Alexa Fluor® 488 (1:500) i Alexa Fluor® 594 (1:500) (Molecular Probes, Invitrogen) a temperatura ambient durant 1 hora en fosc.
- Rentar durant 5 minuts en fosc amb PBS: 3 rentats.
- Tenyir els nuclis cel·lulars amb Hoechst 33342 durant 1 minut.
- Rentar amb PBS 1X.
- Muntar els cobreobjectes amb medi de muntatge específic per fluorescència Fluoromount® (Sigma-Aldrich).

4. Assajos de diferenciació cel·lular

La diferenciació cel·lular és el procés, en virtut del qual, les cèl·lules pateixen modificacions citològiques donant lloc a una forma i una funció determinada durant el desenvolupament embrionari o la vida d'un organisme pluricel·lular, especialitzant-se en un tipus cel·lular (Fuster *et al.* 1996).

Per analitzar la capacitat pluripotencial de les cèl·lules progenitores, els assajos de diferenciació es duen a terme amb cèl·lules de passatge 5-7 sembrades en plaques de cultiu de 24 pous. A cada placa se sembren 4 pous amb 20.000 cèl·lules viables cadascun: 2 pous són cultivats amb medi complet com a control de l'experiment i 2 amb el medi de diferenciació corresponent. Cada pou conté 1 ml de medi i es renova cada 3-4 dies.

4.1. Diferenciació adipogènica

El medi utilitzat per la diferenciació adipogènica és l'*STEMPRO® Adipogenesis Differentiation Kit* (GIBCO, Invitrogen). Per esbrinar si les cèl·lules tenen capacitat de diferenciar-se en adipòcits, el tractament es manté durant 28 dies i posteriorment es fixen i es tenyeixen amb Oil Red O (Sigma-Aldrich). El protocol és el següent:

- Rentar amb PBS cada pou: 3 rentats.
- Fixar amb 1 ml de paraformaldehid al 4% (p/v) durant 10 minuts a temperatura ambient.
- Rentar amb PBS cada pou: 3 rentats.
- Afegir 2 ml de solució d'Oil Red O durant 60 minuts a temperatura ambient i en agitació:
 - Solució d'estoc: 0.5% (p/v) en Isopropanol
 - Solució de treball: 60% (v/v) en aigua bidestil·lada de la solució d'estoc. Filtrar-ho.
- Rentar amb PBS cada pou: 3 rentats.
- Afegir 1 ml PBS-0.1% Azida (p/v). Capturar imatges.

4.2. Diferenciació osteogènica

El medi utilitzat per la diferenciació osteogènica és l'*STEMPRO® Osteogenesis Differentiation Kit* (GIBCO, Invitrogen). Per esbrinar si les cèl·lules tenen capacitat de diferenciar-se cap a osteòcits, el tractament es manté durant 21 dies i posteriorment es fixen i es tenyeixen seguint el protocol de tinció amb Alizarin Red (Sigma-Aldrich), segons s'especifica a continuació:

- Rentat amb PBS cada pou: 3 rentats.
- Fixar amb 1 ml de paraformaldehid al 4% durant 10 minuts a temperatura ambient.
- Rentar amb PBS cada pou: 3 rentats.
- Afegir 2 ml d'Alizarin Red a l'1% (p/v) en aigua bidestil·lada durant 10 minuts a temperatura ambient i en agitació.
- Rentar amb PBS cada pou: 3 rentats.
- Afegir 1 ml PBS-0.1% Azida. Capturar imatges.

4.3. Diferenciació condrogènica

Per l'anàlisi de diferenciació condrogènica s'utilitza l'*STEMPRO® Chondrogenesis Differentiation Kit* (GIBCO, Invitrogen). Per tal d'esbrinar si les cèl·lules tenen capacitat de diferenciació cap el llinatge condrogènic, el medi de diferenciació es manté durant 21 dies i posteriorment les cèl·lules es fixen i es tenyeixen amb Alcian Blue (Sigma-Aldrich), tal i com es descriu a continuació:

- Rentar amb PBS cada pou: 3 rentats.
- Fixar amb 1ml de paraformaldehid al 4% durant 10 minuts a temperatura ambient.
- Rentar amb PBS cada pou: 3 rentats.
- Afegir 2 ml d'Alcian Blue a l'1% (p/v) en 0.1N d'HCl durant 30 minuts a temperatura ambient i en agitació:
 - Obtenir la solució d'HCl 0.1N a partir d'HCl 1N: 20 ml d'HCl 1N + 180 ml d'aigua bidestil·lada.
 - Preparar 10 ml de la tinció: 0.1 g d'Alcian Blue en 10 ml d'HCl 0.1N. Filtrar-ho.
- Rentar amb HCl 0.1N cada pou: 3 rentats.

- Rentar amb 1 ml d'aigua bidestil·lada per a neutralitzar l'àcid.
- Afegir 1 ml PBS-0.1%Azida. Capturar imatges.

Experimentació *in vivo*

1. Animals

Com a model experimental animal, el porc és àmpliament utilitzat en els estudis de fisiopatologia cardíaca degut a la gran similitud del seu sistema cardiovascular amb el de l'ésser humà. Per aquest motiu el model animal escollit per aquest estudi ha estat el porc d'encreuament comercial (Landrace x Large White). En tots els casos s'han utilitzat porcs femelles degut a la seva major disposició de teixit adipós, idoni per a la realització d'aquest estudi. El pes dels animals ha estat de 30-40 Kg.

Tots els procediments experimentals s'han dut a terme segons dicta el Real Decreto 1201/2005 i han estat aprovats pel comitè local d'experimentació i benestar animal (veure Annexe 1).

2. Disseny experimental

En funció del temps d'evolució postinfart, els animals utilitzats en aquest treball es divideixen en els següents grups:

Tractament immediat: els animals d'aquest grup d'estudi són sotmesos a un IAM mitjançant lligadura de la primera marginal de l'artèria circumflexa. En els animals tractats, transcorreguts 30 minuts després de la inducció de la lesió isquèmica, es realitza la transposició d'un pedicle de teixit adipós pericardíac. En el grup control, el teixit adipós pericardíac es disseca i s'escindeix.

- Model de 6 dies d'evolució: sacrifici als 6 dies post-IM.
 - Grup tractament subagut (TS; n=8)
 - Grup control subagut (CS; n=5)
- Model de 30 dies d'evolució: sacrifici als 30 dies post-IM.
 - Grup tractament agut (TA; n=16)
 - Grup control agut (CA; n=17)

Adicionalment, es van incloure 3 animals pertanyents al grup *sham* als quals es va realitzar la transposició del pedicle adipós

pericardíac sense ser sotmesos a l'IM. Van ser sacrificats als 30 dies d'evolució.

Tractament crònic: en una primera intervenció els animals se sotmeten a un IM mitjançant l'embolització percutània de la primera marginal de l'artèria circumflexa amb la col·locació d'un *coil*. Transcorreguts 15 dies, es realitza una toracotomia lateral esquerra per a la posterior transposició del pedicle de teixit adipós pericardíac sobre la cicatriu miocardiaca derivada del procés isquèmic en els animals tractats. En els animals control es disseca el teixit adipós i es retira.

- Model de 30 dies d'evolució: sacrifici als 30 dies transcorreguts després de la transposició del pedicle adipós.
 - Grup tractament crònic (TC; n= 8)
 - Grup control crònic (CC; n= 8)

3. Anestèsia, analgèsia i monitorització

Totes les intervencions quirúrgiques segueixen el següent protocol anestèsic:

- Sedació: 10 mg/kg d'azaperona (Stresnil®, Laboratoris Dr. Esteve) per via intramuscular.
- Inducció anestèsica: tiopental sòdic (Tiobarbital® 1g, B.Braun) a la dosi de 15 mg/kg per via endovenosa a la vena auricular marginal.
- Anestèsia: seguidament es procedeix a la intubació orotraqueal i connexió a un respirador volumètric amb anestèsia gasosa d'isofluorane (Forane®, Abbott Laboratories) al 2%.
- Bloqueig neuromuscular: besilat d'atracuri (Tracrium 5ml®, GlaxoSmithKline) a la dosi de 1.5 mg/kg per via endovenosa per establir relaxació de la musculatura esquelètica durant el procés quirúrgic.
- Analgèsia: 0.75 mg/kg de fentanil (Fentanest® 0.05 mg/ml, Kern Pharma) cada 45 minuts per via endovenosa durant la intervenció quirúrgica i un pegat transdèrmic de fentanil (Durogesic® Matrix 25 microgramos/h, Janssen-Cilag) d'alliberació retardada com analgèsia postquirúrgica.

- Antibioteràpia: un cop finalitzada la cirurgia s'administra tularomicina a la dosi de 2.5 mg/kg per via intramuscular (Draxxin®, Pfizer Animal Health).

Tots els procediments quirúrgics inclouen la monitorització de l'animal amb electrocardiograma, capnografia, pulsioximetria, temperatura i pressió arterial no invasiva.

4. Inducció de l'IM

4.1. Model agut

L'animal se situa en decúbit lateral esquerre i es rasura i desinfecta la zona toràcica esquerra amb povidona iodada.

Es realitza una incisió entre el quart i cinquè espai intercostal de 15 cm de longitud seguint la direcció de la costella. Seguidament, per ordre de profunditat, es disseca per plans:

1. Teixit subcutani
2. Múscul cutani del tronc
3. Múscul dorsal ample
4. Múscul serrat ventral del tòrax a nivell dorsal i múscul oblic extern de l'abdomen ventralment.
5. Múscul intercostal extern

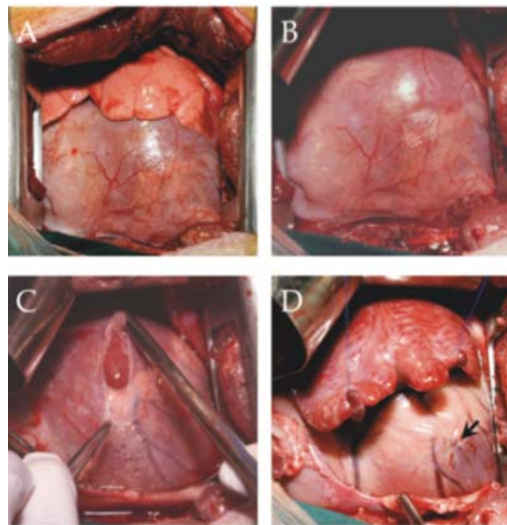


Figura 4. 1. Imatges representatives de la tècnica quirúrgica per a la inducció de l'IM. Abordatge en el quart espai intercostal amb l'exposició de la cara lateral esquerra del cor (A), lòbul esquerre pulmonar enretirat (B), pericardiectomia (C), localització de l'artèria coronària primera marginal de l'artèria circumflexa i lligadura (fletxa) amb canvi de coloració del teixit hipòxic (D).

Posteriorment es desinserta l'aponeurosi del múscul intercostal intern de la cara cranial de la cinquena costella per no lesionar estructures vàsculonervioses. A continuació, s'incideix la pleura parietal

i s'introdueix el separador toràctic de Finochietto per separar les dos costelles adjacents i establir l'abordatge cardíac.

Seguidament es realitza una pericardiectomia en creu amb una incisió vertical i una horitzontal. Les quatre porcions de pericardi resultants s'escindeixen i es retiren. Amb aquesta maniobra, queden exposats l'aurícula esquerra i els dos terços basals de la paret lliure del ventricle esquerre. S'identifica l'artèria coronària circumflexa que s'inicia en la bifurcació del tronc comú, juntament amb l'artèria coronària descendent anterior. L'artèria circumflexa transcorre paral·lelament al solc auriculoventricular i al llarg del seu recorregut emet branques conegudes com a artèries marginals. Per a induir l'infart es realitza una lligadura de la primera artèria marginal, a 1.5 cm del seu origen amb material no reabsorbible (Prolene 5/0 W8556 12-S, Ethicon). Com a conseqüència, apareix un canvi de coloració del teixit miocardiàc dependent de l'artèria closa degut a la hipòxia tissular. Tal i com s'ha descrit en l'apartat 2 (Disseny experimental), transcorreguts 30 minuts de la inducció de l'IM, es procedeix a aplicar el tractament quirúrgic que correspon a la transposició del pedicle adipós pericardiàc en els animals dels grups de tractament. Als animals dels grups control es retira el teixit adipós pericardiàc per al seu posterior estudi *in vitro*.

Un cop finalitzada la cirurgia, es procedeix a tancar el camp quirúrgic. La reducció de la ferida quirúrgica es realitza per plans:

1. Reducció de l'espai intercostal: amb material reabsorbible (Vicryl 1, 8X45, triangular, Ethicon) s'aproximen amb dues lligadures discontinües la quarta i cinquena costella.
2. Capes musculars: sutura discontinua amb punts en creu amb material reabsorbible (Vicryl 0, 36 mm triangular, 36-S, Ethicon).
3. Teixit subcutani: sutura contínua amb material reabsorbible del 0.
4. Pell: sutura intradèrmica contínua amb material reabsorbible (Vicryl 2/0, 36 mm triangular, 36-S, Ethicon).

4.2. Model crònic

L'animal se situa en decúbit supí i es rasura i desinfecta la zona pelviana dreta amb povidona iodada.

Es procedeix a la canalització de l'artèria femoral dreta mitjançant punció femoral. Seguidament s'incorpora un introductor 6F per on transcorre inicialment la guia del catèter guia fins arribar al si de Valsalva. En aquest punt s'introdueix a través de la guia un catèter introductor (RENEGADE STC-18 150/20/STRAIGHT/1RO; Boston

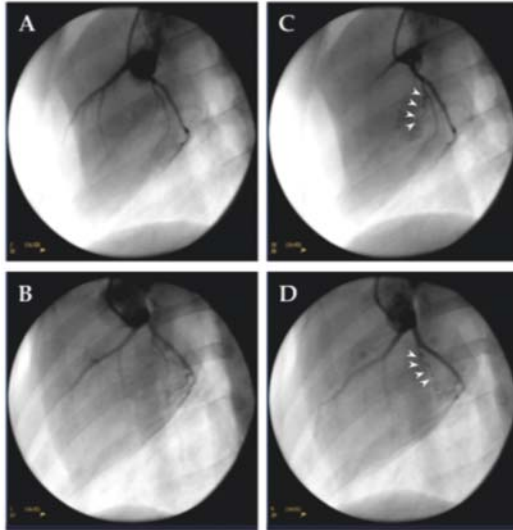


Figura 2. Inducció de l'IM amb implantació de coil. (A-B) Fotografies representatives d'angiografies basals de dos animals del grup control d'IM crònic. (C-D) i després de la implantació d'un coil (fletxes), a la branca marginal de l'artèria coronària circumflexa. En totes les imatges el catèter guia està col·locat al si de Valsalva des d'on s'injecta el contrast iodat per a obtenir la imatge de l'arbre coronari.

Scientific) per on circula el coil i es posiciona a l'entrada del tronc comú. Es retira la guia i s'introdueix el catèter d'embolització amb un coil de 3 mm de diàmetre i 23 mm de longitud (VortX™ 18 Diamond Shape 2 mm/3 mm/23 mm/3.3 mm; Boston Scientific) fins arribar a la primera marginal de l'artèria circumflexa. En aquesta localització es procedeix a l'alliberació del coil girant el cargol del catèter transportador d'embolització en sentit antihorari. Aquestes condicions garanteixen la total oclusió coronària i la creació de lesió endotelial que evitarà la reperfusió.

Transcorreguts 10 minuts, es comprova amb una infusió de contrast iodat que s'hagi assolit l'oclusió total de l'artèria. Seguidament es retiren els 2 catèters (catèter introductor i catèter d'embolització). S'extreu l'introduidor de l'artèria femoral i es realitza l'hemostàsia per compressió durant 20 minuts. L'animal es recupera i no és fins passats 15 dies quan es torna a intervenir per aplicar el tractament de la transposició del pedicle adipós pericardíac.

5. Anàlisi funcional: ressonància magnètica cardíaca

L'anàlisi de la funció cardíaca amb ressonància magnètica (RM) es realitza en animals del model agut de 30 dies d'evolució d'IM (n=7 controls i n=6 tractats) i als animals del model crònic (n=8 controls i n=8

tractats) per a valorar el possible efecte beneficiós del pedicle pericardíac. En ambdós models, es porta a terme una RM basal, una segona 2 hores postinfart (model agut) o 15 dies postinfart (model crònic) i una tercera el dia del sacrifici. La captura d'imatges es fa en apnea i electrocardiograma constant amb un escàner de 4 canals de fase de 1.5 Tesles (1.5T MR Scanner, Intera, Philips). Per analitzar la funció global del ventricle esquerre es capturen imatges en eix curt i projecció T1 emprant una seqüència de precessió lliure i estat estacionari amb un nombre de talls suficient per poder avaluar la totalitat del ventricle esquerre, des de la base fins l'àpex. Els paràmetres d'imatge són els següents: temps de repetició de 4.1 ms; temps de retard de 2.1 ms; angle d'inclinació de 60°; camp de visió de 320 X 320 mm; matriu de 160 X 160 píxels, gruix de tall de 7 mm; ample de banda de 1249.7 Hz/píxel. Les imatges de realç tardà s'adquireixen 10 minuts després de l'administració intravenosa del bolus de gadolini (Gd-DTPA, 0.2 mmol/kg; Magnevist®, Schering AG) utilitzant una seqüència de fase sensible d'inversió-recuperació (temps de repetició de 4.9 ms, temps de retard de 1.6 ms, angle d'inclinació de 15°; temps d'inversió de 157 ms i camp de visió de 330 X 330 mm, matriu de 224 X 200 píxels, gruix de tall de 10 mm, ample de banda de 282.3 Hz/píxel). Les variables de l'estudi són la fracció d'ejecció ventricular esquerra (FEVE), el volum sistòlic (VS) final i el volum diastòlic (VD) final. L'anàlisi es realitza a cegues en una estació de treball.

6. Sacrifici

Transcorreguts 6 (grup subagut), 30 (grup agut) o 45 (grup crònic) dies després de la inducció de l'IM es procedeix al sacrifici dels animals per a l'obtenció de la peça cardíaca per al posterior estudi.

Tots els animals se seden i anestesien segons el protocol anteriorment descrit (apartat 3). Es col·loquen en decúbit supí i s'incideix la línia mitja del tòrax des del manubri de l'estern fins l'apòfisi xifoide. Es disseca per plans en el següent ordre: pell, múscul subcutani i aponeurosi dels músculs pectorals, mitjançant electrobisturí. A continuació es realitza una esternotomia mitja amb serra oscil·lant i es col·loca un separador esternal de Finochietto per permetre l'accés a la cavitat toràctica.

Es procedeix al sacrifici de l'animal amb una injecció endovenosa de clorur potàssic. Immediatament a l'aturada cardiorespiratòria se seccionen els grans vasos (aorta, vena cava superior, artèria i venes pulmonars) i s'obté el cor sencer per al seu processament.

7. Anàlisi morfomètrica: càlcul de la mida de la cicatriu postinfart

La peça cardíaca es talla en tres seccions per a procedir a l'anàlisi morfomètrica. El primer tall es realitza just a nivell de la lligadura de la primera marginal de l'artèria coronària circumflexa. El segon a 1.5 cm respecte la primera incisió i el tercer a 1.5 cm respecte la segona. Com a resultat s'obtenen tres seccions anomenades S1, S2 i S3. Les tres seccions es fotografien digitalment per la seva cara apical (exceptuant la S3, per la cara basal) (Figura 2.).

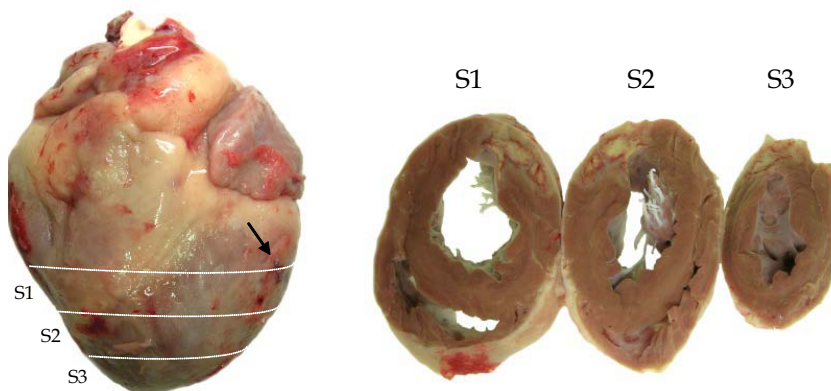


Figura 7. Imatge d'un cor extret després d'un sacrifici on s'aprecia la lligadura a l'artèria coronària (fletxa) i es mostren les línies imaginàries per dividir l'òrgan en l'obtenció de les seccions (S1, S2 i S3).

Per a dur a terme l'estudi morfomètric es mesura a S1 l'àrea total del ventricle esquerre i l'àrea de la zona isquèmica, que es diferencia pel canvi de coloració. Aquestes mesures s'obtenen mitjançant el *software* d'anàlisi d'imatges ImageProPlus versió 6.2.1. (Media Cybernetics). Un cop mesurades les àrees s'aplica la següent fórmula per a obtenir l'extensió del ventricle isquèmic respecte l'àrea total del ventricle esquerre:

$$\text{Àrea ventricular esquerra} = \text{àrea total} - \text{àrea de la llum}$$

Àrea ventricular esquerra – Àrea isquèmica

X 100

Àrea ventricular esquerra

8. Obtenció i inclusió de teixit per a l'estudi histològic

8.1. Processament de les mostres

De cada secció cardíaca obtinguda per cada animal (S1, S2 i S3) es recullen quatre blocs de teixit mitjançant talls sagitals realitzats des de l'epicardi fins l'endocardi (Figura 8.1.):

- A. Teixit control: miocardi sa (1 bloc)
- B. Teixit infartat: miocardi lesionat (3 blocs)

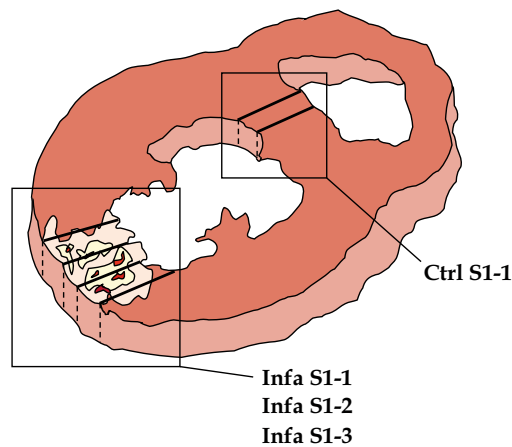


Figura 8.1. Dibuix representatiu d'una secció cardíaca amb la cicatriu derivada de l'IM. Mitjançant talls o seccions s'obtenen 3 blocs de teixit necròtic (B) i 1 de teixit control (A) de la zona septal per a la seva posterior inclusió en parafina.

Els blocs es fixen en paraformaldehid al 4% durant 48 hores a 4°C i posteriorment s'inclouen en parafina. A partir dels blocs de parafina del teixit cardíac es realitzen talls de 4 µm de gruix mitjançant el micròtom.

9. Anàlisi histològica

9.1. Tinció histològica tricròmica de Masson

La tinció tricròmica de Masson permet diferenciar les fibres de col·lagen present en el teixit cardíac que en condicions fisiològiques es troben disposades com a feixos de fibres gruixudes per a donar resistència al teixit. En l'escenari de l'IM, la porció de miocardi que es necrosa degut a l'oclusió de l'artèria coronària de la qual depèn, pateix un procés de fibrosi que dóna lloc a una cicatriu de col·lagen. Així doncs, amb la tinció tricròmica de Masson podem determinar quina és l'extensió de la lesió isquèmica i donar una breu descripció de les característiques de l'IM.

Les solucions per a dur a terme la tinció tricròmica de Masson es detallen tot seguit:

a. Àcid fosfomolibdic 1%:

- 1 g d'àcid fosfomolibdic (Merck-Espanya)
- 100 ml d'aigua bidestil·lada

b. Blau d'anilina:

- Blau d'anilina (VWR International) en saturació
- Àcid acètic al 2.5% (2.5 ml en 100 ml d'aigua bidestil·lada)

c. Fucsina de Ponceau: (2 parts de la solució A + 1 part de la solució B)

- Solució A:

- 1 g de Ponceau Silidina (Sigma-Aldrich)
- 100 ml d'aigua acètica al 0.5% (0.5 ml en 100 ml d'aigua bidestil·lada)

- Solució B:

- 1 g de Fucsina àcida (Merck-Espanya)
- 100 ml d'aigua acètica al 0.5%

d. Aigua acètica a l'1%:

- 1 ml d'àcid acètic (Fluka BioChemika)
- 99 ml d'aigua bidestil·lada

El protocol de la tinció tricròmica de Masson dut a terme per tenyir les seccions obtingudes de teixit cardíac s'especifica a continuació:

- Hidratar les mostres: xilè (2 x 7 minuts), etanol 100° (2 x 7 minuts), etanol 96° (15 minuts), etanol 70° (5 minuts), aigua corrent (1 rentat).
- Tenyir amb hematoxilina (Sigma-Aldrich) durant 5 minuts.
- Rentar amb aigua corrent.
- Rentar amb aigua acètica.
- Rentar amb aigua corrent.
- Tenyir amb fucsina de Ponceau durant 5 minuts.
- Rentar amb aigua corrent 1 minut.
- Rentar amb aigua acètica 1 minut.
- Tenyir amb àcid fosfomolibdic durant 5 minuts.
- Rentar amb aigua acètica 1 minut.
- Tenyir amb blau d'anilina durant 5 minuts.
- Rentar amb aigua corrent.
- Rentar amb aigua acètica.
- Rentar amb aigua corrent.
- Deshidratar les mostres: aigua corrent (1 rentat), etanol 70° (5 minuts), etanol 96° (15 minuts), etanol 100° (2 x 7 minuts), xilè (2 x 7 minuts).
- Muntar els cobreobjectes amb Eukitt® (Fluka BioChemika)

9.2. Tinció histològica Picro-sirius Red

Els talls histològics obtinguts s'utilitzen per a la tinció de Picro-sirius Red per tal de quantificar el col·lagen total present en el teixit. Aquesta tinció permet diferenciar entre el col·lagen propi del miocardi (col·lagen tipus I) i el resultat de la cicatriu miocardiaca derivada d'un procés isquèmic (col·lagen tipus III) (Nicoletti *et al.* 1995). Per aquesta determinació és necessari emprar un microscopi òptic amb llum polaritzada on es diferencia el col·lagen tipus I de color vermell o groc i el tipus III de color verd.

Es mesuren la fracció total de col·lagen, el col·lagen tipus I (Col I), tipus III (Col III) i la ràtio Col I/Col III als animals del model agut a dia 6 (n=3 controls i n=5 tractats) i 30 (n=5 controls i n=5 tractats) d'evolució, i

als animals del model crònic (n=8 controls i n=9 tractats) a les zones d'infart i distals. Els resultats s'expressen com el percentatge de col·lagen total, tipus I o tipus III ocupat per camp (200x).

Per a realitzar la tinció de Picro-sirius Red han estat necessàries les següents solucions:

- a. Solució A: Picro-sirius Red
 - 0.5 g Direct Red 80 (Sigma-Aldrich)
 - 500 ml de solució saturada d'àcid pícric (Sigma-Aldrich)
- b. Solució B: aigua acètica al 0.5%:
 - 5 ml àcid acètic glacial (Sigma-Aldrich)
 - 995 ml d'aigua bidestil·lada

El protocol de la tinció per Picro-sirius Red és el següent:

- Hidratar les mostres: xilè (2 x 7 minuts), etanol 100° (2 x 7 minuts), etanol 96° (15 minuts), etanol 70° (5 minuts), aigua corrent (1 rentat).
- Tenyir les mostres amb la solució A durant 90 minuts.
- Fer 2 rentats amb la solució B.
- Deshidratar: aigua corrent (1 rentat), etanol 70° (5 minuts), etanol 96° (15 minuts), etanol 100° (2 x 7 minuts), xilè (2 x 7 minuts).
- Muntar els cobreobjectes amb Eukitt®.

10. Anàlisi immunohistoquímica

10.1. Anàlisi de l'àrea vascular

Per a l'anàlisi de l'àrea vascular, les seccions de 4 µm obtingudes es marquen amb Isolectina GSLI B4 biotinilada (1:25) (500 µg/mL; Griffonia Simplicifolia lectin I B4, Vector Labs) i estreptavidina conjugada amb Alexa Fluor® 488 (1:500) (Vector Labs). La Isolectina B4 conté només la subunitat B i s'ha descrit el seu ús com a marcador de les cèl·lules endotelials en animals no primats (Kuhlmann *et al.* 1984).

La vascularització miocardiàica es mesura a dia 6 (n=3 controls i n=5 tractats) i 30 (n=5 controls i n=5 tractats) als animals del model agut, i als 30 dies (n=5 controls i n=8 tractats) en el cas del animals del model

crònic. Concretament s'analitzen les zones d'infart i distals. Addicionalment, l'àrea vascular també s'avalua en el pedicle adipós pericardíac que cobreix l'IM i en el pedicle que es troba distalment, en contacte amb el miocardi sa, als 6 dies (n=5 tractats), als 30 dies (n=4) del model agut i als 30 dies (n=4) del model crònic. Els resultats s'expressen com el percentatge de l'àrea vascular ocupada per camp (200x).

Paral·lelament es realitzen estudis de doble immunohistoquímica emprant Isolectina B4 i l'anticòs anti-cTnI (1:200) per a marcar el múscul cardíac.

El protocol pel marcatge amb Isolectina B4 utilitzat es detalla a continuació:

- Hidratar les mostres: xilè (2 x 7 minuts), etanol 100° (2 x 7 minuts), etanol 96° (15 minuts), etanol 70° (5 minuts), aigua corrent (1 rentat).
- Rentar amb PBS: 3 rentats de 5 minuts.
- Permeabilitzar les membranes amb PBS i Tritó al 0.2%: 3 rentats de 5 minuts.
- Incubar en cambra humida amb la Isolectina B4 durant una nit a 4°C en PBS, Tritó al 0.2%, sèrum de cavall (1:20) (GIBCO, Invitrogen) i gelatina de pell bovina (1:10) (Sigma-Aldrich). Addicionalment, per marcar el miocardi s'afegeix a la incubació l'anticòs anti-cTnI (*rabbit* Troponin I (H-170) sc-15368, Santa Cruz). Les dilucions queden especificades anteriorment en aquest apartat.
- Temperar les mostres durant 60 minuts.
- Rentar amb PBS i Tritó al 0.2%: 3 rentats de 5 minuts.
- Incubar amb anticòs secundari Estreptavidina-Alexa Fluor® 488 i pel reconeixement de la cTnI l'anticòs *donkey anti-rabbit* Alexa Fluor® 594 (1:1000) (5 µg/ml; Molecular Probes, Invitrogen) a temperatura ambient durant 60 minuts.
- Rentar amb PBS: 3 rentats de 5 minuts.
- Tenyir els nuclis cel·lulars amb Hoechst 33342 durant 10 minuts.
- Rentar amb PBS durant 5 minuts.
- Muntar els cobreobjectes amb medi de muntatge específic per fluorescència Fluoromount®.

10.2. Anàlisi d'apoptosi cel·lular mitjançant la tècnica de TUNEL

La tècnica de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick End Labeling*) (Roche Diagnostics) és un mètode comunament emprat per a la detecció de l'ADN fragmentat que resulta del procés d'apoptosi cel·lular (Gavrieli *et al.* 1992). L'assaig es basa en la detecció de fragments d'ADN per la deoxinucleotidil terminal transferasa, un enzim que catalitza l'addició de biotina-dUTPs. Amb aquest mètode també poden quedar marcades les cèl·lules que han patit greus malformacions al seu ADN.

L'apoptosi cel·lular es mesura als animals del model agut de dia 6 (n=3 controls i n=5 tractats) a les zones d'infart, periinfart i distal. Els resultats s'expressen com el percentatge de cèl·lules apoptòtiques respecte el total de cèl·lules comptades per camp (630x).

Els passos a seguir del protocol de TUNEL són els següents:

- Hidratar les mostres: xilè (2 x 7 minuts), etanol 100° (2 x 7 minuts), etanol 96° (15 minuts), etanol 70° (5 minuts), aigua corrent (1 rentat).
- Rentar amb PBS: 1 rentat de 5 minuts.
- Incubació amb tampó citrat sòdic 10 mM pH6: en ebullició durant 20 minuts i posteriorment deixar temperar.
- Rentar amb PBS: 2 rentats de 5 minuts.
- Preparar el reactiu de TUNEL: treure 100 µl de la *Label Solution* i afegir 50 µl de la solució d'enzim.
- Afegir el reactiu de TUNEL durant 1 hora en cambra humida a 37°C.
- Rentar amb PBS: 3 rentats de 5 minuts.
- Tenyir els nuclis cel·lulars amb Hoechst 33342 durant 10 minuts.
- Rentar amb PBS durant 5 minuts.
- Muntar els cobreobjectes amb medi de muntatge per fluorescència Fluoromount®.

10.3. Anàlisi de proliferació cel·lular i endotelial

La proliferació cel·lular s'analitza mitjançant el marcatge amb l'anticòs anti-Ki67. El Ki67 és una proteïna nuclear per a la proliferació cel·lular que es troba present en les fases G_1 , S, G_2 , i de mitosi del cicle cel·lular i absent en la fase G_0 .

La proliferació cel·lular s'analitza en els animals del model crònic d'IM. La finalitat d'aquesta anàlisi és la de valorar la presència de cèl·lules en proliferació dins de la cicatriu miocardiaca i quines d'elles són d'estirp endotelial. Per això es realitza una doble immunohistoquímica contra l'antigen Ki67 i la Isolectina B4 biotinilada. Finalment, es capten imatges d'animals tractats ($n=4$) i controls ($n=4$) i es compta el nombre de cèl·lules Ki67 positives i d'aquestes, quines són endotelials (Isolectina B4 i Ki67 positives).

A continuació es descriu el protocol del doble marcatge Ki67 i Isolectina B4:

- Hidratar les mostres: xilè (2 x 7 minuts), etanol 100° (2 x 7 minuts), etanol 96° (15 minuts), etanol 70° (5 minuts), aigua corrent (1 rentat).
- Rentar amb PBS: 3 rentats de 5 minuts.
- Permeabilitzar les membranes cel·lulars amb tampó citrat sòdic 10 mM pH6: en ebullició durant 20 minuts i posteriorment deixar temperar.
- Rentar amb PBS: 3 rentats de 5 minuts.
- Rentar amb PBS i Tritó al 0.2%: 3 rentats de 5 minuts.
- Bloquejar les unions inespecífiques durant 1 hora a temperatura ambient amb PBS, Tritó al 0.2%, sèrum de cavall (1:5) i gelatina de pell bovina al 2% (1:10).
- Incubar en cambra humida amb l'anticòs primari anti-Ki67 (1:200) (*rabbit* Ki67 (H-300); Santa Cruz) i la Isolectina B4 (1:25) durant una nit a 4°C en PBS, Tritó al 0.2%, sèrum de cavall (1:20) i gelatina de pell bovina (1:10).
- Temperar les mostres durant 60 minuts.
- Rentar amb PBS 1X i tritó al 0.2%: 3 rentats de 5 minuts.
- Incubar amb anticossos secundaris: Estreptavidina-Alexa Fluor®647 i *donkey anti-rabbit* Cy™2 (1:1000) (Jackson

Immunoresearch Laboratories Inc.), a temperatura ambient durant 1 hora.

- Rentar amb PBS: 3 rentats de 5 minuts.
- Tenyir els nuclis cel·lulars amb Hoechst 33342 durant 10 minuts.
- Rentar amb PBS durant 5 minuts.
- Muntar els cobreobjectes amb medi de muntatge per fluorescència Fluoromount®.

11. *Microarrays: anàlisi de l'expressió gènica*

Per a l'estudi de l'expressió gènica es processen 36 mostres aparellades procedents de miocardi i de greix pericardíac d'animals amb IM de 6 (n=3) i de 30 dies (n=3) d'evolució. S'obté teixit cardíac procedent del septe interventricular com a zona distal, teixit miocardiàc infartat, greix pericardíac dels animals control i greix procedent del pedicle pericardíac dels animals tractats. Addicionalment, es processa teixit miocardiàc i greix d'origen pericardíac de 3 animals sans com a control endogen d'expressió gènica.

11.1. *Extracció d'ARN, anàlisi de qualitat i creació dels perfils de l'expressió gènica*

Per a l'extracció total d'ARN s'utilitzen els kits *RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit* o *RNeasy Lipid Tissue Mini Kit* (Qiagen). El protocol realitzat en les mostres de teixit adipós es descriu a continuació:

- Abans de començar:
 - Afegir al tampó RPE 4 vegades el seu volum d'etanol 100°.
 - Posar la centrífuga a 4°C per què s'atemperi.
- Peser la mostra sense excedir els 100 mg.
- Afegir 1 ml de Qiazol (Qiagen) per tub.
- Escindir i homogeneïtzar el teixit amb el *TissueRuptor*.
- Deixar el tub amb l'homogenat 5 minuts a temperatura ambient.
- Afegir 200 µl de cloroform i agitar vigorosament durant 15 segons.
- Deixar el tub amb l'homogenat 2-3 minuts a temperatura ambient.

- Centrifugar a 12.000 x g durant 15 minuts a 4°C. Després pujar la temperatura de la centrifuga a 20-25°C per a la resta del procediment.
- Transferir la fase aquosa del tub a un nou tub. Afegir 600 µl d'etanol 70° i barrejar amb el vòrtex.
- Transferir 700 µl de la mostra a la columna col·locada en un tub de 2 ml. Tancar amb cura i centrifugar a 20-25°C a ≥ 8000 x g durant 15 segons per rentar la membrana. Extreure el líquid sobrant.
- Llençar el líquid obtingut i repetir el pas anterior amb la resta de la mostra.
- Afegir 700 µl del tampó RW1 a la columna. Tancar amb cura i centrifugar a 20-25°C a ≥ 8000 x g (≥ 10000 rpm) durant 15 segons per rentar la membrana. Extreure el líquid sobrant.
- Afegir 500 µl de tampó RPE a la columna. Tancar amb cura i centrifugar a 20-25°C a ≥ 8000 x g (≥ 10000 rpm) durant 15 segons per rentar la membrana. Extreure el líquid sobrant.
- Afegir 500 µl de tampó RPE a la columna. Tancar amb cura i centrifugar a 20-25°C a ≥ 8000 x g (≥ 10000 rpm) durant 2 minuts per rentar la membrana. Extreure el líquid sobrant.
- Opcional: col·locar la columna de *RNeasy spin* en un *ependorff* net de 2 ml i centrifugar durant 1 minut a màxima velocitat.
- Col·locar la columna de *RNeasy spin* en un *ependorff* net de 1.5 ml. Afegir 30-50 µl de *RNase-free water* directament a la membrana de la columna de *RNeasy spin*. Per eluir l'ARN, centrifugar a 20-25°C a ≥ 8000 x g (≥ 10000 rpm) durant 1 minut.
- Repetir el pas anterior utilitzant un altre cop 30-50 µl de *RNase-free water* o l'extreta del pas anterior (si es necessita una alta concentració d'ARN). Reutilitzar el tub del pas anterior.

L'anàlisi de la integritat i la puresa de les mostres queda descrit a l'apartat 2.2. La creació dels perfils d'expressió gènica està indicada a l'apartat 3.

11.2. Anàlisi funcional de l'expressió gènica mitjançant *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA)

Per a dur a terme l'anàlisi funcional es pugen les llistes resultants dels gens regulats diferencialment a l'eina *online* anomenada *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA versió 8.0, *Ingenuity System Inc*;

www.ingenuity.com). Per a comparar els efectes de la transposició del pedicle adipós pericardíac als 6 i 30 dies de seguiment, s'inclouen els gens que mostren una regulació diferencial a l'infart i al teixit adipós pericardíac. L'anàlisi IPA es realitza tenint en compte una significació estadística de $P < 0.05$. Per interpretar les dades en el context dels processos biològics, vies i xarxes s'empra la funció de "Core Analysis" dins del programa.

12. Anàlisi estadística

Les dades pertanyents a l'anàlisi de l'evolució de l'expressió gènica de l'IM es presenten com a mitjana \pm SD, mentre que les pertanyents a la resta d'estudis es representen com a mitjana \pm SEM. Totes les anàlisis es realitzen amb el *software* estadístic SPSS (versió 15.0.1, SPSS Inc.). Les diferències entre 2 grups es comparen usant el test de t-Student o ANOVA d'un sol factor per a més de 2 grups d'estudi, amb el test de Tukey per l'anàlisi de comparació múltiple. Les dades obtingudes per RM s'analitzen com a mesures repetides en el temps usant el test d'ANOVA amb el factor de correcció de Greenhouse-Geisser. Els valors amb $P < 0.05$ es consideren significatius.

Les dades resultants de l'anàlisi de *microarrays* s'analitzen usant R i Bioconductor, amb una normalització RMA i un filtratge no específic, i amb el paquet limma (*linear models for microarray data*) i la correcció FDR (*false discovery rate*) per la detecció dels gens expressats diferencialment.

Resultats

1. Estudi dels patrons temporals de l'expressió gènica de l'IM

1.1. L'IM altera l'expressió gènica en tot el cor

Inicialment, per tal d'analitzar els canvis de l'expressió gènica causats per l'IM a nivell cardíac, es van comparar les mostres de miocardi distal i infartat en els 3 temps d'estudi (6, 30 i 45 dies) amb les obtingudes del miocardi d'animals sans. Com a resultat es van obtenir 6 llistes de seqüències d'ADNc expressades de manera diferencial (veure material digital adjunt).

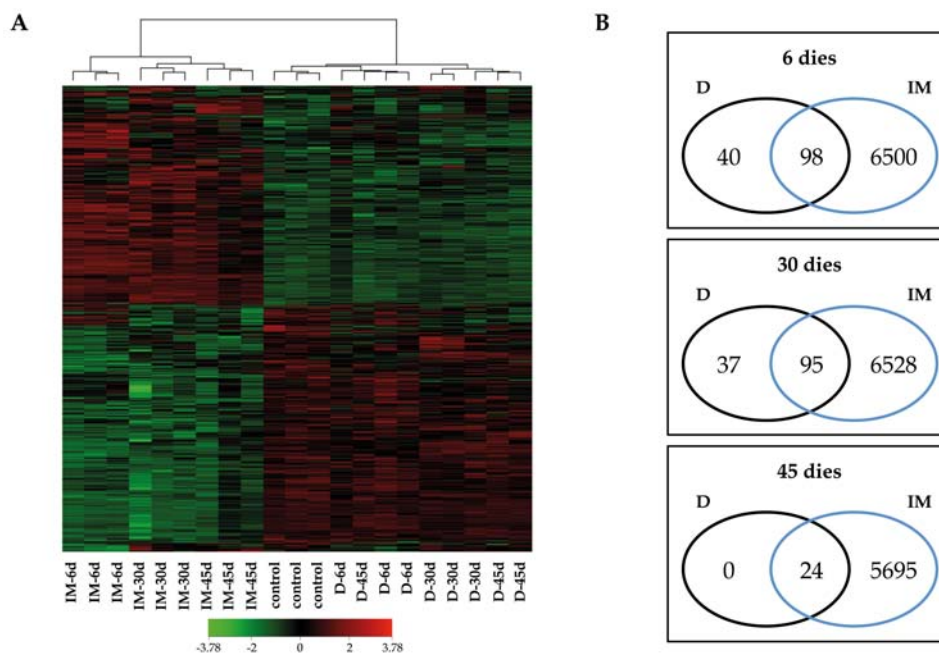


Figura 1.1. Patró de l'expressió gènica diferencial en l'IM. **(A)** *Heatmap* o mapa d'expressió dels gens que estan regulats significativament (P valor ajustat < 0.05). Cada columna correspon al resultat de l'expressió de cada mostra analitzada individualment, on també s'inclouen les mostres procedents dels animals sans. Els valors normalitzats, representats en vermell o verd, es mostren d'acord l'escala de gradació de color que apareix en la part inferior del *heatmap*. **(B)** Diagrames de Venn representant els gens diferencials del panell A entre els 3 grups d'estudi. **Infart de miocardi (IM); Miocardi distal (D); dies (d).**

En la figura 1.1. es mostra el mapa de l'expressió gènica diferencial en el miocardi infartat, distal als 6, 30 i 45 dies d'evolució i el

corresponent als animals sans. Tal com queda reflectit en el panell B, als 6 dies d'evolució 6598 gens van alterar la seva expressió a la zona

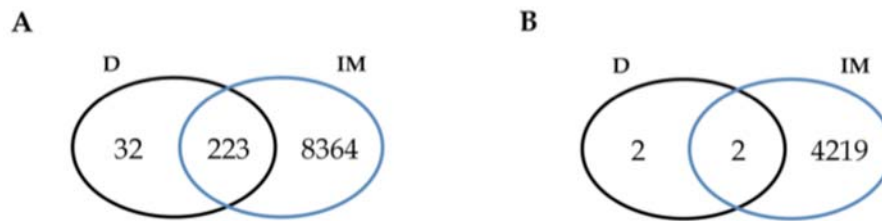


Figura 1.2. Expressió gènica del miocardi infartat i distal. (A) Diagrames de Venn amb tots els gens expressats diferencialment en qualsevol dels 3 temps d'estudi i (B) aquells que estan alterats als 6, 30 i 45 dies després de l'infart. **Infart de miocardi (IM); Miocardi distal (D).**

d'infart i 138 a la zona distal, dels quals 40 van resultar ser comuns a les dos zones d'estudi. Als 30 dies, 6623 gens estaven alterats a la zona d'infart, 132 a la zona distal i 95 eren comuns en els dos teixits. Finalment, als 45 dies 5719 estaven alterats a l'infart dels quals 24 també es trobaven alterats en el miocardi distal.

Analitzant conjuntament els 3 temps d'estudi es va detectar que 8619 gens (6124 corresponents a símbols de gens únics assignats per la HGNC) estaven expressats diferencialment als cors infartats respecte les mostres procedents de miocardi sa. De les 8587 seqüències d'ADNc (6101 gens únics) alterades a la zona d'infart, 4221 (3300 gens únics) estaven alterats en els 3 temps d'estudi (Figura 1.2.).

Aquests resultats mostren, com era esperat, l'existència de canvis en l'expressió gènica que principalment afecten a la zona de miocardi infartat. Tot i així, cal destacar que la zona distal que no ha patit cap lesió també presenta canvis d'expressió gènica, encara que molt menys rellevants.

1.2. Anàlisi dels gens diferencialment expressats en el miocardi infartat

Mitjançant l'eina d'estudi que ofereix l'IPA, fou possible identificar les funcions més destacades i les vies canòniques associades amb els gens diferencialment expressats en la zona d'infart en els 3

temps d'estudi. D'aquesta anàlisi cal destacar, d'entre altres, 5 vies relacionades a nivell cardiovascular alterades tant a 6, 30 com 45 dies. Aquestes corresponen a la via de senyalització apoptòtica, factors promotors de la cardiogènesi en vertebrats, via de senyalització d'hipòxia en el sistema cardiovascular, pluripotencialitat de les cèl·lules mare embrionàries humanes i la via de senyalització de la hipertròfia cardíaca (Figures 1.2.a fins 1.2.f.).

Pel que fa a la via de senyalització apoptòtica pot esmentar-se que ha estat alterada de manera diferencial l'expressió gènica de 48 gens en la zona d'infart respecte el miocardi sa. D'aquest grup, 22 gens han estat sobreexpressats i 22 inhibits al llarg dels 3 temps d'estudi. Els 4 gens restants (BCL2, MAP2K1, PRKCE i ROCK1) es trobaven sobreexpressats o inhibits segons el temps d'evolució de l'IM (Figura 1.3.).

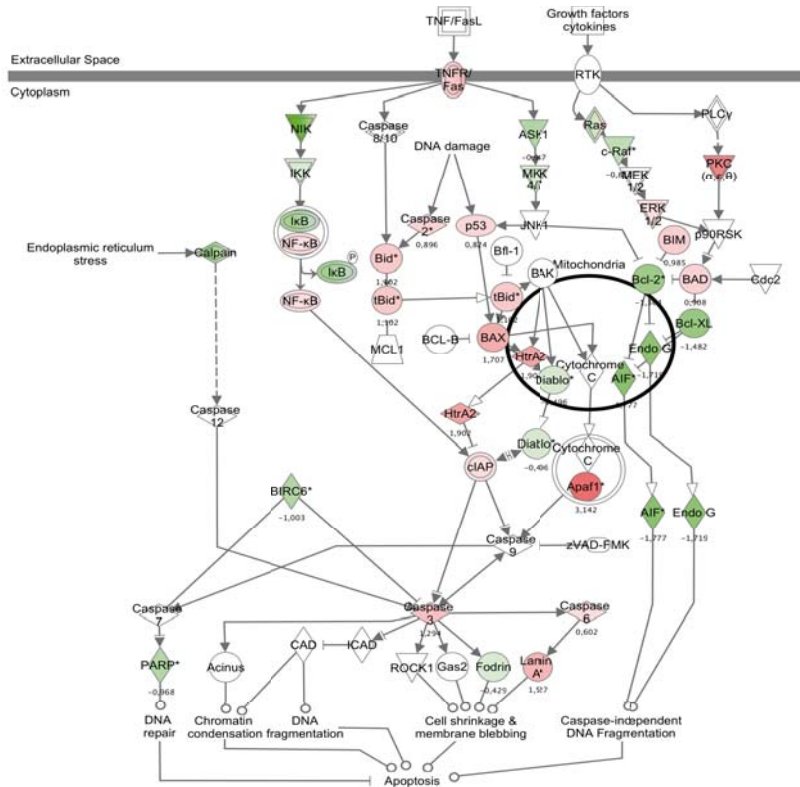
D'entre els gens pertanyents a la via de factors promotors de la cardiogènesi en vertebrats, 23 del total de 38 gens alterats han estat sobreexpressats mentre que 13 han quedat inhibits; els 2 gens restants (FZD4 i PRKCE) han variat la seva expressió al llarg del temps: inhibits als 6 dies i sobreexpressats als 30 i 45 dies (Figura 1.4.).

Del total de gens que conformen la via de senyalització d'hipòxia en el sistema cardiovascular, es van trobar alterats 36 dels quals 20 van resultar inhibits i 15 sobreexpressats; el gen EP300 sobreexpressat als 6 dies, va mostrar una inhibició en la seva expressió gènica (Figura 1.5.).

Dins la via de pluripotencialitat de les cèl·lules mare embrionàries humanes, 42 gens presentaven una expressió diferencial en el temps. D'aquests, 29 estaven sobreexpressats i 10 inhibits en els 3 temps estudiats. A més, 2 gens s'inhibien als 6 dies i posteriorment se sobreexpressaven (FZD4 i SMAD6), mentre que el gen WNT6 es trobava inhibit tant als 6 com als 30 dies i després es trobava sobreexpressat (Figura 1.6.).

Finalment, 98 gens mostraven una expressió alterada en la via de senyalització de la hipertròfia cardíaca, dels quals 38 estaven sobreexpressats i 54 inhibits. Addicionalment, 3 gens estaven sobreexpressats als 6 dies i posteriorment inhibits (EP300, GNG5 i MAP2K1); el RND3 resultava estar inhibit inicialment per sobreexpressar-se a partir dels 45 dies de seguiment i el gen ROCK1 se sobreexpressava als 6 i 45 dies i quedava inhibit als 30 dies (Figura 1.7.).

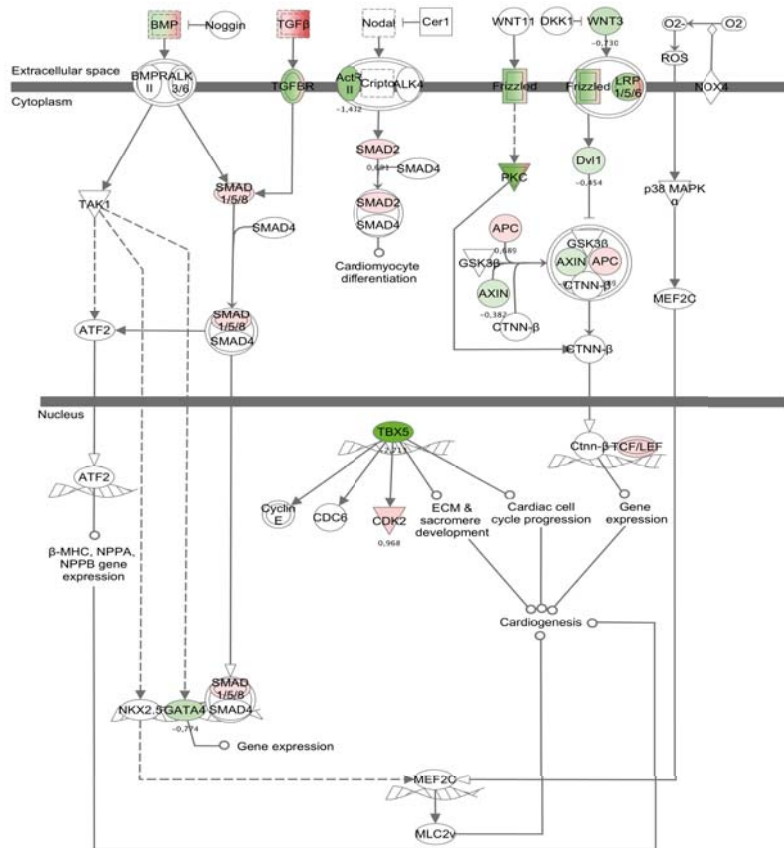
Via de senyalització apoptòtica



	6 d	30 d	45 d		6 d	30 d	45 d		6 d	30 d	45 d
AIFM1	-1,78	-1,59	-1,59	CASP6	0,60	0,77	0,12	MAPK1	-0,07	-0,28	-0,78
APAF1	3,14	1,94	1,82	CYCS	-0,89	-2,33	-1,10	MAPK3	0,60	0,84	0,53
BAX	1,71	1,42	1,06	DIABLO	-0,50	-0,73	-0,92	NFKBIA	-1,23	-0,86	-0,78
BCL2	-1,36	0,22	-0,02	ENDOG	-1,72	-1,90	-1,37	NFKBIB	-0,49	-1,02	-0,63
BCL2L1	-1,48	-1,13	-0,62	HRAS	-0,73	-0,70	-0,64	PARP1	-0,97	-0,79	-0,83
BCL2L11	0,98	0,90	0,56	HTRA2	1,90	2,32	2,22	PRKCA	2,62	2,30	1,79
BID	1,10	0,71	0,44	IKBKKG	-0,42	-0,72	-0,03	PRKCE	-0,01	0,28	0,64
BIRC2	-0,09	-0,16	-0,36	KRAS	1,30	0,95	0,60	RAF1	-0,81	-0,78	-0,64
BIRC3	-0,50	-1,42	-1,08	LMNA	1,53	1,36	1,08	RELA	0,31	0,40	0,21
BIRC6	-1,00	-1,19	-0,64	MAP2K1	0,20	-0,72	-0,64	ROCK1	-0,11	0,40	-1,35
CAPN1	0,53	0,38	0,01	MAP2K2	-0,23	-0,69	-0,66	RRAS	0,58	0,49	0,32
CAPN2	0,60	0,58	0,48	MAP2K4	-0,18	-0,43	-0,36	SPTAN1	-0,43	-0,37	-0,45
CAPN5	0,33	0,96	0,97	MAP2K7	-0,42	-0,29	-0,14	TNFRSF1A	1,01	0,86	0,67
CAPNS1	-1,50	-0,80	-1,02	MAP3K5	-0,99	-1,32	-0,64	TNFRSF1B	1,63	0,89	1,08
CASP2	0,90	0,48	0,54	MAP3K14	-3,17	-1,88	-0,36	TP53	0,82	0,84	0,39
CASP3	1,29	0,76	0,62	MAP4K4	1,33	1,11	1,03	XIAP	0,44	0,39	0,50

Figura 1.3. Expressió gènica alterada en la via de la senyalització apoptòtica en l'IM. A la part superior es mostra l'esquema representatiu dels gens que participen en la via de senyalització apoptòtica. En vermell queden ressaltats els gens sobreexpressats i en verd els inhibits als 6 dies d'evolució. A la part inferior es llisten tots aquells gens que resten alterats en els 3 temps d'estudi amb el valor log₂ FC corresponent. Dies (d); verd (gen inhibït); vermell (gen sobreexpressat).

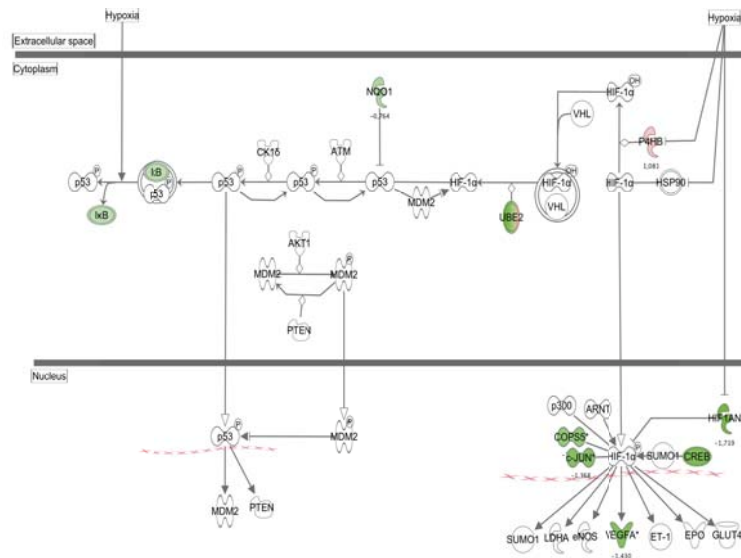
Factors promotores de la cardiogènesi en vertebrats



	6d	30d	45d		6d	30d	45d		6d	30d	45d
ACVR2B	-1,43	-0,91	-0,64	FZD5	-1,23	-1,72	-0,72	SMAD2	0,69	1,32	1,01
APC	0,69	0,08	0,07	FZD8	0,45	0,98	0,49	SMAD5	0,40	0,54	0,49
AXIN1	-0,38	-0,33	-0,50	GATA4	-0,77	-0,81	-0,70	SMO	0,60	0,58	0,64
BMP1	1,96	1,65	1,38	GSK3B	-0,02	-0,64	-0,40	TBX5	-2,71	-1,94	-1,42
BMP2	0,99	1,40	0,56	LEF1	0,58	0,18	0,10	TCF7L1	1,08	1,81	1,68
BMP4	0,03	0,93	0,32	LRP1	2,31	2,45	2,04	TCF7L2	1,11	1,50	1,34
BMP5	-0,58	-0,12	-0,21	LRP5	-1,33	-0,85	-0,90	TGFB1	0,83	0,17	0,11
BMP6	-0,61	-0,76	-0,02	LRP6	0,61	1,55	0,87	TGFB2	1,58	1,60	1,47
BMPR1A	0,36	0,66	0,54	PRKCA	2,62	2,30	1,79	TGFB3	4,28	4,69	4,33
CDK2	0,97	0,41	0,35	PRKCE	-0,01	0,28	0,64	TGFB2	1,29	1,69	1,11
DVL1	-0,45	-0,12	-0,16	PRKD1	0,90	1,62	1,33	TGFB3	-0,99	-0,94	-0,75
FZD2	1,12	1,45	0,93	PRKD3	-2,34	-2,29	-1,32	WNT3	-0,73	-0,49	-0,38
FZD4	-1,44	0,94	0,59	SMAD1	0,60	0,66	0,55				

Figura 1.4. Alteració en l'expressió gènica dels factors promotores de la cardiogènesi en vertebrats en l'evolució de l'IM. A la part superior es mostra l'esquema representatiu dels gens que participen en la via dels factors promotores de la cardiogènesi. En vermell queden ressaltats els gen que estan sobreexpressats i en verd els inhibits als 6 dies d'evolució. A la part inferior es llisten tots aquells gens que resten alterats en els 3 temps d'estudi amb el valor log₂ FC corresponent. Dies (d); verd (gen inhibít); vermell (gen sobreexpressat).

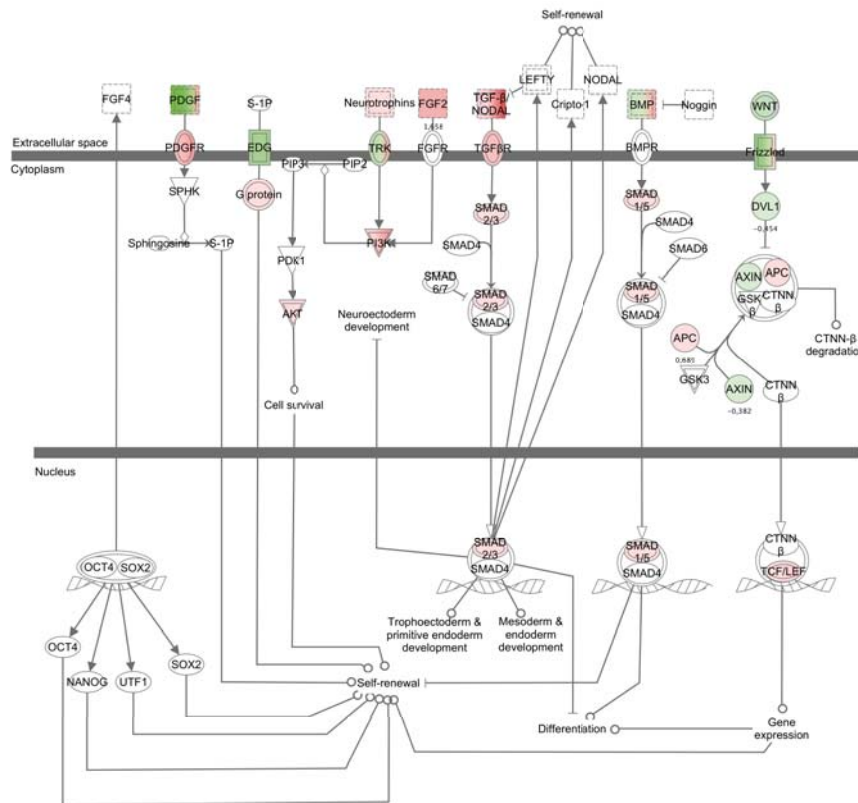
Via de senyalització d'hipòxia del sistema cardiovascular



	6d	30d	45d		6d	30d	45d
BIRC6	-1,00	-1,19	-0,64	UBE2B	-1,22	-1,18	-1,12
CDC34	-0,82	-1,43	-0,91	UBE2C	2,77	1,25	1,61
COP55	-1,42	-1,05	-1,14	UBE2D1	-1,51	-2,79	-2,00
EDN1	1,01	1,11	0,61	UBE2D3	-1,01	-1,29	-0,90
EP300	0,35	-0,14	-0,14	UBE2D4	-1,45	-1,39	-1,33
HIF1A	0,80	0,28	0,10	UBE2E1	-0,12	-0,40	-0,19
HIF1AN	-1,46	-1,90	-1,72	UBE2E2	0,23	0,43	0,15
HSP90B1	0,65	0,33	0,25	UBE2E3	0,79	0,55	0,42
JUN	-1,83	-1,25	-1,36	UBE2I	0,43	0,51	0,31
LDHA	1,90	0,64	0,45	UBE2J1	1,56	1,31	1,06
NFKBIA	-1,23	-0,86	-0,78	UBE2J2	0,68	0,13	0,13
NFKBIB	-0,49	-1,02	-0,63	UBE2L3	-0,21	-0,24	-0,44
NOS3	-0,57	-0,41	-0,25	UBE2L6	1,07	1,69	1,00
NQO1	-1,14	-0,94	-0,76	UBE2N	-0,76	-0,64	-0,62
P4HB	1,27	1,10	1,08	UBE2Q1	0,58	0,34	0,34
SLC2A4	-0,65	-0,57	-0,25	UBE2R2	-0,72	-0,93	-0,69
TP53	0,82	0,84	0,39	UBE2V1	0,36	0,03	0,03
UBE2A	-0,20	-0,32	-0,79	VEGFA	-1,99	-1,52	-1,18

Figura 1.5. Expressió gènica alterada en la via de la senyalització d'hipòxia del sistema cardiovascular en l'evolució de l'IM. A la part superior es mostra l'esquema representatiu dels gens que participen en la via de senyalització d'hipòxia. En vermell queden ressaltats els gens que es troben sobreexpressats i en verd els gens inhibits als 6 dies d'evolució. A la part inferior es mostra una llista de tots aquells gens que resten alterats en els 3 temps d'estudi amb el valor \log_2 FC corresponent. Dies (d); verd (gen inhibit); vermell (gen sobreexpressat).

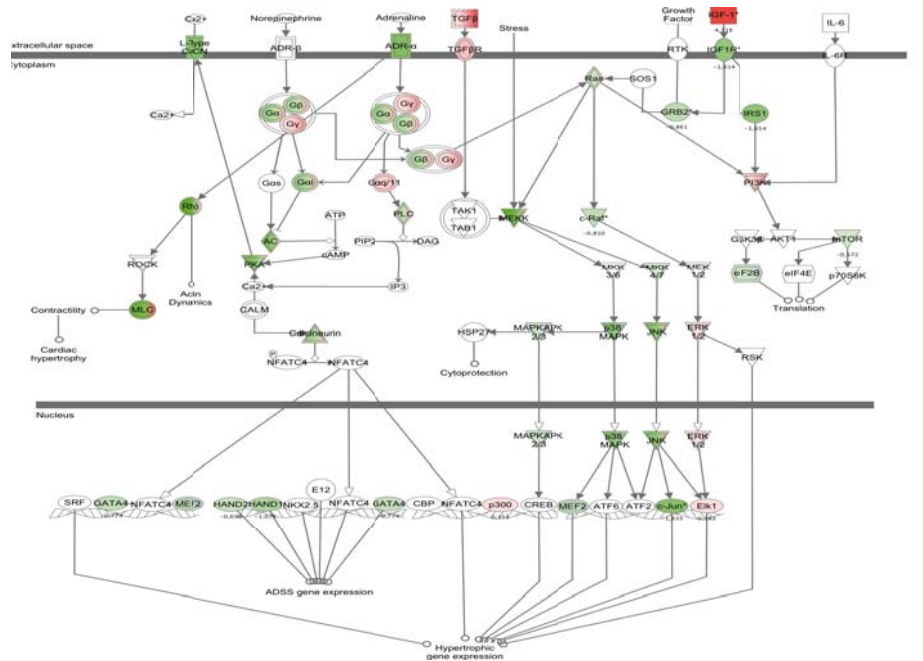
Pluripotencialitat de cèl·lules mare embrionàries humanes



	6d	30d	45d		6d	30d	45d		6d	30d	45d
AKT3	0,73	1,42	0,96	FZD5	-1,23	-1,72	-0,72	SMAD1	0,60	0,66	0,55
APC	0,69	0,08	0,07	FZD8	0,45	0,98	0,49	SMAD2	0,69	1,32	1,01
AXIN1	-0,38	-0,33	-0,50	GNAS	0,73	1,16	1,87	SMAD3	-0,50	-0,59	-0,40
BMP1	1,96	1,65	1,38	GSK3B	-0,02	-0,64	-0,40	SMAD5	0,40	0,54	0,49
BMP2	0,99	1,40	0,56	LEF1	0,58	0,18	0,10	SMAD6	-0,14	0,86	0,25
BMP4	0,03	0,93	0,32	NGF	0,41	0,73	0,39	SMO	0,60	0,58	0,64
BMP5	-0,58	-0,12	-0,21	NTRK2	1,90	3,45	4,01	TCF7L1	1,08	1,81	1,68
BMP6	-0,61	-0,76	-0,02	NTRK3	-0,85	-0,53	-0,20	TCF7L2	1,11	1,50	1,34
BMPR1A	0,36	0,66	0,54	PDGFC	-1,13	-0,56	-0,56	TGFB1	0,83	0,17	0,11
DVL1	-0,45	-0,12	-0,16	PDGFD	1,70	2,28	2,40	TGFB2	1,58	1,60	1,47
FGF2	1,66	1,14	1,53	PDGFRA	2,17	2,57	2,10	TGFB3	4,22	4,69	4,33
FGFR1	0,45	1,09	0,88	PDGFRB	1,37	1,26	1,09	TGFB2	1,29	1,69	1,11
FZD2	1,12	1,45	0,93	PIK3C3	0,93	0,26	0,24	WNT3	-0,73	-0,49	-0,38
FZD4	-1,44	0,94	0,59	PIK3CG	2,57	1,64	1,41	WNT6	-0,37	-0,03	0,01

Figura 1.6. Evolució de l'expressió gènica alterada en la via referent a la pluripotencialitat de cèl·lules mare embrionàries en l'IM. Esquema representatiu dels gens que participen dita via. En vermell queden ressaltats els que estan sobreexpressats i en verd els gens inhibits als 6 dies d'evolució. A continuació es mostra una llista de tots aquells gens que resten alterats en els 3 temps d'estudi amb el valor \log_2 FC corresponent. Dies (d); verd (gen inhibat); vermell (gen sobreexpressat).

Via de senyalització de la hipertròfia cardíaca



	6d	30d	45d		6d	30d	45d		6d	30d	45d		6d	30d	45d
ADCY3	1,43	2,01	1,94	GNG5	0,05	-0,44	-0,47	MAPK3	0,60	0,84	0,53	PPP3R1	-0,10	-0,50	-0,21
ADCY6	-1,70	-2,49	-1,34	GNGI1	0,53	1,23	0,87	MAPK9	1,91	1,36	0,87	PRKACA	-0,35	-0,61	-0,51
ADCY10	-2,06	-1,62	-1,19	GNGI2	2,03	2,66	2,40	MAPK11	-0,34	-0,10	-0,17	PRKACB	-1,17	-1,39	-1,50
ADRA1B	-1,92	-1,72	-1,07	GRB2	-0,86	-0,62	-0,43	MAPK12	-1,88	-2,18	-1,19	PRKAG1	-1,42	-0,65	-0,89
CACNAC	-1,82	-1,66	-1,06	GSK3B	-0,02	-0,64	-0,40	MAPKA2	-0,50	-0,75	-0,49	PRKARA	0,87	0,49	0,59
CALM1	0,57	0,16	0,22	HAND1	-1,08	-1,85	-1,32	MAPKA3	-0,57	-0,91	-0,54	PRKARA	-2,20	-2,21	-2,29
EIF2B2	0,05	0,56	0,15	HAND2	-0,70	-0,71	-0,33	MEF2A	-0,77	-0,49	-0,36	PRKARB	1,43	1,38	0,76
EIF2B3	-0,60	-0,71	-0,50	HRAS	-0,73	-0,70	-0,64	MEF2B	-0,57	-0,11	-0,11	RAF1	-0,81	-0,78	-0,64
EIF2B4	-0,56	-0,20	-0,33	HSPB1	-0,26	-0,87	-0,79	MEF2D	-0,44	-1,02	-0,60	RHOA	0,96	0,83	0,53
ELK1	0,38	-0,09	0,19	IGF1	4,32	3,35	2,83	MTOR	-0,57	-0,70	-0,59	RHOB	-0,82	-0,75	-1,13
EP300	0,35	-0,14	-0,14	IGFIR	-1,61	-0,99	-1,55	MYL1	3,50	1,50	3,61	RHOC	0,86	0,72	0,50
FNBP1	-3,61	-2,40	-0,87	IRS1	-1,65	-0,95	-1,09	MYL3	-0,91	-1,50	-0,61	RHOG	1,09	0,43	0,48
GATA4	-0,77	-0,81	-0,70	JUN	-1,83	-1,25	-1,36	MYL4	2,47	2,83	2,13	RHOJ	-2,64	-3,29	-2,18
GNAI2	0,43	0,28	0,38	KRAS	1,30	0,95	0,60	MYL6	1,80	1,77	1,40	RHOT1	-0,54	-0,85	-0,26
GNAI1	-1,35	-0,91	-1,28	MAP2K1	0,20	-0,72	-0,64	MYL7	-2,59	-2,03	-0,93	RHOT2	-0,42	-0,26	-0,10
GNAI2	1,61	1,23	0,89	MAP2K2	-0,23	-0,69	-0,66	MYL6B	-0,85	-0,57	-0,39	RND3	-2,01	-0,07	0,39
GNAI3	0,97	0,90	0,67	MAP2K4	-0,18	-0,43	-0,36	PDI3A	1,36	1,15	1,16	ROCK1	-0,10	0,40	-1,35
GNAL	1,38	1,41	1,72	MAP2K7	-0,42	-0,29	-0,14	PIK3C3	0,93	0,26	0,24	RRAS	0,58	0,49	0,32
GNAQ	1,10	1,23	2,25	MAP3K1	1,40	0,89	0,66	PIK3CG	2,57	1,64	1,41	TAB1	-0,34	-0,42	-0,52
GNAS	0,73	1,16	1,87	MAP3K5	-0,99	-1,32	-0,64	PLCB4	-0,88	-0,86	-0,64	TGFB1	0,83	0,17	0,11
GNB1	1,43	1,01	0,58	MAP3K11	-0,26	-0,72	-0,44	PLCD1	0,50	0,82	0,57	TGFB2	1,58	1,60	1,47
GNB2	0,73	0,50	0,29	MAP3K12	-1,54	-1,49	-1,36	PLCD3	-0,51	-0,07	-0,01	TGFB3	4,22	4,69	4,33
GNB5	-1,03	-0,52	-0,71	MAP3K14	-3,17	-1,88	-0,36	PPP3CA	1,46	0,86	0,70	TGFBR2	1,29	1,69	1,11
GNB1L	-0,49	-0,84	-0,65	MAP3K15	-1,42	-1,76	-0,82	PPP3CB	1,10	0,99	0,79				
GNG2	2,17	1,82	1,17	MAPK1	-0,07	-0,28	-0,78	PPP3CC	-1,26	-1,31	-0,79				

Figura 1.7. Expressió gènica alterada en la via de senyalització de la hipertrofia cardíaca en l'evolució de l'IM. A la part superior es mostra l'esquema dels gens que participen en la via de la hipertrofia cardíaca. En vermell es mostren els gens sobreexpressats i en verd els gens inhibits als 6 dies d'evolució. A la part inferior es llisten tots els gens que resten alterats en els 3 temps d'estudi amb el valor log₂ FC corresponent. Dies (d); verd (gen inhibít); vermell (gen sobreexpressat).

1.3. Patrons temporals de l'expressió gènica

A partir dels resultats obtinguts de la comparació del teixit infartat amb el miocardi distal, es van poder obtenir 4 patrons principals segons el comportament dels gens en l'evolució de l'IM. El patró 1 que englobava tots aquells gens que en els 3 temps d'estudi estaven sobreexpressats o inhibits, contenia 6790 gens corresponents a 8619 transcrits reconeguts inicialment com expressats diferencialment. D'aquest grup de gens, 3174 mostraven sobreexpressió mentre que 3616 es mantenien inhibits.

Un cop analitzat aquest patró a nivell funcional, s'han identificat gens relacionats amb diferents categories, incloent la patologia cardiovascular (913 gens), desordres de teixit connectiu i genètics (3119 gens), mort cel·lular (776 gens), desenvolupament tissular (203 gens), cicle cel·lular (414 gens) i creixement i proliferació cel·lular (528 gens). En la figura 1.8. es mostren els diferents *heatmaps* dels *clusters* funcionals de cada categoria. Cal destacar que tots els gens relacionats amb l'aterosclerosi i la isquèmia (inclosos a la categoria de patologia cardiovascular), desordres de teixit connectiu i creixement i proliferació cel·lular es trobaven sobreexpressats en tots els temps d'estudi.

Adicionalment, es van identificar altres 3 patrons temporals d'expressió gènica (2, 3 i 4) que comprenien 411 seqüències d'ADNc (Figura 1.9.). El patró 2 incloïa gens que a dia 6 estaven sobreexpressats o inhibits i que posteriorment normalitzaven els seus nivells d'expressió. Aquest grup de gens formava part principalment de les categories de creixement i proliferació cel·lular (45 gens), cicle cel·lular (20 gens) i patologia cardiovascular (37 gens).

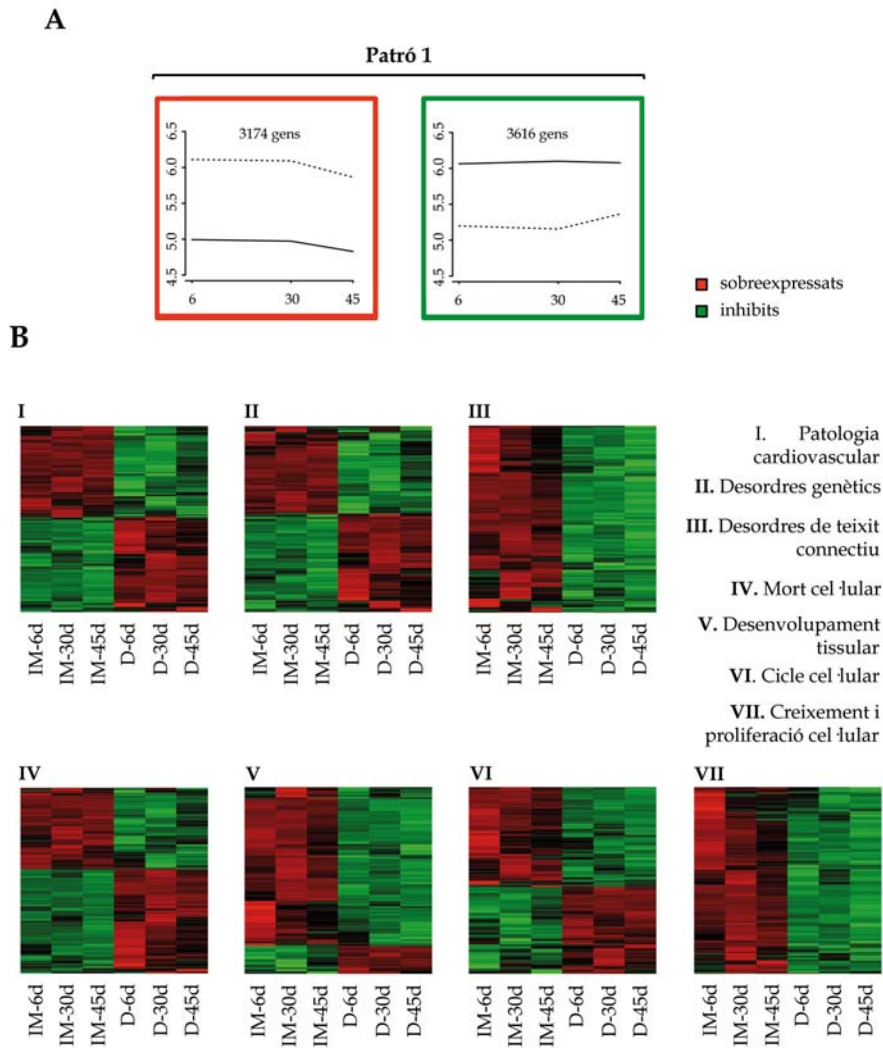


Figura 1.8. Patrons temporals agrupats per categories funcionals de la majoria de gens expressats diferencialment en el teixit infartat. (A) Els gràfics mostren els gens compresos en el patró 1 amb una expressió similar sostinguda en el temps en l'evolució de l'IM, sobreexpressats (gràfica enquadrada en vermell) o inhibits (gràfica enquadrada en verd). L'eix X mostra els dies d'anàlisi i l'Y representa el \log_2 FC. (B) *Heatmaps* dels grups o *clusters* funcionals obtinguts a partir dels gens pertanyents al patró 1, on es compara l'expressió gènica de la zona de miocardi distal amb el teixit infartat. Cada fila representa un ADNc diferent i les columnes fan referència al miocardi distal (D) o al teixit infartat (IM) en cada temps d'estudi. 6 dies (6d); 30 dies (30d); 45 dies (45d).

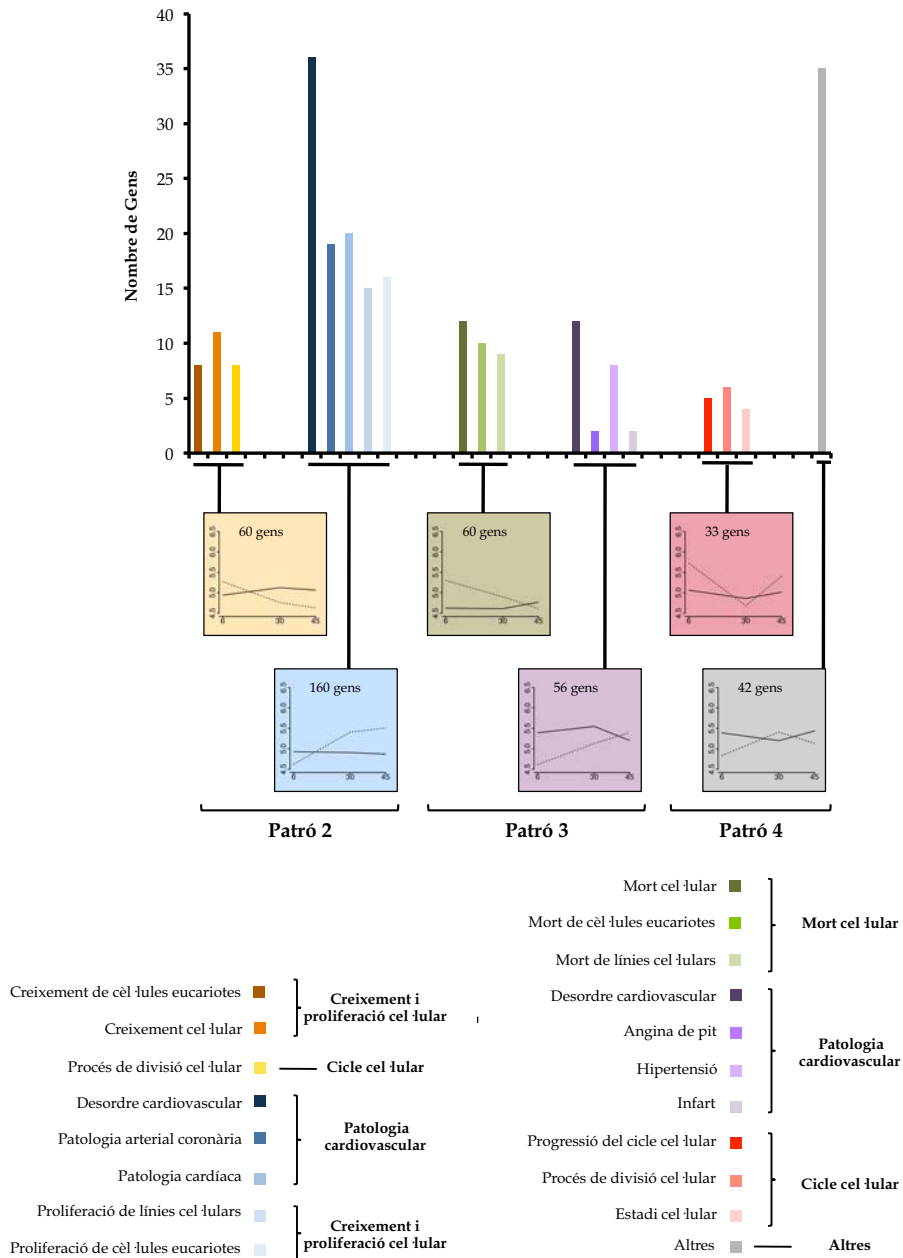


Figura 1.9. Patrons temporals secundaris dels gens expressats diferencialment en el teixit infartat agrupats segons la seva classe funcional. Aquest panell mostra les diferents categories representatives dividides en anotacions funcionals. En la part inferior de la gràfica estan representats els patrons temporals d'expressió gènica al llarg del temps. L'eix X gràfica els dies d'anàlisi mentre que l'Y fa referència a l'expressió gènica descrita com a \log_2 FC.

El patró 3 englobava els gens sobreexpressats als 6 i 30 dies i que normalitzaven la seva expressió als 45 dies de seguiment. Aquest conjunt de gens pertanyien principalment a les categories de mort cel·lular (13 gens) i patologia cardiovascular (15 gens) (Figura 1.9.).

Finalment, el patró 4 el definien gens que mostraven una corba “ \vee ” o “ \wedge ”, és a dir, gens sobreexpressats a 6 i 45 dies i inhibits als 30 dies (33 gens, 6 associats amb cicle cel·lular) i viceversa (42 gens, 5 associats amb la síntesi proteica) (Figura 1.9.).

1.4. Validació dels resultats obtinguts per *microarray* mitjançant RT-qPCR

Per a validar per RT-qPCR el resultat obtingut amb l'anàlisi de *microarray* es van seleccionar 7 gens de 2 vies canòniques anteriorment descrites. Els gens candidats van ser el BMP2, BMPR1A, SMAD1, TGFB3, LMNA, TNFRSF1A i el TP53, que formaven part de les vies de senyalització apoptòtica i dels factors promotors de la cardiogènesi en vertebrats. Tal i com es mostra a la figura 1.10. l'expressió d'aquests gens en el teixit infartat mitjançant la tècnica de RT-qPCR ha estat similar a l'obtinguda amb l'anàlisi per *microarray*.

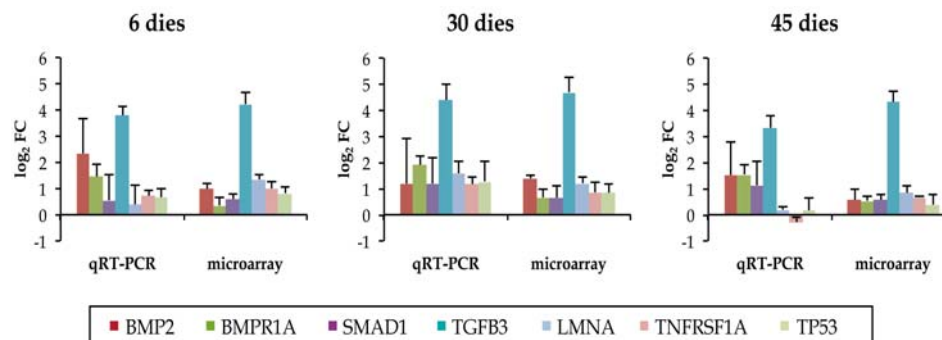


Figura 1.11. Expressió obtinguda per RT-qPCR i per *microarray* de 7 gens seleccionats en el teixit infartat de 6, 30 i 45 dies d'evolució. Els valors d'expressió gènica estan normalitzats respecte el gen PGK1. Les dades es representen com a mitjana \pm SD del log₂ FC. *Fold change* (FC).

2. Caracterització de les cèl·lules progenitores residents al teixit adipós epicardíac (epiATDPC) i pericardíac (periATDPC) porcí

2.1. Aïllament i cultiu cel·lular

Les mostres de teixit adipós d'origen pericardíac (n=4) i epicardíac (n=5) es van processar tal i com es descriu a material i mètodes. De tots els casos es van obtenir suficients cèl·lules per a poder fer els estudis de pluripotencialitat i de fenotipatge. Totes les poblacions cel·lulars es van cultivar sota condicions estàndard de cultiu i els estudis experimentals es van realitzar amb cèl·lules mantingudes en cultiu fins a passatge 5 (2-3 mesos segons el tipus cel·lular).

2.2. Anàlisi dels marcadors de superfície mitjançant citometria de flux

Per fenotipar les periATDPCs i les epiATDPCs es van analitzar a nivell basal els marcadors de superfície mitjançant citometria de flux (n=3 casos de cada població cel·lular). Com a resultat es va observar que ambdós poblacions es comportaven fenotípicament igual i guardaven el patró característic de les cèl·lules mesenquimals. Així, les cèl·lules mostraven una expressió positiva pels marcadors CD29, CD44, CD90 i CD105, i eren negatives per CD14, CD34, CD45 i CD106. Els resultats obtinguts queden reflectits en la taula 2.2.

	periATDPC	epiATDPC
CD14	13.2±6.9	6.8±4.5
CD29	98.7±0.2	72.4±17.9
CD34	0.2±0.2	2.7±0
CD44	96.9±1.2	88.1±6.1
CD45	2.3±1.2	5.9±3.7
CD90	99.5±0.3	99±1.2
CD105	91.6±1.2	83.5±14.5
CD106	0.1±0.02	0.5±0.6

Taula 2.2. Expressió de marcadors de superfície. Les dades representen el percentatge de cèl·lules positives respecte el nombre total de cèl·lules analitzades.

Es mostren 2 exemples dels casos analitzats (Figura 2.2.). Tal i com s'observa, les periATDPCs presenten un patró d'expressió dels marcadors de superfície molt similar al de les cèl·lules d'origen epicardíac. De nou, es va observar que ambdós poblacions són positives per CD29, CD44, CD90 i CD105.

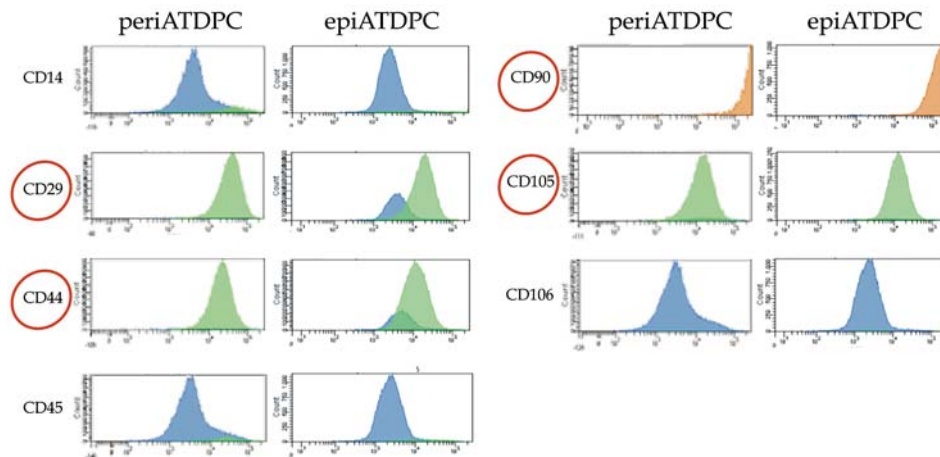


Figura 2.2. Histogrames de l'expressió dels marcadors de superfície analitzats per citometria de flux. Cas representatiu de cada tipus cel·lular a passatge 5. S'encerclen en vermell els marcadors que són positius en ambdues poblacions cel·lulars.

2.3. Anàlisi de l'expressió basal de marcadors cardíacs en les epiATDPCs i periATDPCs

L'anàlisi de l'expressió basal de marcadors cardíacs en les periATDPCs i epiATDPCs es va realitzar mitjançant l'estudi a nivell proteic per immunocitofluorescència a passatges 9 i 8, respectivament.

Ambdós tipus cel·lulars van expressar marcatge per Cx-43, α -actinina i GATA 4, mentre que van resultar ser negatives per a cTnI (Figura 2.5.).

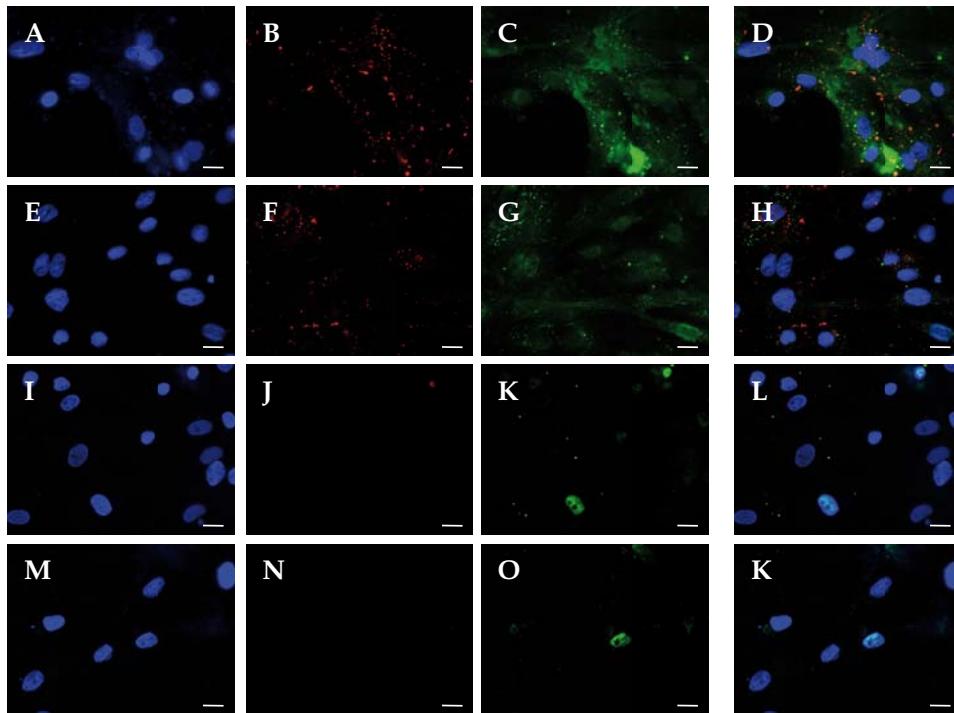


Figura 2.3. Expressió basal de proteïnes cardíques per immunocitofluorescència de les cèl·lules periATDPCs i epiATDPCs en cultiu. (A-D i I-L) cèl·lules mesenquimals de greix pericardíac i (E-H i M-K) de greix epicardíac. (B, F) En vermell, marcatge de la proteïna citoesquelètica α -actinina a nivell citoplasmàtic. (J, N) Del mateix color, marcatge de la proteïna citoplasmàtica troponina cardíaca I. (C, G) Marcatge en color verd de la proteïna d'unió gap Cx-43 situada en les membranes cel·lulars. (K, O) Expressió del factor de transcripció nuclear GATA 4 en color verd. Totes les mostres han estat contratenyides a nivell nuclear amb Hoechst 33342, en color blau (A, E, I, M). (D, H, L, K) Merge o superposició de l'expressió dels anticossos anteriorment descrits i el marcatge nuclear. (barra d'escala = 50 μ m).

2.4. Anàlisi de la pluripotencialitat de les epiATDPCs i periATDPCs

2.4.1. Diferenciació adipogènica

Tal i com s'observa en la figura 2.5.1. cap de les dues poblacions d'estudi, l'epicardíaca i la pericardíaca, van acumular vacuoles lipídiques, tret diferencial dels adipòcits. Només dos casos d'origen

epicardíac van mostrar una lleugera vacuolització que es tenyia de color vermell en sotmetre'ls a la tinció específica d'Oil Red O (Figura 2.5.1.).

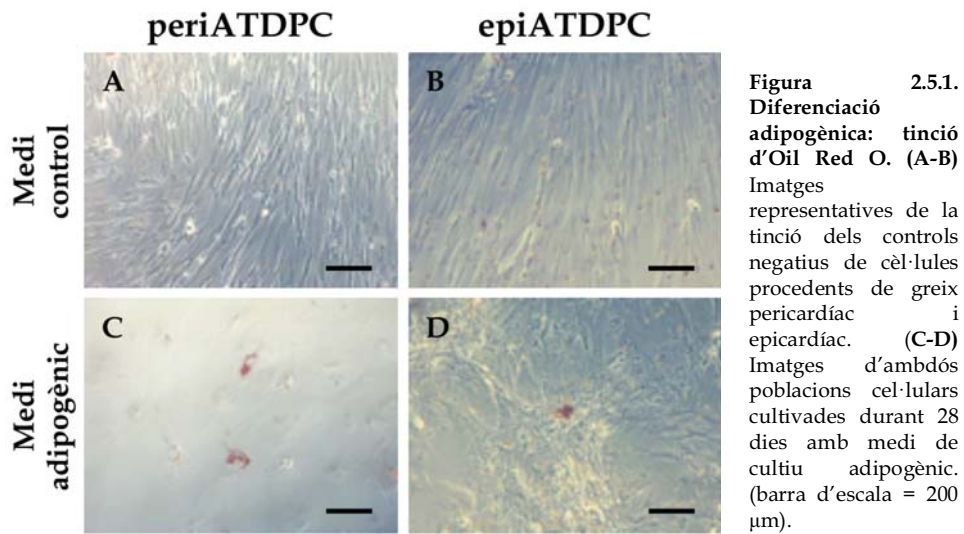
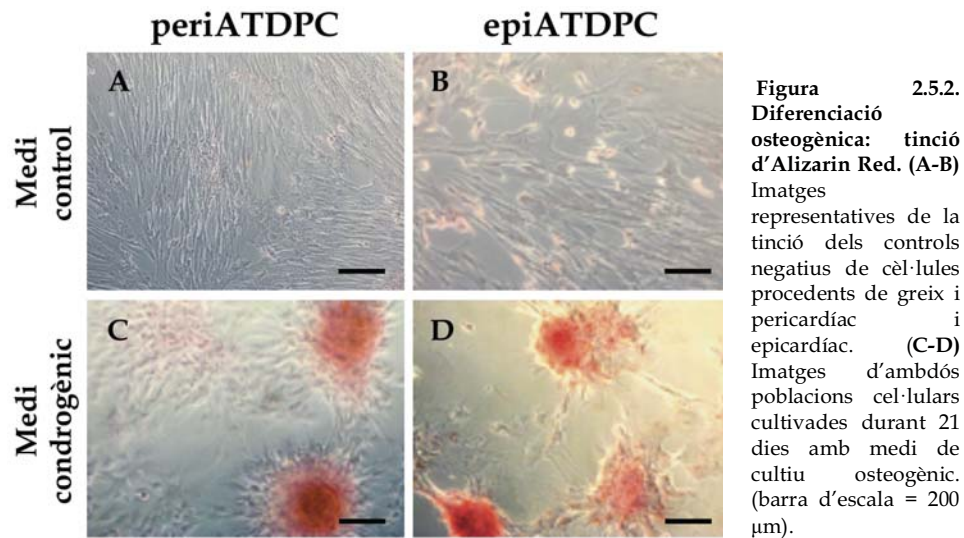


Figura 2.5.1.
Diferenciació adipogènica: tinció d'Oil Red O. (A-B)
 Imatges representatives de la tinció dels controls negatius de cèl·lules procedents de greix pericardíac i epicardíac. (C-D) Imatges d'ambdós poblacions cel·lulars cultivades durant 28 dies amb medi de cultiu adipogènic. (barra d'escala = 200 µm).

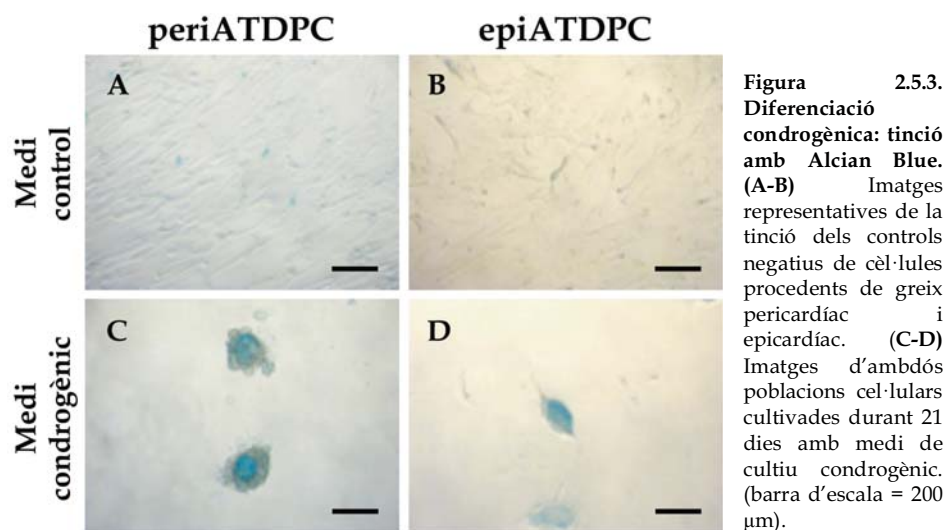
2.4.2. Diferenciació osteogènica

En ambdós tipus poblacionals es va poder detectar una elevada capacitat de diferenciació cap a llinatge osteogènic per dos motius rellevants: inicialment es van formar agregats cel·lulars amb disposició concèntrica de manera similar a com ho fan els osteòcits i posteriorment van aparèixer abundants dipòsits de calci que quedaven tenyits amb l'Alizarin Red, recobrint la superfície de cultiu. Així doncs, es confirma que els dos tipus cel·lulars mostren capacitat de diferenciació cap a llinatge osteogènic (Figura 2.5.2.).



2.4.3. Diferenciació condrogènica

Es va analitzar el grau de diferenciació de les cèl·lules d'origen epicardíac i pericardíac mitjançant la tinció específica amb l'Alcian Blue. A nivell morfològic, es van formar agregats cel·lulars de forma estelada que van acabar formant un cèl·lula rodona de característiques molt similars als condroblastes. La tinció va confirmar la presència de mucopolisacàrids propis del teixit cartilaginós (Figura 2.5.3.).



3. Transposició d'un pedicle adipós d'origen pericardíac sobre l'IAM en el model porcí

3.1. Supervivència del model d'IAM

De tots els animals utilitzats en aquest estudi (52) van ser exclosos 6 individus durant la fase d'inducció de l'IM. Quatre van morir per fibril·lació ventricular refractària a cardioversió i 2 per asistòlia ventricular. Així doncs, el model porcí d'IAM per lligadura coronària marginal presentat en aquest estudi va tenir un 10% de mortalitat.

Per poder determinar que tots els animals de l'estudi havien patit un IM d'iguals característiques es van extraure mostres sanguínies a nivell basal i 2 hores postinfart. No es van trobar diferències significatives entre els animals del grup control i tractat en els nivells circulants de troponina cardíaca (cTnI) ni mioglobina ($0.9 \pm 0.2 \mu\text{g/L}$ vs. $0.7 \pm 0.3 \mu\text{g/L}$, $P=0.56$; i $451.7 \pm 101.2 \mu\text{g/L}$ vs. $425.3 \pm 87.7 \mu\text{g/L}$, $P=0.85$, respectivament).

3.2. Tractament quirúrgic: transposició del pedicle adipós pericardíac en l'IAM

Prèviament a la inducció de l'IM es va identificar el teixit adipós d'origen pericardíac així com la seva vascularització. Aquest greix es troba situat a sobre de la fàscia visceral pericardíaca i cobert per una fina capa de teixit fibrós que li dóna el suport ideal per ésser manipulat com una membrana consistent. Un cop localitzat, es va procedir a la seva dissecció sense lesionar l'aportació sanguínia pròpia per garantir la seva viabilitat. El pedicle resultant es va reservar per a la seva posterior implantació en els animals del grup tractament, mentre que en els del grup control es va extraure per a l'estudi *in vitro* de les cèl·lules progenitores d'origen adipós.

Transcorreguts 30 minuts després de realitzar la lligadura arterial coronària, es va recuperar el pedicle adipós d'origen pericardíac i es va situar sobre el miocardi isquèmic de manera que quedés totalment cobert. En cas necessari, el pedicle es va alliberar parcialment de la capa fibrosa que el sustenta, fins a aconseguir l'extensió necessària per cobrir

tota la superfície miocàrdica afectada. A continuació, el pedicle adipós es va adherir als marges sans del miocardi isquèmic amb 0.1-0.2 ml de cola tissular Glubran® (N-butil-2 Cianocrilat, Metacrilosisolfolà, Cardiolink, Barcelona, Spain) dipositada amb una xeringa de 1000 U.I. amb agulla hipodèrmica de 24G (Figura 3.2.2.).

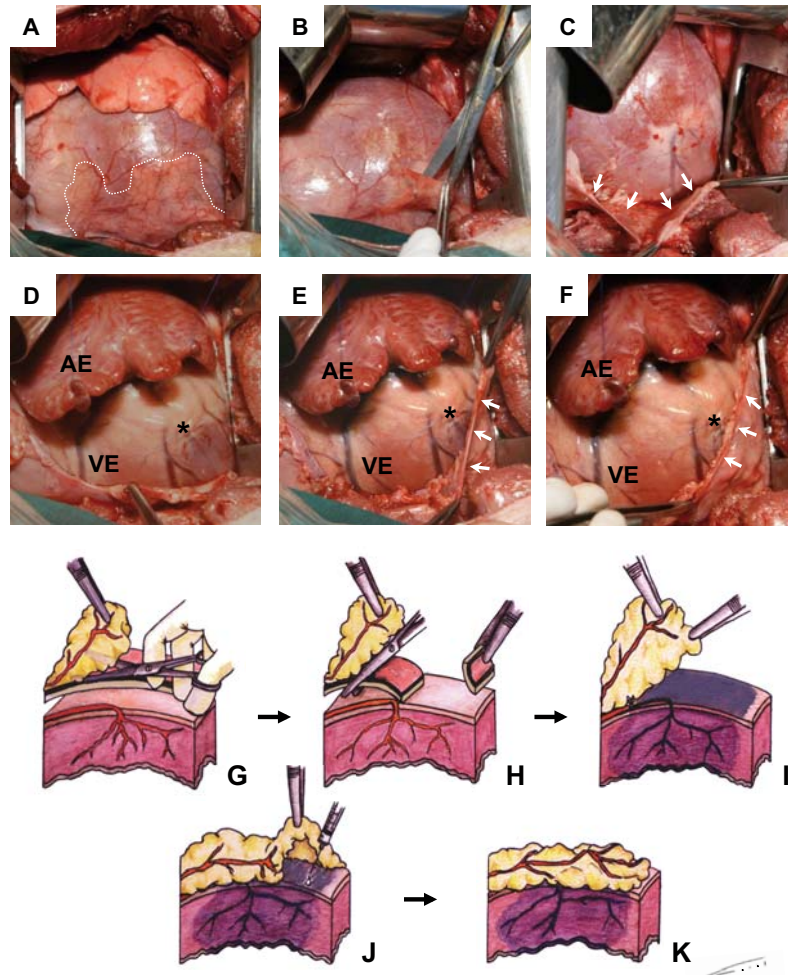


Figura 3.2.2. Transposició d'un pedicle adipós d'origen pericardíac. (A) Realització d'una toracotomia lateral esquerra per exposar el cor i permetre la identificació del teixit adipós (**línia discontinua**). (B, C) Dissecció del teixit adipós pericardíac per a la creació del pedicle (**fletxes**). (D) Després de la pericardiectomia parcial, s'indueix l'IM amb la lligadura de la primera branca marginal de l'arteria coronària circumflexa (**asterisc**). (E, F) Transposició del pedicle sobre la superfície infartada i posterior adhesió del pedicle amb cola tissular als marges sans, cobrint completament el miocardi isquèmic. (G-K) Il·lustracions esquemàtiques dels passos implicats en la intervenció de la transposició del pedicle adipós pericardíac. **Aurícula esquerra (AE); ventricle esquerre (VE)**.

3.3. Supervivència i viabilitat del tractament quirúrgic

Els animals que van sobreviure no van patir arítmies atrials ni ventriculars durant les intervencions quirúrgiques. Cal destacar que cap mort va ser deguda a l'aplicació de la nova tècnica quirúrgica presentada en aquesta tesi. Així doncs, podem afirmar que aquest mètode ofereix un 100% en la supervivència dels individus tractats.

Addicionalment, es va poder constatar que en el moment del sacrifici tots els animals del grup tractament tenien perfectament adherit i posicionat el pedicle adipós pericardíac a la superfície miocardiaca infartada.

3.4. Anàlisi de la funció ventricular amb RM cardíaca

Per a l'anàlisi de la funció ventricular es van incloure 7 animals del grup control i 6 tractats. A tots els individus es va realitzar una mesura basal, una segona 2 hores després de la inducció de l'infart i una tercera, transcorreguts 30 dies, abans del sacrifici. Inicialment es va comparar la FEVE, el VS i VD entre els dos grups a temps basal i 2 hores postinfart. La finalitat d'aquestes anàlisis va ser la de comprovar que tots els animals tenien una funció ventricular basal semblant i que l'IM havia estat similar en ambdós grups. Cal destacar que com a resultat no es van obtenir diferències significatives en cap temps de l'estudi (Taula 3.4.a.).

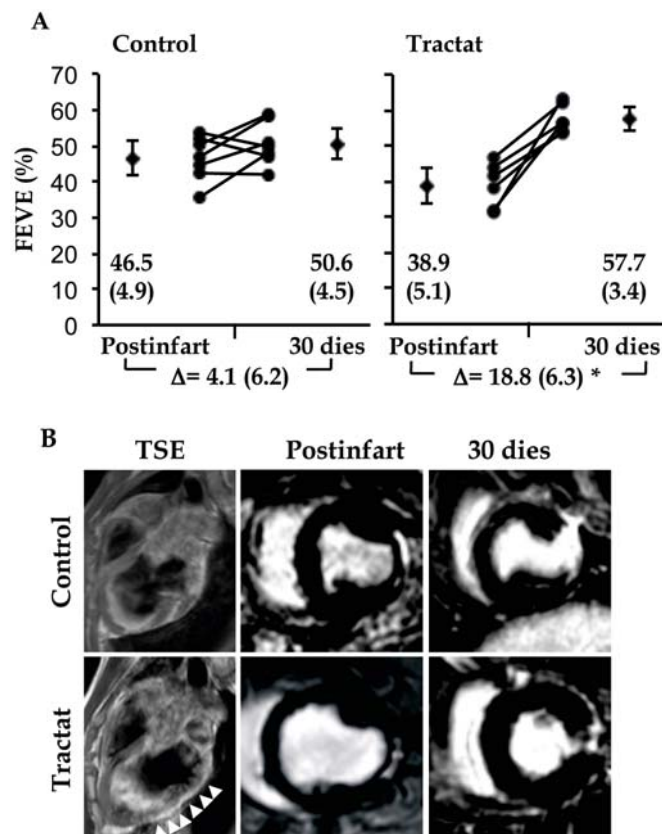
	Basal			2h postinfart		
	Controls	Tractats	<i>P</i> valor	Controls	Tractats	<i>P</i> valor
VS (ml)	24.5±5.1	26.8±5.3	0.43	27.7±5.2	33.7±6.9	0.11
VD (ml)	54.9±10	60.2±5.7	0.26	61.4±10.5	67.2±14.8	0.44
FEVE (%)	47.6±6	42.7±8.6	0.28	46.5±6.3	38.9±6.3	0.06

Taula 3.4.a. Volums sistòlics (VS) i diastòlics (VD) i fracció d'ejecció del ventricle esquerre (FEVE) a temps basal i 2 hores postinfart. Comparativa dels dos temps d'anàlisi dins de cada grup d'estudi amb el *P* valor resultant (t-Student).

Seguidament es va contrastar de la funció ventricular des de 2 hores postinfart fins a 30 dies entre els dos grups. En primer lloc es va

realitzar una prova t-Student comparant els dos temps d'anàlisi dins de cada grup d'estudi. Mentre que els controls no presentaven canvis quant a la FEVE (46.5% *vs.* 50.6%; $P=0.242$) els animals tractats havien experimentat un augment significatiu ($P<0.001$): la FEVE havia passat del 38.9% en el dia de l'infart fins a un 57.7% a dia de sacrifici.

En segon lloc es va procedir a l'anàlisi comparativa entre els dos grups d'estudi tenint en compte els dos temps. Així, les dades es van tractar com a mesures repetides en el temps i per tant, es va realitzar un test d'ANOVA amb la posterior correcció de Greenhouse-Geisser. Com a resultat es va comprovar que la FEVE en els animals tractats va ser 5 vegades superior respecte la dels controls a dia de sacrifici (18.8% *vs.* 4.1%; $P=0.007$). Les imatges de realç tardà adquirides abans del sacrifici van confirmar, tal com s'havia demostrat amb l'anàlisi morfomètrica, que la mida de l'infart era substancialment menor en els animals tractats (Figura 3.4.).



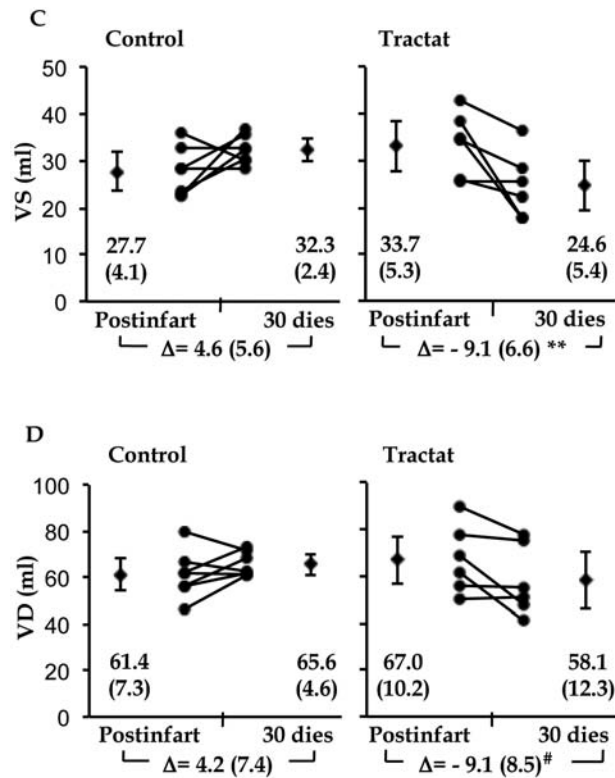


Figura 3.4. Anàlisi de la funció cardíaca amb ressonància magnètica. (A) Fracció d'ejecció del ventricle esquerre (FEVE) 2 hores postinfart i als 30 dies de seguiment en els animals control i tractats. Es mostren les dades per cada individu (**punts**) i la mitjana (\pm SEM) de cada grup d'animals (**diamants**). (B) Imatges representatives de cada grup en projecció *Turbo-spin eco* (TSE) en eix longitudinal i T1 en l'eix curt amb contrast retardat de gadolini. La projecció TSE mostra en blanc brillant el pedicle adipós adherit al miocardi en l'animal tractat (**fletxes**). Les imatges de projecció T1 mostren el teixit miocardiàc viable (negre) i la zona d'infart (blanc) en els 2 temps d'estudi indicats. (C, D) Volum sistòlic (VS) i diastòlic (VD) 2 hores postinfart i als 30 dies de seguiment en els animals control i tractats. Es mostren les dades per cada individu (**punts**) i la mitjana (\pm SEM) de cada grup (**diamants**). (* $P=0.007$, ** $P=0.009$, i # $P=0.03$ vs. el grup control).

Les anàlisis dels volums ventriculars també van demostrar benefici en l'efecte de remodelat ventricular en el grup d'animals del pedicle adipós. El VS dels animals tractats va disminuir significativament entre les 2 hores postinfart i els 30 dies de seguiment (33.7 mL vs. 24.5 mL; $P=0.048$), mentre que el VD només es va veure modestament reduït (67 mL vs. 58.1 mL; $P=0.32$). Contràriament, en els animals control ambdós volums (VS i VD) van augmentar significativament (27.7 mL vs. 32.3 mL; $P=0.07$ i 61.4 mL vs. 65.6 mL; $P<0.001$, respectivament) degut al procés natural de remodelat ventricular advers. En fer una anàlisi

comparativa entre els dos grups es van detectar diferències significatives al llarg del temps (-9.1 mL *vs.* 4.6 mL; $P=0.009$ i -9.1 mL *vs.* 4.2 mL; $P=0.03$, pel VS i VD en els tractats *vs.* els controls, respectivament) (Figura 3.4. C i D).

3.5. Anàlisi morfomètrica

L'anàlisi morfomètrica es va obtenir mesurant l'àrea de l'IM respecte l'àrea total del ventricle esquerre. Així, els animals del grup tractament, tant a 6 com a 30 dies, presentaven un IM significativament menor respecte els controls. A 6 dies, la mida de l'infart dels animals tractats era del $5.1\pm 1.4\%$ *vs.* el $12.9\pm 3.6\%$ en el grup control, i la diferència va resultar ser estadísticament significativa amb una $P=0.018$. A 30 dies de seguiment, els animals tractats tenien una extensió d'infart respecte el total del ventricle esquerre de $4.4\pm 2.3\%$ mentre que en els controls era de $7.7\pm 3\%$. La diferència entre els dos grups també resultà estadísticament significativa amb una $P=0.049$.

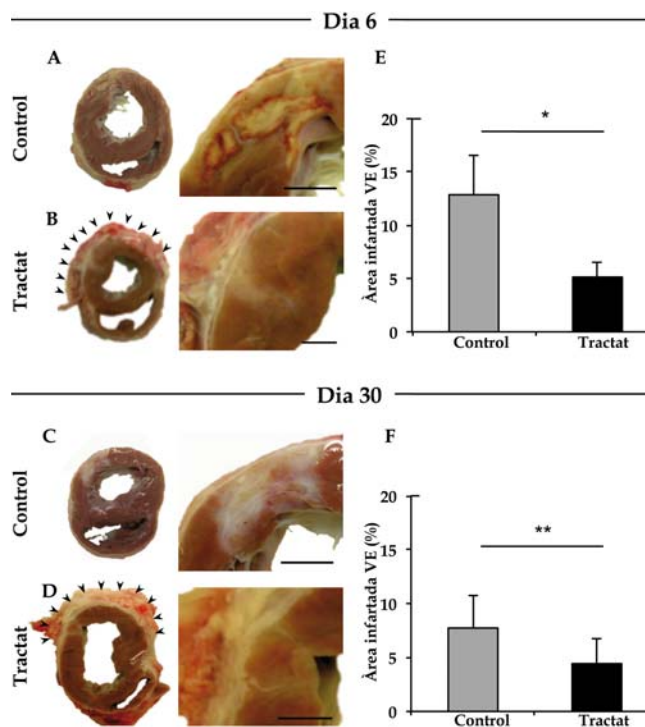


Figura 3.5. Anàlisi morfomètrica als 6 i 30 dies d'evolució. (A-D) Imatges representatives de seccions cardíaques de porcs controls i tractats. En els cors dels animals tractats, el pedicle adipós pericardíac queda indicat (fletxes). Imatges macroscòpiques mostrant les diferències de les característiques tissulars de les cicatrius miocardiàques entre grups (barra d'escala = 1 cm) i la reducció de l'àrea d'infart als animals tractats. (E) Histograma del percentatge de l'àrea d'infart del ventricle esquerre (VE) mesurat als cors dels animals. * $P=0.018$ i ** $P=0.049$ als 6 i 30 dies respectivament.

3.6. Fibrosi cicatricial i contingut de col·lagen

3.6.1. Fibrosi cicatricial

En els animals control de 6 dies d'evolució, mitjançant la tinció tricròmica de Masson, es va poder visualitzar la pèrdua de fibres musculars cardíques amb hialinització focal i edema intersticial a nivell tissular. Contràriament, als animals tractats els infarts van ser no-transmurals i només un d'ells tenia hemorràgia a nivell macroscòpic. Histològicament, hi havia molt menys edema i abundant teixit miocardiàc viable en comparació amb els controls.

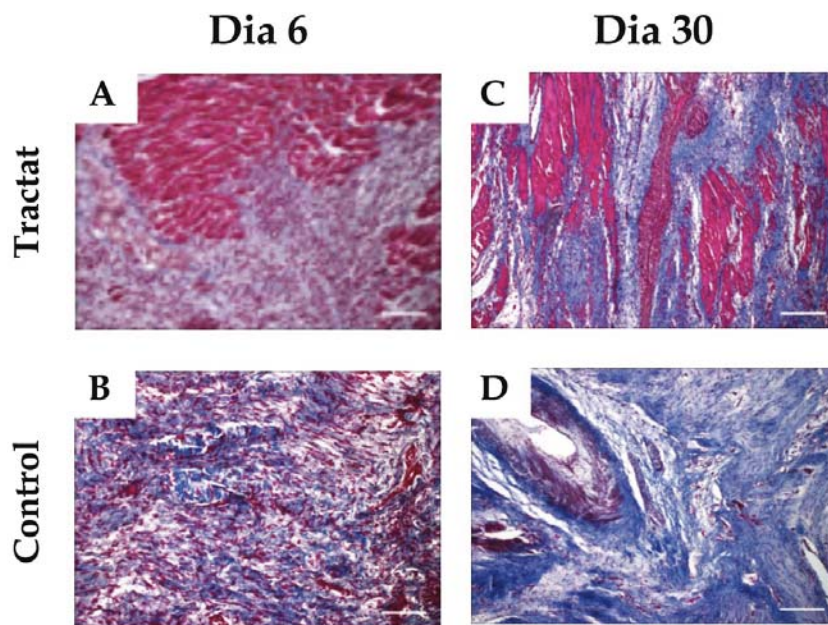


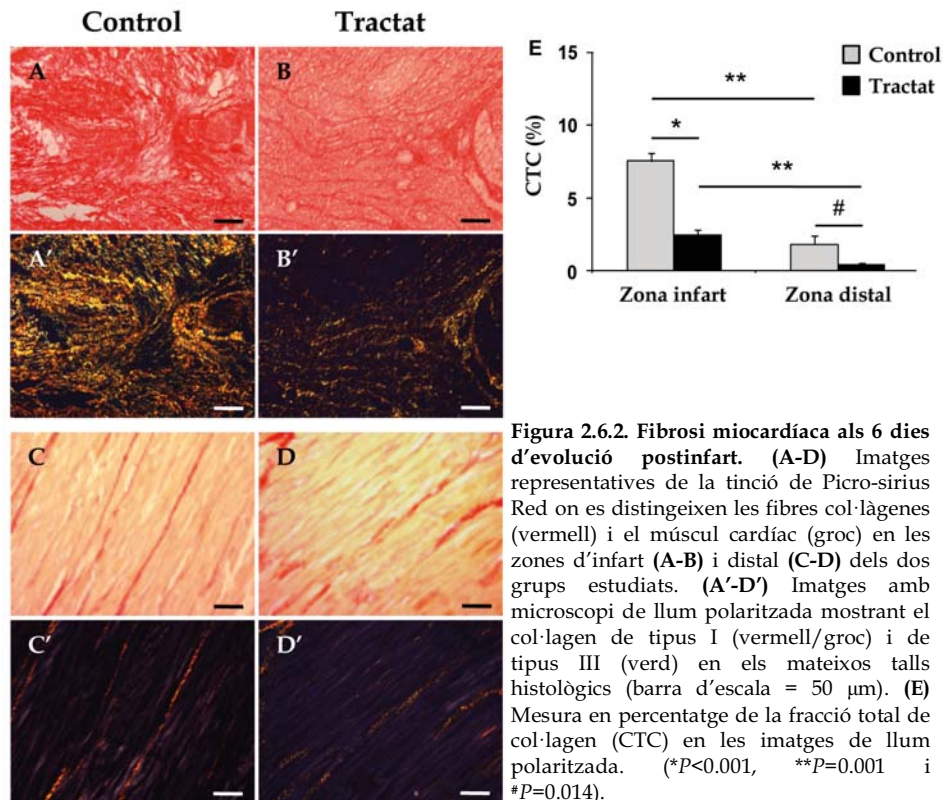
Figura 2.6.1. Fibrosi cicatricial als 6 i 30 dies d'evolució. (A-D) Fotografies representatives de talls histològics de miocardi de porcs controls i tractats tant a 6 com a 30 dies d'evolució postinfart. La tinció emprada és la tricròmica de Masson; en color blau s'observen els dipòsits de teixit fibròtic mentre que el color rosa fúcsia correspon al teixit muscular viable. En ambdós temps d'estudi els teixits dels animals tractats conserven illots de miocardi sa dintre de la cicatriu cardíaca, mentre que els controls mostren un grau de fibrosi superior. (barra d'escala = 50 μ m).

Pel que fa als animals de 30 dies de seguiment (n=10 controls; n=10 tractats), tant els pertanyents al grup control com al tractat, presentaven una capa subendocardiàcia viable, possiblement pel contacte directe amb la sang oxigenada present a la cavitat ventricular. A més,

havia desaparegut la sang extravasada característica dels estadis inicials de la cicatriu cardíaca. Als animals del grup control el teixit necròtic s'havia substituït per teixit connectiu ferm, mentre que als tractats hi havia molta menys fibrosi i la presència de múltiples extensions de fibres musculars intactes. Aquests illots musculars viables van poder ser identificats també amb la tinció tricròmica de Masson.

3.6.2. Contingut de col·lagen

Per a valorar i quantificar les possibles variacions del contingut de col·lagen a nivell cicatricial es va emprar la tinció específica de Picro-sirius Red. Aquest anàlisi es va realitzar tant en talls de les zones d'infart com distal del miocardi dels animals controls i tractats a 6 i 30 dies d'evolució.



Als animals de 6 dies, el contingut total de col·lagen (CTC) en la zona de l'infart va ser de $2.4 \pm 0.4\%$ en els tractats i de $7.5 \pm 0.5\%$ en els controls ($P < 0.001$). Sota microscopi amb llum polaritzada, el col·lagen de tipus III (verd) dels animals control va ser d'un 7% del CTC mentre que en els animals tractats va assolir el 33%. A la zona distal, el CTC va ser de $0.4 \pm 0.1\%$ en els animals tractats i de $1.8 \pm 0.6\%$ en els controls ($P = 0.014$) (Figura 2.6.2.).

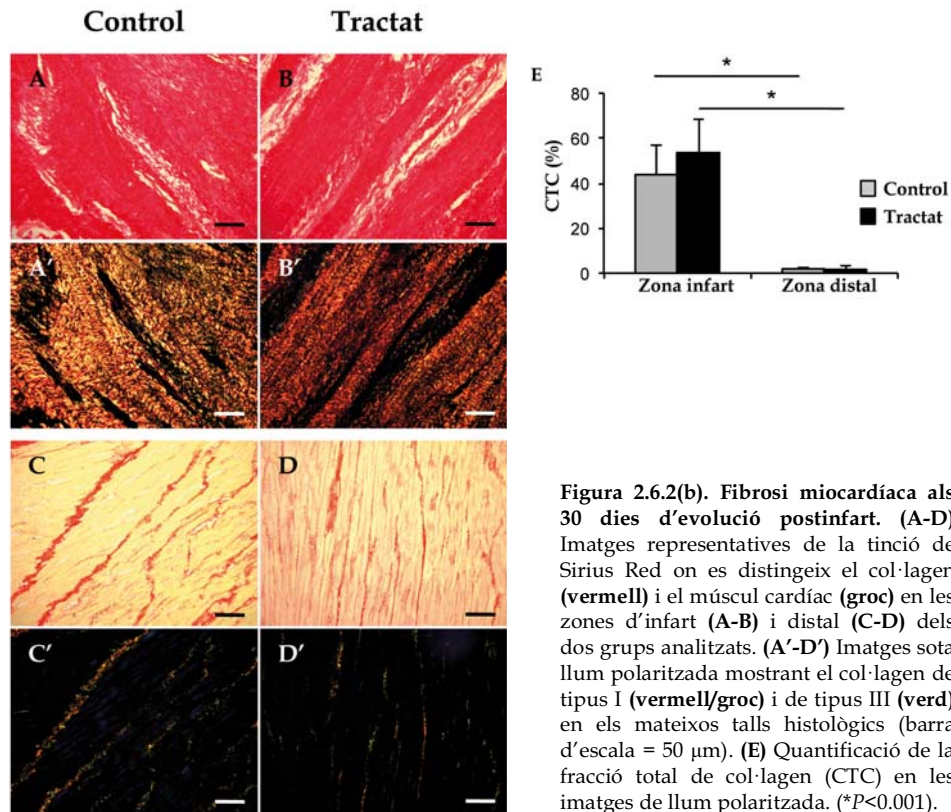


Figura 2.6.2(b). Fibrosi miocàrdica als 30 dies d'evolució postinfart. (A-D) Imatges representatives de la tinció de Sirius Red on es distingeix el col·lagen (vermell) i el múscul cardíac (groc) en les zones d'infart (A-B) i distal (C-D) dels dos grups analitzats. (A'-D') Imatges sota llum polaritzada mostrant el col·lagen de tipus I (vermell/groc) i de tipus III (verd) en els mateixos talls histològics (barra d'escala = 50 µm). (E) Quantificació de la fracció total de col·lagen (CTC) en les imatges de llum polaritzada. (* $P < 0.001$).

Pel que fa als individus de 30 dies de seguiment, les característiques fibroses de la cicatriu ja madura van resultar ser molt similars entre ambdós grups d'estudi (CTC: $53.7 \pm 14.5\%$ vs. $43.8 \pm 13.2\%$; $P = 0.67$; col·lagen de tipus I: $91.4 \pm 10.8\%$ vs. $87.9 \pm 10.8\%$; $P = 0.96$; i col·lagen de tipus III: $8.6 \pm 10.8\%$ vs. $12.1 \pm 10.8\%$; $P = 0.96$) entre controls i tractats, respectivament.

3.7. Connexions vasculars entre el pedicle pericardíac i el miocardi infartat

S'ha estudiat si existeix la participació de processos vasculars davant del benefici obtingut mitjançant la transposició del pedicle adipós vascularitzat sobre la superfície isquèmica aguda. Als animals de 6 dies d'evolució postinfart s'ha observat que existeixen microvasos que es tenyeixen amb Isolectina B4 connectant el pedicle vascularitzat amb el miocardi isquèmic adjacent (Figura 3.7. A i B). Contràriament, en els animals del grup *sham* (sense IM però amb la transposició pedicular) aquestes connexions no s'han identificat (Figura 3.7.).

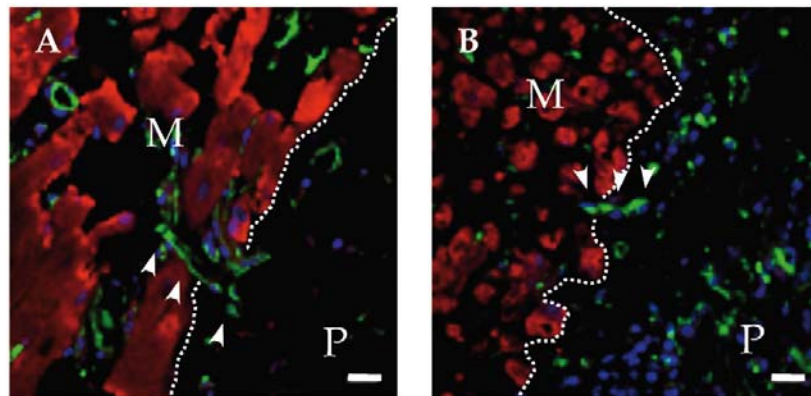


Figura 3.7. Connexions vasculars entre el pedicle adipós i el miocardi isquèmic. Imatges representatives de microvasos a la interfase entre el pedicle adipós pericardíac i el miocardi infartat després de 6 dies de tractament (A,B). S'ha realitzat marcatge amb l'anticòs anti-cTnI (vermell), contra la proteïna Isolectina B4 (verd) i Hoechst 33342 (blau) pels nuclis, mostrant els tubs vasculars (fletxes) connectant el pedicle adipós (P) i el miocardi (M) adjacent (línia discontinua) (barra d'escala = 50 μ m).

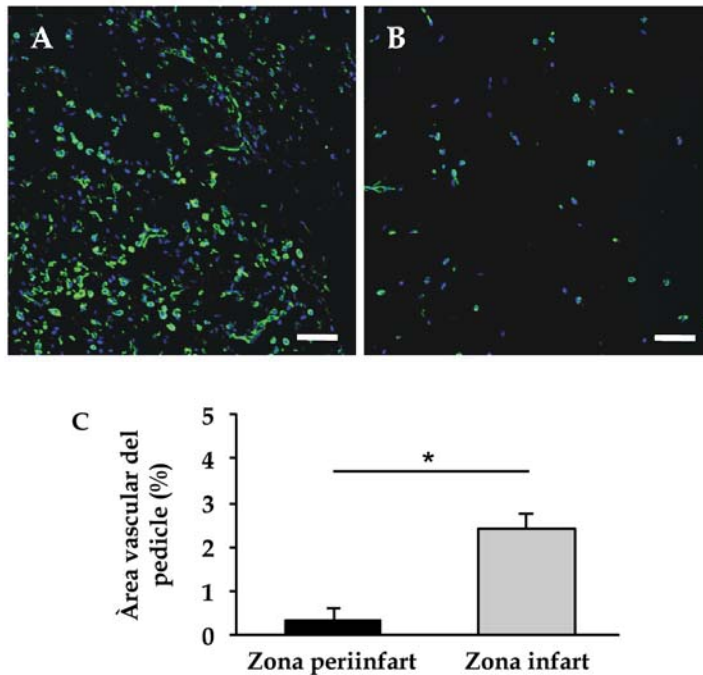
3.8. Àrea vascular del teixit miocardiàc i del pedicle adipós

Pel que fa a l'estudi de la vascularització a nivell miocardiàc no es van detectar diferències significatives entre els animals controls i els tractats, ni a la zona d'infart ($4.5 \pm 2.1\%$ vs. $4.3 \pm 0.9\%$; $P=0.92$), periinfart ($2.0 \pm 0.8\%$ vs. $3.0 \pm 0.4\%$; $P=0.33$) ni a la distal ($2.8 \pm 1.8\%$ vs. $2.1 \pm 1.4\%$; $P=0.57$) als 6 dies de seguiment.

Tal com ja va quedar palès a 6 dies, tampoc es van detectar diferències significatives entre animals controls i tractats als 30 dies

postinfart, ni a la zona d'infart (0.4 ± 0.1 vs. 0.6 ± 0.2 ; $P=0.3$), periinfart (3.2 ± 0.9 vs. 2.5 ± 0.6 ; $P=0.55$) ni distalment (0.6 ± 0.2 vs. 1.4 ± 0.4 ; $P=0.18$).

Després d'analitzar en els animals de 6 dies de seguiment l'àrea vascular, es va poder constatar que la zona del pedicle adipós que estava en íntim contacte amb la superfície isquèmica miocardiàcia havia desenvolupat una marcada hipervascularització en comparació amb els marges del pedicle llunyans a la isquèmia ($2.4 \pm 0.9\%$ vs. $0.3 \pm 0.2\%$; $P < 0.001$) (Figura 3.8.2.).



En canvi, transcorreguts 30 dies, la hipervascularització pedicular detectada al 6 dies d'evolució respecte els marges llunyans a la isquèmia ja no era evident ($0.6 \pm 0.4\%$ vs. $0.8 \pm 0.5\%$; $P=0.74$). De fet, la densitat vascular del pedicle era similar a la trobada en el pedicle dels animals pertanyents al grup *sham*, és a dir, en els animals no infartats ($0.6 \pm 0.4\%$ vs. 0.4 ± 0.2 ; $P=0.55$).

3.9. Apoptosi miocardiàica

Arrel de la presència de connexions vasculars entre el pedicle i el miocardi isquèmic adjacent, es va realitzar l'estudi de l'apoptosi cel·lular amb la tècnica immunohistoquímica de TUNEL. L'apoptosi miocardiàica és un procés de mort cel·lular programada que apareix després de l'IAM, tant a la zona isquèmica depenent de l'artèria closa com a les zones distals, i és el principal responsable de la mida de l'infart generat (Anversa et al. 1998). Aquest fenomen apareix ja a les 2 hores postoclusió coronària i aconsegueix un pic màxim als 7 dies d'evolució de l'IM. Per aquest motiu, només han estat avaluats els animals de 6 dies de seguiment, doncs als 30 dies postinfart ja no hi ha presència de cèl·lules apoptòtiques.

Com a resultats obtinguts cal destacar que hi va haver una disminució significativa de les cèl·lules en apoptosi a la zona periinfart dels animals tractats respecte els animals del grup control ($18\pm 20\%$ vs. $64\pm 17\%$; $P<0.001$). Pel que fa a la zona d'infart, es van trobar molt poques cèl·lules TUNEL positives tant als animals tractats com als controls. Com a conseqüència no es van detectar diferències significatives entre els dos grups d'animals estudiats ($24\pm 27\%$ vs. $12\pm 16\%$; $P=0.4$) (Figura 3.9.).

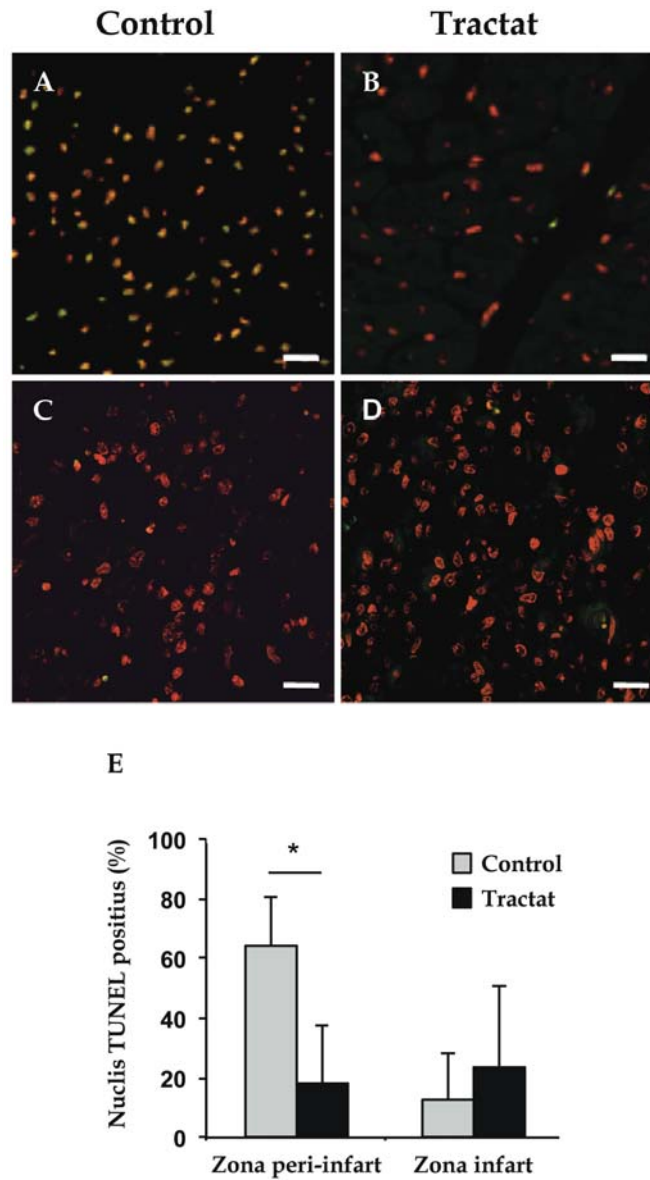


Figura 3.9. Apoptosi miocardiaca als 6 dies d'evolució postinfart. (A-D) Imatges representatives de microscòpia confocal de la zona miocardiaca periinfart (A-B) i de la zona infart (C-D). Els nuclis cel·lulars queden reflectits en vermell i el marcatge de TUNEL en color verd. En color taronja s'observen les cèl·lules apoptòtiques, color resultant de la superposició dels dos marcatges (barra d'escala = 20 μ m). (E) Histograma de barres dels nuclis TUNEL positius observats a la zona periinfart i infart dels dos grups d'estudi. (* $P < 0.001$).

3.10. Anàlisi de l'expressió gènica del miocardi i el pedicle adipós

Finalment, es va analitzar l'expressió d'ARNm tant a 6 com a 30 dies d'evolució postinfart. Dels 11.265 gens anotats interrogats, 81 van mostrar una regulació diferencial pel tractament de la transposició del pedicle adipós, com a mínim en una de les condicions estudiades (Figura 3.10.a. A i B). A dia 6, en el pedicle adipós pericardíac 13 gens van augmentar la seva expressió mentre que 10 van inhibir-se. Transcorreguts 30 dies postinfart només es van trobar 2 gens sobreexpressats i 13 d'inhibits. A més, 10 dels 48 gens totals regulats en el teixit adipós es trobaven alterats en ambdós temps d'estudi (Figura 3.10.a. A; Taula 3.10.a.; Taula 3.10.c.). Cal destacar que aquesta desena de gens comuns en els dos temps d'estudi corresponien a transcrits que codifiquen per proteïnes de resposta en la fase aguda i que es trobaven sobreexpressats als 6 dies i inhibits als 30 (Taula 3.10.b.).

A la zona de l'IM es van detectar 15 gens amb la seva expressió alterada únicament en aquesta localització als 6 dies; 5 d'ells estaven sobreexpressats i la resta inhibits (Figura 3.10.a. B; Taula 3.10.d.). Al cap d'un mes, es van detectar 18 gens regulats únicament en la zona d'infart; la majoria d'ells estaven inhibits i només 2 restaven sobreexpressats (Figura 3.10.a. B; Taula 3.10.e.). A diferència del teixit adipós, en el miocardi infartat no es van trobar gens comuns en els dos temps analitzats.

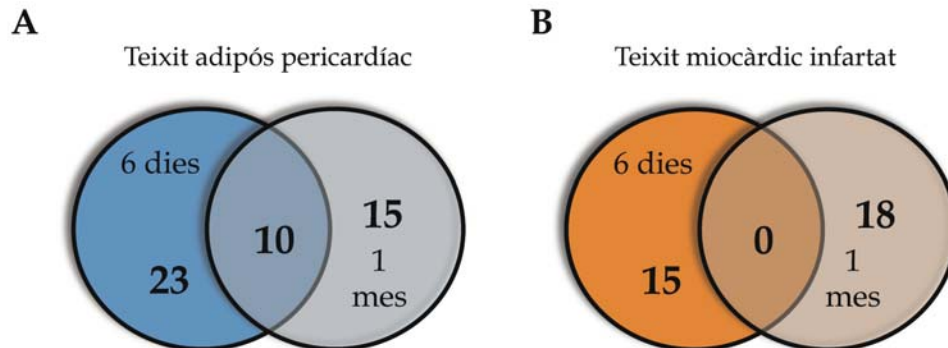


Figura 3.10.a. Alteració de l'expressió gènica per la transposició del pedicle adipós pericardíac. (A i B) Diagrames de Venn il·lustrant el número de gens únics i comuns alterats en el teixit adipós pericardíac (A) i el miocardi infartat (B) a 6 i 30 dies d'evolució postinfart. Els números en cada cercle representen el nombre total de gens modulats en cada condició experimental. En aquest anàlisi han quedat inclosos només els gens diferencialment expressats ($P < 0.05$).

A més, el programa IPA va identificar els gens principals i les seves funcions, i les vies canòniques associades amb els gens d'expressió diferencial en cada anàlisi comparatiu. Una dada de rellevància és que en el pedicle adipós pericardíac la resposta transcripcional, als 6 dies d'evolució, es trobava dominada per la sobreexpressió de involucrats en la progressió del cicle cel·lular, proliferació i creixement cel·lular, i en l'angiogènesi i desenvolupament de vasos sanguinis (Figura 3.10.b.). Addicionalment, gens que implicats en el moviment cel·lular i la resposta inflamatòria també es trobaven sobreexpressats (Figura 3.10.b.).

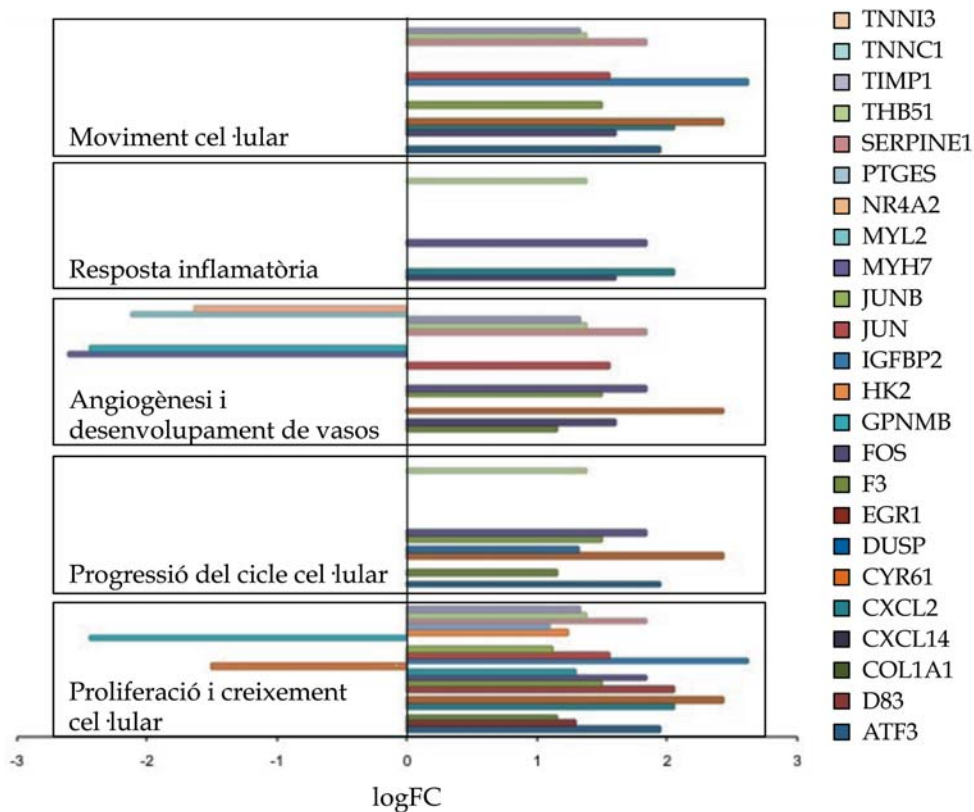


Figura 3.10.b. Funcions dels gens principals regulats al teixit adipós pericardíac als 6 dies d'evolució postinfart i els gens comuns a 6 i 30 dies de seguiment. Es grafica el logaritme del FC (*Fold change*) per a cada gen descrit.

A continuació s'adjunten les llistes completes dels gens alterats en ambdós temps d'estudi tant al teixit miocardiàc infartat com en el teixit adipós (Taules 3.10.a-e).

Taula 3.10.a. Gens regulats únicament en el teixit adipós pericardíac 6 dies posttractament.

Gene name	UniGene (S. <i>Scrofa</i>)	logFC (mean)	Molecular function	Biological process	Pathway
ACP5	Ssc.575.1.S1_at	1.58	Phosphatase	Cation transport / Skeletal development	Role of Osteoblasts, Osteoclasts and Chondrocytes in Rheumatoid Arthritis / Riboflavin metabolism
ARL4A	Ssc.30613.1.A1_at	-1.04	Small GTPase	General vesicle transport	Huntington disease
ATP5L	Ssc.30641.1.S1_at	-1.03	Unclassified	Unclassified	Oxidative Phosphorylation / Purine metabolism
AUTS2	Ssc.31175.1.S1_at	1.17	Unclassified	Unclassified	Unclassified
BGN	Ssc.5943.1.S1_at	1.06	Extracellular matrix	Cell adhesion-mediated signaling / Skeletal development	Unclassified
CD83	Ssc.12095.1.S1_at	1.30	Unclassified	Unclassified	Dendritic cell maturation / TREM1 signaling / Communication between innate and adaptative immune system cells
COL1A1	Ssc.1091.2.S1_at	1.16	Extracellular matrix structural protein	Cell adhesion / Cell structure	Integrin signalling > collagen
F3	Ssc.19907.1.S1_at	1.50	Defense/immunity protein	Ligand mediated signaling / Blood clotting	Angiogenesis >Tissue factor / Blood coagulation > Tissue factor
FCN2	Ssc.137.1.S1_at	-1.81	Antibacterial response protein	Cell adhesion-mediated signaling / Cell adhesion	Unclassified
GPNMB	Ssc.18572.1.S1_at	1.30	Unclassified	Unclassified	Unclassified
HK2	Ssc.3509.1.S1_at	-1.51	Carbohydrate kinase	Glycolysis	Glycolysis > hexokinase
IGFBP2	Ssc.47.1.S1_at	2.62	Miscellaneous fuction protein	Extracellular matrix protein-mediated signaling / Growth factor homeostasis	IGF-1 signaling
MYH7	Ssc.1544.1.S1_at	-2.60	Actin binding motor protein	Muscle contraction / Muscle development / Citokinesis	Wnt signaling / Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling / Calcium signaling /
MYL2	Ssc.2386.1.S1_a_at	-2.44	Actin family cytoeskeletal protein / Calmodulin related protein	Muscle contraction / Muscle development / Cell structure and motility	Tight junction signaling / Cardiomyocyte differentiation / Integrin signaling / CXCR4 signaling / Cardiogenesis
PTGES	Ssc.1310.1.S1_at	1.10	Synthase and synthetase isomerase	Other lipid, fatty acid and steroid metabolism	Eicosanoid signaling / Arachidonic acid metabolism

RBP4	Scs.15695.1.S1_at	-1.42	Transfer/carrier protein	Vitamin/cofactor transport	Acute phase response signaling / RAR activation
RGS2	Scs.3139.1.A1_at	1.76	G-protein modulator	G-protein mediated signaling	Heterotrimeric G-protein signaling / cAMP-mediated signaling
SERPINE1	Scs.9781.1.S1_at	1.85	Serine protease inhibitor	Proteolysis	P53 pathway / Coagulation system / TGF-beta signaling / HMGB1 signaling / Acute phase response signaling
SGK2	Scs.24957.1.S1_at	-1.54	Non-receptor serine / Theronine protein kinase	Inhibition of apoptosis / Intracellular signaling cascade / Homeostasis activities	Unclassified
THBS1	Scs.924.2.A1_at	1.38	Signaling molecule / Enzyme regulator / Extracellular matrix	Blood clotting / Developmental process	P53 pathway > Thrombospondin-1 / Bladder cancer signaling
TIMP1	Scs.11784.1.S1_at	1.34	Metalloprotease inhibitor	Proteolysis / Developmental process	IL-17 signaling / Leukocyte extravasation signaling
TNNC1	Scs.3085.1.S1_at	-2.12	Actin binding cytoeskeletal protein / Calmodulin related protein	Muscle contraction / Muscle development / Calcium mediated signaling	Calcium signaling
TNNI3	Scs.2589.1.S1_at	-1.63	Non-motor actin binding protein	Muscle contraction / Muscle development	Calcium signaling / Protein kinase A signaling

Taula 3.10.b. Gens regulats comuns a 6 i 30 dies posttractament en el teixit adipós pericardíac

Gene name	UniGene (<i>S. Scrofa</i>)	logFC 6 days (mean)	logFC 1 month (mean)	Molecular function	Biological process	Pathway
ATF3	Ssc.16466.1.A1_at	1.95	-1.56	CREB transcription factor / Nucleic acid binding	Induction of apoptosis / mRNA transcription regulation	Apoptosis signaling
CXCL2	Ssc.4871.1.S1_at	2.06	-2.76	Chemokine	Cell proliferation and differentiation	Unclassified
DUSP1	Ssc.6058.1.S1_at	1.32	-1.13	Protein phosphatase	Muscle development / Cell cycle control	Glucocorticoid signaling / RAR signaling / ERK/MAPK signaling / p38 MAPK signaling / G-protein coupled receptor signaling
EGR1	Ssc.16460.1.S1_at	2.06	-3.71	KRAB box transcription factor / Nucleic acid binding	mRNA transcription regulation	Angiotensin II-stimulated signaling through G / CXCR4 signaling
FOS	Ssc.1555.1.A1_at	1.84	-2.85	Transcription factor / Nucleic acid binding	Cell proliferation and differentiation / Cell cycle control / Immunity and defense	Angiogenesis / Apoptosis signaling / T and B cell activation
IER2	Ssc.11269.1.A1_at	1.34	-2.34	Unclassified	Unclassified	Unclassified
JUN	Ssc.9075.1.A1_at	1.56	-1.18	Transcription factor / Nucleic acid binding	Cell proliferation and differentiation / Cell cycle control	Angiogenesis / Apoptosis signaling
JUNB	Ssc.10881.1.S1_at	1.13	-1.83	Transcription factor / Nucleic acid binding	Cell proliferation and differentiation / Cell cycle control	Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling / TGF-beta signaling
NR4A2	Ssc.4643.1.A1_at	1.24	-1.55	Nuclear hormone receptor / Transcription factor	Stress response / Signal transduction	Unclassified
ZFP36	Ssc.3411.1.A1_at	1.19	-2.21	RNA-binding protein	Intracellular signaling cascade / RNA catabolism	Unclassified

Taula 3.10.c. Gens regulats únicament en el teixit adipós pericardíac 30 dies posttractament.

Gene name	UniGene (<i>S. Scrofa</i>)	logFC (mean)	Molecular function	Biological process	Pathway
ALDH1A2	Ssc.17522.1.A1_at	-2.18	Dehydrogenase	Carbon metabolism	5-Hydroxytryptamine degradation > Aldehyde dehydrogenase
BTG2	Ssc.17286.1.A1_at	-2.09	Unclassified	MAPKKK cascade / Cell cycle control / Cell proliferation and differentiation / Oncogenesis	Cell cycle regulation by BTG family proteins
CDH11	Ssc.8698.1.S1_at	1.23	Cadherin	Cell adhesion-mediated signaling / Cell adhesion / Neurogenesis	Wnt signaling > cadherin / Cadherin signaling
CLDN4	Ssc.16674.1.S1_at	-1.33	Tight junction	Cell structure	Leukocyte extravasation signaling / Tight junction signaling
DUSP6	Ssc.25164.1.S1_at	-1.14	Kinase inhibitor / Protein phosphatase	Protein phosphorylation / MAPKKK cascade / Cell proliferation and differentiation	Oxidative stress response
HOXB6	Ssc.13232.2.A1_at	-2.36	Homeobox transcription factor / Nucleic acid binding	mRNA transcription regulation / Segment specification / Neurogenesis	Wnt signaling
IER3	Ssc.5182.1.A1_at	-1.21	Unclassified	Stress response	Unclassified
IFI6	Ssc.20101.1.S1_at	-1.13	Unclassified	Immunity and defense	Unclassified
IFIT3	Ssc.31140.1.S1_at	-1.35	Miscellaneous function	Interferon-mediated immunity	Interferon signaling
IGHM	Ssc.11070.1.S1_at	2.36	Immunoglobulin	B-cell- and antibody-mediated immunity	B-cell activation
INSIG1	Ssc.15598.1.S1_at	-1.54	Miscellaneous function protein	Cholesterol metabolism	Unclassified
ISG15	Ssc.11557.1.A1_at	-1.74	Ribosomal protein	Proteolysis	Activation of IRF by cytosolic pattern recognition receptors
MYOC	Ssc.15062.1.S1_at	-1.96	Receptor	Cell surface receptor mediated signal transduction / Vision / Cell structure and motility	Unclassified

PPAP2A	Scs.21113.2.S1_at	-1.16	Phosphatase	Steroid metabolism / G-protein mediated signaling	Glycerolipid, sphingolipid and Glycerophospholipid metabolism / Phospholipid degradation
RNASE1	Scs.2824.1.S1_at	-1.22	Emdoribonu clease / Hydrolase	RNA catabolism	Unclassified

Taula 3.10.d. Gens regulats únicament en el teixit infartat 6 dies posttractament.

Gene name	UniGene (S. <i>Scrofa</i>)	logFC (mean)	Molecular function	Biological process	Pathway
C21ORF7	Ssc.27048.1.A1_at	-1.12	Non-receptor serine/threonine protein kinase	Protein phosphorylation / Receptor protein serine/threonine kinase signaling	Interleukin signaling / Wnt signaling / Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling
COMP	Ssc.16356.1.S1_at	-1.45	Extracellular matrix / Signaling molecule	Blood clotting / Developmental process	Unclassified
ERBB3	Ssc.4203.1.S1_at	-1.36	Tyrosine protein kinase receptor / Growth factor / Protein kinase	Cell cycle control / Cell proliferation and differentiation / Oncogenesis / Protein phosphorylation	EGF receptor signaling / Cadherin signaling
FABP4	Ssc.1089.1.S1_at	1.11	Transfer/carrier protein	Lipid and fatty acid transport and binding / Steroid hormone-mediated signaling / Ectoderm development	Unclassified
FST	Ssc.4747.1.S1_at	1.31	Select regulatory molecule	Homeostasis	BMP signaling
HBA1	Ssc.8925.1.S1_at	1.25	Transfer/carrier protein	Transport / Blood circulation and gas exchange	Unclassified
HBB	Ssc.7157.1.A1_at	1.04	Unclassified	Unclassified	Unclassified
IGF1	Ssc.16231.1.S1_a_at	-0.86	Growth factor	Ligand-mediated signaling / Developmental processes / Cell proliferation and differentiation	Insulin/IGF pathway-mitogen activated protein kinase/MAP kinase cascade and B signaling cascade / Cardiac hipertrophic signaling / Myc mediated apoptosis signaling
IGF2	Ssc.9365.2.S1_a_at	-1.16	Growth factor	Ligand-mediated signaling / Developmental processes / Cell proliferation and differentiation	Insulin/IGF pathway-mitogen activated protein kinase/MAP kinase cascade and B signaling cascade / Growth hormone signaling
INSIG1	Ssc.15598.1.S1_at	1.13	Miscellaneous function protein	Cholesterol metabolism	Unclassified
LPAR1	Ssc.31062.1.S1_at	-1.15	G-protein coupled receptor	G-protein mediated signaling / Intracellular signaling cascade / Ligand-mediated signaling	Gα12/13 signaling / RhoA signaling

LTBP2	Ssc.19136.1.S1_at	-1.07	Extracellular matrix structural protein and glycoprotein / Cell adhesion molecule / Calmodulin related protein / Annexin / Signaling molecule	Cell communication / Vision / Skeletal development	Unclassified
NOV	Ssc.16434.1.A1_at	-1.31	Growth factor / Signaling molecule	Cell communication	IGF-1 signaling
PTGDS	Ssc.16187.1.S1_at	-1.62	Synthase / Isomerase		Eicosanoid signaling / Arachidonic acid metabolism
TNC	Ssc.16209.1.S1_at	-1.08	Cell adhesion molecule / Extracellular matrix glycoprotein	Extracellular matrix protein-mediated signaling / Neurogenesis	Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling

Taula 3.10.e. Gens regulats únicament en el teixit infartat 30 dies posttractament.

Gene name	UniGene (S. Scrofa)	logFC (mean)	Molecular function	Biological process	Pathway
ANK3	Ssc.13587.1.A1_at	-1.39	Cytoskeletal protein	Cell structure	Unclassified
CCK	Ssc.717.1.S1_at	-2.59	Peptide hormone	Ligand-mediated signaling / Muscle contraction	Cholecystokinin/gastrin-mediated Signaling
CD163	Ssc.11991.1.A1_at	1.51	Receptor	Phagocytosis / Macrophage-mediated immunity	Unclassified
CDH2	Ssc.22271.1.A1_at	-1.07	Cadherin	Cell adhesion-mediated protein / Cell adhesion	Wnt signaling / Cadherin signaling
CPT1B	Ssc.15966.1.S1_at	-1.34	Acetyltransferase / Acyltransferase	Amino acid metabolism / Fatty acid metabolism	Muscarinic acetylcholine receptor 2 and 4 signaling / Mitochondrial dysfunction
FABP3	Ssc.4360.1.A1_at	-1.52	Transfer/carrier protein	Lipid and fatty acid transport and binding / Steroid hormone-mediated signaling / Ectoderm development	LPS/IL-1 mediated inhibition of RXR function
GAPDH	AFFX-Ssc-gapdh-5_at	-1.06	Unclassified	Unclassified	Glycolysis/ gluconeogenesis / Maturity onset diabetes of young (MODY) signaling
GOT1	Ssc.3528.1.S1_at	-1.19	Transaminase	Amino acid metabolism	Asparagine and aspartate biosynthesis / Tyrosine biosynthesis / Phenylalanine biosynthesis
HLA-DRB4	Ssc.210.7.S1_x_at	1.59	Major histocompatibility complex antigen	MHCII-mediated immunity	Antigen presentation pathway / Communication between innate and adaptative immune cells
IFIT3	Ssc.31140.1.S1_at	-1.13	Miscellaneous function	Interferon-mediated immunity	Interferon signaling
ISG15	Ssc.11557.1.A1_at	-1.74	Ribosomal protein	Proteolysis	Activation of IRF by cytosolic pattern recognition receptors
LPL	Ssc.1147.2.S1_at	-1.11	Lipase	Lipid and fatty acid transport / Transport	2-Arachidonoylglycerol biosynthesis
MT3	Ssc.15694.1.S1_at	-1.00	Unclassified	Unclassified	Unclassified
PRKAA2	Ssc.16257.1.S1_at	-1.25	Non-receptor serine/threonine protein kinase	Gluconeogenesis / Protein phosphorylation / Stress response	P53 pathway by glucose deprivation > AMP-activated protein kinase

RYR2	Ssc.16180.1.S1_at	-1.62	Ligand-gated ion channel / Cation transport / Muscle contraction	Calcium mediated signaling / Cation transport / Muscle contraction	Beta2 adrenergic receptor signaling / Beta1 adrenergic receptor signaling
TNNI3	Ssc.2589.1.S1_at	-1.17	Non-motor actin binding protein	Muscle contraction / Muscle development	Calcium signaling / Protein kinase A signaling
TNNT2	Ssc.19141.1.S1_at	-1.23	Actin binding motor protein	Muscle contraction	Calcium signaling
TPM1	Ssc.13956.2.S1_a_at	-1.26	Actin binding motor protein	Muscle contraction / Muscle development / Cell structure / Cell motility	Calcium signaling

4. Transposició d'un pedicle adipós d'origen pericardíac sobre l'ICM en el model porcí

4.1. Supervivència del model d'ICM

Tots els animals utilitzats en aquest estudi (20) van superar la fase d'inducció d'IM i van arribar a terme en l'estudi. Així doncs, el model porcí d'ICM per implantació de *coil* coronari a nivell marginal presentat en aquest estudi ha tingut un 100% de supervivència. Tot i així, 4 van ser exclosos per diferents motius: un va presentar comunicació (shunt) arteriovenosa a nivell coronari, 2 van ser exclosos per tenir una artèria marginal de baix diàmetre que va donar lloc a un infart difícilment detectable i un va necessitar la implantació de 2 *coils* per assolir l'oclusió coronària.

Per poder determinar que tots els animals de l'estudi havien patit un IM d'iguals dimensions es van extraure mostres sanguínies a nivell basal i 2 hores postinfart. No es van trobar diferències entre els animals controls i tractats en els nivells circulants de cTnI ni mioglobina ($0.05 \pm 0.03 \mu\text{g/L}$ vs. $0.16 \pm 0.06 \mu\text{g/L}$, $P=0.12$; i $34.2 \pm 2.78 \mu\text{g/L}$ vs. $48.0 \pm 9.42 \mu\text{g/L}$, $P=0.16$, respectivament).

4.2. Tractament quirúrgic de la transposició del pedicle adipós pericardíac en l'ICM

Transcorreguts 15 dies després de la inducció de l'IM, els animals van ser sotmesos a la nova tècnica quirúrgica consistent en la transposició del pedicle adipós pericardíac sobre la superfície isquèmica crònica. Els animals pertanyents al grup control van ser intervinguts sota les mateixes condicions tot i que el pedicle va ser escindit.

La intervenció quirúrgica es va dur a terme amb el protocol de sedació, anestèsia i analgèsia anteriorment descrit. Els animals van ser sotmesos a una toracotomia lateral esquerra en el quart espai intercostal per poder accedir al cor i detectar la localització de l'IM. Prèviament, tal com ja s'havia realitzat en el model agut, es va procedir a la creació del pedicle adipós pericardíac sense lesionar l'aportament sanguini propi per garantir la seva viabilitat. El pedicle resultant es va reservar i

seguidament es va identificar la lesió miocardiaca que va ser coberta completament en tots els casos pel pedicle adipós adherit als marges sans amb cola tissular (veure apartat 3.2.2. de la secció de Resultats). En els animals control es va extraure el pedicle per a l'estudi *in vitro*.

4.3. Supervivència i viabilitat del nou tractament quirúrgic

Tal com ja havia quedat demostrat en el model agut d'IM, durant les intervencions dels animals del model d'ICM no es van detectar arítmies atrials ni ventriculars. Cal destacar que cap animal va morir per l'aplicació de la nova tècnica quirúrgica presentada en aquest estudi. Així doncs, podem afirmar que aquest mètode ofereix un 100% en la supervivència dels individus.

Addicionalment, es va poder constatar que en el moment del sacrifici tots els animals del grup tractament tenien perfectament adherit el pedicle adipós pericardiàc a la superfície miocardiaca infartada.

4.4. Anàlisi de la funció ventricular amb RM cardíaca

Per a l'anàlisi de la funció ventricular es van incloure 8 animals control i 8 tractats. A tots els individus es va realitzar una mesura basal, una segona 15 dies després de la inducció de l'infart i la darrera transcorreguts 30 dies després de l'aplicació del tractament, abans del sacrifici. Inicialment es va comparar la FEVE, VS i VD entre els dos grups a temps basal i seguidament a la inducció de l'infart.

Inicialment es va fer una anàlisi dels valors basals i 15 dies de la inducció de l'infart, abans de l'aplicació del tractament, per comprovar que no hi havia diferències entre grups. Cap de les variables d'estudi va mostrar diferències entre els animals controls i tractats (Taula 4.4.a).

	Basal			15d Postinfart		
	Controls	Tractats	P valor	Controls	Tractats	P valor
VS (ml)	25.6±1.4	25.02±1.2	0.74	25.07±2.20	27±2.5	0.57
VD (ml)	48.9±1.9	45.19±1.9	0.19	47.73±2.8	48.3±2.9	0.89
FEVE (%)	47.3±2.7	44.4±2.1	0.41	47.8±2.7	44.7±2.8	0.44

Taula 4.4.a. Valors finals dels volums sistòlics (VS) i diastòlics (VD) i de la fracció d'ejecció (FEVE) a temps basal i 15 dies postinfart. Comparativa dels dos temps d'anàlisi dintre de cada grup d'estudi amb el P valor resultant (t-Student).

Seguidament es va fer l'anàlisi de l'evolució de la funció ventricular des dels 15 dies postinfart de miocardi fins a 45 dies (30 dies de tractament) entre els dos grups. Inicialment es va realitzar una prova t-Student comparant els dos temps d'anàlisi a cada grup d'estudi i com a resultat es va poder constatar que, tant en els controls com en els tractats, el volum diastòlic augmentava significativament ($P=0.001$ i $P=0.006$, respectivament) donant lloc a remodelat ventricular. Quant a l'anàlisi de les mesures repetides en el temps comparant els dos grups d'estudi, no es van establir diferències significatives intragrups en cap de les variables de l'estudi funcional.

4.5. Anàlisi morfomètrica

L'anàlisi morfomètrica es va obtenir mesurant l'àrea que ocupava l'IM respecte el ventricle esquerre. Mitjançant aquesta mesura es va poder concloure que els animals del grup tractament tenien un IM menor significativament respecte els controls. Al sacrifici la mida de l'infart dels animals tractats era del $5.9\pm 0.6\%$ vs. el $8.7\pm 1.1\%$ que representava el grup control, i la diferència va resultar ser estadísticament significativa amb una $P=0.039$ (Figura 4.5.).

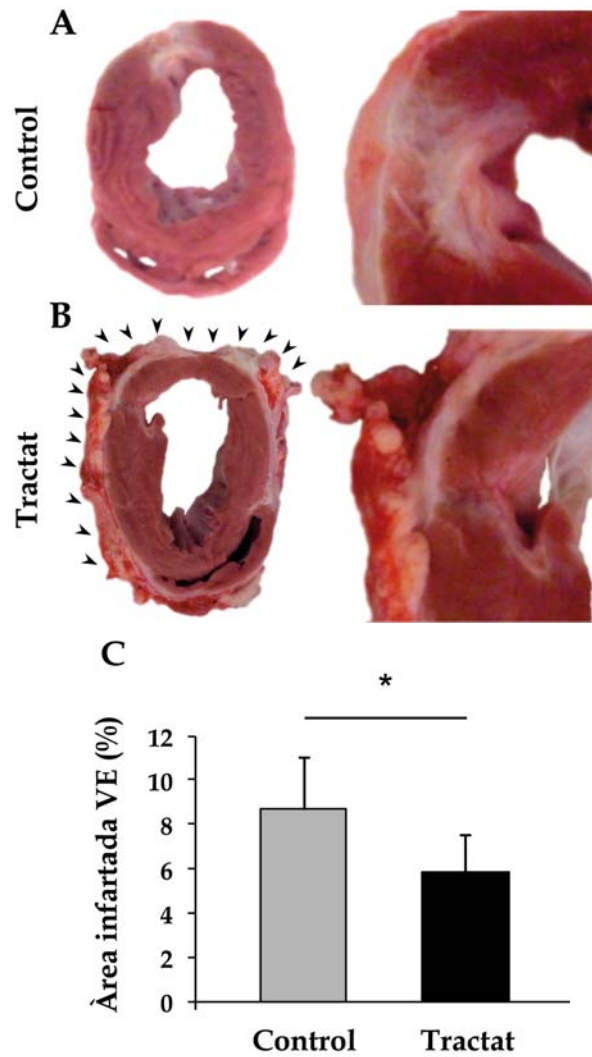


Figura 4.5. Anàlisi morfomètrica del model crònic. (A i B) imatges representatives de seccions cardíaques d'animals control i tractat. A l'animal tractat queda indicat el pedicle adipós d'origen pericardíac adherit a la superfície miocardiàca (fletxes). (C) Mesura del percentatge de l'àrea infartada de ventricle esquerre (VE). * $p=0.039$ comparat amb el grup control.

L'anàlisi macroscòpica de les seccions cardíaques va permetre comprovar que la necrosi incloïa gairebé la totalitat del gruix de la paret ventricular en tots els casos i que, tant en els animals control com en els

tractats, hi havia dipòsits de calci com a signe clar de cicatriu miocardiàica crònica.

4.6. Fibrosi cicatricial i contingut de col·lagen

4.6.1. Fibrosi cicatricial

Mitjançant la tinció histològica tricròmica de Masson es va poder realitzar una anàlisi descriptiva de les característiques de l'àrea corresponent a l'IM i compararla entre grups. Com a resultat es va poder comprovar que en el miocardi infartat dels porcs tractats hi havien abundants illots de fibres musculars intactes (Figura 4.6.1.).

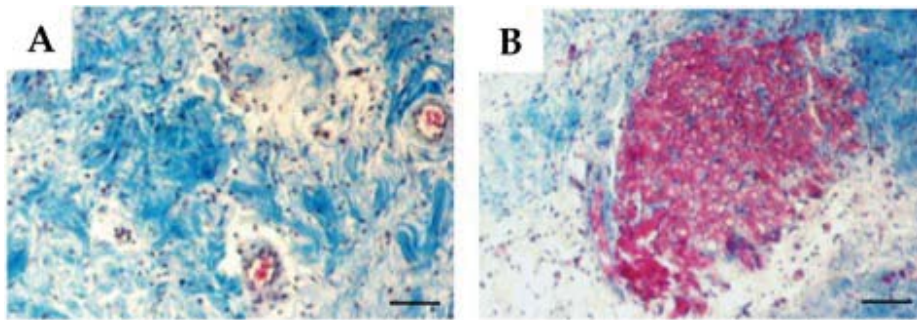


Figura 4.6.1. Tinció histològica tricròmica de Masson del model crònic. (A i B) Seccions histològiques representatives de l'àrea d'infart d'un animal del grup control (A) i un de tractat (B). (barra d'escala = 50 μ m).

4.6.2. Contingut de col·lagen

El contingut de col·lagen es va estudiar tant a la zona d'infart com a la zona miocardiàica distal 30 dies després de la transposició del pedicle adipós. Transcorregut aquest període, el CTC no va mostrar diferències significatives entre els controls i els tractats ni a la zona d'infart (33.0 ± 2.5 vs. 34.1 ± 1.9 respectivament; $P=0.75$) ni a la zona distal (1.8 ± 0.3 vs. 2.5 ± 0.6 respectivament; $P=0.30$). Tampoc es van detectar diferències pel que fa a l'anàlisi del col·lagen tipus I, tipus III ni la ràtio I/III entre grups a cada zona (Taula 4.6.2.).

	Zona infart			Zona distal		
	Controls	Tractats	P valor	Controls	Tractats	P valor
Ratio I/III	10.1±6.3	5.4±0.9	0.48	0.8±0.2	0.6±0.2	0.51
Col·lagen I	20.7±4.1	27.7±1.7	0.19	0.7±0.1	0.8±0.2	0.67
Col·lagen III	12.2±3.8	6.4±1.1	0.22	1.1±0.2	1.7±0.5	0.34

Taula 4.6.2. Valors resultants de l'anàlisi del contingut de col·lagen en les diferents zones d'estudi. Comparativa entre els dos grups d'estudi tant a la zona d'infart com a la zona distal amb el P valor resultant (t-Student).

4.7. Connexions vasculars entre el pedicle pericardíac i el miocardi infartat

Tal com ja estava descrit en el model agut d'IM, es va voler determinar si també hi havia l'existència de connexions vasculars entre el pedicle adipós i l'IM. Per aquest motiu es va realitzar un estudi immunohistoquímic contra Isolectina B4, cTnI i Hoechst 33342 de la zona que incloïa la interfase pedicle-miocardi. Com a resultat es va poder corroborar que també hi havia presència de vasos Isolectina B4 positius que comunicaven els dos teixits travessant el límit del pedicle i endinsant-se a l'espessor del miocardi (Figura 4.7.).

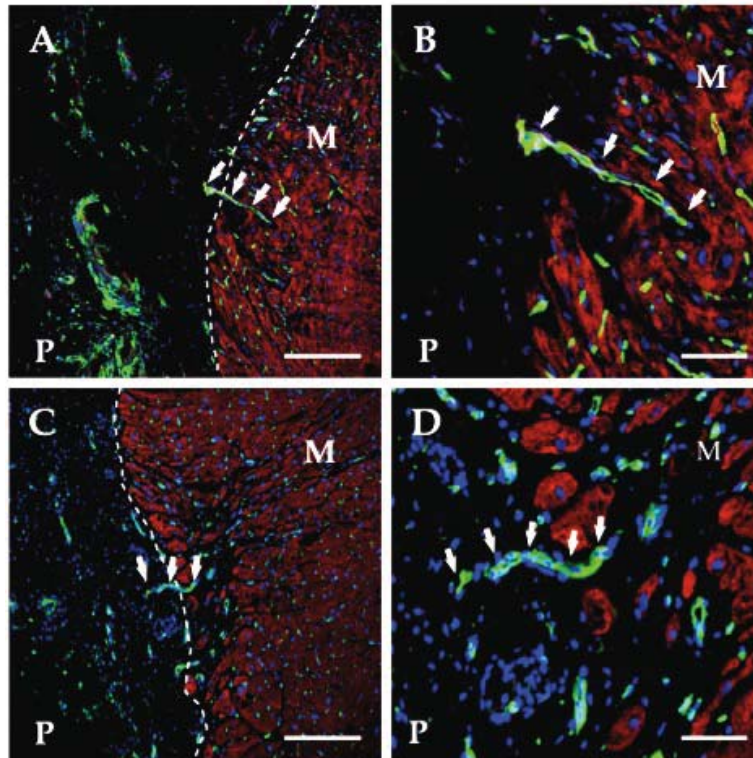


Figura 4.7. Connexions vasculars entre el pedicle adipós i el miocardi isquèmic crònic de 30 dies d'evolució. (A-D) Tinció immunohistoquímica contra cTnI (vermell) amb Isolectina B4 (verd) i tinció nuclear amb Hoechst 33342 (blau) marcant els vasos sanguinis (fletxes) en el límit (línia discontinua) entre el pedicle adipós (P) i el miocardi (M) (barra d'escala=50µm). (B i D) Imatges amb zoom (630X) de les fotografies prèviament descrites on es pot observar clarament el recorregut del vas sanguini (barra d'escala = 10 µm).

4.8. Àrea vascular miocardiàica i del pedicle adipós

Degut a la presència de connexions vasculars, es va estudiar si podien existir diferències de vascularització entre grups en el miocardi infartat, a la zona periinfart i distal. Per aquest motiu es va fer una anàlisi immunohistoquímica amb talls histològics de les zones esmentades anteriorment amb incubació amb Isolectina B4 i Hoechst 33342. Com a resultat es va determinar que no hi havia diferències significatives entre controls i tractats ni en la zona de l'infart (0.08 ± 0.02 vs. 0.09 ± 0.07 respectivament; $P=0.22$), ni a la zona periinfart (0.27 ± 0.07 vs. 0.23 ± 0.07 respectivament; $P=0.73$) ni distalment (0.30 ± 0.11 vs. 0.34 ± 0.06 respectivament; $P=0.75$) (Figura 4.8.1).

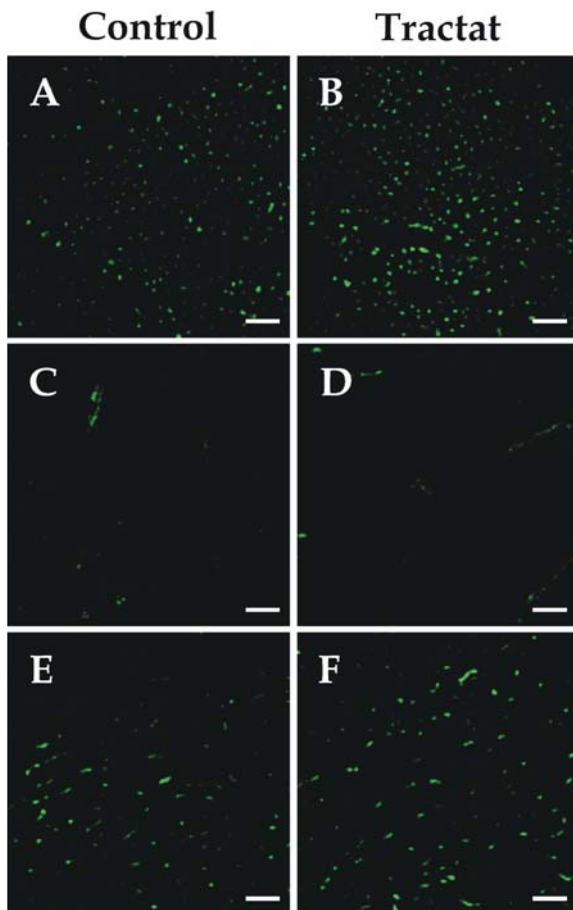


Figura 4.8.1. Àrea vascular miocardiàica del model crònic. (A-F) Tinció immunohistoquímica contra Isolectina B4 (**verd**) marcant els vasos sanguinis del miocardi distal (A i B), zona d'infart (C i D) i zona periinfart (E i F) en el grup control i tractat (barra d'escala = 20 μ m).

Pel que fa a l'estudi de la vascularització del pedicle adipós, es va analitzar per poder valorar si hi havien diferències entre la zona adjacent a l'IM i la zona que estava adherida als marges de miocardi sa. Els resultats de l'anàlisi van mostrar que no hi havia diferència entre ambdues zones (0.09 ± 0.09 vs. 0.07 ± 0.03 respectivament; $P=0.83$) (Figura 4.8.2.), tal com ja s'havia descrit en el model agut a 30 dies de seguiment.

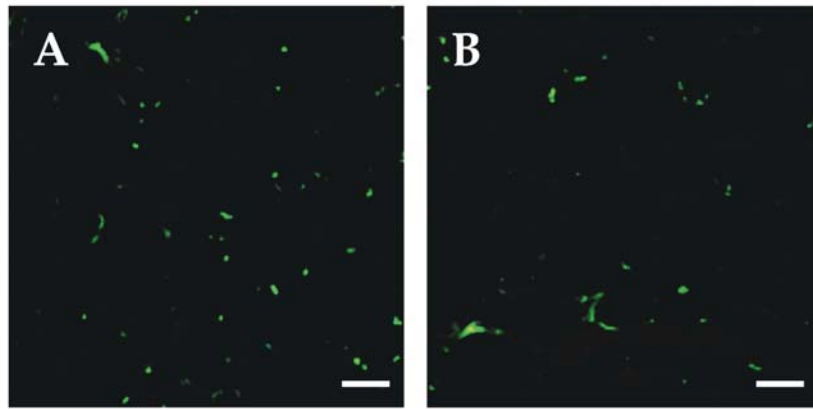


Figura 4.8.2. Àrea vascular del pedicle adipós pericardíac en el model crònic d'infart. (A-B) Seccions representatives de la tinció immunohistoquímica contra Isolectina B4 (**verd**) marcant els vasos sanguinis del pedicle en contacte amb el miocardi isquèmic (A) i el pedicle adherit als marges sans del miocardi (B) (barra d'escala = 20 μ m).

4.9. Anàlisi de proliferació cel·lular i endotelial

Mitjançant l'expressió de la proteïna nuclear Ki67 pròpia de les cèl·lules en proliferació, es va fer un estudi de proliferació cel·lular a la cicatriu cardíaca dels animals després de 30 dies de l'aplicació del tractament terapèutic. Addicionalment, es va valorar si hi havia diferències entre els individus tractats i els controls a nivell de proliferació de cèl·lules endotelials. Tot i que no s'havien trobat diferències a nivell de densitat vascular si que s'havien localitzat connexions vasculars entre el pedicle implantat i el miocardi isquèmic. Aquesta troballa va ser la raó de fer un estudi més profund i valorar si afectava a la proliferació endotelial dins la cicatriu crònica.

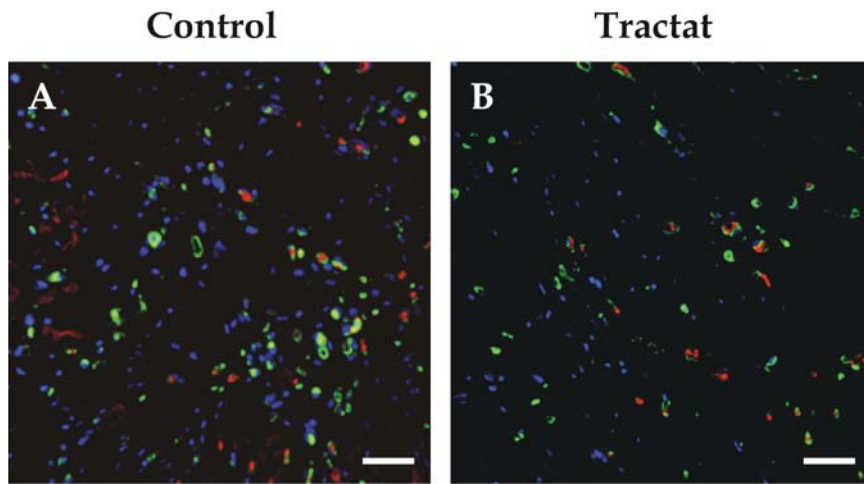


Figura 4.9. Imatges representatives de la zona d'infart d'un animal control (A) i un tractat (B) on es detecta el marcatge d'Isolectina B4 (verd), Ki67 (vermell) i nuclis (blau) (barra d'escala = 20 μ m).

Es van analitzar 4 animals de cada grup i com a resultat no van haver diferències significatives entre els animals tractats i controls ni en el nombre total de cèl·lules proliferatives (9.13 ± 2.25 *vs.* 6.94 ± 3.56 , respectivament) ni de cèl·lules endotelials en proliferació (5.69 ± 2.41 *vs.* 4.38 ± 2.63 , respectivament) (Figura 4.9.).

Discussió

1. Estudi dels patrons temporals d'expressió gènica de l'IM

En el present estudi s'han utilitzat els *microarrays* d'ADNc per avaluar les alteracions en l'expressió gènica en el context de l'IM per donar a conèixer les bases moleculars subjacents d'aquesta patologia. Més de 8000 seqüències d'ADNc diferents, corresponents a 6124 gens únics de la HGNC, han mostrat alteració en la seva expressió gènica en el miocardi remodelat. Els patrons d'agrupament amb expressió gènica similar amb funcions relacionades han revelat l'existència d'empremtes moleculars dels processos biològics associats amb l'IM.

L'expressió gènica ha estat analitzada en 3 punts temporals (6, 30 i 45 dies) després de la inducció de l'IM. La naturalesa i extensió de l'expressió gènica ha variat amb el temps. Quan l'oclusió coronària té una durada de 24 hores a varies setmanes, el miocardi lesionat respon amb una major expressió de gens relacionats amb l'apoptosi, la producció de matriu extracel·lular i la disminució de l'expressió dels gens relacionats amb la producció energètica (Sehl *et al.* 2000; Stanton *et al.* 2000; Jin *et al.* 2001; Lyn *et al.* 2000).

Amb aquest anàlisi ha estat possible identificar 22 gens proapoptòtics que estaven sobreexpressats i 22 antiapoptòtics que han quedat inhibits en tots els temps d'estudi.

Addicionalment, en aquest anàlisi d'expressió gènica també ha quedat inclòs el miocardi distal (septe interventricular) per valorar si patia alteracions gèniques davant d'un IM localitzat i com a eina comparativa amb el propi miocardi lesionat. Aquest darrer punt s'ha basat en dades de *microarray* prèviament publicades, les quals van identificar una regió específica d'expressió gènica comparant la paret lliure del ventricle esquerre amb el septe interventricular (Tschope *et al.* 2000; Sandmann *et al.* 2001; Chugh *et al.* 2003). Els resultats derivats del present estudi realitzat en el model porcí d'IM confirmen l'existència d'una marcada alteració gènica en el teixit infartat respecte el miocardi distal. Tot i així, cal destacar que també ha estat detectada una alteració en el miocardi distal respecte el miocardi amb condició fisiològica (animals sans).

És àmpliament conegut que les dades d'expressió, p.e. nivell de mRNA, pot ser que no reflecteixin amb precisió els nivells de proteïna donat que pot tenir lloc el control de translació i transducció post-processament (Peterson *et al.* 2000). A més, cal tenir en comte que l'expressió proteica no sempre té una conseqüència fisiològica o patològica. No obstant, l'ús de *microarrays* facilita l'exploració sistemàtica de l'expressió de gens a gran escala i proporciona una àmplia informació referent a la fisiologia i patologia cardíaca.

Amb els resultats obtinguts i prèviament publicats (Lawrence *et al.* 2000) cal destacar que les comparacions dels canvis d'expressió gènica entre diferents models haurien de contribuir a una major comprensió de la relació entre els gens i les malalties. Els estudis centrats en el descobriment de les vies de resposta específica, la identificació de factors afavoridors de l'activació de factors de protecció genètica en els cardiomiòcits i els factors de regulació negativa de lesions relacionades amb els gens, han d'ésser una prioritat en el desenvolupament de noves estratègies terapèutiques per a superar les conseqüències perjudicials d'un esdeveniment isquèmic.

2. Anàlisi de la pluripotencialitat de les cèl·lules progenitores derivades de teixit adipós d'origen pericardíac

Al 2010 el nostre grup de recerca va descriure l'existència d'una nova població de cèl·lules humanes d'origen mesenquimal en el teixit adipós (ATDPCs) epicardíac, situat a la base del cor (Bayes-Genis *et al.* 2010). Aquestes cèl·lules van mostrar *in vitro*, sota condicions d'hipòxia, l'expressió de factors proangiogènics (VEGF, TNF- α , bFGF i IL6) i van formar estructures tubulars quan es cultivaven amb medi de diferenciació endotelial. Mitjançant citometria de flux es determinar que les epiATDPCs presentaven un patró de marcadors de superfície similar al de les cèl·lules mesenquimals. També es va comprovar que a nivell basal les epiATDPCs tenien major expressió de marcadors cardíacs, tant a nivell d'ARN (Cx43, GATA4, α -actinina sarcomèrica i SERCA2) com de proteïna (β -MHC, SERCA2, α -actinina sarcomèrica, GATA4, Cx43 i Tbx5), respecte les ATDPCs d'origen subcutani. D'altra banda, quan aquestes cèl·lules van ser trasplantades en un model murí d'IAM es va observar una millora de la funció ventricular i, a més, preservaven el gruix de la paret ventricular isquèmica. Addicionalment, l'administració d'aquest nou tipus cel·lular va augmentar el nombre de vasos a nivell de la cicatriu cardíaca.

A partir d'aquests resultats publicats, com a segon objectiu de l'estudi experimental d'aquesta Tesi es va basar en la cerca d'una nova població mesenquimal en el greix d'origen pericardíac i comparar-la amb la població de les epiATDPCs en el model porcí. L'execució d'aquest objectiu era fonamental per a valorar si el teixit adipós d'origen pericardíac podia ésser un bon candidat per a la transposició del teixit en forma de pedicle vascularitzat per a valorar el possible efecte beneficiós sobre la cicatriu miocardiaca.

Els resultats obtinguts de l'anàlisi de diferenciació cap als llinatges adipós, ossi i cartilaginós van demostrar que tant les cèl·lules d'origen epicardíac com pericardíac no presentaven la capacitat de diferenciació adipogènica però sí es diferenciaven cap a osteòcits i condrocits. Pel que fa a la caracterització fenotípica, els dos tipus cel·lulars expressaven els mateixos marcadors de superfície que corresponen al patró de marcadors de cèl·lules mesenquimals. Les

cèl·lules eren positives per CD29, CD44, CD90 i CD105, mentre que no expressaven CD14, CD34, CD45 ni CD106. Aquest patró va coincidir amb el patró d'expressió descrit anteriorment en les ATDPCs humanes (Bayes-Genis *et al.* 2010).

Donada l'existència de cèl·lules d'origen mesenquimal en el teixit adipós pericardíac es va considerar a aquest teixit com a bon candidat per a la transposició del teixit en forma de pedicle vascularitzat, per a procedir a l'experimentació *in vivo* en el model porcí i valorar si la transposició d'aquest greix pericardíac sobre la cicatriu d'infart podria generar beneficis terapèutics.

3. Transposició d'un pedicle adipós d'origen pericardíac sobre l'IAM

En aquest tercer estudi s'ha examinat l'efecte d'un pedicle adipós pericardíac transposat sobre la superfície miocardiàca isquèmica en el model porcí. Els resultats obtinguts han mostrat que el pedicle, aïllat de la superfície pericardíaca, causa efectes beneficiosos sobre la funció cardíaca.

Aquests efectes poden ser explicats com a mínim per tres mecanismes diferents: primer, els volums ventriculars van resultar menors en els animals tractats degut principalment a la reducció de la cicatriu de l'IM per part del pedicle i pels seus efectes directes en la matriu extracel·lular del col·lagen del cor. Segon, l'existència de connexions vasculars entre el pedicle transposat i el miocardi infartat. Tercer, menor índex d'apoptosi cel·lular en la zona periinfart dels animals tractats que facilita major supervivència miocardiàca.

Les tècniques actuals emprades per preservar el miocardi infartat estan basades en la revascularització de les artèries coronàries epicardiàques afectades (Favaloro. 1968; Grüntzig. 1978). Malgrat l'existència d'aquests procediments terapèutics, el mal pronòstic del xoc cardiogènic resultant de l'IAM segueix sent un repte important per als cardíologs i cirurgians cardiovasculars (Hochman *et al.* 1999; Goldberg *et al.* 1999) sobretot en pacients en els que cap de les artèries patents estan disponibles per a la seva revascularització (Antman *et al.* 2004; Giugliano *et al.* 2003).

Al llarg dels anys hi ha hagut diferents esforços per revascularitzar el miocardi isquèmic, incloent la simple inserció de l'artèria mamària interna en un forat fet prèviament en el miocardi anòxic (Unger *et al.* 1990) o en una perforació transmiodiàca amb làser per permetre la perfusió miocardiàca, imitant els sinusoides propis dels cors dels rèptils (Stone *et al.* 2002). Desafortunadament, aquests dos mètodes van ser poc exitosos i només eren aplicables en una selecció de pacients amb patologies molt particulars.

La revascularització dels òrgans alterats mitjançant empelts vasculars ha estat duta a terme de manera més eficaç (Rocha *et al.* 2007; Motegi *et al.* 2007). Basant-nos en aquests estudis previs, la investigació

mostrada en aquest projecte ha demostrat el desenvolupament de nous vasos que comuniquen el pedicle vascularitzat amb el miocardi infartat. Curiosament, en els animals pertanyents al grup *sham* aquestes connexions no van ser localitzades i per tant, aquesta troballa demostra que el dany tissular i la hipòxia miocardiaca exerceixen un gran estímul per a la formació de vascularització col·lateral.

Anteriorment ja havien quedat ben descrites les diferents fases de la nova formació de vasos (Folkman *et al.* 1987). Amb la transposició del pedicle adipós als 6 dies d'evolució de l'IM ja es detectaven microvasos de nova formació. Varis estudis suggereixen que la invasió de nous vasos sanguinis dintre de diferents tipus de teixits té lloc entre el dies 2 i 7 (Morgan *et al.* 1982; Pevec *et al.* 1996) i per tant, el cronograma de l'angiogènesi d'aquest estudi corrobora l'existència de les comunicacions vasculares que apareixen en el model presentat en aquest projecte. Aquesta nova vascularització col·lateral pot millorar la tensió local d'oxigen en el límit entre el pedicle i el miocardi i per tant, disminuir la hipòxia tissular generada per l'IM.

D'altra banda, hi ha altres estudis que demostren l'aparició de cardiomiòcits apoptòtics en mostres miocardiàques de pacients que havien mort després un IAM. Aquest patró apoptòtic principalment apareix en les zones de periinfart (Saraste *et al.* 1997; Veinot *et al.* 1997). En el present estudi s'ha aportat més evidències demostrant que la transposició del pedicle adipós pericardiàc millora els paràmetres de funció cardíaca, particularment la fracció d'ejecció, i disminueix significativament la mida de l'infart. Aquestes troballes en el grup d'animals tractats poden ser explicades per la reducció de la mort cel·lular en el miocardi isquèmic, com ha quedat demostrat en el grup d'animals d'IAM sacrificats als 6 dies d'evolució.

Molts estudis han demostrat que el teixit adipós perivascular i d'origen miocardiàc es comporta com una font d'hormones conegudes, les quals generen efectes autocrins, paracrins i endocrins importants (Ahima *et al.* 2000). Aquestes hormones podrien participar en el benefici inicial del pedicle, tot i que en aquest estudi no hem pogut obtenir mostres del dia a dia per a confirmar aquesta hipòtesi. Hi ha estudis que descriuen que les hormones derivades del teixit adipós poden oferir efectes cardioprotectors contra la isquèmia, incloent l'atenuació de l'apoptosi dels cardiomiòcits, disminució de la mida de l'infart i la modulació de la ràtio I/III de col·lagen (Sweeney. 2010).

Usant la llum polaritzada s'ha pogut detectar canvis en l'organització estructural del col·lagen durant la maduració de la cicatriu. Les dades del col·lagen tipus I i III en la cicatriu és consistent amb altres treballs descriptius del procés de cicatrizació (Whittaker *et al.* 1989).

L'increment de la quantitat de col·lagen tipus III és propi del procés de cicatrizació, i la presència de fibres tipus III és un fet important per a la disminució subseqüent de les fibres tipus I. Als animals del grup tractament s'han identificat major nombre de fibres III a dia 6 d'evolució. El mecanisme pel qual el pedicle adipós modula la maduració de la cicatriu encara resta incògnit; tot i que la modulació de la matriu col·làgena pot tenir implicacions importants sobre el benefici observat mitjançant la transposició pedicular. El remodelat ventricular després d'un infart es caracteritza per un canvi en la proporció dels col·làgens tipus I i III, amb un increment en la ràtio I/III (Marijanski *et al.* 1995). El col·lagen tipus III proporciona una estructura idònia per l'alineació de les fibres tipus I, essencials per mantenir la forma i contribuir a la rigidesa passiva i activa del miocardi (Weber. 1989) limitant el remodelat dels ventricles. De fet, als experiments presentats en aquest treball, s'ha detectat menor remodelat i menys retenció de contrast de gadolini en els animals tractats.

La revascularització arterial coronària és el tractament més efectiu després d'un IM, i tota la resta de procediments per preservar el miocardi, incloent la present intervenció quirúrgica, han de ser considerats quan la revascularització (per via percutània o quirúrgica) no és possible. El gran inconvenient de la intervenció de la transposició del pedicle adipós, en termes d'aplicabilitat clínica potencial, és la necessitat de realitzar una toracotomia per accedir al cor. Per tant, seria convenient l'ús de la toracoscòpia per a garantir una cirurgia de mínima invasió.

En conclusió, la transposició d'un pedicle adipós d'origen pericardíac ofereix efectes beneficiosos sobre la funció cardíaca després de l'IAM en el model porcí. L'aplicació del pedicle vascularitzat limita el remodelat ventricular donat la reducció de la mida de la cicatriu cardíaca mediat per un major aportació sanguínia. Malgrat no s'ha observat ni esperat la recuperació completa de la disfunció miocardiaca després de la transposició pedicular, aquest estudi pot ser emprat com a prova de principi mitjançant l'aplicació d'un pedicle vascularitzat per a preservar el múscul cardíac en el marc de l'IM.

4. Transposició d'un pedicle adipós d'origen pericardíac sobre l'ICM

Aquest quart estudi fa referència als resultats obtinguts de la transposició d'un pedicle adipós vascularitzat d'origen pericardíac sobre la cicatriu resultant d'un ICM. Les dades obtingudes de l'anàlisi histològica mostren que la transposició de dit pedicle ofereix efectes beneficiosos en l'ICM reduint la mida de l'infart. Tanmateix, també han pogut identificar-se la presència de connexions vasculars entre el pedicle adipós transposat i el miocardi infartat.

Els mecanismes que podrien explicar aquests efectes són poc coneguts i podrien ser de caràcter multifactorial. Primerament, aquesta vascularització colateral de nova formació pot millorar la tensió local d'oxigen en el límit entre el miocardi infartat i el pedicle adipós i, per tant, reduir la hipòxia tissular existent. En segon lloc, sabent que el teixit adipós es comporta com una font molt rica en cèl·lules progenitores, aquestes podrien migrar des del greix fins el miocardi. De fet, hi ha moltes evidències de que el teixit adipós és un reservori de cèl·lules progenitores i, particularment, d'aquelles que tenen caràcter mesenquimal (Zuk *et al.* 2002; Dicker *et al.* 2005; Izadpanah *et al.* 2006). A més, recentment dins el greix cardíac han estat identificats diferents subtipus de cèl·lules progenitores caracteritzades per tenir un fenotip cardíac capaces de diferenciar-se *in vitro* en cèl·lules miocardiàques i endotelials, però no en adipòcits (Bayes-Genis *et al.* 2010). Quan aquests progenitors cardíacs són trasplantats en el miocardi isquèmic en models de rata i ratolí d'IM, les cèl·lules injectades expressen marcadors cardíacs (troponina I, α -actinina sarcomèrica) i endotelials (CD31), hi ha un increment de la vascularització i la mida de l'infart es redueix en ambdós models.

En aquest estudi ha estat impossible marcar i seguir les cèl·lules del pedicle adipós donat que es tracta d'un flap connectat a nivell vascular amb el miocardi i no pot ésser explantat. Addicionalment, tampoc s'ha pogut demostrar l'existència de regeneració cardíaca, tot i així s'ha detectat una reducció de la mida de l'infart de manera significativa. Com que les adipocines alliberades pel pedicle adipós tenen efectes positius a nivell local és possible que aquest efecte pugui considerar-se com un mecanisme alternatiu als anteriorment esmentats. Molts estudis ha descrit que el teixit adipós perivascular i el miocardi es

comporten com a fonts hormonals, les quals poden garantir efectes endocrins, paracrins i autocrins (Ahima *et al.* 2000). Aquestes hormones podrien participar en l'efecte beneficiós que aporta el pedicle adipós, tot i que en aquest treball no s'ha pogut determinar donat la impossibilitat d'obtenir mostres dia rere dia per confirmar aquests efectes. No obstant això, hi ha gran evidència que les hormones secretades pel teixit adipós poden tenir efectes cardioprotectors contra la isquèmia, incloent l'atenuació de l'apoptosi dels cardiomiòcits, la reducció de la mida de l'infart i la modulació de la ràtio de col·lagen I/III (Sweeney. 2010).

La revascularització terapèutica ofereix una gran promesa per al tractament de la isquèmia miocardiaca. El VEGF, PLGF i altres factors de creixement en models animals han mostrat resultats satisfactoris en el camp de la revascularització. Malgrat tot, no estan exempts de reaccions adverses (formació d'edema, hipotensió, estimulació de cèl·lules tumorals latents) i el benefici obtingut en els estudis clínics ha estat bastant modest (Loges *et al.* 2009; Maulik *et al.* 2008). Per aquest motiu, teràpies alternatives com la transposició d'un pedicle adipós han de ser avaluades per verificar la seva utilitat. Si resultés d'aquesta manera, el seu pas a la pràctica clínica podria donar-se relativament ràpid, doncs la intervenció tècnicament és simple, no requereix cap material addicional ni cap despesa econòmica important i no comporta cap consideració ètica ni social que pugui rebutjar el seu ús. De fet, als inicis dels 40, Beck i els seus col·legues, en la recerca de teràpies alternatives per tractar la malaltia isquèmica cardíaca, van proposar nombrosos teixits disponibles a la cavitat toràcica, com el pericardi, el greix mediastínic i la paret toràcica per a revascularitzar el miocardi. En tots els casos es van observar comunicacions extracoronàries produïdes pels empelts tissulars cap al miocardi (Beck. 1943).

A nivell funcional no s'han trobat beneficis significatius entre els animals tractats i els controls. Davant d'aquest resultat, s'han considerat tres possibles explicacions per la manca del benefici funcional. Primerament, l'infart induït per la implantació del *coil* en la branca marginal de l'artèria coronària circumflexa era relativament petit i per tant els canvis en el pla funcional han resultat molt poc notables per a poder valorar millories significatives. De fet, no s'han detectat arítmies ni esdeveniments letals en aquesta sèrie d'estudi. En segon lloc, per detectar canvis substancials s'hauria de realitzar aquesta nova teràpia en una població més nombrosa. La RM cardíaca s'ha convertit en la tècnica estàndard per avaluar la funció i els volums cardíacs degut a la seva gran

reproductibilitat. Aquesta tècnica permet, en comparació amb l'ecocardiografia, una reducció considerable al número d'animals necessaris per provar una hipòtesi en la recerca de canvis en els paràmetres de remodelat ventricular (Bellenger *et al.* 2000). Finalment, no podem excloure canvis funcionals a nivell local donat que la contractilitat regional no ha pogut ser avaluada.

Com a conclusió, el pedicle adipós pericardíac aplicat a la superfície isquèmica crònica en el model porcí redueix la mida de l'IM i actua com a suport vascular pel miocardi necròtic. Tot i que no s'observa ni s'espera una recuperació completa de la disfunció cardíaca després de la transposició pedicular, aquest estudi pot ser efectiu com a prova de principi basada en un pedicle vascular en la malaltia d'IM crònic. Per aquest motiu, han de dur-se a terme noves estratègies terapèutiques per potenciar l'efecte del pedicle adipós com l'administració simultània de factors de creixement i/o cèl·lules mare en estudis futurs.

Conclusions

La realització d'aquest treball de tesi doctoral ha donat com a fruit les següents conclusions:

1. S'ha descrit el mapa genètic evolutiu derivat dins el marc d'infart de miocardi porcí per a oferir una nova eina pels estudis genètics de patologia coronària.
2. S'ha identificat, aïllat i caracteritzat una nova població cel·lular mesenquimal derivada del teixit adipós pericardíac porcí.
3. La transposició d'un pedicle adipós vascularitzat pericardíac sobre la superfície isquèmica aguda miocardiàca redueix la mida de l'infart de miocardi, disminueix l'apoptosi miocardiàca i genera connexions vasculars entre el pedicle i el miocardi infartat evitant el remodelat ventricular advers, en el model porcí.
4. La transposició d'un pedicle adipós vascularitzat pericardíac sobre la superfície isquèmica crònica miocardiàca redueix la mida de l'infart de miocardi i genera connexions vasculars entre el pedicle i el miocardi infartat, en el model porcí.

Bibliografia

Abrams HL. Angiocardiology and thoracic aortography. Classic descriptions in diagnostic roentgenology. Vol. 1. Springfield. 492-501 (1964).

Ahima RS., Filer JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab.* 11, 327-32 (2000).

Antman EM., Anbe DT., Armstrong PW., Bates ER., Green LA., Hand M., Hochman JS., Krumholz HM., Kushner FG., Lamas GA., Mullany CJ., Ornato JP, Pearle DL., Sloan MA., Smith SC Jr., Alpert JS., Anderson JL., Faxon DP., Fuster V., Gibbons RJ., Gregoratos G., Halperin JL., Hiratzka LF., Hunt SA., Jacobs AK., American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines; Canadian cardiovascular Society. ACC/AHA guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction – executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on practice guidelines (Writing Committee to Revise the 1999 Guidelines for the Management of Patients With Acute Myocardial Infarction). *Circulation.* 110, 588-636 (2004).

Anversa P., Cheng W., Liu Y., Leri A., Redaelli G., Kajstura J. Apoptosis and myocardial infarction. *Basic Res Cardiol.* 93, 8-12 (1998)

Assmus B., Schächinger V., Teupe C., Britten M., Lehmann R., Döbert N., Grünwald F., Aicher A., Urbich C., Martin H., Hoelzer D., Dimmeler S., Zeiher AM. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction. *Circulation.* 106, 3009-17 (2002).

Bayes-Genis A., Salido M., Solé Ristol F., Puig M., Brossa V., Campreciós M., Corominas JM., Mariñoso ML., Baró T., Vela MC., Serrano S., Padró JM., Bayes de Luna A., Cinca J. Host cell-derived cardiomyocytes in sex-mismatch cardiac allografts. *Cardiovasc Res.* 56, 404-10 (2002).

Bayes-Genis A., Muñoz-Diaz E., Catusus L., Arilla M., Rodriguez C., Sierra J., Madoz PJ., Cinca J. Cardiac chimerism in recipients of peripheral-blood and bone marrow stem cells. *Eur J Heart Fail.* 6, 399-402 (2004).

Bayes-Genis A., Roura S., Soler-Botija C., Farré J., Hove-Madsen L., Llach A., Cinca J. Identification of cardiomyogenic lineage markers in untreated human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Transplant Proc.* 37, 4077-9 (2005).

Bayes-Genis A., Bellosillo B., de la Calle O., Salido M., Roura S., Ristol FS., Soler c., Martinez M., Espinet B., Serrano S., Bayes de Luna A., Cinca J. Identification of male cardiomyocytes of extracardiac origin in the hearts of women with male progeny: male fetal cell microchimerism of the heart. *J Heart Lung Transplant.* 24, 2179-83 (2005).

Bayes-Genis A., Soler-Botija C., Farré J., Sepúlveda P., Raya A., Roura S., Prat-Vidal C., Gálvez-Montón C., Montero JA., Büscher D., Izpisúa JC. Human progenitor cells derived from cardiac adipose tissue ameliorate myocardial infarction in rodents. *J Mol Cell Cardiol.* 49, 771-80 (2010).

Barnard CN. The operation. A human cardiac transplant: an interim report of a successful operation performed at Groote Schuur Hospital, Cape Town. *S Afr Med J.* 41, 1271-4 (1967).

Bearzi C., Rota M., Hosoda T., Tillmanns J., Nascimbene A., De Angelis A., Yasuzawa-Amano S., Trofimova I., Siggins RW., Lecapitaine N., Cascapera S., Beltrami AP., D'Alessandro DA., Zias E., Quaini F., Urbanek K., Michler RE., Bolli R., Kajstura J., Leri A., Anversa P. Human cardiac stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104, 14068-73 (2007).

Beck CS. Principles underlying the operative approach to the treatment of myocardial ischemia. *Ann Surg.* 118, 788-806 (1943).

Beck CS., Pritchard WH., Feil HS. Ventricular fibrillation of long duration abolished by electric shock. *JAMA.* 135, 985 (1947).

Bellenger NG., Davies LC., Francis JM., Coats AJ., Pennell DJ. Reduction in sample size for studies of remodeling in heart failure by the use of cardiovascular magnetic resonance. *J Cardiovasc Magn Reson.* 2, 271-8 (2000).

Beltrami AP., Urbanek K., Kajstura J., Yan SM., Finato N., Bussani R., Nadal-Ginard B., Silvestri F., Leri A., Beltrami CA., Anversa P. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med.* 344, 1750-7 (2001).

Bengtsson H., Simpson K., Bullard J., Hansen K. Aroma.affymetrix: A generic framework in R for analyzing small to very large Affymetrix data sets in bounded memory. Tech Report 745, Department of Statistics, University of California, Berkeley. 2008

Bezold AV., Breymann E. Von der Veränderungen des Herz Untersuchungen aus dem physiologischen Laboratorium in Würzburg. II (1862).

Bittl JA., Kuntz RE., Estella P., Sanborn TA., Baim DS. Analysis of late lumen narrowing after excimer laser-facilitated coronary angioplasty. J Am Coll Cardiol. 23, 1314-20 (1994).

Black JW., Duncan W.A.M., Shanks R.G. Comparison of some properties of pronethalol and propranolol. Brit. J. Pharmacol. 25, 577-91 (1965).

Braunwald E., Zipes DP., Libby P. Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine, 6th ed. W. B. Saunders Company (Edición en español). Vol. 2, Section IV., Chap 35, 1364 (2004).

Breitbach M., Bostani T., Roell W., Xia Y., Dewald O., Nygren JM., Fries JW., Tiemann K. Bohlen H., Hescheler J., Weiz A., Bloch W., Jacobsen SE., Fleischmann BK. Blood. 110, 1362-9 (2007).

Burke GE., Wright IS. Tromexan 3,3'-carboxymethylenebis (4-hydroxycouinarin) ethyl ester experimental and clinical properties. Circulation. 3, 164-70 (1950).

Chalmers JP. Rational basis for drug treatment of hypertension. Aust N Z J Med. 11, 69-72 (1981).

Chirac P. *De motu cordis, adversaria analytica*. 121 (1698).

Chugh SS., Whitesel S., Turner M., Roberts CT. Jr., Nagalla SR. Genetic basis for chamber-specific ventricular phenotypes in the rat infarct model. Cardiovasc Res. 57, 477-85 (2003).

Cohnheim J., Schulthess-Rechberg AV. Ueber die Folgen der Kranz-Arterien-Verschliessung für das Herz. Virchow's Archiv. 85, 503-37 (1881).

Davies CH., Ormerod OJ. Failed coronary thrombolysis. *Lancet*. 351, 1191-6 (1998).

Dawson E., Mapili G., Erickson K., Taqvi S., Roy K. Biomaterials for stem cell differentiation. *Adv Drug Deliv rev.* 60, 215-28 (2008).

de Wert G., Mummery C. Human embryonic stem cells: research, ethics and policy. *Hum Reprod.* 18, 672-82 (2003).

Dicker A., Le Blanc K., Aström G., van Harmelen V., Götherström C., Blomqvist L., Arner P., Rydén M. Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Exp Cell Res.* 308, 283-90 (2005).

Di Rocco G., Iachininoto MG., Tritarelli A., Straino S., Zacheo A., Germani A., Crea F., Capogrossi MC. Myogenic potential of adipose-tissue-derived cells. 119, 2945-52 (2006).

Dvir T., Bauer M., Schroeder A., Tsui JH., Anderson DG., Langer R., Liao R., Kohane DS. Nanoparticle targeting the infarcted heart. *Nano Lett.* Sep 14 (Epub ahead of print) 2011.

Erichsen JE. On the influence of the coronary circulation on the action of the heart. *The London Medical Gazette.* II, 561-4 (1842).

Erickson RG., Gimble JM., Franklin DM., Rice HE., Awad H., Guilak F. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 290, 763-9 (2002).

Eschenhagen T., Fink C., Remmers U., Scholz H., Wattachow J., Weil J., Zimmermann W., Dohmen HH., Schäfer H., Bishopric N., Wakatsuki T., Elson EL. Three-dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: a new heart muscle model system. *FASEB J.*, 11, 683-94 (1997).

Farré J., Roura S., Prat-Vidal C., Soler-Botija C., Llach A., Molina CE., Hove-Madsen L., Cairó JJ., Gòdia F., Bragós R., Cinca J., Bayes-Genis A. *Growth Factors.* 25, 71-6 (2007).

Favaloro RG. Saphenous vein autograft replacement of severe segmental coronary occlusion: operative technique. *Ann Thorac Surg.* 5, 334-9 (1968).

Ferrara N., Gerber HP., LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 9, 669-76 (2003).

Folkman J., Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science.* 235, 442-7 (1987).

Fulwyler MJ. Status quo in flow-through cytometry. *J Histochem Cytochem.* 22, 605-6 (1974).

Fuster V., Ross R., Topol EJ. *Artherosclerosis and coronary artery disease.* First edition. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers Inc.; 1996.

Gasser R., Wolff P., Schwarz T., Eber W., Fürschuss W., Klein W. Myocardial ischemia: some historical notes. *Int J Angiol.* 3, 157-9 (1994).

Gaustad KG., Boquest AC., Anderson BE., Gerdes AM., Collas P. *Biochem Biophys Res Commun.* 314, 420-7 (2004).

Gavrieli Y., Sherman Y., Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.* 119, 493-501 (1992).

Gimble JM., Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy.* 5, 362-9 (2003).

Gimble JM., Katz AJ., Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res.* 100, 1249-60 (2007).

Giugliano RP., Braunwald E., TIMI Study Group. Selecting the best reperfusion strategy in ST-elevation myocardial infarction: it's all a matter of time. *Circulation.* 108, 2828-30 (2003).

Goldberg RJ., Samad NA., Yarzebski J., Gurwitz J., Bigelow C., Gore JM. Temporal trends in cardiogenic shock complicating acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* 340, 1162-8 (1999).

Grines CL., Weaver WD. Treating myocardial infarction: importance of early reperfusion. *Lancet.* 344, 490-1 (1994).

Grüntzig A., Schneider HJ. The percutaneous dilatation of chronic coronary stenoses--experiments and morphology. *Schweiz Med Wochenschr.* 107, 1588 (1977).

Grüntzig A. Transluminal dilatation of coronary-artery stenosis. *Lancet.* 361, 527 (1978).

Hall D., Gruentzig A. Percutaneous transluminal coronary angioplasty: current procedure and future direction. *AJR Am J Roentgenol.* 142, 13-6 (1984).

Heeschen C., Lehmann L., Honold J., Assmus B., Aicher A., Walter DH., Martin H., Zeiher AM., Dimmeler S. Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease. *Circulation.* 109, 1615-22 (2004).

Heller A. Ueber die regeneration des Herzmuskels. *Beitr. Z. Path. Anat. U. Z. Allg. Path.* LVII, 223 (1915).

Herrick J.B. Clinical features of sudden obstruction of the coronary arteries. *JAMA* 250, 1757-65 (1912).

Hochman JS., Sleeper LA., Webb JG., Sanborn TA., White HD., Talley JD., Buller CE., Jacobs AK., Slater JN., Col J., McKinlay SM., LeJemtel TH. Early revascularization in acute myocardial infarction complicated by cardiogenic shock. SHOCK Investigators. Should we emergently revascularize occluded coronaries for cardiogenic shock. *N Engl J Med.* 34, 625-34 (1999).

Hoffmann R., Mintz GS., Dussallant GR., Popma JJ., Pichard AD., Satler LF., Kent KM., Griffin J., Leon MB. Patterns and mechanisms of in-stent

restenosis. A serial intravascular ultrasound study. *Circulation*. 94, 1247-54 (1996).

Houtgraaf JH., den Dekker WK., van Dalen BM., Springeling T., de Jong R., van Geuns RJ., Geleijnse ML., Fernandez-Aviles F., Zijlstra F., Serruys PW., Duckers HJ. First Experience in Humans Using Adipose Tissue-Derived Regenerative Cells in the Treatment of Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol*. 59, 539-40 (2012).

Ingram DA., Mead LE., Tanaka H., Meade V., Fenoglio A., Mortell K., Pollok K., Ferkowicz MJ., Gilley D., Yoder MC. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood*. 104, 2752-60 (2004).

Ingram DA., Mead LE., Moore DB., Woodard W., Fenoglio A., Yoder MC. Vessel wall-derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells. *Blood*. 105, 2783-6 (2005).

Irizarry RA., Bolstad BM., Collin F., Cope LM., Hobbs B., Speed TP. Summaries of Affimetryx GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res*. 31, e15 (2003).

Ishikawa K., Tilemann L., Fish K., Hajjar RJ. Gene delivery methods in cardiac gene therapy. *J Gene Med*. Doi: 10.1002/jgm. 1609 (2011).

Iyer A., Kumarasinghe G., Hicks M., Watson A., Gao L., Doyle A., Keogh A., Kotlyar E., Hayward C., Dhital K., Granger E., Jansz P., Pye R., Spratt P., Macdonald PS. Primary graft failure after heart transplantation. *J Transplant*. 175768. Epub 2011 Aug 1 (2011).

Izadpanah R., Trygg C., Patel B., Kriedt C., Dufour J., Gimble JM., Bunnell BA. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem*. 99, 1285-97 (2006).

Jessup M., Greenberg B., Mancini D., Cappola T., Pauly DF., Jaski B., Yaroshinky A., Zsebo KM., Dittrich H., Hajjar RJ. Calcium

Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID) Investigators. Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID): a phase 2 trial of intracoronary gene therapy of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in patients with advanced heart failure. *Circulation*. 124, 304-13 (2011).

Jeziarska-Wozniak K., Mystkowska D., Tutas A., Jurkowski MK. Stem cells as therapy for cardiac disease – a review. *Folia Histochem Cytobiol*. 49, 13-25 (2011).

Jin H., Yang R., Awad TA., Wang F., Li W., Williams SP., Ogasawara A., Shimada B., Williams PM., de Feo G., Paoni NF. Effects of early angiotensin-converting enzyme inhibition on cardiac gene expression after acute myocardial infarction. *Circulation*. 103, 736-42 (2001).

Johns TN., Olson BJ. Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals. *Ann Surg*. 140, 675-82 (1954).

Julian DG. The history of coronary care units. *Br Heart J*. 57, 497-502 (1987).

Kajstura J., Leri A., Finato N., Di Loreto C., Beltrami CA. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95, 8801-5 (1998).

Kantrowitz A., Tjonneland S., Freed PS., Phillips SJ., Butner AN., Sherman JL Jr. Intraaortic balloon pumping. *JAMA*. 203, 988 (1968).

Karsner HT., Dwyer JE. Studies in infarction: IV. Experimental bland infarction of the myocardium, myocardial regeneration and cicatrization. *J Med Res*. 34, 21-40 (1916).

Kirtane AJ., Gupta A., Iyengar S., Moses JW., Leon MB., Applegate R., Brodie B., Hannan E., Harjai K., Jensen LO., Park SJ., Perry R., Racz M., Saia F., Tu JV., Waksman R., Lansky AJ., Mehran R., Stone GW. Safety and efficacy of drug-eluting and bare metal stents: comprehensive meta-analysis of randomized trials and observational studies. *Circulation*. 119, 3198-206 (2009).

Kloner RA., Ganote CE., Jennings RB. The "No-Reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest.* 54, 1496-508 (1974).

Kocher AA., Schuster MD., Szabolcs MJ., Takuma S., Burkhoff D., Wang J., Homma S., Edwards NM., Itescu S. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med.* 7, 430-6 (2001).

Kuhlmann WD., Peschke P. Comparative study of procedures for histological detection of lectin binding by use of Griffonia simplicifolia agglutinin I and gastrointestinal mucosa of the rat. *Histochemistry.* 81, 265-72 (1984).

LaDue JS., Wroblewski F., Karmen A. Serum glutamic oxaloacetic transaminase activity in human acute transmural myocardial infarction. *Science.* 120, 497-9 (1954).

Laufer ST. Subacute myocardial infarction or necrosis. *Can Med Assoc J.* 45, 230-8 (1941).

Lawrence WS., Garrad LJ., Damm D., Garrick BL., Lam A., Kapoun AM., Zheng Q., Protter AA., Schreiner GF., White RT. Altered patterns of gene expression in response to myocardial infarction. *Circ Res.* 86, 939-45 (2000).

Léobon B., Roncalli J., Joffre C., Mazo M., Boisson M., Barreau C., Calise D., Arnaud E., André M., Pucéat M., Pénicaud L., Prosper F., Planat-Bénard V., Casteilla L. Adipose-derived cardiomyogenic cells: in vitro expansion and functional improvement in a mouse model of myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 83, 757-67 (2009).

Livak KJ., Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 25, 402-8 (2001).

Loges S., Roncal C., Carmeliet P. Development of targeted angiogenic medicine. *J Thromb Haemost.* 7, 21-33 (2009).

Lowe T. Myocardial infarction. *Br Heart J.* 6, 115-8 (1944).

Lunde K., Solheim S., Aakhus S., Arnesen H., Abdelnoor M., Egeland T., Endresen K., Ilebekk A., Mangschau A., Fjeld JG., Smith HJ., Taraldsrud E., Grøgaard HK., Bjørnerheim R., Brekke M., Müller C., Hopp E., Ragnarsson A., Brinchmann JE., Forfang K. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* 355, 1199-209 (2006).

Lyn D., Liu X., Bennett NA., Emmett NL. Gene expression profile in mouse myocardium after ischemia. *Physiol Genomics.* 2, 93-100 (2000).

Lyon TP., Yankley A., Gofman JW., Strisower B. Lipoproteins and diet in coronary heart disease; a five-year study. *Calif Med.* 84, 325-8 (1956).

Magovern JA, Furnary AP, Christlieb IY, Kao RL, Magovern GJ. Right latissimus dorsi cardiomyoplasty for left ventricular failure. *Ann Thorac Surg.* 53, 1120-2 (1992).

Marijjanowski MM., Teeling P., Mann J., Becker AE. Dilated cardiomyopathy is associated with an increase in the type I/type III collagen ratio: a quantitative assessment. *J Am Coll Cardiol.* 25, 1263-72 (1995).

Martínez-Estrada OM., Muñoz-Santos Y., Julve J., Reina M., Vilaró S. Human adipose tissue as a source of Flk-1+ cells: new method of differentiation and expansion. *Cardiovasc Res.* 65, 328-33 (2004).

Matthias N., Schwarzer M., Pinkernell K., Fotuhi P., Alt EU. Effect of stem cells on left ventricular wall thickness and capillary density in pigs following myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 47, 206-207 (2006).

Maulik N., Thirunavukkarasu M. Growth factors and cell therapy in myocardial regeneration. *J Mol Cell Cardiol.* 44, 219-27 (2008).

McLean J. The discovery of heparin. *Circulation.* 19, 75-8 (1959).

Meliga E., Strem BM., Duckers HJ., Serruys PW. Adipose-Derived cells. *Cell Transplant.* 16, 963-70 (2007).

Menasché P., Alfieri O., Janssens S., McKenna W., Reichenspurner H., Trinquart L., Vilquin JT., Marolleau JP., Seymour B., Larghero J., Lake S., Chatellier G., Solomon S., Desnos M., Hagege AA. The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation*. 117, 1189-200 (2008).

Michels KB., Yusuf S. Does PTCA in acute myocardial infarction affect mortality and reinfarction rates? A quantitative overview (meta-analysis) of the randomized clinical trials. *Circulation*. 91, 476-85 (1995)

Miller DW., Hessel EA., Winterscheid LC., Merendino KA., Dillard DH. Current practice of coronary artery bypass surgery. Results of a national survey. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 73, 75-83 (1977).

Mirowski M., Reid PR., Mower MM., Watkins L Jr., Platia EV., Griffith LS., Juanteguy JM. Use of the automatic implantable cardioverter-defibrillator in the treatment of malignant ventricular arrhythmias. *Herz*. 9, 83-9 (1984).

Miyahara Y., Nagaya N., Kataoka M., Yanagawa B., Tanaka K., Hao H., Ishino K., Ishida H., Shimizu T., Kangawa K., Sano S., Okano T., Kitamura S., Mori H. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med*. 12, 459-65 (2006).

Molavi B., Chen J., Mehta JL. Cardioprotective effects of rosiglitazone are associated with selective overexpression of type 2 angiotensin receptors and inhibition of p42/44 MAPK. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 291, H687*93 (2006).

Morgagni JB. *De sedibus et causis morborum, per anatomen indagatis*. Venetiis, Lib. II. 16, 252 (1761).

Morgan E., Lima O., Goldberg M., Ferdman A., Luk SK., Cooper JD. Successful revascularization of totally ischemic bronchial autografts with omental pedicle flaps in dogs. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 84, 204-10 (1982).

Motegi S., Tamura A., Abe M., Okada E., Nagai Y., Ishikawa O. Reverse latissimus dorsi musculocutaneous flap for reconstruction of lumbar radiation ulcer. *J Dermatol*. 34, 565-9 (2007).

Nicholls M. Pioneers of cardiology: Rune Elmqvist, MD. *Circulation*. 115, 1109-11 (2007).

Nicoletti A., Heudes D., Hinglais N., Appay MD., Philippe M., Sassy-Prigent C., Bariety J., Michel JB. Left ventricular fibrosis in renovascular hypertensive rats. Effect of losartan and spironolactone. *Hypertension*. 26, 101-11 (1995).

Nussbaum J., Minami E., Laflamme MA., Virag JA., Ware CB., Masino A., Mushkeli V., Pabon L., Reinecke H., Murry CE. Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. *FASEB J*. 21, 1345-57 (2007).

Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*. 448, 313-7 (2007).

OMS. The World Health Report 2004 - Changing History. 120-4 (2004).

Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Jakoniuk I., Anderson SM., Li B., Pickel J., McKay R., Nadal-Ginard B., Bodine DM., Leri A., Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 410, 701-5 (2001).

Ott HC., Matthiesen TS., Goh SK., Black LD., Kren SM., Netoff TI., Taylor DA. *Nat Med*. 14, 213-21 (2008).

Panum PL. Experimentelle Beiträge zur Lehre von der Embolie. *Virchows Archiv*. 25, 433-530 (1862).

Pardee HEB. An electrocardiographic sign of coronary artery obstruction. *Arch Intern Med*. 26, 244-57 (1920).

Parkinson J., Bedford DE. Successive changes in the electrocardiogram after cardiac infarction (Coronary thrombosis). *Heart*. 14, 195-239 (1928).

Parry C.H. An inquiry into the symptoms and causes of syncope anginosa, commonly called angina pectoris. *Cruttwell*; 1799.

Peterson JT., Li H., Dillon L., Bryant JW. Evolution of matrix metalloprotease and tissue inhibitor expression during heart failure progression in the infarcted rat. *Cardiovasc Res.* 46, 307-15 (2000).

Pevec WC., Ndoye A., Brinsky JL., Wiltse S., Cheung AT. New blood vessels can be induced to invade ischemic skeletal muscle. *J Vasc Surg.* 24, 534-41 (1996).

Planat-Benard V., Silvestre JS., Cousin B., André M., Nibbelink M., Tamarat R., Clergue M., Manneville C., Saillan-Barreau C., Duriez M., Tedgui A., Levy B., Pénicaud L., Casteilla L. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation.* 109, 656-63 (2004).

Planat-Bénard V., Menard C., André M., Pucéat M., Perez A., Garcia-Verdugo JM., Pénicaud L., Casteilla L. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circ Res.* 94, 223-9 (2004).

Prat-Vidal C., Roura S., Farré J., Gálvez C., Llach A., Molina CE., Hove-Madsen L., Garcia J., Cinca J., Bayes-Genis A. Umbilical cord blood-derived stem cells spontaneously express cardiomyogenic traits. *Transplant Proc.* 39, 2434-7 (2007).

Radusic M., Park H., Shing H., Consi T., Schoen FJ., Langer R., Freed LE., Vunjak-Novakovic G. Functional assembly of engineered myocardium by electrical stimulation of cardiac myocytes cultured on scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 18129-34 (2004).

Radusic M., Marsano A., Maidhof R., Wang Y., Vunjak-Novakovic G. Cardiac tissue engineering using perfusion bioreactor systems. *Nat Protoc.* 3, 719-38 (2008).

Rangappa S., Fen c., Lee EH., Bongso A., Sim EK. Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes. *Ann Thorac Surg.* 75, 775-9 (2003).

Reifart N., Vandormael M., Krajcar M., Göhring S., Preusler W., Schwarz F., Störger H., Hofmann M., Klöpffer J., Müller S., Haase J. Randomized comparison of angioplasty of complex coronary lesions at a single

center. Excimer Laser, Rotational Atherectomy, and Balloon Angioplasty Comparison (ERBAC) Study. *Circulation*. 96, 91-8 (1997).

Rigol M., Solanes N., Farré J., Roura S., Roqué M., Berruezo A., Bellera N., Novensà L., Tamborero D., Prat-Vidal, Huzman MA., Batlle M., Hoefsloot M., Sitges M., Ramírez J., Dantas AP., Merino A., Sanz G., Brugasa J., Bayes-Genis A., Heras M. Effects of adipose tissue-derived stem cell therapy after myocardial infarction: impact on the route of administration. *J Card Fail*. 16, 357-66 (2010).

Rocha LS., Paiva GR., de Oliveira LC., Filho JV., Dantos ID., Andrews JM. Frontal reconstruction with frontal musculocutaneous V-Y island flap. *Plast Reconstr Surg*. 120, 631-7 (2007).

Rodbell M. Metabolism of isolated fat cells. IV. Regulation of release of protein by lipolytic hormones and insulin. *J Biol Chem*. 241, 3909-17 (1966).

Rodbell M. Metabolism of isolated fat cells. II. The similar effects of phospholipase C (*Clostridium perfringens* alpha toxin) and of insulin on glucose and amino acid metabolism. *J Biol Chem*. 241, 130-9 (1966).

Rodbell M. Jones AB. Metabolism of isolated fat cells. 3. The similar inhibitory action of phospholipase (*Clostridium perfringens* alpha toxin) and of insulin on lipolysis stimulated by lipolytic hormones and theophylline. *J Biol Chem*. 241, 140-2 (1966).

Roura S., Farré J., Soler-Botija C., Llach A., Hove-Madsen L., Cairó JJ., Gòdia F., Cinca J, Bayes-Genis A. Effect of aging on the pluripotential capacity of human CD105+ mesenchymal stem cells. *Eur J Heart Fail*. 8, 555-63 (2006).

Roura S., Planas F., Prat-Vidal C., Leta R., Soler-Botija C., Llach A., Molina CE., Hove-Madsen L., Cairó JJ., Gòdia F., Bragós R., Cinca J, Bayes-Genis A. Idiopathic dilated cardiomyopathy exhibits defective vascularization and vessel formation. *Eur J Heart Fail*. 9, 995-1002 (2007).

Roura S., Bayes-Genis A. Vascular dysfunction in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Nat Rev Cardiol*. 6, 590-8 (2009).

Roura S., Farré J., Hove-Madsen L., Prat-Vidal C., Soler-Botija C., Gálvez-Montón C., Vilalta M., Bayes-Genis A. Exposure to cardiomyogenic

stimuli fails to transdifferentiate human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Basic Res Cardiol.* 105, 419-30 (2010).

Safford KM., Hicok KC., Safford SD., Halvorsen YD., Wilkinson WO., Gimble JM., Rice HE. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 294, 371-9 (2002).

Sandmann S., Yu M., Kaschina E., Blume A., Bouzinova E., Aalkjaer C., Unger T. Differential effects of angiotensin AT1 and AT2 receptors on the expression, translation and function of the Na⁺-H⁺ exchanger and Na⁺-HCO₃⁻ symporter in the rat heart after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 37, 2154-65 (2001).

Saraste A., Pulkki K., Kallajoki M., Henriksen K., Parvinen M., Volpio-Pulkki LM. Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation.* 95, 320-3 (1997).

Schächinger V., Assmus B., Britten MB., Honold J., Lehmann R., Teupe C., Abolmaali ND., Vogl TJ., Hofmann WK., Martin H., Dimmeler S., Zeiher AM. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOCARE-AMI trial. *J Am Coll Cardiol.* 44, 1690-9 (2004).

Schächinger V., Erbs S., Elsässer A., Haberbosch W., Hambrecht R., Hölschermann H., Yu J., Corti R., Mathey DG., Hamm CW., Süselbeck T., Assmus B., Tonn T., Dimmeler S., Zeiher AM; REPAIR-AMI Investigators. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* 355, 1210-21 (2006).

Schatz RA., Baim DS., Leon M., Ellis SG., Goldberg S., Hirshfeld JW., Cleman MW., Cabin HS., Walker C., Stagg J. Clinical experience with the Palmaz-Schatz coronary stent. Initial results of a multicenter study. *Circulation.* 83, 148-61 (1991).

Sehl PD., Tai JT., Hillan KJ., Brown LA., Goddard A., Yang R., Jin H., Lowe DG. Application of cDNA microarrays in determining molecular phenotype in cardiac growth, development, and response to injury. *Circulation.* 101, 1990-9 (2000).

- Selzer A. Myocardial infarction and heart failure. *Calif Med.* 68, 350-2 (1948).
- Serruys PW., Kutryk MJ., Ong AT. Coronary-artery stents. *N Engl J Med.* 354, 483-95 (2006).
- Shintani S., Murohara T., Ikeda H., Ueno T., Honma T., Katoh A., Sasaki K., Shimada T., Oike Y., Imaizumi T. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation.* 103, 2776-9 (2001).
- Shrager JB., Wain JC., Wright CD., Donahue DM., Vlahakes GJ., Moncure AC., Grillo HC., Mathisen DJ. Omentum is highly effective in the management of complex cardiothoracic surgical problems. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 125, 526-32 (2003).
- Silber S., Albertsson P., Avilés FF., Camici PG., Colombo A., Hamm C., Jørgensen E., Marco J., Nordrehaug JE., Ruzylo W., Urban P., Stone GW., Wijns W. Guías de Práctica Clínica sobre intervencionismo coronario percutáneo. *Rev Esp Cardiol.* 58, 679-728 (2005).
- Simpson D., Liu H., Fan TH., Nerem R., Dudley SC. Jr. A tissue engineering approach to progenitor cell delivery results in significant cell engraftment and improved myocardial remodeling. *Stem Cells.* 25, 2350-7 (2007).
- Smith FJ., Goodrich BE. The neutrophilic partition in myocardial infarction. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 51, 247-61 (1935).
- Smith FJ., Keyes JW., Denham RM. Myocardial infarction. A study of the acute phase. *J Mich State Med Soc.* 50, 1388-401 (1951).
- Smith FM. The ligation of coronary arteries with electrocardiographic study. *Arch Intern Med.* 22, 8-27 (1918).
- Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol.* 3, Article 3 (2004).
- Sorenson CW., Wright IS. A synthetic anticoagulant: a polysulfuric acid ester of polyanhydromannuronic acid (Paritol). Experience with its use in man. *Circulation.* 2, 658-67 (1950).

Spiers FW. A note on Roentgen's X-ray absorption measurements in 1895. *Br J Radiol.* 59, 1109-10 (1986).

Stanton LW., Garrard LJ., Damm D., Garrick BL., Lam A., Kapoun AM., Zheng Q., Protter AA., Schreiner GF., White RT. Altered patterns of gene expression in response to myocardial infarction. *Circ Res.* 86, 939-45 (2000).

Stone GW., Teirstein PS., Rubenstein R., Schmidt D., Withlow PL., Kosinski EJ., Mishkel G., Power JA. A prospective, multicenter, randomized trial of percutaneous transmyocardial laser revascularization in patients with nonrevascularizable chronic total occlusions. *J Am Coll Cardiol.* 39, 1581-7 (2002).

Strem BM., Zhu M., Alfonso Z., Daniels EJ., Schreiber R., Begyui R., MacLellan WR., Hedrick MH., Fraser JK. Expression of cardiomyocytic markers on adipose tissue-derived cells in a murine model of acute myocardial injury. *Cytotherapy.* 7, 282-91 (2005).

Sweeney G. Cardiovascular effects of leptin. *Nat Rev Cardiol.* 7, 22-9 (2010).

Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 131, 861-72 (2007).

Taylor DA., Atkins BZ., Hungspreugs P., Jones TR., Reedy MC., Hutcheson KA., Glower DD., Kraus WE. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med.* 4, 929-33 (1998).

Thygesen K., Alpert JS., White HD.; Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction., Jaffe AS., Apple FS., Galvani M., Katus HA., Newby LK., Ravkilde J., Chaitman B., Clemmensen PM., Dellborg M., Hod H., Porela P., Underwood R., Bax JJ., Beller GA., Bonow R., Van der Wall EE., Bassand JP., Wijns W., Ferguson TB., Steg PG., Uretsky BF., Williams DO., Armstrong PW., Antman EM., Fox KA., Hamm CW., Ohman EM., Simoons ML., Poole-Wilson PA., Gurfinkel EP., Lopez-Sendon JL., Pais P., Mendis S., Zhu JR., Wallentin LC., Fernández-Avilés F., Fox KM., Parkhomenko AN., Priori

SG., Tendera M., Voipio-Pulkki LM., Vahanian A., Camm AJ., De Caterina R., Dean V., Dickstein K., Filippatos G., Funck-Brentano C., Hellems I., Kristensen SD., McGregor K., Sechtem U., Silber S., Tendera M., Widimsky P., Zamorano JL., Morais J., Brener S., Harrington R., Morrow D., Lim M., Martinez-Rios MA., Steinhubl S., Levine GN., Gibler WB., Goff D., Tubaro M., Dudek D., Al-Attar N. *Circulation*. 116, 2634-53 (2007).

Toledo-Pereyra LH. Christiaan Barnard. *J Invest Surg*. 23, 72-8 (2010).

Tomanek RJ., Zheng W., Peters KG., Lin P., Holifield JS., Suvarna PR. Multiple growth factors regulate coronary embryonic vasculogenesis. *Dev Dyn*. 221, 265-73 (2001).

Tschope C., Heringer-Walther S., Koch M., Spillmann F., Wendorf M., Hauke D., Bader M., Schultheiss HP., Walther T. Myocardial bradykinin B2-receptor expression at different time points after induction of myocardial infarction. *J Hypertens*. 18, 223-8 (2000).

Unger EF., Scheffield CD., Epstein SE. Creation of anastomoses between an extracardiac artery and the coronary circulation. Proof that myocardial angiogenesis occurs and can provide nutritional blood flow to the myocardium. *Circulation*. 82, 1449-66 (1990).

Valina C., Pinkernell K., Song YH., Bai X., Sadat S., Campeau RJ., Le Jemtel TH., Alt E. *Eur Heart J*. 28, 2667-77 (2007).

Van RL., Bayliss CE., Roncari DA. Cytological and enzymological characterization of adult human adipocyte precursors in culture. *J Clin Invest*. 58, 699-704 (1976).

van Dijk A., Naaijken BA., Jurgens WJ., Nalliah K., Sairras S., van der Pijl RJ., Vo K., Vonk AB., van Rossum AC., Paulus WJ., van Milligen FJ., Niessen HW. Reduction of infarct size by intravenous injection of uncultured adipose derived stromal cells in a rat model is dependent on the time point of application. *Stem Cell Res*. 7, 219-29 (2011).

Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol.* 231, 232-5 (1971).

Veinot JP., Gattinger DA., Fliss H. Early apoptosis in human myocardial infarcts. *Hum Pathol.* 28, 485-92 (1997).

Vunjak-Novakovic G., Tandon N., Godier A., Maidhof R., Marsano A., Martens TP., Radisic M. Challenges in cardiac tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev.* 16, 169-87 (2010).

Vunjak-Novakovic G., Lui KO., Tandon N., Chien KR. Bioengineering heart muscle: a paradigm for regenerative medicine. *Annu Rev Biomed Eng.* 13, 245-67 (2011).

Wearn JT. The role of the thebesian vessels in the circulation of the heart. *J Exp Med.* 47, 293-315 (1928).

Weber KT. Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol.* 65, 1637-52 (1989).

White PD. Heart disease. The Macmillan Company, New York. (1931).

Whittaker P., Boughner DR., Kloner RA. Analysis of healing after myocardial infarction using polarized light microscopy. *Am J Pathol.* 134, 879-93 (1989).

Wolf D., Reinhard A., Seckinger A., Katus HA., Kuecherer H., Hansen A. Dose-dependent effects of intravenous allogeneic mesenchymal stem cells in the infarcted porcine heart. *Stem Cell Dev.* 18, 321-9 (2009).

Wollert KC., Meyer GP., Lotz J., Ringes-Lichtenberg S., Lippolt P., Breidenbach C., Fichtner S., Korte T., Hornig B., Messinger D., Arseniev L., Hertenstein B., Ganser A., Drexler H. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet.* 364, 141-8 (2004).

Wu KH., Mo XM., Han ZC., Zhou B. Stem cell engraftment and survival in the ischemic heart. *Ann Thorac Surg.* 92, 1971-25 (2011).

Yang ZJ., Zhang YR., Chen B., Zhang SL., Jia EZ., Wang LS., Zhu TB., Li CJ., Wang H., Huang J., Cao KJ., Ma WZ., Wu B., Wang LS., Wu CT. Phase I clinical trial on intracoronary administration of Ad-hHGF treating severe coronary artery disease. *Mol Biol Rep.* 36, 1323-9 (2009).

Zimmermann WH, Melnychenko I, Wasmeier G, Didie M, Naito H, Nixdorff U., Hess A., Budinskiy I., Brune K., Michaelis B., Dhein S., Schwoerer A., Ehmke H., Eschenhagen T. Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts. *Nat Med.* 12, 452-8 (2006).

Zuk PA., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell JW., Katz AJ., Benhaim P., Lorenz HP., Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 7, 211-28 (2001).

Zuk PA., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte DA., Huang JL, Mizuno H., Alfonso ZC., Fraser JK., Benhaim P., Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 13, 4279-95 (2002).

Articles d'autoria anònima

Anticoagulant therapy of acute myocardial infarction. *Br Med J.* 2, 991-2 (1950).

Annex



Barcelona, 7 de juliol de 2006

El Comitè d'Ètica d'Experimentació Animal de la Unitat d'Experimentació Animal (UEA) de "l'Institut Català de Ciències Cardiovasculars (ICCV)" ha avaluat el procediment ICCV-015 titulat "Implantació de membranes de teixit adipós epicàrdic per al tractament de l'infart de miocardi en el model porcí" presentat per l'investigador principal Dr. Jordi Farré, i ha conclòs la seva idoneïtat d'acord al benestar animal, model experimental, disseny i objectius de l'estudi, i mínim nombre possible d'animals emprats.

Sonia Sánchez Gómez
Responsable en Benestar Animal de l'UEA

Publicacions

Transposition of a pericardial-derived vascular adipose flap for myocardial salvage after infarct

Carolina Gálvez-Montón^{1*†}, Cristina Prat-Vidal^{1†}, Santiago Roura¹, Jordi Farré²,
Carolina Soler-Botija¹, Aida Llucà-Valdeperas¹, Idoia Díaz-Güemes³,
Francisco M. Sánchez-Margallo³, Alejandro Arís⁴, and Antoni Bayes-Genis^{1,5}

¹ICREC (Heart Failure and Cardiac Regeneration) Research Program, IGTP, Cardiology Service, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Ctra. Can Ruti, Camí de les Escoles, s/n, 08916 Badalona, Barcelona, Spain; ²Networking Biomedical Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Barcelona, Spain; ³Jesús Usón Minimally Invasive Surgery Centre, JUMISC, Cáceres, Spain; ⁴Cardiac Surgery Service, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain; and ⁵Department of Medicine, UAB, Barcelona, Spain

Received 4 January 2011; revised 2 April 2011; accepted 11 May 2011

Time for primary review: 28 days

Aims Coronary artery occlusion is associated with the risk of ventricular remodelling, heart failure, and cardiogenic shock. Novel strategies are sought to treat these ominous complications. We examined the effect of a pericardial-derived fat flap secured over an acute infarct caused by coronary occlusion.

Methods and results A novel intervention consisting of the pericardial isolation of a vascularized adipose flap and its transposition fully covering acute infarcted myocardium was developed in the swine model of coronary artery ligation ($n = 52$). Left ventricular (LV) ejection fraction and LV end-diastolic and end-systolic volumes were assessed using magnetic resonance imaging (MRI). Infarct size and gene expression analysis were performed on Day 6 and 1 month. Histological changes, collagen volume fraction (CVF), and vascular density were also evaluated on postmortem sections. One month after the intervention, a 18.8% increase in LV ejection fraction ($P = 0.007$), and significant reductions in LV end-systolic ($P = 0.009$) and LV end-diastolic volumes ($P = 0.03$) were found in treated animals compared with the control-MI group. At Day 6, histopathology confirmed a significant infarct size reduction ($P = 0.018$), the presence of vascular connections at the flap-myocardium interface, and less apoptosis in the infarct border zone compared with control animals ($P < 0.001$). Up-regulation of genes involved in cell cycle progression, cellular growth and proliferation, and angiogenesis were identified within the flap.

Conclusions Our results indicate that a vascular fat flap exerts beneficial effects on LV function and limits myocardial remodelling. Future studies must confirm whether these findings provide an alternative therapeutic approach for myocardial salvage after infarction.

Keywords Infarction • Ventricular function • Cardiovascular surgery • Fibrosis

1. Introduction

Rapid and complete reperfusion of the blocked artery following acute myocardial infarction (MI) is critical to minimize myocardial necrosis and optimize cardiac repair.¹ Therapies to lyse the blood clot² and revascularize the stenotic arteries^{3,4} are effective treatments for acute MI. Nevertheless, frequently before reperfusion can be achieved or even arterial revascularization has been accomplished, cell necrosis initiates a process of adverse ventricular remodelling, leading to chamber dilatation, contractile dysfunction, and eventually cardiogenic shock.^{5,6} Cardiogenic shock complicates 7–10% of cases of acute MI

and is associated with a 70–80% mortality rate.⁷ Novel therapeutic approaches for this condition are actively sought.

To improve cardiac function recovery after infarction, engineered heart tissue^{8–10}, or autologous vascularized tissue flaps may be effective techniques to limit tissue damage. Omentum flaps have been applied to heal anastomoses considered at risk for dehiscence,¹¹ and the transposition of *latissimus dorsi* covering the left ventricle has been tested in patients with refractory heart failure.¹²

In this study, we transposed a pericardial-derived adipose flap over an infarct-related coronary artery region in pigs. Here, we provide 'proof of principle' evidence of histological and functional benefit, as

* Corresponding author. Tel: +34 93 4978662; fax: +34 93 4978654. Email: cgalvezmonton@gmail.com

† C.G.-M. and C.P.-V. contributed equally to this work.

Published on behalf of the European Society of Cardiology. All rights reserved. © The Author 2011. For permissions please email: journals.permissions@oup.com.

well as the potential mechanisms of pericardial adipose flap-aided myocardial salvage after acute coronary occlusion.

2. Methods

This study was approved by the Animal Experimentation Unit Ethical Committee of the Catalan Institute of Cardiovascular Sciences (ICCC) and complies with all guidelines concerning the use of animals in research and teaching as defined by the *Guide For the Care and Use of Laboratory Animals* (NIH Publication No. 80-23, revised 1996).

2.1 Myocardial infarction model

For this study, 52 female crossbreed Landrace X Large White pigs (30–40 kg) were premedicated with azaperone (10 mg/kg, IM; Stresnil[®], Laboratorios Dr Esteve, Barcelona, Spain) followed by pentobarbital sodium (15 mg/kg, IV; Tiobarbital[®] 1 g, B.Braun, Barcelona, Spain). Animals underwent endotracheal intubation, and anaesthesia was maintained by 2% isoflurane inhalation. Fentanyl (0.75 mg/kg/45 min, IV; Fentanest[®], Kern Pharma, Barcelona, Spain) and a 1.5 mg/kg atracurium besylate bolus (Tracrium[®], GlaxoSmithKline, London, UK) were given during intervention. Acute MI was induced by a double-ligation (Prolene 5/0 W8556 12-S, Ethicon, Inc., Somerville, NJ, USA) of the first marginal branch of the circumflex artery, 1.5 cm distal from the atrioventricular groove. Transposition of pericardial adipose flap was performed in the treated group within 30 min after MI induction. In control-MI animals, excision and removal of pericardium and fat preceded coronary occlusion. Tulatromicin (2.5 mg/kg, IM; Draxxin[®], Pfizer Animal Health, Madrid, Spain) was administered at the end of the intervention and a transdermal fentanyl patch was applied to allow analgesic post-operative care (Durogesic[®], Janssen-Cilag, Madrid, Spain). All surgical procedures were done under monitoring conditions with ECG registration and measures of capnography, pulse oximetry, non-invasive arterial blood pressure and temperature.

Animals were randomly distributed into 6-day ($n = 6$ control-MI and $n = 7$ treated) or 1-month ($n = 17$ control-MI and $n = 16$ treated) groups after MI. A subgroup of 1-month pigs ($n = 7$ control-MI and $n = 6$ treated) underwent magnetic resonance imaging (MRI) at multiple time points (baseline, 2 h and 1 month after MI) to assess functional recovery. Three additional control-sham pigs (no MI induction) were sacrificed at 1 month to account for related fat flap changes.

2.2 Pericardial-derived adipose flap intervention

Under sterile conditions, thoracotomy was performed on the fourth left intercostal space to expose the heart, initially covered by the pericardium and pericardial fat (Figure 1A). Using dissection scissors, the pericardial adipose tissue was easily detached, maintaining its vascularization to create the adipose flap (Figure 1B and C). Then, the pericardium was partially excised and the outer surface of the cardiac chambers exposed. After 30 min of MI induction (Figure 1D), myocardium in the affected region became reddish purple and pericardial adipose flap was gently displaced, to fully cover the ischaemic zone (Figure 1E). To secure the flap, edges were sealed to the myocardial healthy zones using 0.1–0.2 mL of cyanoacrylic-based surgical glue (co-monomer of *N*-butyl-2-cyanoacrylate and metacryloxysulpholane; Glubran[®]2, Cardioliink, Barcelona, Spain) (Figure 1F). Figure 1G–K schematically illustrates the sequence of events involved during the pericardial fat flap intervention.

2.3 MRI

Cardiac MRI was performed at 1.5 T (Intera, Philips, Best, The Netherlands) using a phased-array cardiac coil by investigators blinded to the treatment arm. All images were acquired in apnoea with ECG gating.

2.4 Morphometric, histological, and immunohistochemical analysis

After being premedicated, all animals were sacrificed with an intravenous injection of potassium chloride solution. Left ventricular (LV) infarct size was blindly measured in digitally photographed transverse heart sections from 1 cm distally to coronary ligation. Biopsies from infarct core, infarct border and remote myocardium were taken and fixed in 10% buffered formalin or flash frozen in liquid nitrogen. Masson's Trichrome was performed for the primary histological examination. A polarized light microscope was used to measure collagen types I and III on randomly selected Sirius red-stained sections from both infarct core and remote zones.¹³ Vessel area was blindly assessed by measuring Isolectin-B4-stained (Vectors Labs, Peterborough, UK) vessels in infarct core, border, and remote zones from Day 6 and 1-month groups. Moreover, vessel area within the fat flap was analysed: adipose tissue covering the infarct and that in contact with healthy myocardium. Apoptosis was analysed in infarct core and border zones from 6-day group, using an *in situ* cell death detection kit (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain). Quantitative morphometric and histological measurements were completed with Image-Pro Plus software (6.2.1 version; Media Cybernetics, Inc., Bethesda, MD, USA).

2.5 Microarray gene expression and analysis

To detect changes in gene expression profile due to pericardial adipose flap intervention, 36 paired tissue samples from both groups were analysed: infarct core, remote zone, pericardial flap from treated animals, and pericardial adipose tissue from control-MI. Here, we compared gene expression in control-MI pericardial adipose tissue and transposed flap from treated animals both at 6 days and at 1 month after intervention. Moreover, we analysed gene expression in myocardial infarct tissue from control-MI and treated animals at both indicated time points.

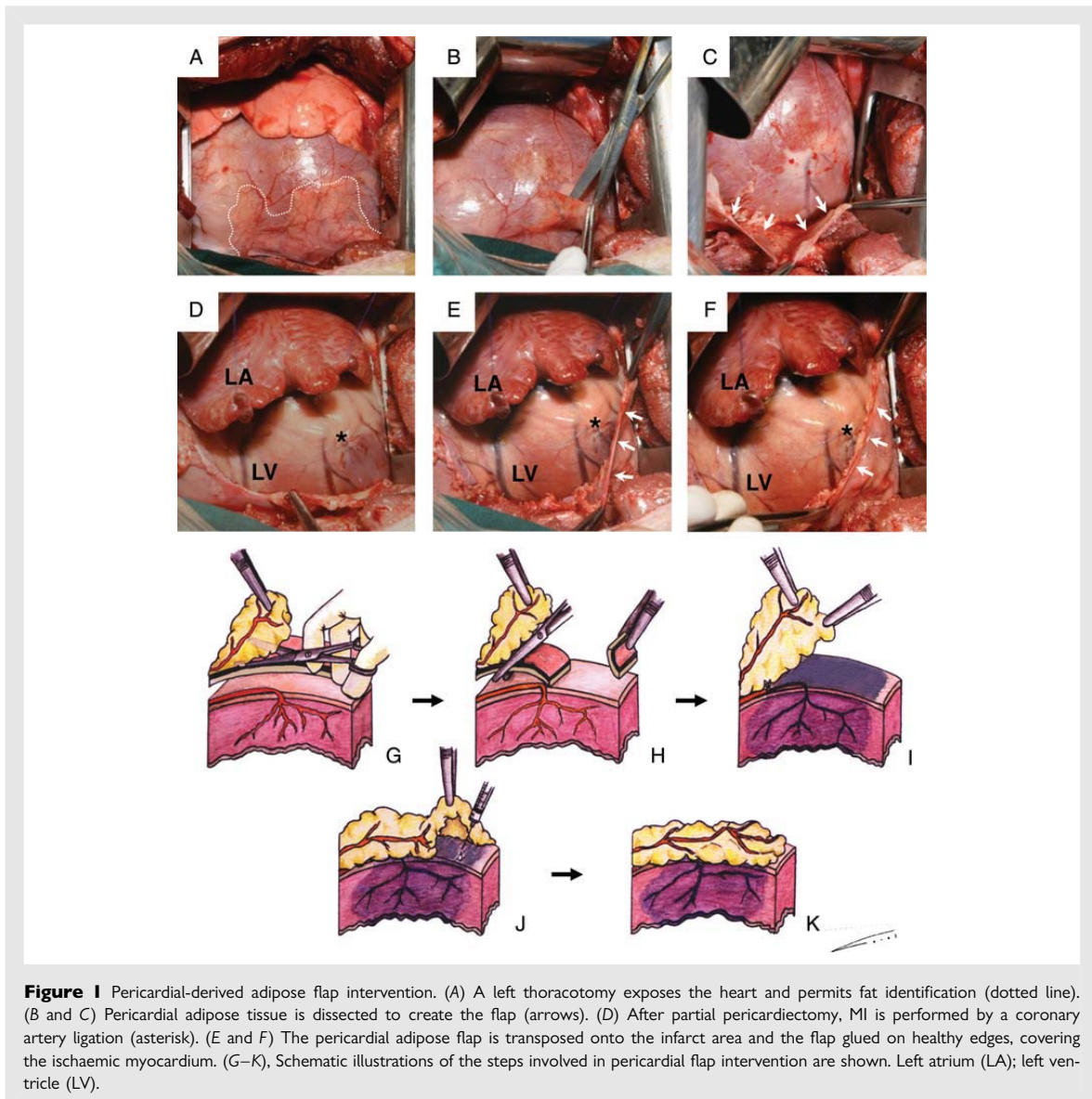
Microarray expression profiles were obtained using the Affymetrix GeneChip[®] Porcine Genome Array (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Briefly, 200 ng of total RNA from each sample was processed, labelled, and hybridized to GeneChip[®] according to the Affymetrix GeneChip[®] 3' IVT Express Kit User Manual. For functional analysis, lists of differentially regulated probe sets were uploaded into the Ingenuity Pathway Analysis online tool (IPA 8.0, Ingenuity System, Inc., www.ingenuity.com).

2.6 Statistical analysis

Data are presented as mean \pm SEM. All analyses were performed with SPSS (15.0.1 version, SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Differences between groups were compared using Student's *t*-test or one-way ANOVA for multiple comparisons, with Tukey's test for the *post hoc* analysis. MRI data were analysed as repeated measures using ANOVA with the Greenhouse–Geisser correction. Values of $P < 0.05$ were considered significant. Microarray data analysis was performed using R and Bioconductor, with an RMA-normalization and non-specific filtering, and limma (linear models for microarray data) package with the false discovery rate correction for the detection of differentially expressed genes.

3. Results

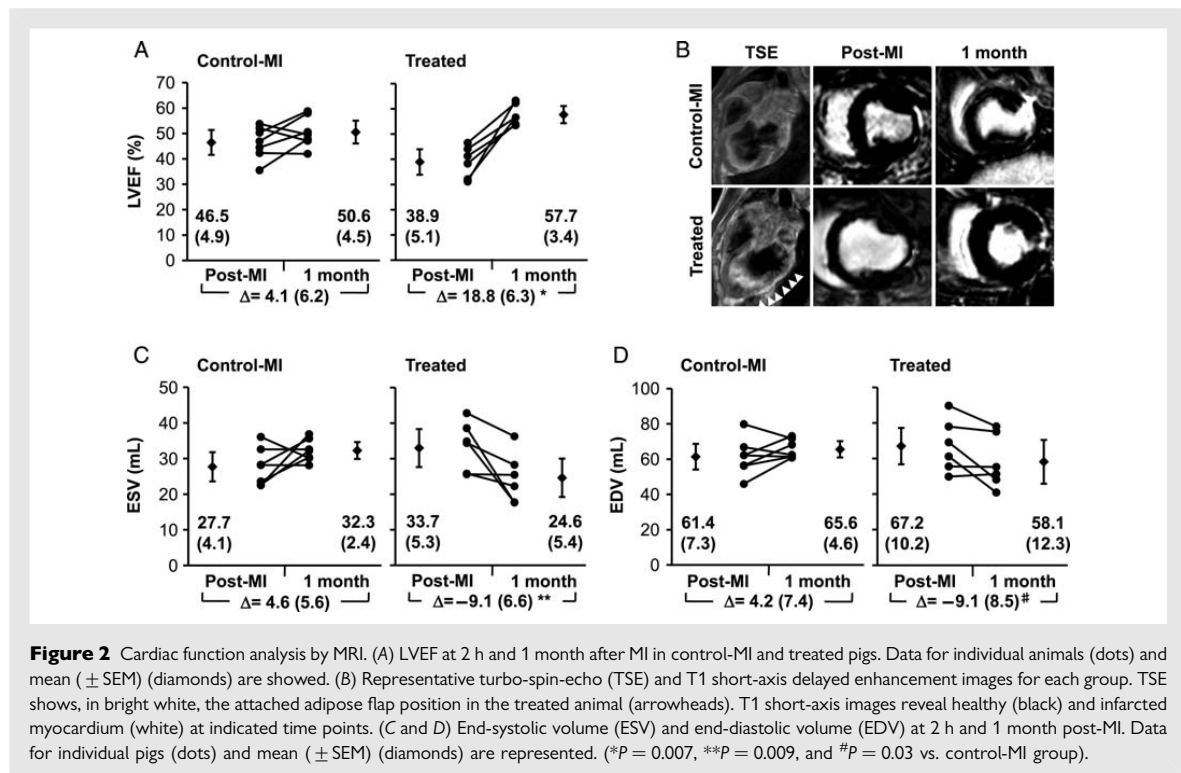
Six out of 52 infarcted pigs died during MI induction (4 due to ventricular fibrillation and 2 asystole). No atrial or ventricular arrhythmias were detected during intervention in surviving animals. In all treated pigs, cardiac examination upon sacrifice showed the fat flap covering the infarct area. Serial blood samples were obtained for cardiac biomarkers to measure acute myocardial damage. Remarkably, no significant differences in the circulating levels of cardiac troponin I (cTnI) and myoglobin were found between treated and control-MI animals (0.9 ± 0.2 vs. 0.7 ± 0.3 $\mu\text{g/L}$, $P = 0.56$; and 451.7 ± 101.2 vs. 425.3 ± 87.7 $\mu\text{g/L}$, $P = 0.85$, respectively).



3.1 Ventricular function

Baseline left ventricular ejection fraction (LVEF) was similar between groups ($P = 0.49$). In control-MI, no significant changes were found between 2 h and 1 month ($P = 0.24$) (Supplementary material online, Table S2). In contrast, the LVEF increased from $38.9 \pm 5.1\%$ post-MI to $57.7 \pm 3.4\%$ before euthanasia in treated animals ($P < 0.001$). The LVEF improvement was five-fold higher in treated compared with control-MI animals (18.8 ± 6.3 vs. $4.1 \pm 6.2\%$; $P = 0.007$) (Figure 2A). Delayed enhancement images, acquired before sacrifice, confirmed infarct size was substantially smaller in treated pigs (Figure 2B).

Analysis of ventricular volumes also showed a beneficial remodelling effect in the adipose flap group. In treated animals, end-systolic volume (ESV) significantly decreased between post-MI and 1 month without significant changes over time in end-diastolic volume (EDV) (Supplementary material online, Table S2). In control-MI pigs, ESV showed tendency to increase and EDV significantly increased between 2 h and 1 month due to adverse LV remodelling (see Supplementary material online, Table S2). Comparison between groups showed significant volume differences over time (-9.1 ± 6.6 vs. 4.6 ± 5.6 mL; $P = 0.009$ and -9.1 ± 8.5 vs. 4.2 ± 7.4 mL; $P = 0.03$, for ESV and EDV in treated vs. control-MI, respectively) (Figure 2C and D).



3.2 Scar maturation and collagen content

A set of experiments was done to analyse gross histopathological changes ($n = 33$ pigs). Thirteen swine were euthanized 6 days after MI. In control-MI animals, myocardial necrosis involved nearly the full thickness of the ventricular wall in all cases with abundant red blood cell extravasation (Figure 3A). Light microscopy revealed loss of cross striations with appearance of focal hyalinization and interstitial tissue oedema (Figure 3E). In contrast, all treated animals developed non-transmural infarcts (Figure 3B), and only one had scattered zones of macroscopic haemorrhage. Histologically, less oedema and a greater amount of salvaged myocardial tissue was observed in treated animals (Figure 3F). Morphometry revealed that LV infarct area was significantly smaller in treated compared with control-MI pigs (5.1 ± 1.4 vs. $12.9 \pm 3.6\%$; $P = 0.018$) (Figure 3I).

At 1-month after MI a layer of viable subendocardium (that derives its oxygen directly from the ventricular cavity) was often present in all animals (Figure 3C and D). The necrotic muscle fibres and extravasated red cells were dissolved. At this stage, the infarcted area converted into a firm connective tissue scar in control-MI animals (Figure 3G). Interspersed intact muscle fibres were found more abundantly and LV infarct area was smaller in treated pigs (4.4 ± 2.3 vs. $7.7 \pm 3\%$; $P = 0.049$) (Figure 3H and J).

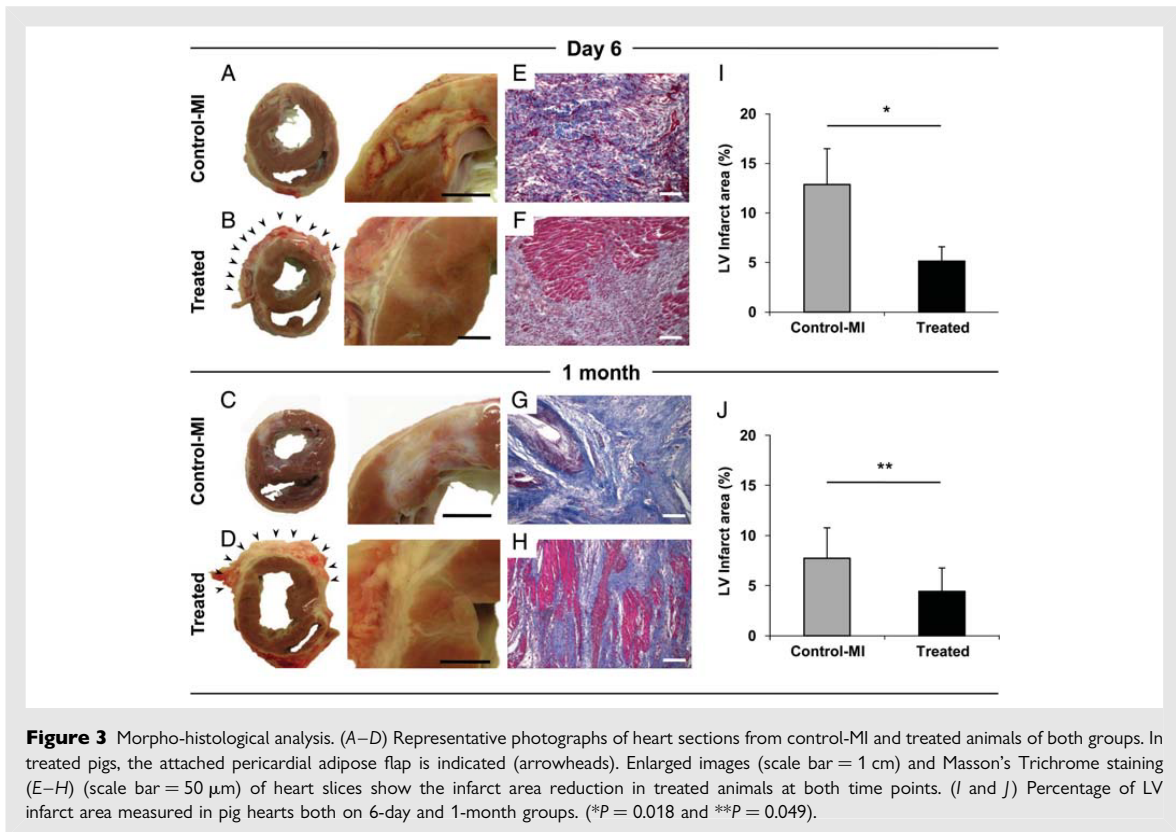
Collagen content was measured in infarct core and remote myocardium (Figure 4A–E). On Day 6 after MI, collagen volume fraction (CVF) at the infarct core was $2.4 \pm 0.4\%$ in treated and $7.5 \pm 0.5\%$ in control-MI pigs ($P < 0.001$). Collagen type III accounted for only 7% of extracellular matrix in control-MI group while it rose up to 33% of

total collagen in treated animals. At the remote myocardium, CVF was $0.4 \pm 0.1\%$ in treated and $1.8 \pm 0.6\%$ in control-MI pigs ($P = 0.014$) (Figure 4E). After 1 month, the mature fibrous scar characteristics were similar among groups (CVF: 53.7 ± 14.5 vs. $43.8 \pm 13.2\%$; $P = 0.67$; collagen type I: 91.4 ± 10.8 vs. $87.9 \pm 10.8\%$; $P = 0.96$; and collagen type III: 8.6 ± 10.8 vs. $12.1 \pm 10.8\%$; $P = 0.96$).

3.3 Vascular connections in the flap-myocardium boundary

We studied whether vascularization processes participated in the benefit obtained by the adipose flap. As early as 6 days after treatment, lectin-positive microvessels connecting the vascular flap with the underlying myocardium became apparent (Figure 5A and B). Remarkably, in control-sham pigs (fat flap applied on top on non-infarcted myocardium) these connections were not identified (data not shown). Interestingly, the flap intimately contacting the acutely ischaemic myocardium became intensely vascularized. Vessel area at the flap increased eight-fold compared with unstimulated fat (flap edges covering healthy myocardium) (2.4 ± 0.9 vs. $0.3 \pm 0.2\%$; $P < 0.001$) (Figure 5C–E). In myocardial tissue samples, comparison of the control-MI and treated group revealed no differences in vessel density in infarct, remote, and border zones at 6 days ($P = 0.92$, $P = 0.57$, and $P = 0.33$, respectively) and after 1 month ($P = 0.3$, $P = 0.18$, and $P = 0.55$, respectively).

Increased vascular supply might enhance cell viability. Here, we found at Day 6, a significant reduction in apoptotic cells in the infarct border zone of animals receiving the flap treatment ($18 \pm$



20 vs. $64 \pm 17\%$; $P < 0.001$) (Figure 5F and G). Within the infarct core, a very limited number of cells undergoing apoptosis were identified in both treated (Figure 5I) and control-MI (Figure 5H) animals (24 ± 27 vs. $12 \pm 16\%$; $P = 0.4$) (Figure 5J).

3.4 Gene expression analysis

Finally, we analysed mRNA expression at 6-day and 1-month groups. Of $\sim 11\,265$ annotated genes interrogated, 81 genes showed differential regulation by the treatment in at least one condition (Figure 6A and B). In the pericardial adipose tissue at Day 6, 13 unique regulated genes were increased and 10 were decreased; at 1 month, 2 unique regulated genes were increased and 13 were decreased; moreover, 10 of the 38 total regulated genes in adipose tissue were altered on both 6-day and 1-month groups (Figure 6A; Supplementary material online, Table S1A–C). Remarkably, all 10 of these common genes, which correspond mostly with transcripts encoding acute phase response proteins, were up-regulated on Day 6 and down-regulated at 1 month (Supplementary material online, Table S1B).

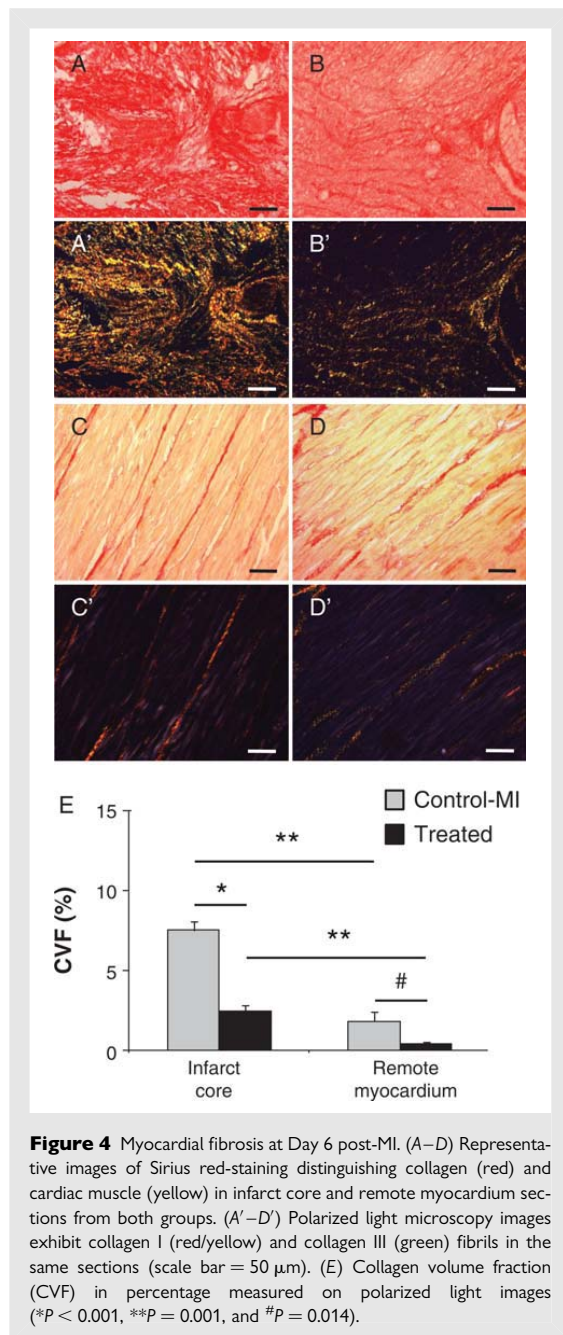
To elucidate which adipokines might participate in the beneficial effect exerted by the flap, we analysed the expression pattern of 56 adipose tissue-related target genes. Comparing stimulated vs. non-stimulated flap, we found 19 related genes interrogated in microarray data, most of them up-regulated (FGF-2, IGF-1, VEGF, TGFB3, TF, IL-18, $\alpha 2$ -macroglobulin, VCAM-1, ICAM-1, fibronectin, lysyl oxidase, and apelin). Additionally, we only detected VEGF expression by immunohistochemistry in the stimulated-pericardial adipose flap

(see Supplementary material online, Figure S1). In infarct core tissue, 15 unique regulated genes were detected on Day 6; 5 were up-regulated and the remaining down-regulated (Figure 6B; Supplementary material online, Table S1D). At 1 month, 18 unique regulated genes were detected; the majority of them was down-regulated and only 2 were increased (Figure 6B; Supplementary material online, Table S1E). No common genes were found at the two studied time points in infarct core tissue.

Furthermore, IPA identified top genes and functions, and canonical pathways associated with the differentially expressed genes for each comparison analysed. Interestingly, in pericardial adipose tissue, early transcriptional response on Day 6 was dominated by up-regulation of genes involved in cell cycle progression, cellular growth and proliferation, and angiogenesis and blood vessel development (Figure 6C). In addition, those involved in cellular movement and inflammatory response were also up-regulated (Figure 6C).

4. Discussion

In this study, we examined the effect of a vascular adipose flap wrapped around oxygen-deprived myocardium in the porcine model. Our data show that a vascularized adipose flap, isolated from the pericardial surface, exerts beneficial effects on LV function. These effects may be partly explained by at least three mechanisms: First, LV volumes were smaller in treated animals, mainly due to reduction in the infarct scar by the flap, and also by direct effects



on the collagen network of the heart. Second, vascular communications developed between the transposed adipose flap and the recipient ischaemic bed. Finally, the former might contribute to cell survival in the infarct border after implantation.

Current techniques used to salvage infarcted myocardium rely on the revascularization of the major epicardial coronary arteries.^{3,4} However, the adverse prognosis of cardiogenic shock resulting from acute MI remains a major challenge for cardiologists and

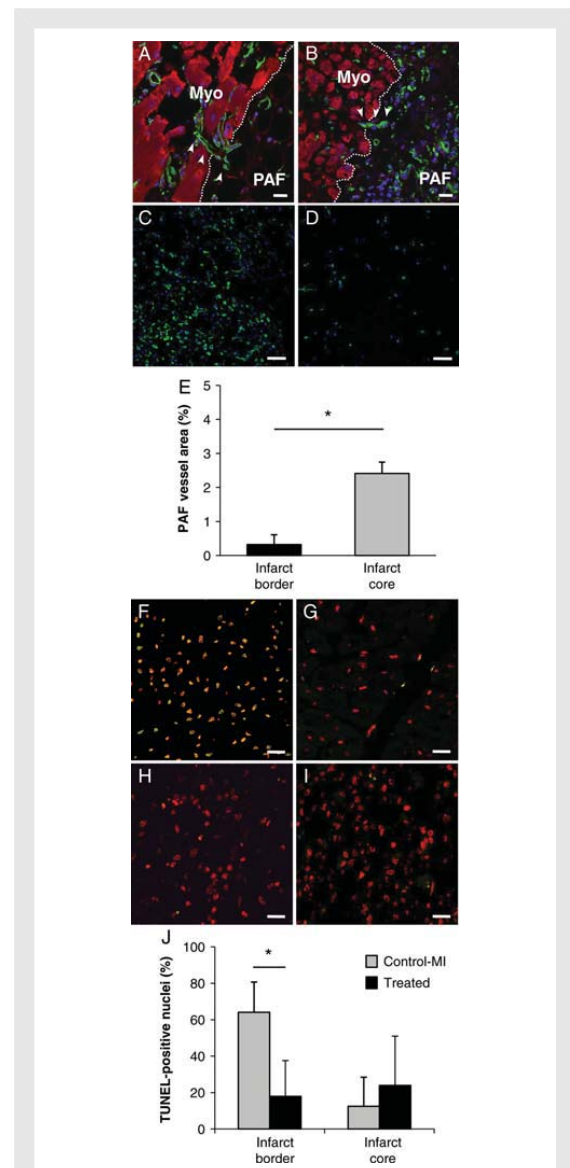
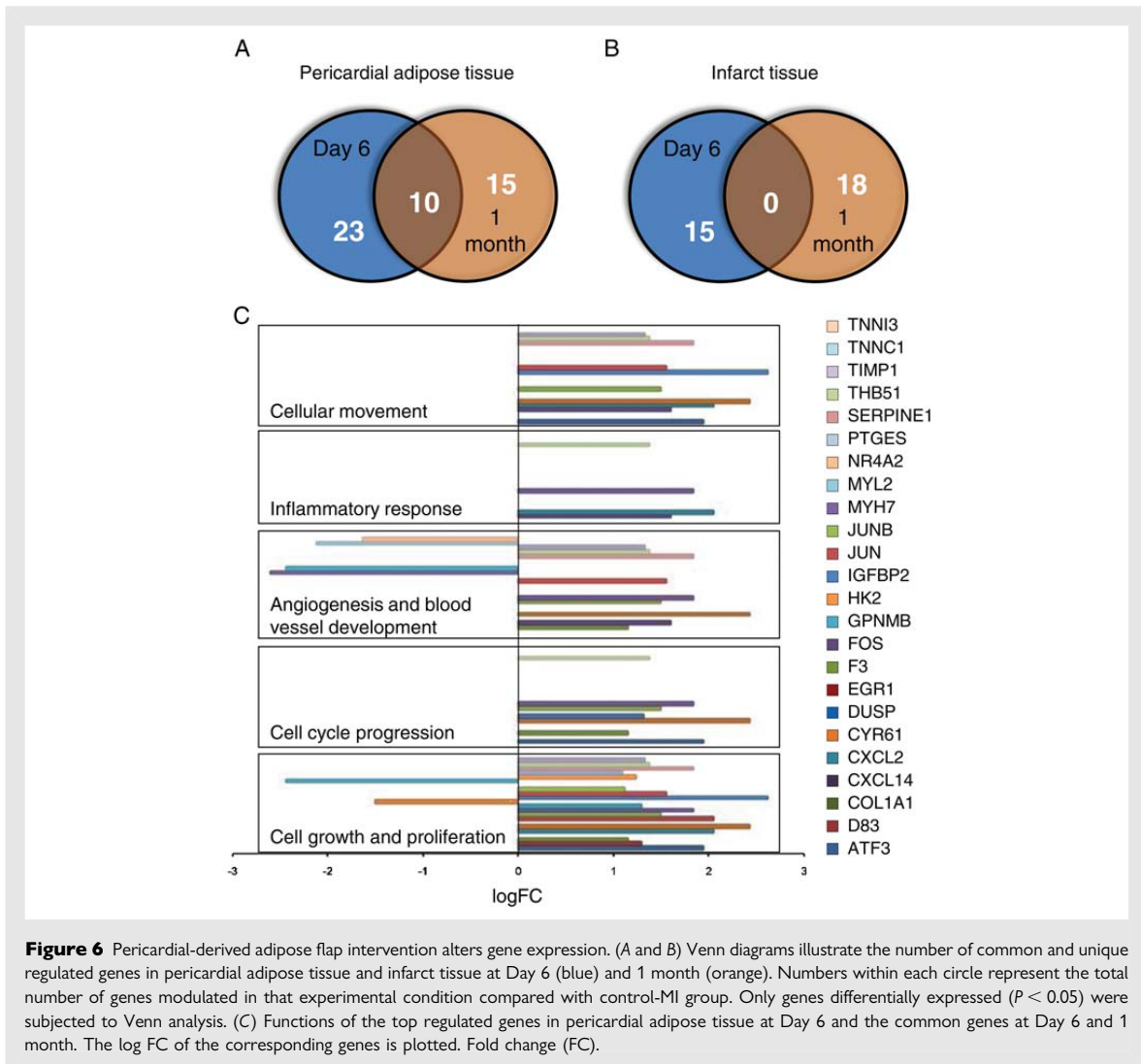


Figure 5 Microvessels at the fat flap–ischaemic myocardium interface and apoptosis in myocardium 6 days after intervention. (A and B) Immunohistochemistry against cTnI (red) with Isolectin-B4 (green) and nuclei-Hoechst 33342 (blue) staining shows vascular tubes (arrows) connecting the pericardial adipose flap (PAF) and the myocardium (Myo) boundary (dotted line) (scale bar = 50 μ m). Representative lectin-stained sections of adipose pedicle stimulated by the ischaemic myocardium (C) and flap edges (D) close to healthy myocardium (scale bar = 20 μ m). (E) Percentage of vessel area within the flap. Data represent mean (\pm SEM) of the vessel area occupied per field. (F–I) Representative confocal microscopy images showing TUNEL-positive cells in infarct border (F and G) and infarct core (H and I) from control-MI (F and H) and treated (G and I) animals. The overlaid colour (yellow–orange) corresponds to the sum of TUNEL labelling (green) and the counterstained nuclei (red) (scale bar = 20 μ m). (J) TUNEL-positive nuclei per field in myocardial zones from both groups. (* P < 0.001).



cardiovascular surgeons,^{6,7} particularly in patients in whom no patent arteries are available for revascularization.^{1,14} Over the years, there have been a few efforts to indirectly revascularize the ischaemic heart, including the simple insertion of the internal mammary artery into a hole made in ischaemic myocardium¹⁵ or transmyocardial perforation with lasers to allow perfusion of the ischaemic myocardium, mimicking the sinusoids seen in reptilian hearts.¹⁶ Unfortunately, these methods were either unsuccessful or successful only in selected patients with particular categories of disease.

Dynamic cardiomyoplasty using *latissimus dorsi* muscle was developed to treat congestive heart failure.¹⁷ However, long-term clinical data showed only modest benefit and skeletal muscle fatigue secondary to chronic continuous electrical stimulation. In recent years, there has been a totally innovative approach to surgical treatment of failing myocardium by implanting a mesh wrap around the heart (Acorn

CorCap devices).¹⁸ Despite the promise, the early enthusiasm has been tempered in light of preliminary clinical data.

Indirect revascularization of damaged organs, by means of vascular grafts, has been achieved with more accomplishment.^{19,20} Our investigation shows new microvessels develop to bridge the interface between adjacent adipose tissue and ischaemic myocardium. In control-sham animals these vascular connections were not found, thus, demonstrating that tissue injury and hypoxia appear to be strong stimuli for the formation of such collaterals. The temporal stages of blood vessel development have been well described.²¹ We already found microvessels on Day 6 after MI at the interface between the pericardial-derived adipose flap and the acutely ischaemic myocardium. Several studies suggest that the invasion of new blood vessels into various tissues occurs within 2–7 days,^{22,23} and the time course of angiogenesis in this model is consistent with

those studies. This newly developed collateral circulation may improve local oxygen tension at the flap-myocardium boundary and decrease myocardial tissue hypoxia.

Studies of myocardial samples from patients who died from acute MI show typical apoptotic myocytes, mainly in the border zone of the infarcted myocardium.^{24,25} In the present study, we provided further evidence demonstrating that the fat flap intervention improved cardiac function parameters, particularly ejection fraction, and significantly decreased infarct size. These findings in the treated group could be explained by an ischaemic myocardial cell death reduction, as shown in a subgroup of pigs sacrificed early 6 days after coronary artery ligation.

The increment in contractility observed by pericardial adipose flap intervention is far greater than that obtained with other strategies such as stem cell therapy and tissue engineering. A recent meta analysis of 18 studies and 999 patients concluded that the available evidence suggests bone marrow cell transplantation is associated only with modest improvements in physiological and anatomical parameters (pooled LVEF difference 3.7%).²⁶ The development of engineered heart tissue for cardiac repair is evolving at a quick pace, yet several important questions remain for its potential clinical application, such as the use of autologous cells with cardiogenic potential and graft immunogenicity.^{8,10} Moreover, these engineered approaches have been tested in small rodents with limited benefit in terms of global increase in ejection fraction parameters.⁹ Here, we propose an alternative approach using autologous pericardial adipose tissue as a vascularized and biological membrane. In our model, mean global LVEF increased by 19% in the adipose flap group and 4% in the control group. Most importantly, our data were obtained in the swine post-infarction model, the animal model with the highest similarity to the human heart in size and physiology.²⁷

Many studies have described the myocardium and perivascular adipose tissue as well-known sources of hormones, which might exert important autocrine, paracrine, and endocrine effects.²⁸ Such hormones might participate in the early beneficial role of the flap, yet in this study we have not been able to obtain temporal tissue samples in a day to day basis to confirm such effects. However, evidence accumulates that adipose-derived hormones can offer cardioprotective effects against ischaemia, including attenuation of cardiomyocyte apoptosis, reduction in infarct size, and modulation of collagen I/III ratio.²⁹

Our results indicate an up-regulation of the potent angiogenic factor VEGF accompanied by hypervascularization only in the infarct-stimulated adipose flap. This is consistent with up-regulation of angiogenic and blood vessel development genes found in the stimulated pericardial adipose flap and with the appearance of vascular communications at the flap-myocardium boundary. We hypothesized that secreted VEGF by adipose tissue has an autocrine effect promoting angiogenesis within the flap. Moreover, a paracrine effect of VEGF in infarcted myocardium might activate the pro-survival Erk 1/2 cascade conferring cardioprotection.³⁰

Using polarized light, we were able to detect changes in the structural organization of collagen during scar maturation. The finding of both type I and type III collagen in the scar is consistent with other work on wound healing.³¹ The increased amount of type III collagen is typical of the healing process, and the presence of type III fibres is an important feature for subsequent laying down of type I fibres. In animals covered by the adipose flap, we identified more type III fibres at Day 6. The mechanism by which the flap modulates scar

maturation remains elusive; however, modulation of the collagen network may have important implications in the beneficial effect observed by the flap. Myocardial remodelling after infarction is characterized by a change in the proportion of collagens I and III, with an increase in the I/III ratio.³² Type III collagen provides the framework for the alignment of type I fibres, essential to maintain the shape and contribute to the passive and active stiffness of the myocardium,³³ thus limiting remodelling of the ventricular chambers. Indeed, in our functional experiments, we found less remodelling and less gadolinium retention in treated animals.

Pericardial adipose flap intervention altered gene expression in both myocardial infarct tissue and in the transposed adipose tissue, but only 81 genes appear to be differentially regulated. This may be partially explained by the *P* cut-off criterion which balances sensitivity and specificity in microarray studies.³⁴ In this study, common altered genes between remote myocardium and infarct core zones were discarded, as well as common genes among healthy adipose tissue and non-treated adipose tissue (control-MI) and/or treated flap. Therefore, our results highlight those genes significantly altered by the treatment irrespective of the infarction itself. Remarkably, in pericardial adipose tissue we found up-regulation of genes involved in angiogenesis and blood vessel development, a finding consistent with the hypervascularization of the stimulated flap and with the appearance of vascular communications at the flap-myocardium boundary.

Coronary artery revascularization is the most effective treatment for acute MI, and all other approaches to salvage myocardium, including the present intervention, may only be considered when revascularization (either by percutaneous or surgical means) is not feasible. One major drawback of this pericardial-derived fat flap intervention, in terms of potential clinical applications, is the need for thoracotomy to gain access to the heart. The use of thoracoscopy for controlled dissection and transposition of the flap would be ideal.

In conclusion, transposition of a pericardial-derived adipose flap exerts beneficial effects on LV function after acute MI in the swine model. The application of a vascularized adipose flap limits LV remodelling, by means of reducing the infarct size and improving cell survival mediated by an enhanced vascular supply. Although we neither observed nor expected complete reversal of myocardial dysfunction after flap engraftment, we believe our study can serve as a proof of principle for a vascular flap approach to salvage cardiac muscle in acute MI.

Supplementary material

Supplementary material is available at *Cardiovascular Research* online.

Acknowledgements

We thank T. Bosch and D. Padrol for surgical assistance; C. Díez for support in data analysis; M. Martí and J.R. Lima for their expert technical assistance; J. Maestre, S. Javato, and V. Crisóstomo for helping with MRI execution and analysis; and A. Ferrero for help on statistical analysis.

Conflict of interest: none declared.

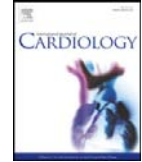
Funding

This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo, [CD07/00163 to C.P.-V.]; Ministerio de Ciencia e

Inovación [SAF2008-05144-C02-01 to A.B.-G.]; La Marató de TV3 [080330 to A.B.-G.]; and from European Commission, 7th Framework Programme [RECATABI, NMP3-SL-2009-229239 to A.B.-G.].

References

- Antman EM, Anbe DT, Armstrong PW, Bates ER, Green LA, Hand M et al. ACC/AHA guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to Revise the 1999 Guidelines for the Management of Patients with Acute Myocardial Infarction). *Circulation* 2004;**110**: e82–e292.
- Boersma H, Califf R, Collins R, Deckers JW, Simoons ML. Selection of reperfusion therapy for individual patients with evolving myocardial infarction. *Eur Heart J* 1997; **18**:1371–1381.
- Favaloro RG. Saphenous vein graft in the surgical treatment of coronary artery disease. Operative technique. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1969;**58**:178–185.
- Gruntzig A. Transluminal dilatation of coronary-artery stenosis. *Lancet* 1978;**1**:263.
- Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. Cardiac remodeling—concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *J Am Coll Cardiol* 2000;**35**:569–582.
- Hochman JS, Sleeper LA, Webb JG, Sanborn TA, White HD, Talley JD et al. Early revascularization in acute myocardial infarction complicated by cardiogenic shock. SHOCK Investigators. Should We Emergently Revascularize Occluded Coronaries for Cardiogenic Shock. *N Engl J Med* 1999;**341**:625–634.
- Goldberg RJ, Gore JM, Alpert JS, Osganian V, de Groot J, Bade J et al. Cardiogenic shock after acute myocardial infarction. Incidence and mortality from a community-wide perspective, 1975–1988. *N Engl J Med* 1991;**325**:1117–1122.
- Simpson D, Liu H, Fan TH, Nerem R, Dudley SC Jr. A tissue engineering approach to progenitor cell delivery results in significant cell engraftment and improved myocardial remodeling. *Stem Cells* 2007;**25**:2350–2357.
- Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H et al. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med* 2006;**12**:459–465.
- Zimmermann WH, Melnychenko I, Wasmeier G, Didie M, Naito H, Nixdorff U et al. Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts. *Nat Med* 2006;**12**:452–458.
- Shrager JB, Wain JC, Wright CD, Donahue DM, Vlahakes GJ, Moncure AC et al. Omentum is highly effective in the management of complex cardiothoracic surgical problems. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;**125**:526–532.
- Magovern JA, Furnary AP, Christlieb IY, Kao RL, Magovern GJ. Right latissimus dorsi cardiomyoplasty for left ventricular failure. *Ann Thorac Surg* 1992;**53**:1120–1122.
- Nicoletti A, Heudes D, Hinglais N, Appay MD, Philippe M, Sassy-Prigent C et al. Left ventricular fibrosis in renovascular hypertensive rats. Effect of losartan and spironolactone. *Hypertension* 1995;**26**:101–111.
- Giugliano RP, Braunwald E. Selecting the best reperfusion strategy in ST-elevation myocardial infarction: it's all a matter of time. *Circulation* 2003;**108**:2828–2830.
- Unger EF, Sheffield CD, Epstein SE. Creation of anastomoses between an extracardiac artery and the coronary circulation. Proof that myocardial angiogenesis occurs and can provide nutritional blood flow to the myocardium. *Circulation* 1990;**82**: 1449–1466.
- Stone GW, Teirstein PS, Rubenstein R, Schmidt D, Whitlow PL, Kosinski EJ et al. A prospective, multicenter, randomized trial of percutaneous transmyocardial laser revascularization in patients with nonrevascularizable chronic total occlusions. *J Am Coll Cardiol* 2002;**39**:1581–1587.
- Chachques JC, Grandjean P, Schwartz K, Mihaileanu S, Fardeau M, Swynghedauw B et al. Effect of latissimus dorsi dynamic cardiomyoplasty on ventricular function. *Circulation* 1988;**78**:III203–III216.
- Jugdutt BI. Current and novel cardiac support therapies. *Curr Heart Fail Rep* 2009;**6**: 19–27.
- Rocha LS, Paiva GR, de Oliveira LC, Filho JV, Santos ID, Andrews JM. Frontal reconstruction with frontal musculocutaneous V-Y island flap. *Plast Reconstr Surg* 2007;**120**: 631–637.
- Motegi S, Tamura A, Abe M, Okada E, Nagai Y, Ishikawa O. Reverse latissimus dorsi musculocutaneous flap for reconstruction of lumbar radiation ulcer. *J Dermatol* 2007;**34**:565–569.
- Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987;**235**:442–447.
- Morgan E, Lima O, Goldberg M, Ferdman A, Luk SK, Cooper JD. Successful revascularization of totally ischemic bronchial autografts with omental pedicle flaps in dogs. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1982;**84**:204–210.
- Pevce WC, Ndoye A, Brinsky JL, Wiltse S, Cheung AT. New blood vessels can be induced to invade ischemic skeletal muscle. *J Vasc Surg* 1996;**24**:534–541; discussion 541–534.
- Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Henriksen K, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM. Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation* 1997;**95**:320–323.
- Veinot JP, Gattinger DA, Fliss H. Early apoptosis in human myocardial infarcts. *Hum Pathol* 1997;**28**:485–492.
- Abdel-Latif A, Bolli R, Tleyjeh IM, Montori VM, Perin EC, Hornung CA et al. Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med* 2007;**167**:989–997.
- Weaver ME, Pantely GA, Bristow JD, Ladley HD. A quantitative study of the anatomy and distribution of coronary arteries in swine in comparison with other animals and man. *Cardiovasc Res* 1986;**20**:907–917.
- Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 2000;**11**:327–332.
- Sweeney G. Cardiovascular effects of leptin. *Nat Rev Cardiol* 2010;**7**:22–29.
- Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK) pathway. *Cardiovasc Res* 2004;**61**:448–460.
- Whittaker P, Boughner DR, Kloner RA. Analysis of healing after myocardial infarction using polarized light microscopy. *Am J Pathol* 1989;**134**:879–893.
- Marjjanowski MM, Teeling P, Mann J, Becker AE. Dilated cardiomyopathy is associated with an increase in the type I/type III collagen ratio: a quantitative assessment. *J Am Coll Cardiol* 1995;**25**:1263–1272.
- Weber KT. Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol* 1989;**13**:1637–1652.
- Shi L, Jones WD, Jensen RV, Harris SC, Perkins RG, Goodsaid FM et al. The balance of reproducibility, sensitivity, and specificity of lists of differentially expressed genes in microarray studies. *BMC Bioinformatics* 2008;**9**(Suppl. 9):S10.



Post-infarction scar coverage using a pericardial-derived vascular adipose flap. Pre-clinical results[☆]

Carolina Gálvez-Montón^{a,1}, Cristina Prat-Vidal^{a,1}, Santiago Roura^a, Carolina Soler-Botija^a,
Aida Lluçia-Valldeperas^a, Idoia Díaz-Güemes^b, Francisco M. Sánchez-Margallo^b, Antoni Bayes-Genis^{a,c,*}

^a ICREC (Heart Failure and Cardiac Regeneration) Research Program, IGTP, Cardiology Service, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona, Spain

^b Jesús Usón Minimally Invasive Surgery Centre, JUMISC, Cáceres, Spain

^c Department of Medicine, UAB, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 August 2011

Received in revised form 29 October 2011

Accepted 4 November 2011

Available online xxx

Keywords:

Chronic infarction

Cardiovascular intervention

Flap transposition

ABSTRACT

Background: Myocardial salvage after coverage with a fat flap was recently demonstrated in acute coronary occlusion. The effect of this novel therapeutic strategy on a chronic myocardial scar is unknown.

Methods: Myocardial infarction (MI) was induced by coil deployment in the mid circumflex artery in the swine model. Two weeks after infarction, a pericardial-derived adipose flap was transposed, fully covering the scar, in the treated group. Infarct size and histopathology were analyzed on *post mortem* sections. To assess cell migration, adenoviral eGFP vectors were injected in the adipose flap and expression was evaluated upon sacrifice both at the flap and myocardium. Magnetic resonance imaging (MRI) was used to measure left ventricular (LV) ejection fraction and ventricular volumes at baseline, 2 weeks post-MI, and at 6 weeks.

Results: One month after flap transposition, histopathology confirmed a 34% reduction in infarct size (8.7% vs. 5.7%; $P = 0.04$) and the presence of vascular connections at the flap-myocardium interface. High eGFP expression was detected at the infarct core both at the gene and protein level (negligible signal was detected at the flap on sacrifice). At the functional level, changes in LV ejection fraction and volumes (end-systolic and end-diastolic) were not significantly different between groups (all P values > 0.1).

Conclusions: Our data support the use of post-infarction scar coverage with a pericardial-derived fat flap to reduce infarct size, due partly to neovascular connections and cell trafficking at the flap-myocardium interface. Further studies are needed to validate the functional and clinical relevance of this intervention.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Myocardial infarction (MI) remains a leading cause of morbidity and mortality in developed and developing countries [1]. MI is generally caused by inappropriate oxygen availability due to constriction or blockage of the coronary arteries supplying the heart, leading to irreversible cardiomyocyte loss and depressed left ventricular (LV) pump function. Fortunately, our current therapeutic armamentarium includes treatments to lyse the blood clot [2] and revascularize the stenotic arteries (mainly primary percutaneous coronary intervention or

coronary artery bypass graft surgery), [3,4] which are effective in limiting infarct size. However, many patients receive medical assistance too late; therefore, by the principle “time is myocardium”, a myocardial scar is usually inevitable.

Numerous wound-healing surgeries are based on the creation and transposition of a pediculated flap as a source of blood supply to support damaged tissue. Representative examples are cardiomyoplasty [5] or the transposition of *latissimus dorsi* over the left ventricle in patients with refractory heart failure [6]. Along these lines, we recently developed a novel interventional approach consisting of the transposition of a pericardial-derived adipose flap after acute coronary occlusion to salvage ischemic myocardium [7]. Numerous vascular connections at the flap-myocardium interface were identified, together with a reduction in infarct size at the histological level, positive remodeling, and a marked increase (~19%) in left ventricular ejection fraction (LVEF) assessed by magnetic resonance imaging (MRI). In acute infarction, the release of a plethora of proangiogenic cytokines may have driven this neovascular process. In chronic myocardial infarction, when maturation of the scar is achieved and the cytokine party is over, it is uncertain whether a fat flap transposition may be useful. Accordingly, we tested the effect of post-

[☆] Grant Support: This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo, Sara Borrell Grant to C.P.-V. [CD07/00163]; Ministerio de Ciencia e Innovación [SAF 2008-05144-C02-01 to A.B.-G.]; La Marató de TV3 [080330 to A.B.-G.]; and from Fundació Privada Daniel Bravo Andreu.

* Corresponding author at: ICREC (Heart Failure and Cardiac Regeneration) Research Program, Head of Cardiology Service, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Crta. Canyet, s/n, 08916 Badalona, Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 4973743; fax: +34 93 4978654.

E-mail address: abayes.germantrias@gencat.cat (A. Bayes-Genis).

¹ Both authors contributed equally to this work.

infarction scar coverage using a pericardial-derived vascular adipose flap in the porcine model of chronic MI.

2. Materials and methods

The authors of this manuscript have certified that they comply with the Principles of Ethical Publishing in the International Journal of Cardiology [8].

This study was approved by local Animal Experimentation Unit Ethical Committee and complies with all guidelines concerning the use of animals in research and teaching as defined by the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NIH Publication No. 80–23, revised 1996).

2.1. Study design

MI was experimentally induced in Landrace X Large White pigs (20–30 kg) by coil deployment in the first marginal branch of the circumflex artery. A total of 16 swine were randomly distributed into control-MI ($n=8$) and treated ($n=8$) groups. Pericardial-derived adipose flap intervention was applied as a treatment 2 weeks after MI induction. MRI was performed at baseline, at 2 weeks, and 6 weeks post-MI (prior to sacrifice). To demonstrate cell migration and trafficking from the flap to the myocardium, an additional proof of principle experiment was performed in which Ad5-eGFP viral particles were injected in the adipose flap ($n=1$). The study design is depicted in Fig. 1.

2.2. Chronic MI model

Pigs (20–30 kg) were premedicated with an IM mixture of ketamine (20 mg/kg; Ketolar®, Parke-Davis, Pfizer Animal Health, Madrid, Spain), diazepam (0.25 mg/kg; Valium®, Roche Diagnostics, S.L., Madrid, Spain), and atropine (0.25 mg/kg; Atropina® Braun, B. Braun Medical, S.A., Barcelona, Spain). Anaesthetic induction was done with propofol (4 mg/kg, IV; Recofol®, Bayer Schering Pharma, Barcelona, Spain). Animals underwent endotracheal intubation, and anaesthesia was maintained by 2% sevoflurane inhalation. A continued IV infusion of Ketorolac (0.15 mg/kg/h; Toradol®, Roche) and tramadol (0.5 mg/kg/h; Adolonta®, Grünenthal Pharma, S.A., Madrid, Spain) was used as an intraoperative analgesic. At the beginning of the intervention, a 1 mg/kg lidocaine bolus (IV, Lidocaina® 2%, B. Braun) was administered, followed by a continuous infusion (1 mg/kg/h) maintained for 1 h after coil deployment. At the end of the surgery, 2.5 mg/kg of tulatromicin, IM (Draxxin®, Pfizer) was administered as antibiotic therapy.

After engaging the left main artery using a 6-F AR1 guide catheter, a left lateral MI was experimentally induced by percutaneous embolization coil deployment (VortX-18 Diamond 3 mm/3.3 mm coil, Boston Scientific/Target, Natick, MA, USA) in the first marginal branch of the circumflex artery. All surgical procedures were done under monitoring conditions with ECG registration and measures of capnography, pulse oximetry, non-invasive arterial blood pressure, and temperature. The onset of ST segment elevation on the ECG was used to assess MI. Complete coronary occlusion (TIMI flow score = 0) was confirmed by angiography in all cases (Supplementary Fig. 1).

2.3. Pericardial-derived adipose flap transposition

Two weeks after MI induction, animals underwent a left lateral thoracotomy on the fourth intercostal space to expose the heart. First, the myocardial scar was localized in the LV lateral wall; then, a vascularized pericardial adipose flap was displaced to fully cover the necrotic zone in treated pigs, as previously described in detail [7]. Briefly, the vascularized pericardial adipose flap was detached and, after a pericardiectomy, displaced and sealed over the necrotic scar. In control-MI pigs, pericardium and fat were excised and removed. In the Ad5-eGFP experiment, adenoviral vectors (2.25×10^{10} TU, in 750 μ l basal DMEM) were injected at 10 different sites in the clamped adipose flap during the intervention 5 min before sealing the flap to the myocardium.

2.4. Morphometric, histological, and immunohistochemical analysis

After premedication with ketamine, diazepam, atropine, and propofol as previously described, animals were anesthetized by 2% sevoflurane and then were sacrificed with an intravenous injection of potassium chloride solution. LV infarct size was blindly measured in digitally photographed transverse heart sections. Sections from the infarct core, infarct border, and remote myocardium were taken and fixed in 10% buffered formalin or flash frozen in liquid nitrogen. Masson's Trichrome staining was performed for the primary histological examination. The Sirius red positive staining area was expressed as a percentage of the area of the field occupied by collagen (collagen volume fraction, CVF). A polarized light microscope was used to measure collagen types I and III [9] on randomly selected Sirius red-stained sections from both the infarct core and remote zones. The vessel area was blindly assessed by isolectin-B4-staining in the infarct core, border, and remote zones. In addition, the vessel area within the pericardial adipose flap covering the infarct was assessed. To delineate the flap-myocardium boundary, slices were incubated with a cardiac troponin I (cTnI) primary antibody, as previously reported [7]. Additionally, to identify eGFP-labeled cells, immunohistochemistry against GFP was performed with a rabbit anti-GFP polyclonal antibody (1:2500; Abcam plc, Cambridge, UK) and with a goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 conjugated secondary antibody (2 μ g/mL; Molecular Probes, Invitrogen, El Prat de Llobregat, Spain).

2.5. Quantitative real-time PCR

Total RNA was isolated from the adipose flap and remote and infarct core zones using the RNeasy Lipid or Fibrous Tissue Mini Kits (Qiagen Iberia, S.L., Madrid, Spain). Next, RNA was treated with DNase RQ1 (Promega Biotech Ibérica, S.L., Madrid, Spain) and retrotranscribed using random hexamers and the SuperScript™ III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, S.A., Barcelona, Spain) according to the manufacturer's protocol. Quantitative RT-PCR amplifications were carried out with 2 μ l of pre-diluted cDNA (1:100) in a final volume of 20 μ l containing 10 μ l SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems Hispania, S.A., Madrid, Spain) and 2 μ l of each eGFP oligonucleotide primer (forward: 5'-AAGTTCATCTGCACCACCG-3'; reverse: 5'-TCCTTGAAGAAGATGGTCCG-3'). Data were collected and analyzed on the Mastercycler® ep realplex² thermal cycler (Eppendorf Ibérica, S.L., Valencia, Spain). The Δ threshold cycle (Ct) method was used to calculate relative quantification of eGFP, using GUSB as an endogenous reference (forward: 5'-CCCCAGCGATGGACCCAGGA-3'; reverse: 5'-TCGGCCTCGAAGGGGAGGTG-3').

2.6. Protein extraction and Western blot

Protein extracts were obtained using RIPA buffer (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, Spain) with a protease inhibitor cocktail (1:100; Sigma). Equivalent amounts of protein (assayed with BioRad DC protein assay; Bio-Rad Laboratories, S.A., Madrid, Spain) were resolved on 12% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes (0.45 μ m pore size; Bio-Rad), and probed with specific rabbit anti-GFP polyclonal antibody (1:2500; Abcam) and mouse anti- α -tubulin monoclonal antibody (1:1000; Calbiochem, Merck, Madrid, Spain). An enhanced chemiluminescence detection system (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA) was used to visualize protein bands.

2.7. MRI

Cardiac MRI was performed at 1.5 T (Intera, Philips, Best, The Netherlands) using a phased-array four-channel surface coil and ECG gating. T1 short-axis images were acquired during suspended respiration using a standard steady-state free-precession sequence (repetition time, 4.1 ms; echo time 2.1 ms; flip angle, 60°; field of view, 320 \times 320 mm; matrix, 160 \times 160 pixels, slice thickness, 7 mm; bandwidth, 1249.7 Hz/pixel). Delayed enhancement images were acquired 10 min after intravenous gadolinium bolus administration (Gd-DTPA, 0.2 mmol/kg; Magnevist®, Schering AG, Berlin, Germany) using a phase sensitive inversion-recovery sequence, as previously described [7]. LVEF, end-systolic volume (ESV), and end-diastolic volume (EDV) measurements were analyzed on an offline workstation by investigators unaware of the treatment allocation.

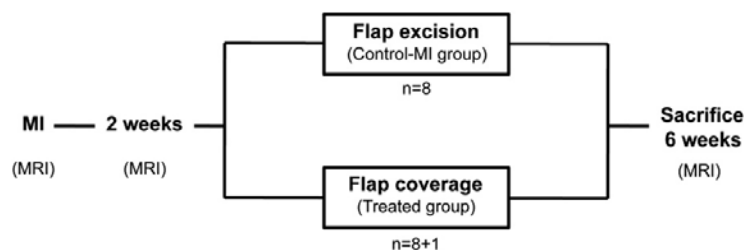


Fig. 1. Study design. n = number of pigs, MI = myocardial infarction, MRI = magnetic resonance imaging.

Please cite this article as: Gálvez-Montón C, et al, Post-infarction scar coverage using a pericardial-derived vascular adipose flap. Pre-clinical results, Int J Cardiol (2011), doi:10.1016/j.ijcard.2011.11.019

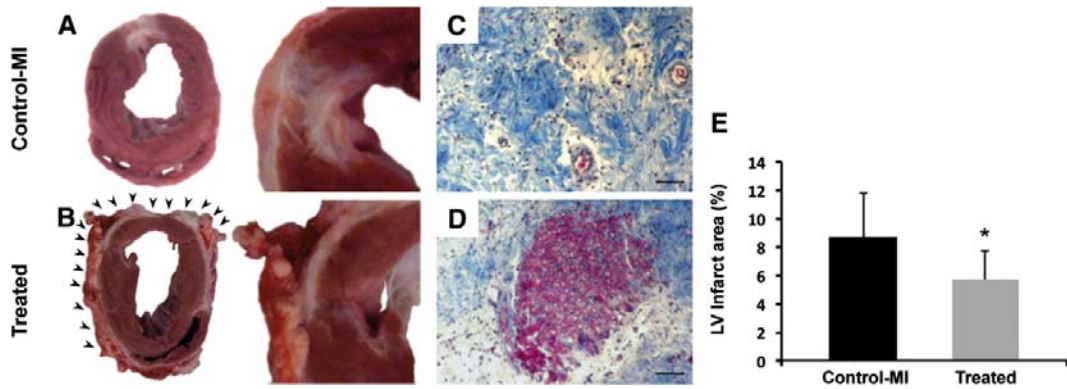


Fig. 2. Morpho-histological analysis. (A, C) Representative heart sections from control-MI and treated pigs. The attached pericardial adipose flap is indicated (arrowheads). Enlarged images and the Masson's Trichrome staining (scale bar = 50 μ m) of heart slices show infarct area reduction in treated animals. (B, D) Percentage of the LV infarct area measured in treated pig hearts compared with the control-MI group (* $P=0.04$).

2.8. Statistical analysis

Data are presented as mean \pm SEM. All analyses were performed with SPSS (15.0.1 version, SPSS Inc., Chicago, IL). Differences between groups were compared using Student's *t*-test. MRI data were analyzed as repeated measures using ANOVA with the Greenhouse-Geisser correction. Values of $P < 0.05$ were considered significant.

3. Results

None of the studied animals died during experimentation or follow-up and cardiac examination upon sacrifice showed the fat flap remained in place covering the infarct area in all treated animals.

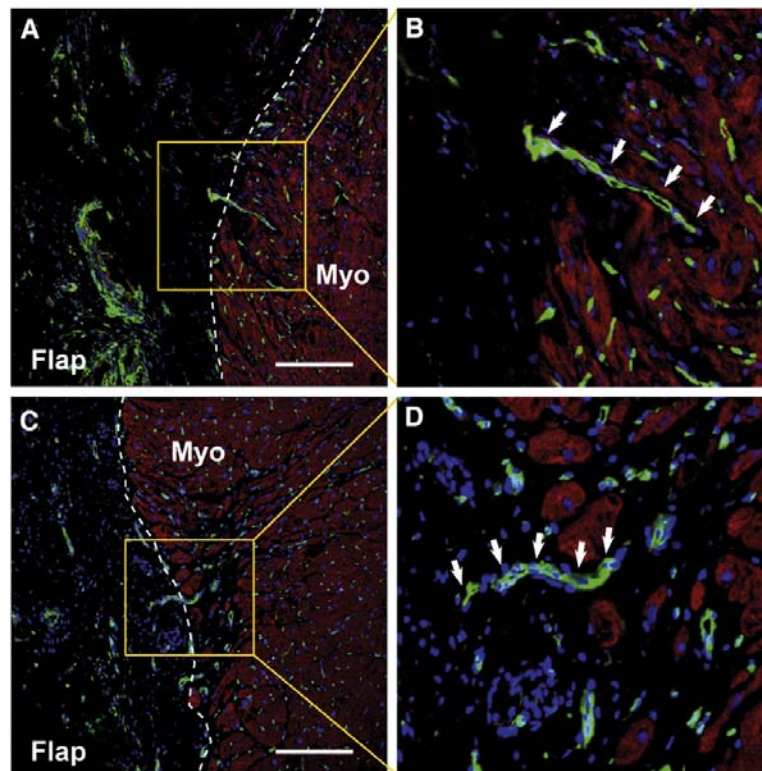


Fig. 3. Microvessels at the fat flap–infarct border interface 4 weeks after intervention. (A and C) Immunofluorescence against cTnI (red) with Isolectin-B4 (green) and nuclei-Hoechst 33342 (blue) staining shows vascular tubes (arrows) connecting the pericardial adipose flap (Flap) and the myocardium (Myo) interface (dotted line) (scale bar = 50 μ m). (B and D) Zoomed images from A and C, respectively.

Please cite this article as: Gálvez-Montón C, et al. Post-infarction scar coverage using a pericardial-derived vascular adipose flap. Pre-clinical results, *Int J Cardiol* (2011), doi:10.1016/j.ijcard.2011.11.019

To verify the MI caused by coil deployment was similar among experimental groups, serial blood samples were obtained for cardiac biomarker measurements. No significant differences in the circulating levels of cTnI ($0.16 \pm 0.16 \mu\text{g/L}$ vs. $0.05 \pm 0.07 \mu\text{g/L}$, $P=0.12$) and myoglobin ($48 \pm 18.8 \mu\text{g/L}$ vs. $34.2 \pm 6.2 \mu\text{g/L}$, $P=0.24$) were found between treated and control-MI animals.

First, we analyzed gross histopathological changes between groups. Morphometry revealed a 34% LV infarct area reduction in treated compared with control-MI animals ($5.7 \pm 2\%$ vs. $8.7 \pm 3.1\%$; $P=0.04$) (Fig. 2). Masson's Trichrome staining showed the presence of scarce intact muscle fibers in treated pigs (Fig. 2D). Collagen content was measured in the infarct core and remote myocardium. Four weeks after flap intervention, there were no differences in CVF between groups in the infarct core ($34.1 \pm 4.6\%$ vs. $33.0 \pm 7\%$; $P=0.75$) and remote myocardium ($2.1 \pm 1.4\%$ vs. $1.8 \pm 0.8\%$; $P=0.65$). Nevertheless, treated animals showed significant differences in the collagen I/III ratio in the infarct core vs. remote myocardium ($P=0.001$), which were not present in control-MI animals ($P=0.18$).

Previously, in acute infarctions, we identified a very significant increase in vascularization within the flap and development of flap-myocardium interface connections [7]. In this chronic scar model, we also found lectin-positive microvessels connecting the vascularized adipose flap with the underlying myocardium (Fig. 3). An increase in vessel area was not identified in the myocardium or within the flap (not shown).

In an attempt to demonstrate cell migration and trafficking from the flap to the myocardium, adenoviral-eGFP vectors were injected in the adipose flap during the intervention. Using quantitative real-time PCR (Fig. 4A), we detected very high eGFP expression in the infarct core compared with the remote myocardium ($P=0.001$) and adipose flap ($P<0.0001$). At the protein level, eGFP expression was confirmed in the infarct core and remote myocardium by Western blot and immunofluorescence (Fig. 4B–D).

Functional analysis showed no significant differences in LVEF two weeks post-MI in treated and control-MI pigs ($46.5 \pm 6.6\%$ vs. $47.8 \pm 7.6\%$; $P=0.74$, respectively). The six week post-MI MRI revealed non-significant relative changes in LVEF ($8.9 \pm 10.5\%$ and $8.1 \pm 7.6\%$ in the treated vs. control-MI group, $P=0.87$) (Fig. 5). The analysis of remodeling, assessed by ESV and EDV, did not show differences in volumes over time ($1.4 \pm 8.7 \text{ mL}$ vs. $3.2 \pm 6.2 \text{ mL}$, $P=0.63$; and $14.5 \pm 10.5 \text{ mL}$ vs. $17.1 \pm 11.3 \text{ mL}$, $P=0.64$, for ESV and EDV in the treated vs. control-MI group, respectively).

4. Discussion

In the present study, we extended the results obtained by transposing a fat flap over acute ischemic myocardium to the setting of a chronic myocardial scar. Our data show that a vascularized adipose flap exerts beneficial effects on chronic MI, as assessed by the reduction in infarct size by histological examination. The presence of vascular connections between the transposed fat flap and the recipient necrotic bed were identified.

The mechanisms that may explain infarct reduction by the fat flap are unclear and may be multifactorial. First, this newly developed collateral circulation may improve local oxygen tension at the flap-myocardium boundary and reduce underlying tissue hypoxia (within the necrotic core or at the infarct border zone). Second, since the adipose tissue is an important source of progenitor cells [10], these could have migrated from fat to myocardium. Indeed, there is plenty of evidence that the adipose tissue is a reservoir of progenitor cells, particularly those of mesenchymal phenotype [11,12]. Moreover, a recent report identified a different subtype of progenitor cells within the cardiac fat characterized by an inherent cardiac-like phenotype able to differentiate *in vitro* into myocardial and endothelial cell types, but not into adipocytes [13]. When these cardiac progenitors were transplanted into injured myocardium in mouse and rat models

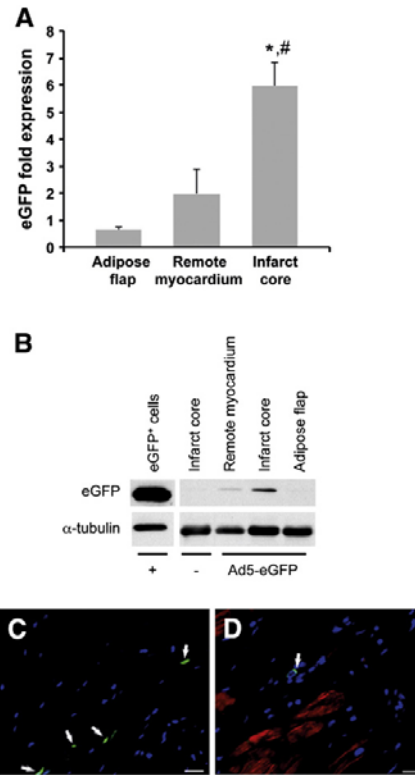


Fig. 4. eGFP-labeled cells trafficking from the flap to the infarcted myocardium. (A) eGFP fold expression analyzed by quantitative real-time PCR in the adipose flap, remote myocardium, and infarct core ($*P=0.001$, $\#P<0.001$). Representative Western blot (B) and immunofluorescence images confirming eGFP-labeled cells in the adipose flap (C) and infarct core (D). A HEK293T-eGFP⁺ cell extract and an infarct core from a non-virus treated animal were used as positive and negative controls, respectively.

of MI, the injected cells expressed cardiac (troponin I, sarcomeric α -actinin) and endothelial (CD31) markers, vascularization increased, and infarct size was reduced in both models [13]. Because the adipose flap transposed in our experiments is connected to mediastinum by a vascular pedicle and cannot be explanted, we were unable to label and track such cells. Thus, as an alternative method, Ad5-eGFP was injected directly in the adipose flap before its transposition. Our results showed eGFP expression in the myocardium, mainly in the infarct core region. Whether these are stem cells mobilizing from the adipose flap to the infarct core cannot be elucidated from these experiments, but our results provide evidence of cell trafficking from the flap to the infarcted myocardium. Adipokines liberated by the flap may exert a positive local effect and should be considered as an alternative mechanism. Many studies have described the myocardium and perivascular adipose tissue as well-known sources of hormones, which might exert important autocrine, paracrine, and endocrine effects [14]. Such hormones might participate in the early beneficial role of the flap; yet, in this study, we have not been able to obtain temporal tissue samples on a day to day basis to confirm such effects. However, evidence accumulates that adipose-derived hormones can offer cardio-protective effects against ischemia, including attenuation of cardiomyocyte apoptosis, reduction of infarct size, and modulation of collagen I/III ratios [15].

In this study pericardial adipose flap transposition was conducted in juvenile pigs two weeks after MI induction. Although the porcine model of myocardial infarction is closest to humans, our results may

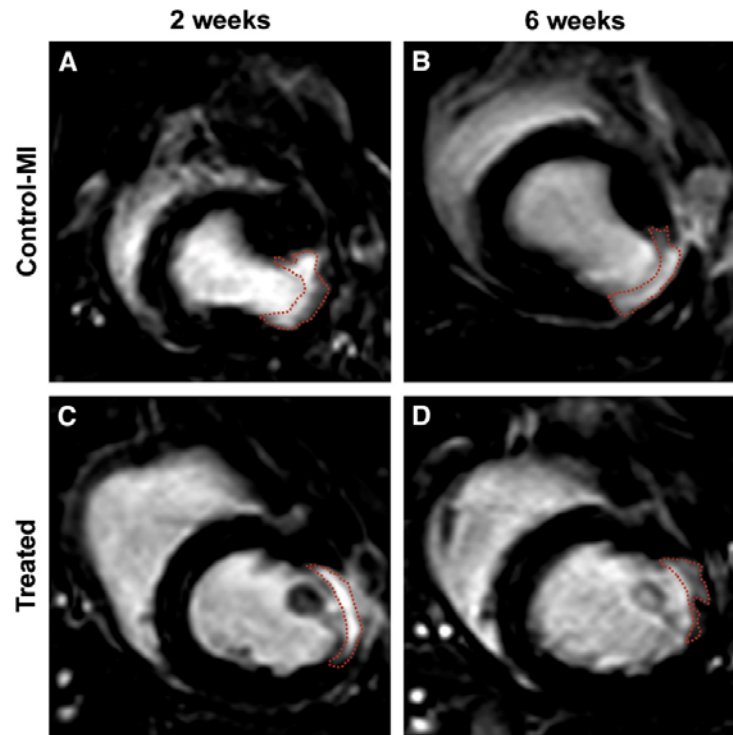


Fig. 5. Cardiac function analysis by MRI. Representative T1 short-axis delayed enhancement images for control-MI (A, B) and treated (C, D) pigs at 2 weeks (A, C) and 6 weeks (B, D) post-MI.

not apply to elderly patients with chronic scars and several risk factors. Indeed, additional studies both in animal models and also in humans are required to determine the true beneficial effect of the transposed adipose flap in different subgroups.

Therapeutic revascularization offers great promise for the treatment of myocardium after ischemia. VEGF, PlGF, and other growth factors have induced successful revascularization in animal models [16]. Yet, there were adverse reactions (edema formation, hypotension, stimulation of dormant tumor cells) and in clinical trials the benefit has been only modest [17,18]. Thus, alternative approaches, such as the fat flap transposition shown here, need to be further evaluated to verify usefulness. If the fat flap is proven useful, the transfer to clinical practice could be quick because the intervention is technically simple, it does not require additional or expensive material, and does not have ethical or social considerations that may constrain its use. In the early forties, Beck in the search for alternative ways to treat ischemic heart disease proposed the use of numerous available tissues in the thoracic cavity, such as pericardium, mediastinal fat, and chest wall, with the aim to revascularize the heart. In all cases, extracoronary communications produced by grafting tissues upon the heart were observed [19], similar to those reported here.

At the functional level, we did not find a significant benefit between treated and control-MI animals. Certainly, there is a need for surrogate end-points for monitoring and LVEF remains widely used. We have considered three potential explanations for the lack of functional benefit. First, the infarct induced by the coil at the oblique marginal artery was relatively small to limit mortality caused by infarct induction and follow-up. Indeed, there was no evidence of arrhythmias or lethal events recorded in this series. Second, a larger series of animals might have been required to obtain statistical differences. Cardiac MRI has become the standard technique for the assessment of

cardiac volumes and function due to its high reproducibility. MRI allows a considerable reduction, compared with echocardiography, in the animal number required to prove a hypothesis in research involving changes in remodeling parameters [20]. We performed our experiments on 16 animals, which was an appropriate number to identify statistically significant changes in volumes and LVEF. Lastly, we cannot exclude minor local changes because regional contractility was not assessed.

In summary, the pericardial-derived adipose flap applied to a chronic infarct in the porcine model reduced infarct size and acted as a vascular supply in necrotic myocardium. Although we neither observed nor expected complete reversal of myocardial dysfunction after flap engraftment, we believe our study can serve as a proof of principle for a vascular flap approach in chronic ischemic heart disease. Future strategies that may strengthen the flap effect, which may include simultaneous delivery of growth factors and/or stem cells, deserve in-depth evaluation and are beyond the scope of the present report.

Supplementary materials related to this article can be found online at [doi:10.1016/j.ijcard.2011.11.019](https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2011.11.019).

Acknowledgements

We thank J. Maestre, S. Javato, and V. Crisóstomo for helping with MRI execution and analysis.

References

- [1] Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, et al. Heart disease and stroke statistics–2011 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2011;123:e18–209.

Please cite this article as: Gálvez-Montón C, et al. Post-infarction scar coverage using a pericardial-derived vascular adipose flap. Pre-clinical results, *Int J Cardiol* (2011), doi:[10.1016/j.ijcard.2011.11.019](https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2011.11.019)

- [2] Boersma H, Califf R, Collins R, Deckers JW, Simoons ML. Selection of reperfusion therapy for individual patients with evolving myocardial infarction. *Eur Heart J* 1997;18:1371–81.
- [3] Favalaro RG. Saphenous vein graft in the surgical treatment of coronary artery disease. Operative technique. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1969;58:178–85.
- [4] Gruntzig A. Transluminal dilatation of coronary-artery stenosis. *Lancet* 1978;1:263.
- [5] Borrego JM, Ordóñez A, Hernández A, et al. Neovascularization by cardiomyoplasty. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 1998;4:266–70.
- [6] Magovern JA, Furnary AP, Christlieb IY, Kao RL, Magovern GJ. Right latissimus dorsi cardiomyoplasty for left ventricular failure. *Ann Thorac Surg* 1992;53:1120–2.
- [7] Gálvez-Montón C, Prat-Vidal C, Roura S, et al. Transposition of a pericardial-derived vascular adipose flap for myocardial salvage after infarct. *Cardiovasc Res* 2011;91:659–67.
- [8] Shewan LG, Coats AJ. Ethics in the authorship and publishing of scientific articles. *Int J Cardiol* 2010;144:1–2.
- [9] Junqueira LC, Cossermelli W, Brentani R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. *Arch Histol Jpn* 1978;41:267–74.
- [10] Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002;13:4279–95.
- [11] Dicker A, Le Blanc K, Astrom G, et al. Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Exp Cell Res* 2005;308:283–90.
- [12] Izadpanah R, Trygg C, Patel B, et al. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem* 2006;99:1285–97.
- [13] Bayes-Genis A, Soler-Botija C, Farré J, et al. Human progenitor cells derived from cardiac adipose tissue ameliorate myocardial infarction in rodents. *J Mol Cell Cardiol* 2010;49:771–80.
- [14] Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 2000;11:327–32.
- [15] Sweeney G. Cardiovascular effects of leptin. *Nat Rev Cardiol* 2010;7:22–9.
- [16] Luttun A, Tjwa M, Moons L, et al. Revascularization of ischemic tissues by PIGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat Med* 2002;8:831–40.
- [17] Loges S, Roncal C, Carmeliet P. Development of targeted angiogenic medicine. *J Thromb Haemost* 2009;7:21–33.
- [18] Maulik N, Thirunavukkarasu M. Growth factors and cell therapy in myocardial regeneration. *J Mol Cell Cardiol* 2008;44:219–27.
- [19] Beck CS. Principles underlying the operative approach to the treatment of myocardial ischemia. *Ann Surg* 1943;118:788–806.
- [20] Bellenger NG, Davies LC, Francis JM, Coats AJ, Pennell DJ. Reduction in sample size for studies of remodeling in heart failure by the use of cardiovascular magnetic resonance. *J Cardiovasc Magn Reson* 2000;2:271–8.

Please cite this article as: Gálvez-Montón C, et al, Post-infarction scar coverage using a pericardial-derived vascular adipose flap. Pre-clinical results, *Int J Cardiol* (2011), doi:10.1016/j.ijcard.2011.11.019