



TESIS DOCTORAL

Estudio comparativo de la administración intracoronaria de dosis crecientes de células madre cardiacas alogénicas de origen porcino en un modelo animal de infarto agudo de miocardio: Valoración de seguridad y eficacia.

Claudia Báez Díaz
Departamento de Medicina Animal

Conformidad de los directores:

Fdo. Dr. D. Francisco Miguel Sánchez Margallo Fdo. Dra. Dña. Verónica Crisóstomo Ayala

2013



Lo que con mucho trabajo se adquiere, más se ama.

(Aristóteles)

A mi abuela Cándida por inculcarme su capacidad de lucha y superación. Abuela, aunque ya no estés aquí, te noto siempre muy cerca.

A mis padres que lo dieron todo por mí. Gracias por vuestra guía y apoyo durante todos estos años.

A mi hermana Sara que siempre ha sabido cómo animarme. Gracias por acompañarme en momentos de tristeza y alegría.

A Carlos que siempre ha creído en mí y me ha apoyado en todos los malos momentos, sin pedir nunca nada a cambio. Nunca podré agradecerte todo lo que has hecho por mí.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Francisco Miguel Sánchez Margallo, director de esta tesis, por sus consejos, comentarios y sugerencias durante la elaboración de esta investigación.

A la Dra. Verónica Crisóstomo Ayala, directora de la tesis, por su disponibilidad, colaboración y tiempo dedicado al desarrollo de este trabajo.

Al Prof. D. Jesús Usón Gargallo, por su apoyo, su cariño y por creer en mí desde el primer momento.

A Fei Sun, coordinador de la Unidad de Diagnóstico y Terapéutica Endoluminal, por los conocimientos que me ha transmitido a lo largo de los últimos años.

A la empresa Coretherapix, en especial al Dr. Luis Rodríguez-Borlado y a la Dra. Itziar Palacios, por el suministro de las células empleadas en esta investigación y por la ayuda que me han brindado durante la elaboración de esta Tesis.

Al departamento de Terapia Celular del CCMIJU, especialmente al Dr. Javier García-Casado y a Verónica Álvarez, por el tiempo dedicado a la preparación de las células y por ofrecerme su ayuda siempre que la he necesitado.

A Beatriz Moreno y Juan Antonio Samino, por la determinación de las muestras sanguíneas para la realización de esta Tesis.

A Mónica García, por todas las horas dedicadas a la anestesia de los animales del proyecto y la amistad que nos une.

A los técnicos de quirófano, en especial a Alejandra Usón, María Borrega y Helena Martín, por su apoyo y los buenos momentos que hemos compartido en quirófano.

A Juan Maestre, por introducirme en el mundo de la resonancia magnética, su paciencia y su colaboración en el trabajo.

A los técnicos de anestesia, por su apoyo en la realización de la fase experimental de la Tesis.

Al servicio de informática, imagen y comunicación, sobre todo a Julia Anaya, por la elaboración de la portada y fondos de power point.

Al servicio de Animalario, por tener siempre los animales a tiempo para las intervenciones.

A mis amigos de CCMIJU, por sus consejos, sus constantes palabras de ánimo y por soportarme en los malos momentos.

A las personas que, aunque no aparecen aquí con nombres y apellidos, han estado presentes de alguna forma durante el desarrollo de este trabajo.

GRACIAS A TODOS.

ÍNDICE

I.INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Hipótesis de trabajo y Objetivos.....	2
II.REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Importancia de las enfermedades cardiovasculares.....	3
2.2. Diagnóstico del infarto agudo de miocardio.....	4
2.2.1. Detección mediante determinación de biomarcadores.....	4
2.2.2. Detección electrocardiográfica.....	6
2.2.3. Detección mediante técnicas de imagen.....	7
2.3. La terapia celular en el tratamiento del IM.....	8
2.4. Infartos experimentales.....	12
2.4.1. La especie animal adecuada.....	12
2.4.2. Modelos de IM.....	16
III.MATERIAL Y MÉTODO.....	19
3.1. Sujetos del estudio.....	19
3.2. Método.....	19
3.2.1. Justificación del Método.....	19
3.3. Planteamiento experimental.....	23
3.4. Anestesia.....	23
3.5. Resonancia Magnética Basal.....	24
3.6. Inducción del modelo de IAM.....	25
3.7. Seguimientos mediante RM.....	27
3.8. Preparación del vehículo/ de la solución celular.....	27
3.9. Inyección intracoronaria.....	28
3.10. Eutanasia y necropsia.....	29
3.11. Procesado de muestras e histología.....	29
3.12. Parámetros estudiados.....	30
3.12.1. Evaluación del infarto.....	30
3.12.2. Seguridad de la inyección intracoronaria.....	31

3.12.3. Eficacia de la inyección intracoronaria.....	32
3.13. Análisis estadístico.....	32
IV. RESULTADOS.....	33
4.1. Inducción del modelo de IAM.....	33
4.1.1. Mortalidad.....	33
4.1.2. Arritmias ventriculares.....	33
4.1.3. Flujo coronario.....	34
4.1.4. Enzimas cardíacas.....	36
4.1.5. Evaluación de constantes vitales.....	38
4.2. Inyección intracoronaria.....	40
4.2.1. Preparación del vehículo/ de la solución celular.....	40
4.2.2. Flujo coronario.....	40
4.2.3. Enzimas cardíacas.....	42
4.2.4. Evaluación de constantes vitales.....	45
4.2.5. Cambios electrocardiográficos.....	45
4.3. Seguimientos mediante RM.....	47
4.3.1. Evaluación del infarto.....	47
4.3.2. Funcionalidad cardíaca.....	52
4.4. Fin de estudio.....	56
4.4.1. Flujo coronario.....	56
4.4.2. Necropsia.....	56
4.4.3. Tinción con TTC.....	56
4.4.4. Histología.....	60
V. DISCUSIÓN.....	65
VI. CONCLUSIONES.....	83
VII. RESUMEN/SUMMARY.....	84
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	86
IX. TRABAJOS MÁS RELEVANTES DEL DOCTORANDO RELACIONADOS CON LA TEMÁTICA DE LA TESIS DOCTORAL.....	119

I. Introducción

Las enfermedades cardiovasculares (ECVs) son la principal causa de mortalidad en todo el mundo (Escobedo-Uribe y cols., 2012), por lo que el desarrollo de fármacos y/o estrategias terapéuticas se ha convertido en un desafío crucial para los sistemas de salud de todos los países desarrollados (Escobedo-Uribe y cols., 2012; Strauer y Kornowsky, 2003; Bartunek y cols., 2006).

La mayor utilización de estrategias farmacológicas, procedimientos quirúrgicos y técnicas intervencionistas, como la angioplastia y/o el *stenting* coronario, han contribuido considerablemente a la reducción de la mortalidad tras un infarto agudo de miocardio (IAM) (Barba, 2009). Dichas terapias, sin embargo, son solamente paliativas y no logran recuperar el tejido miocárdico dañado. Además, el hecho de que estos tratamientos resuelvan procesos cardiacos agudos que en el pasado eran mortales (Torella y cols., 2006), a menudo se traduce en un incremento de la esperanza de vida del enfermo dejando como secuela una enfermedad crónica (Dickstein y cols., 2008; Neubauer, 2007; Jessup y Brozena, 2003).

Para estas secuelas crónicas con frecuencia no se dispone de un tratamiento efectivo para restaurar la función cardiaca (Escobedo-Uribe y cols., 2012; Jessup y

cols., 2009), siendo actualmente el trasplante cardiaco la única opción curativa (Dickstein y cols., 2008; Neubauer, 2007; Jessup y Brozena, 2003). Éste supone una alternativa terapéutica con grandes limitaciones: la escasez de donantes, el elevado coste y la necesidad de un tratamiento inmunosupresor a largo plazo disminuyen en gran medida su utilidad y disponibilidad (Taylor y cols., 2007).

El continuo incremento de la vida media y el envejecimiento progresivo de la población en los países avanzados, ha provocando que las enfermedades crónicas estén adquiriendo características epidémicas cada vez más importantes. Concretamente, el 22% de los hombres y el 47% de las mujeres que sobreviven a un IAM desarrollan insuficiencia cardiaca crónica (ICC) en los 6 años posteriores al infarto (Jiménez-Quevedo y cols., 2006; Roger y cols., 2012).

El problema general de las patologías crónicas post-infarto se debe a un déficit de células contráctiles, así como a una circulación coronaria insuficiente para nutrir las. Por ello, en los últimos años se han buscado métodos que sustituyan el tejido miocárdico perdido a consecuencia del infarto, previniéndose o revirtiéndose de esta manera el proceso de

remodelado patológico causante de la insuficiencia cardíaca de los pacientes (Nadal-Ginard y cols., 2006; Hosoda y cols., 2012).

En la actualidad la terapia celular se ha convertido en una estrategia esperanzadora y prometedora a la hora de tratar la cardiomiopatía isquémica tanto aguda como crónica (Perin y Silva, 2004; Dimmeler y cols., 2005; Wollert y cols., 2004; Menasché y cols., 2001; Tse y cols., 2003). Como resultado, se ha propuesto la administración de diversos tipos celulares para abordar la problemática (Chamuleau y cols., 2009), incluyendo tanto células madre embrionarias como adultas (Escobedo-Uribe y cols., 2012; Geng y cols., 2006).

A día de hoy ya se han conducido numerosos ensayos clínicos que han hecho uso de la terapia celular en el ámbito del infarto de miocardio (IM). No obstante, al menos parte de los pobres resultados de algunos de estos ensayos son consecuencia de una extrapolación defectuosa de los datos obtenidos en pequeños animales. Creemos, por tanto, que la obtención de una mayor cantidad de datos preclínicos en una especie animal más cercana al humano es esencial para evitar los problemas surgidos en muchos de los estudios de terapia celular post-infarto, por pasar a la clínica antes de cubrir las lagunas que existían en el entendimiento de los procesos biológicos implicados (Nadal-Ginard y cols., 2006; Nadal-Ginard y Fuster, 2007).

En relación a la temática específica de los modelos animales representativos de patologías humanas, la experiencia del Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón (CCMIJU) se remonta a sus orígenes, donde se han desarrollado, entre otros, modelos de enfermedades cardiovasculares. Concretamente, en el ámbito de la cardiología y la regeneración miocárdica, el CCMIJU lleva trabajando en distintos proyectos de investigación desde el año 2008. Desde entonces ha adquirido una importante experiencia en cuanto a la modelización de infartos en la especie porcina.

1.1. Hipótesis de trabajo y Objetivos

Partiendo de la hipótesis de que la administración de células madre cardíacas (CMCs) alogénicas tras un IM es capaz de reducir el área de cicatriz y formar miocardio autólogo funcional a través de la activación de CMCs endógenas, en este estudio nos hemos planteado valorar la seguridad y eficacia de la administración intracoronaria de dos dosis diferentes de CMCs alogénicas de origen porcino (25×10^6 y 50×10^6 de células) a los 7 días tras la inducción de un modelo de IAM en la especie porcina, para su posterior traslación a la clínica humana. Asimismo nos hemos propuesto comprobar si existe una relación entre la dosis administrada y el efecto observado.

II. Revisión Bibliográfica

2.1. Importancia de las enfermedades cardiovasculares

A pesar de los avances diagnóstico terapéuticos logrados en los últimos años, las ECVs aparecen actualmente y se mantendrán como la principal causa de mortalidad en todo el mundo, esperándose para el año 2030 cerca de 23,3 millones de fallecimientos a consecuencia de alguna afección incluida en este grupo de patologías (Organización Mundial de la Salud).

Según la American Heart Association, en Estados Unidos una de cada tres defunciones se debe a ECV, siendo la mitad de éstas producidas por una cardiopatía coronaria (Roger y cols., 2012). En el ámbito europeo, dichas patologías son responsables de casi la mitad de las muertes que se registran anualmente, causando más de cuatro millones de fallecimientos. Alrededor del 50% de éstos se deben a cardiopatías de origen isquémico (European Cardiovascular Disease Statistics 2012).

A pesar de que España pertenece al grupo de naciones con menor riesgo de mortalidad por ECV (European Cardiovascular Disease Statistics 2012), con más de 124.000 defunciones anuales estas enfermedades

siguen siendo la primera causa de muerte para el conjunto de la población. De entre todas las afecciones incluidas en el grupo de las ECVs, la que se asocia con una mayor tasa de mortalidad es la cardiopatía isquémica, responsable del 30% de las defunciones (Informe Sociedad Española de Cardiología, 2009).

Además de ser el mayor contribuyente a la mortalidad, las ECVs también influyen de forma significativa en la morbilidad. Así, en España, las tasas de morbilidad hospitalaria en el año 2002 fueron de 1.406 y 365 por 100.000 habitantes respectivamente para el conjunto de las ECVs y la cardiopatía isquémica (Banegas y cols., 2006).

Desde un punto de vista económico las ECVs causan importantes consecuencias en la esfera socioeconómica (Informe Sociedad Española de Cardiología, 2009). Los costes directos e indirectos asociados a este grupo de patologías ascendieron para el año 2009 a 312,6 billones de dólares en Estados Unidos, esperándose para los próximos años un aumento en dicha cifra (Go y cols., 2013). En Europa el coste global de las ECVs es de 196 billones de euros, correspondiéndose 60 de éstos a gastos derivados de las cardiopatías coronarias (European Cardiovascular Disease Statistics 2012).

2.2. Diagnóstico del IM

El diagnóstico del IM comienza cuando se produce el primer contacto médico y se basa generalmente en una historia de dolor torácico que no responde a la administración de nitroglicerina. Entre las claves que indican la presencia de dicha afección se encuentran habitualmente la irradiación del dolor hacia el cuello, la mandíbula o el brazo izquierdo. No obstante, el dolor no siempre es agudo y se pueden observar síntomas menos típicos como náuseas, vómitos, disnea, fatiga, palpitaciones o síncope (Steg y cols., 2012).

Según la última definición de IM, propuesta por la American Heart Association, el American College of Cardiology y la European Society of Cardiology dicho término debe utilizarse cuando exista evidencia de necrosis miocárdica en el contexto clínico consistente con isquemia miocárdica aguda. Entre las pruebas diagnósticas más relevantes se encuentran la determinación de biomarcadores, la evaluación del electrocardiograma (ECG), así como las técnicas de imagen no invasivas (Thygesen y cols., 2012).

2.2.1. Detección mediante determinación de biomarcadores

La detección de un incremento en los niveles de marcadores biológicos en sangre, tales como la troponina (Tpn) cardíaca y la

fracción MB de la creatina quinasa (CK-MB) confirman la existencia de una lesión miocárdica (Thygesen y cols., 2007), sin desvelar, sin embargo, el mecanismo subyacente de esta lesión (Jaffe y cols., 2006 a).

El incremento tanto de la Tpn como de la CK-MB se define como el valor por encima del percentil 99 del límite superior de referencia, el cual está considerado como nivel de decisión para el diagnóstico de IM (Apple y cols., 2003; Bardají, 2005; Apple y cols., 2007; Morrow y cols., 2007).

Actualmente, la Tpn es el biomarcador preferido para la detección del IM, lo que fundamentalmente se debe a la elevada sensibilidad clínica y especificidad del tejido miocárdico (Thygesen y cols., 2012; Steg y cols., 2012). El complejo Tpn consta de 3 subunidades (C, T e I), de las cuales la T y la I son prácticamente exclusivas del miocardio (Bardají, 2005).

La elevación de dicha enzima es detectable a las 2-4 horas tras el inicio de los síntomas, pudiendo persistir durante 7 a 14 días (Hamm y cols., 2012). Su determinación se recomienda por lo tanto en la primera evaluación del paciente, unas 3 a 6 horas más tarde (Welch y cols., 2012; MacRae y cols., 2006), así como a las 12-24 horas si la sospecha clínica es elevada y las muestras anteriores fueron negativas (Welch y cols., 2012). Posteriormente se pueden requerir determinaciones

adicionales si se producen nuevos episodios isquémicos o cuando no se conoce con seguridad el inicio de los síntomas (MacRae y cols., 2006).

Para que un diagnóstico de IM pueda ser establecido es esencial que el valor de Tpn muestre un patrón de subida y bajada (Jaffe, 2006 b). De esta manera podrá diferenciarse de procesos crónicos asociados con enfermedad cardíaca estructural (Thygesen y cols., 2010; de Lemos y cols., 2010; Saunders y cols., 2011). Cuando la presencia de un síndrome isquémico no se pueda asegurar clínicamente, se deben considerar otras afecciones como disección aórtica, embolia pulmonar, insuficiencia cardíaca, miocarditis, sepsis o disfunción renal (Welch y cols., 2012) que igualmente pueden cursar con elevación de este biomarcador (Hamm y cols., 2012).

En los pacientes que presentan una probabilidad clínica baja o intermedia de isquemia miocárdica en evolución, así como una duración prolongada de los síntomas previos, un resultado negativo de Tpn puede ayudar a evitar una angiografía de urgencia (Steg y cols., 2012).

En caso de no estar disponible la realización de un test de Tpn, la mejor alternativa es la determinación de la CK-MB. Su mayor concentración se encuentra en el miocardio, aunque también está presente en pequeñas cantidades en el músculo esquelético y otras localizaciones.

Su detección se puede llevar a cabo desde las 3 horas y hasta los 3 días tras el inicio de un infarto, alcanzando sus niveles máximos a las 12-24 horas. Los tiempos recomendados para llevar a cabo su determinación son idénticos a los descritos para la Tpn (Welch y cols., 2012).

Actualmente, la mayoría de los inmunoanálisis utilizados para determinar la Tpn no permiten detectar valores que se encuentren ligeramente por encima del percentil 99, lo que puede ocurrir en la fase inicial de un IAM sin elevación del segmento ST (IAMSEST). Esta limitación ha fomentado el desarrollo de los métodos denominados de alta sensibilidad (Jaffe y cols., 2013). Éstos se refieren a las técnicas que presentan una mejora en el límite de detección, lo que analíticamente se define como la concentración mínima que puede diferenciarse de cero (Jaffe y Ordonez-Llanos, 2010).

Cuando se utilizan los tests de Tpn de alta sensibilidad en el diagnóstico de un infarto, se recomienda la extracción de muestras de sangre para su determinación en el momento de la presentación del paciente, así como 3 horas más tarde (Hamm y cols., 2011). En el caso de que el valor de dicha enzima no sea detectable en la primera evaluación del paciente, la presencia de IAM será muy poco probable (Jaffe y Ordonez-Llanos, 2013).

2.2.2. Detección electrocardiográfica

El ECG es una parte fundamental en el proceso de diagnóstico del IM, por lo que su adquisición e interpretación deberían llevarse a cabo rápidamente tras la presentación clínica (Diercks y cols., 2006; Thygesen y cols., 2007; Welch y cols., 2012). Hay que señalar que la existencia de un ECG completamente normal no excluye la posibilidad de IM (Hamm y cols., 2012), por lo que los pacientes sintomatológicos con un primer ECG negativo, deberían ser monitorizados continuamente. Los registros de ECG deben repetirse al menos a las 6-9 horas, así como a las 24 horas tras la presentación del paciente. En caso de recurrir el dolor torácico o los síntomas, se debería repetir de forma inmediata. Un último ECG está indicado antes del alta del paciente (Thygesen y cols., 2007; Hamm y cols., 2012).

Entre los signos electrocardiográficos que pueden indicar isquemia aguda se encuentran las arritmias cardiacas, los trastornos de la conducción y la pérdida de amplitud de la onda R. Las alteraciones en las ondas T o Q, o del segmento ST aportan información sobre la arteria relacionada con el infarto, la cantidad de miocardio en peligro y el pronóstico, permitiendo además elegir la estrategia terapéutica más adecuada. Generalmente, la elevación persistente del segmento ST tras un tratamiento de reperfusión indica que éste no se ha llevado a cabo con éxito,

asociándose ello con un peor pronóstico (Thygesen y cols., 2012).

A pesar de que el ECG no es una prueba lo suficientemente robusta para establecer un diagnóstico de isquemia aguda o IM (Holmvang y cols., 2002), esta técnica sigue siendo la prueba más útil para facilitar la segregación de los pacientes en aquellos que presentan un IAM con elevación del segmento ST (IAMCEST) y los que manifiestan un IAMSEST (Welch y cols., 2012).

En los pacientes con IAMCEST la isquemia miocárdica se evidencia en sus estadios más tempranos por cambios en la onda T y el segmento ST. Se pueden observar además ondas Q transitorias durante un episodio de isquemia aguda o, en ocasiones, durante la reperfusión del IAM (Thygesen y cols., 2012). En contraposición, en los pacientes con IAMSEST las manifestaciones electrocardiográficas pueden ser más variables y generalmente incluyen la depresión del segmento ST o la elevación transitoria y cambios en la onda T (Thygesen y cols., 2007; Welch y cols., 2012).

Mientras que la reperfusión miocárdica tras un evento isquémico suele causar la resolución de la elevación del segmento ST, las ondas T habitualmente permanecen invertidas. En cambio, en ausencia de reperfusión, el segmento ST vuelve gradualmente a su estado basal y las ondas

T se invierten de forma simétrica (Welch y cols., 2012; Prasad y cols., 2009).

2.2.3. Detección mediante técnicas de imagen no invasivas

A pesar de que el diagnóstico del IM ha mejorado significativamente en los últimos años, las técnicas diagnósticas anteriormente citadas presentan aún ciertas limitaciones en la práctica clínica (Kim y Farzaneh-Far, 2009). Por un lado, los niveles de Tpn y CK-MB permanecen elevados tan sólo unos pocos días tras un evento agudo (Katus y cols., 1991), por lo que la determinación de dichos marcadores biológicos a tiempos poco apropiados no permiten diagnosticar un IM. Por otro lado, no en todos los pacientes con esta patología se evidencian alteraciones electrocardiográficas. En contrapartida, existen pacientes en los que se observan todos los síntomas clásicos del IM, presentando éstos, sin embargo, otro trastorno que cursa con las mismas manifestaciones clínicas (Kim y cols., 2010). En estas situaciones, las técnicas de imagen no invasivas son especialmente útiles para establecer un diagnóstico definitivo.

Los nuevos criterios para el diagnóstico del IM incluyen modalidades como la ecocardiografía, la imagen radionuclear, así como la tomografía computarizada (TC) y la resonancia magnética (RM) (Kim y cols.,

2010). Todas ellas permiten evaluar la viabilidad miocárdica, la perfusión y la función del ventrículo izquierdo (VI). No obstante, únicamente las técnicas radionucleares facilitan una evaluación directa de la viabilidad del miocito. Por el contrario, otras técnicas proporcionan evaluaciones indirectas de la viabilidad miocárdica, como la respuesta contráctil a la dobutamina por ecocardiografía o la fibrosis miocárdica por RM (Thygesen y cols., 2012).

La ecocardiografía es la modalidad más importante en el contexto agudo debido principalmente a su rapidez y disponibilidad. Permite determinar con facilidad y precisión la función ventricular izquierda y establecer un diagnóstico diferencial de disección aórtica, embolia pulmonar, estenosis aórtica, miocardiopatía hipertrófica o derrame pleural (Cheitlin y cols., 2003; Hamm y cols., 2012). Sin embargo, se trata de una técnica altamente dependiente del operador (Ryan y cols., 2008), por lo que se requiere una amplia experiencia (Alonso-Gómez y cols., 2006) para su correcta realización e interpretación.

A pesar de que la TC con multidetector actualmente no se utiliza para la detección de isquemia miocárdica, dicha técnica tiene el potencial de excluir la presencia de cardiopatía isquémica puesto que permite una visualización directa de las arterias coronarias (Hamm y cols., 2012) lo que facilita la detección de estenosis vasculares

(von Ziegler y cols., 2013). La TC ofrece, además, la posibilidad de cuantificar las calcificaciones coronarias, herramienta que ha mostrado su utilidad en la estratificación del riesgo cardiovascular (Morcillo y cols., 2007; von Ziegler y cols., 2013).

A día de hoy la RM es una modalidad que aún no se encuentra ampliamente disponible. No obstante, varios estudios han demostrado su utilidad en el servicio de urgencias para evaluar a pacientes con dolor torácico, habiéndose observado que es capaz de detectar un IM cuando el primer test de Tpn aún es negativo (Kwong y cols., 2003; Cury y cols., 2008).

Para el diagnóstico del infarto se pueden emplear varias técnicas de RM cardiovascular. No obstante, la más precisa y mejor validada es la resonancia magnética con realce tardío (RM-RT) (Wagner y cols., 2003; Ibrahim y cols., 2007; Kim y cols., 2008; Kim y Farzaneh-Far, 2009; Kim y cols., 2010). Este método consiste en obtener imágenes de inversión-recuperación entre 5 a 10 minutos después de la administración intravenosa (IV) de un medio de contraste de gadolinio (Simonetti y cols., 2001; Kim y cols., 2003), mostrándose el miocardio sano de color negro o anulado y el tejido no viable de color blanco brillante o hiperrealzado. Este mecanismo se debe a que los quelatos de gadolinio son agentes extracelulares, por lo que no atraviesan las membranas celulares intactas. En el contexto de un IAM, en

cambio, se produce la ruptura de las membranas celulares lo que permite la entrada de contraste al interior de los miocitos inviables. Como resultado se produce un incremento de la concentración de gadolinio en la zona del infarto, dando lugar al fenómeno de hiperrealce (Kim y cols., 2010).

Una de las grandes ventajas de la RM-RT es que su elevada resolución espacial facilita la visualización de incluso microinfartos que afectan tan sólo a 1g de tejido, mientras que otras técnicas diagnósticas como la ecocardiografía y la exploración radioisotópica requieren la presencia de un daño tisular superior, dificultando así la detección de infartos subendocárdicos y de pequeño tamaño (Kim y Farzaneh-Far, 2009; Kim y cols., 2010). Asimismo, se ha observado que el patrón de hiperrealce aporta información importante con respecto a la etiología de la lesión miocárdica (McCrohon y cols., 2003; Mahrholdt y cols., 2005; Hunold y cols., 2005).

2.3. La terapia celular en el tratamiento del IM

Los tratamientos convencionales como las angioplastias y la colocación de stents coronarios ayudan a restablecer la perfusión del miocardio isquémico disminuyendo la mortalidad precoz tras un IAM. Sin embargo, el tejido miocárdico dañado no se

recupera, siguiéndole un remodelado ventricular patológico e ICC.

En los últimos años el uso de la terapia celular se ha convertido en una estrategia esperanzadora y prometedora para tratar el IM o la ICC derivada de éste (Perin y Silva, 2004; Dimmeler y cols., 2005; Wollert y cols., 2004; Menasché y cols., 2001; Tse y cols., 2003). La identificación del tipo celular más adecuado, así como la dosis y la vía de administración óptima para esta finalidad terapéutica son, por tanto, una importante cuestión. Como resultado se ha propuesto la utilización de diferentes tipos celulares para abordar la problemática (Chamuleau y cols., 2009), incluyendo tanto células madre embrionarias como adultas (Geng y cols., 2006; Escobedo-Uribe y cols., 2012).

El descubrimiento de las células madre embrionarias fue recibido con gran entusiasmo, debido principalmente a su baja inmunorreactividad (Escobedo-Uribe y cols., 2012). Su uso, sin embargo, se ha visto limitado por cuestiones fundamentalmente éticas (Nadal-Ginard y cols., 2006) y su potencial teratogénico (Kumar y cols., 2005; Oettgen y cols., 2006; Thomson y cols., 1998).

En cuanto al uso de células madre adultas, se ha descrito la utilización de diversos tipos celulares en el contexto de la regeneración miocárdica (Fuchs y cols., 2006; Orlic y cols., 2003; Kawamoto y

cols., 2003; Iwasaki y cols., 2006), incluyendo los mioblastos de células esqueléticas, las células mononucleares de médula ósea, las células mesenquimales, etc. No obstante, las que más se han empleado en este ámbito han sido las células madre derivadas de la médula ósea (Chamuleau y cols., 2009). Los resultados de los ensayos basados en el uso de este último tipo celular han mostrado ser tan sólo moderadamente eficaces, lo que algunos autores atribuyen a la falta de datos preclínicos sólidos y al desconocimiento de los mecanismos de diferenciación celular en cardiomiocitos (Nadal-Ginard y Fuster, 2007).

La comparación directa de diferentes tipos celulares es complicada. Ello implica que, a pesar de haberse conducido numerosos estudios tanto clínicos como preclínicos, aún no se conozca con exactitud el tipo celular más adecuado para el abordaje terapéutico del infarto (Sanganalmath y Bolli, 2013).

El hallazgo de una población de células residentes en el miocardio con características de verdaderas CMCs (Beltrami y cols., 2003; Oh y cols., 2003; Martin y cols., 2004; Messina y cols., 2004; Matsuura y cols., 2004; Laugwitz y cols., 2005; Pfister y cols., 2005) cambió la visión del corazón que hasta entonces se había considerado un órgano carente de células madre y capacidad regenerativa (Anversa y Kajstura, 1998).

Hoy en día se sabe que estas células son las responsables del mantenimiento de la homeostasis celular del miocardio (Nadal-Ginard y cols., 2003; Torella y cols., 2006; Chamuleau y cols., 2009) y que tienen la capacidad de reparar lesiones miocárdicas difusas y de pequeño tamaño (Ellison y cols., 2007 a; Ellison y cols., 2007 b). Son conocidas como depósito fisiológico para la regeneración cardíaca (Chamuleau y cols., 2009; Arsalan y cols., 2012), por estar intrínsecamente programadas para generar tejido cardíaco e incrementar la viabilidad del mismo (Chamuleau y cols., 2009; Hosoda, 2012). Asimismo, se les atribuye un bajo riesgo de provocar arritmias (Arsalan y cols., 2012).

Con la rápida evolución de la medicina regenerativa para abordar el tratamiento del IAM, la definición del método óptimo de administración celular (Figura 1) se

convierte en una cuestión de importancia (Taylor y Ott, 2006). Tal y como ocurría en el caso del tipo celular, a día de hoy no existe una técnica ideal para la administración de células madre, presentando todas ellas ciertas ventajas e inconvenientes.

Actualmente, la técnica de administración que más frecuentemente se ha empleado en el ámbito experimental es la inyección intramiocárdica (Zakharova y cols., 2010; Heldman y Hare, 2008; Bel y cols., 2003; Waksman y cols., 2004; Silva y cols., 2005; Mazo y cols., 2008), que permite la visualización directa de la región dañada (Taylor y Ott, 2006; Opie y Dib, 2006).

Dado que el principal objetivo de cualquier modalidad de administración es lograr una concentración de células viables lo suficientemente alta para reparar la lesión

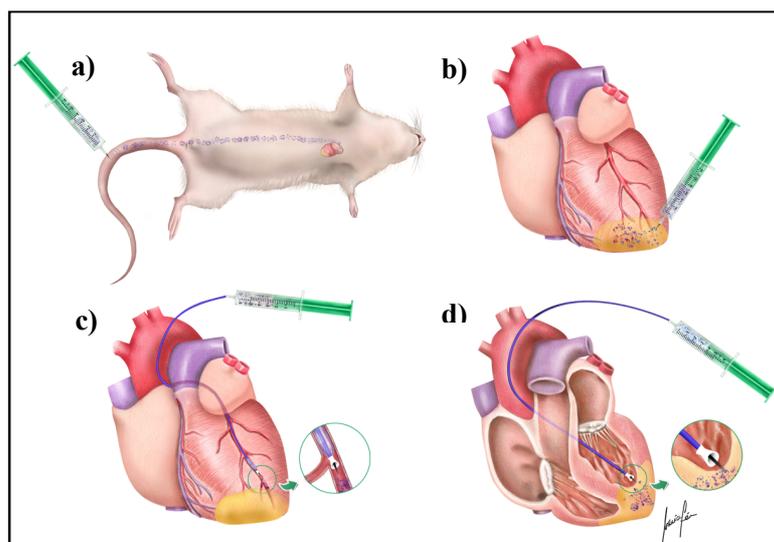


Figura 1: Principales vías de administración utilizadas en el ámbito de la terapia celular. **a)** Vía intravenosa, **b)** Vía intramiocárdica, **c)** Vía intracoronaria y **d)** Vía endomiocárdica.

del miocardio (Chamuleau y cols., 2009; Silva y cols., 2006), el abordaje intramiocárdico no parece óptimo, por producirse la apoptosis de la mayoría de las células administradas (Zakharova y cols., 2010; Robey y cols., 2008).

Otra clara desventaja de esta vía de administración es la necesidad de una toracotomía previa, lo que limita considerablemente su uso, debido a que un número significativo de pacientes que se podrían beneficiar de la inyección de células, no pueden someterse a una cirugía abierta (Taylor y Ott, 2006; Opie y Dib, 2006). En consecuencia, se han planteado otros abordajes menos invasivos como la vía IV, inyección endomiocárdica por vía percutánea y la administración por vía toracoscópica (Taylor y Ott, 2006; Silva y cols., 2006). Mientras que la aplicación por vía IV no permite asegurar una retención celular adecuada en la zona de interés (Oh y cols., 2003; Barbash y cols.), las otras técnicas frecuentemente requieren equipamiento específico que no está disponible en cualquier hospital.

Una vía alternativa es la ruta intracoronaria, que permite una distribución celular más uniforme en la zona del infarto (Li y cols., 2011). Esta técnica tiene la ventaja de no precisar un entrenamiento específico para llevarla a cabo, ni tampoco requerir la adquisición de un equipamiento especial (Opie y Dib, 2006). No obstante, la infusión de células por vía intracoronaria también

ofrece una serie de desventajas. Por un lado, la retención celular es más baja cuando se utiliza esta ruta en comparación con la intramiocárdica (Saganalmath y Bolli, 2013). Por otro lado, existe riesgo de obstrucción microvascular e infarto (Vuliett y cols., 2004; Johnston y cols., 2009), sobre todo con el uso de células mesenquimales, mioblastos de células esqueléticas y células derivadas de cardioesferas (Saganalmath y Bolli, 2013). Un inconveniente adicional es la imposibilidad de utilizar esta modalidad cuando la arteria responsable del infarto está ocluida.

La dosis celular administrada depende en gran medida del modelo animal utilizado, de modo que en modelos de infarto en roedores se emplean dosis generalmente más bajas en comparación con grandes animales y/o humanos. Así, en el caso concreto de las CMCs c-kit+, se ha descrito la administración de una dosis de 40.000 células en ratas infartadas (Rota y cols., 2008; Tang y cols., 2010), mientras que en el cerdo y el paciente humano las dosis celulares probadas han sido de 500.000 (Bolli y cols., 2013) y de 1×10^6 de CMCs (Bolli y cols., 2011), respectivamente.

A pesar de que parece lógico asumir que el efecto de un tratamiento basado en el uso de células madre depende principalmente del número de células administradas, la naturaleza de la relación dosis-efecto es aún desconocida para la mayoría de tipos celulares (Saganalmath y Bolli, 2013). Esto

impide, al menos por el momento, la identificación de la dosis celular óptima.

2.4. Infartos experimentales

La elevada morbi-mortalidad asociada al IAM, así como el incremento exponencial de las investigaciones llevadas a cabo en el campo de la medicina regenerativa cardiovascular requieren el uso de modelos animales tanto para mejorar el conocimiento de los mecanismos implicados en dicha patología como para validar la seguridad y eficacia de nuevas estrategias terapéuticas (Oliveira y Angeli, 2006). En la actualidad, la experimentación animal es un requisito legal encaminado a garantizar la seguridad de nuevos fármacos y procedimientos antes de introducirlos en la clínica humana (Ytrehus, 2000; Chorro y cols., 2009).

Uno de los puntos más importantes que condiciona el éxito posterior de cualquier modelo de patología, así como la posibilidad de extrapolación de los resultados a la clínica humana, es la elección de una especie animal adecuada (Hughes y cols., 2003).

2.4.1. La especie animal adecuada

La elección del modelo experimental adecuado debe basarse fundamentalmente en la finalidad del estudio, es decir, hay que elegir aquel que mejor se adapte a los

objetivos de la investigación. Entre los factores que influyen en esta decisión se encuentran la disponibilidad y accesibilidad a la especie animal que se pretende emplear, las condiciones necesarias para la estabulación, el número de experimentos, el tipo de estudio (agudo o crónico) así como la duración del mismo (Chorro y cols., 2009).

Por cuestiones fundamentalmente económicas gran parte de la experimentación cardiovascular tanto básica como aplicada se ha llevado a cabo en roedores (Pérez de Prado y cols., 2009), por presentar éstos unos costes de mantenimiento generalmente bajos (Hearse y Sutherland, 2000). La utilización de mamíferos de pequeño tamaño ofrece además una ventaja fundamental y es que su vida media corta permite analizar la historia natural del IAM en un periodo de tiempo breve en un gran número de animales (Chorro y cols., 2009; Hearse y Sutherland, 2000). Otros puntos a favor del uso de estas especies son su robustez y la elevada reproducibilidad de los modelos (Hearse y Sutherland, 2000).

A pesar de que el uso de pequeños animales ha mostrado ser muy valioso para la comprensión de gran cantidad de procesos a nivel molecular y celular durante las cuatro últimas décadas (Patten y Hall-Porter, 2009), estos modelos no se asemejan completamente a la realidad observada en la clínica. Existen diferencias considerables

entre las características cardíacas de los roedores y el humano entre los que se cuentan la frecuencia cardíaca, el consumo de oxígeno, el tamaño del órgano, la respuesta a la pérdida de proteínas reguladoras, la expresión de proteínas contractiles y las características fenotípicas de las células madre (Pérez de Prado y cols., 2009; Dixon y Spinale, 2009).

En cambio, los modelos de IAM en grandes animales se asemejan más a la patología humana, por lo que son esenciales a la hora de trasladar los conocimientos obtenidos a la clínica (Hearse y Sutherland, 2000; Dixon y Spinale, 2009). En los últimos años se han planteado multitud de especies de mamíferos de gran tamaño para la modelización de patologías cardiovasculares (Pérez de Prado y cols., 2009; Ou y cols., 2010; Kraitchman y cols., 2000; Krombach y cols., 2005; Reffelmann y cols., 2004; Dixon y Spinale, 2009; Verdouw y cols., 1998). En este sentido, el perro ha sido tradicionalmente la especie más empleada para investigar los efectos de la isquemia miocárdica y del IM (Oliveira y Angeli, 2006). No obstante, su elevado coste, así como la presión social en contra de su uso han centrado la atención en otras especies animales (Verdouw y cols., 1998).

Factores como la disponibilidad y la relativamente buena tolerancia a las intervenciones quirúrgicas hacen que la oveja se haya convertido en un modelo animal frecuentemente utilizado para

estudiar los fenómenos de la isquemia miocárdica. No obstante, este modelo presenta algunas desventajas como son la existencia de variaciones en su anatomía coronaria (lo que obliga a inducir los infartos a través de una toracotomía) (Kim y cols., 2011) y la dificultad para adquirir imágenes mediante técnicas de diagnóstico mínimamente invasivas debido a su anatomía gastrointestinal y contornos torácicos (Dixon y Spinale, 2009).

Los primates tales como los chimpancés representan, en muchos aspectos, el modelo ideal. Son filogenéticamente cercanos a los humanos, tienen un metabolismo similar y ambos desarrollan un síndrome metabólico y enfermedades cardiovasculares a medida que envejecen. Los inconvenientes asociados a estas especies son su larga vida media (requieren experimentos de larga duración) y la existencia de agentes virales potencialmente peligrosos para los humanos. Por otro lado, el uso de primates plantea importantes cuestiones éticas, de modo que su uso solamente está indicado en circunstancias muy limitadas (Russell y Proctor, 2006).

La respuesta a una situación de isquemia miocárdica depende en gran medida de la existencia de circulación colateral. La extensión de dicha circulación ha mostrado ser diferente entre las distintas especies analizadas (Verdouw y cols., 1998). De esta forma, el perro presenta un gran desarrollo de su árbol coronario, lo que en ocasiones

no permite inducir isquemia miocárdica (Dixon y Spinale, 2009), aunque se lleven a cabo oclusiones coronarias prolongadas (Naslund y cols., 1992, Garcia-Dorado y cols., 1987). La especie porcina, en cambio, ha mostrado disponer de una escasa circulación colateral a nivel coronario (Dixon y Spinale, 2009; Pérez del Prado y cols., 2009).

El cerdo ha sido la especie animal que más se ha utilizado en la investigación cardiovascular en los últimos años (Verdouw y cols., 1998), debido fundamentalmente a las limitaciones que presentan las distintas especies citadas, así como por presentar su corazón numerosas similitudes con el de los humanos (Oliveira Angeli, 2006; Teramoto y cols., 2011). Entre estas semejanzas se cuentan la distribución del flujo coronario con un sistema típicamente con dominancia derecha (como ocurre en el 90% de los seres humanos), el sistema de conducción, así como el metabolismo cardíaco (Ytrehus, 2000).

Una característica interesante es la relación existente entre el corazón y el peso corporal. Así, en un animal joven de especie porcina de 30 kg (peso frecuentemente utilizado en investigación) esta relación es casi idéntica a la de los seres humanos, habiéndose demostrado que el sistema cardiovascular de ejemplares jóvenes es lo suficientemente maduro para ser utilizados como modelos en

investigación (Oliveira y Angeli, 2006; Verdouw y cols., 1998).

Múltiples estudios confirman que la anatomía cardíaca humana y porcina es prácticamente idéntica (Douglas, 1972; Hughes, 1986). Aun así, hay que tener en cuenta la existencia de algunas diferencias que pueden ser explicadas en su mayor parte por la diferente posición corporal que presentan ambas especies (unguligrado en el caso del cerdo y ortógrado en el humano). Otras diferencias se deben a la forma lateralmente comprimida de la que dispone el tórax porcino en comparación con la del humano, resultando ello en un corazón típicamente trapezoidal en la especie humana y conoidal en la porcina (Crick y cols., 1998).

Internamente se observa la dominancia de las cámaras cardíacas izquierdas en el caso del corazón porcino (Figura 2 a), presentando su pared ventricular izquierda un mayor grosor que la de los humanos. En consecuencia, el tabique interventricular se encuentra desviado hacia la derecha, componiéndose el ápice cardíaco en su totalidad de musculatura del ventrículo izquierdo. En el humano, en cambio, el ápex se encuentra formado por ambos ventrículos. La aurícula derecha es apreciablemente mayor que la izquierda en el corazón humano (Figura 2 b), mientras que en el caso del cerdo ambas aurículas presentan tamaños similares (Crick y cols., 1998).

La extrapolación de datos de la especie porcina al ser humano justifica la necesidad de obtener un conocimiento detallado de sus arterias coronarias, en particular para evaluar diferencias y similitudes (Vieira y cols., 2008; Weaver y cols., 1986). Aunque se conocen ciertas discrepancias entre la circulación coronaria de ambas especies (Sahni y cols., 2008), la mayoría de los autores concluyen que predominan las semejanzas (Rodrigues y cols., 2005; Sahni y cols., 2008).

El corazón porcino, al igual que el humano, presenta dos ramas arteriales principales. La primera rama, la arteria coronaria izquierda, se divide en la arteria interventricular paraconal (anterior), que transcurre a lo largo del surco interventricular, y en la arteria circunfleja, que lo hace a lo largo del surco auriculoventricular (Crick y cols., 1998). Hay que señalar que los términos

anatómicos son diferentes en la medicina humana y la veterinaria de forma que la rama interventricular paraconal del cerdo, se corresponde con la arteria descendente anterior en el humano (Rodrigues y cols., 2005). La segunda rama, la arteria coronaria derecha, deriva en la arteria coronaria descendente posterior, que transcurre a lo largo del surco interventricular posterior, y la arteria marginal derecha, que irriga el ventrículo derecho (Crick y cols., 1998; Rodrigues y cols., 2005).

Por su parte, el sistema venoso coronario porcino se caracteriza principalmente por carecer de la vena álgos derecha, que en el humano desemboca en la vena cava superior derecha. Por el contrario, en el cerdo se encuentra una prominente vena álgos izquierda, que está ausente en el hombre (Swindle y Smith, 1998).

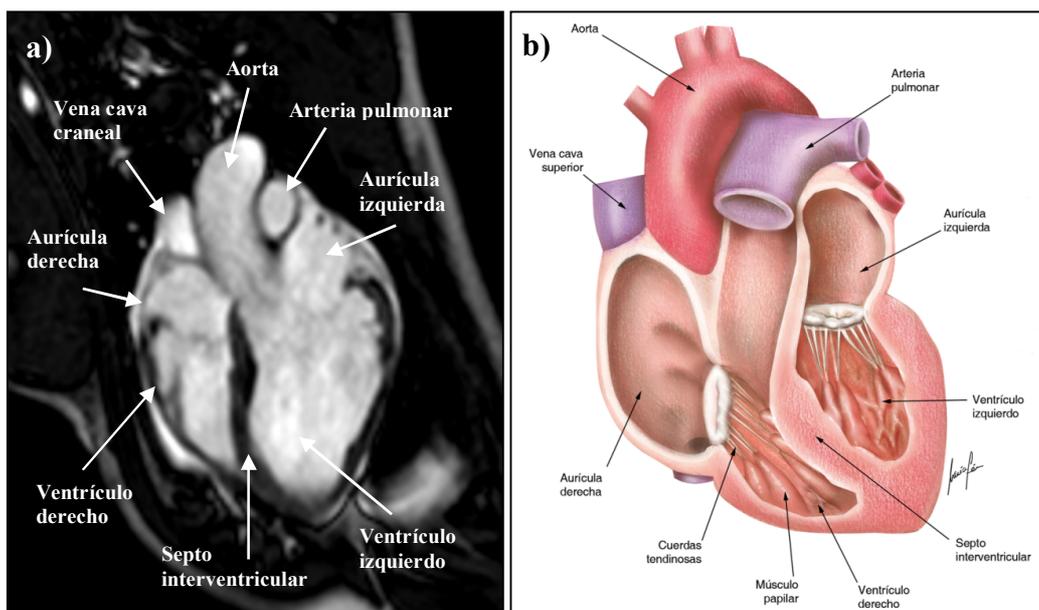


Figura 2: a) Imagen de RM en cuatro cámaras del corazón porcino. Se observa desviación del septo interventricular hacia las cámaras cardiacas derechas. b) Imagen del corazón humano en cuatro cámaras. Se observa predominancia de la aurícula derecha.

2.4.2. Modelos de IM

La inducción de un modelo de IM puede lograrse principalmente por medio de dos métodos. El primero consiste en inducir una lesión aterosclerótica a nivel de las arterias coronarias. Esta técnica, a pesar de imitar de forma más exacta la situación de la enfermedad en los seres humanos, raramente es utilizada en estudios de investigación puesto que la inducción del modelo requiere un largo periodo de tiempo. El segundo método se basa en provocar un bloqueo total o parcial de una arteria coronaria (Russell y Proctor, 2006, Ou y cols., 2010).

La arteria que más frecuentemente se ha utilizado para llevar a cabo la inducción de isquemia miocárdica es la rama descendente anterior de la arteria coronaria izquierda, aunque también se ha descrito la oclusión de la rama circunfleja como método de inducción de infarto, presentando éste último la ventaja de producir tasas de mortalidad inferiores (McCall y cols., 2012).

La razón principal por la que se prefiere la oclusión a nivel de la arteria descendente anterior se debe a que éste es el lugar en el que con mayor frecuencia se producen los infartos en el ser humano. Asimismo, la isquemia a nivel de dicha arteria produce un deterioro considerablemente mayor de la función ventricular izquierda en

comparación con las oclusiones a nivel de la arteria circunfleja (McCall y cols., 2012).

Para las especies previamente citadas se han descrito diferentes modelos de creación de IM. La mayoría de estos métodos emplean técnicas quirúrgicas abiertas para realizar la oclusión coronaria, otros, no obstante, utilizan técnicas endovasculares menos invasivas mediante las que se ocluye de forma permanente (Eldar y cols., 1996; Reffelmann, 2004) o temporal (Reffelmann y cols., 2004; Krombach y cols., 2005; Suzuki y cols., 2008; Thomas y cols., 2005) una arteria coronaria.

Las técnicas de tórax abierto incluyen la oclusión mediante la colocación de dispositivos alrededor del vaso en cuestión (Klocke y cols., 2007; Ou y cols., 2010) y la creación de lesiones a nivel coronario mediante la aplicación de calor (electrocoagulación) o frío (criolesión) (Ou y cols., 2010, Zaragoza y cols., 2011). La ligadura de la arteria descendente anterior (Klein y cols., 1984; Kuster y cols., 2011; Maxwell y cols., 1987; Reimer y Jennings, 1979) es probablemente la técnica más extendida, destacando sobre todo por su relativa sencillez y reproducibilidad (Huang y cols., 2010).

El uso de dispositivos tales como los constrictores ameroides se ve limitado por provocar un cierre gradual del vaso, permitiendo ello el desarrollo de circulación colateral y disminuyendo el grado de

isquemia. La utilización de balones de oclusión externos se asocia a una menor tasa de mortalidad y una menor invasión. Su colocación, sin embargo, requiere un elevado grado de experiencia. Los inconvenientes relacionados con los métodos de creación de infarto mediante frío o calor se deben a que no se garantiza la inducción del modelo patológico y que el daño tisular que se produce no se asemeja a las lesiones producidas por un infarto natural (Ou, y cols. 2010).

Existen una serie de desventajas que son comunes a todas las técnicas de tórax abierto anteriormente descritas. Estas derivan de su carácter invasivo, su mayor riesgo de infecciones y su mayor tasa de complicaciones (Pérez de Prado y cols., 2009). La toracotomía interfiere con el funcionamiento normal del corazón y ejerce, junto a la apertura del pericardio, influencia sobre el patrón de remodelación del corazón izquierdo. Además, el trauma quirúrgico puede dificultar la recuperación anestésica en modelos de IAM (Kraitchman y cols., 2000; Lüdemann y cols., 2007).

Los modelos anteriormente citados generalmente no permiten restaurar el flujo coronario a nivel de la arteria ocluida, de modo que en muchas ocasiones no es posible instaurar un periodo de reperfusión. Asimismo, la toracotomía produce un aumento de artefactos en las imágenes de RM que provienen de la interferencia miocardio-aire, lo que dificulta la

evaluación de dichas imágenes (Krombach y cols., 2005).

Con el objetivo de obviar las limitaciones de los modelos de tórax abierto se han ideado métodos endovasculares que permiten la creación de infartos sin previa toracotomía. Éstos son clínicamente más relevantes que los quirúrgicos (Kraitchman y cols., 2003), sobre todo a la hora de evaluar tratamientos para el IM.

Las ventajas del empleo de dichas técnicas endovasculares se deben fundamentalmente a su propiedad mínimamente invasiva y su gran seguridad (Dixon y Spinale, 2009). Éstas presentan además una menor incidencia de infecciones y tasa de complicaciones que pueden comprometer tanto la supervivencia del animal como la validez de los resultados (Kraitchman y cols., 2000).

Se han creado modelos de IAM inyectando material trombogénico (microcoils, esponjostan, mezclas de fibrinógeno y trombina, etc.) por vía intracoronaria (Tomita y cols., 2002; Liu y cols., 2007; Koning y cols., 1993; Näslund y cols., 1992, Kim y cols., 2011). Sin embargo, estos métodos no permiten llevar a cabo una reperfusión de forma controlada, restableciéndose el flujo coronario en el interior de la arteria tras la lisis espontánea del material empleado para la oclusión, lo que limita su uso para la evaluación de tratamientos en la fase aguda del IM.

Otra forma de inducir un IAM consiste en la administración intracoronaria de etanol, método que destaca por su rapidez y sencillez (Crisóstomo y cols., 2013 a). No obstante, en este modelo tampoco es posible recanalizar la arteria de forma inmediata tras la instauración del infarto, manteniéndose ésta en muchos casos completamente ocluida durante un periodo de al menos 4 semanas (Kim y cols., 2011).

Los infartos también pueden crearse farmacológicamente. Para ello se han administrado por distintas vías fármacos como el isoproterenol, la adriamicina y la ergonovina. Estos productos incrementan el consumo de oxígeno a nivel miocárdico o producen un espasmo de la arteria coronaria disminuyendo el aporte sanguíneo. La principal ventaja de estos modelos es que no se requieren procedimientos quirúrgicos complicados. A pesar de ello, la seguridad de los fármacos, así como la dificultad para elegir de forma adecuada la localización del infarto hacen que estos métodos no gocen de una gran popularidad en el campo de la investigación cardiovascular (McCall y cols., 2012).

El método endovascular más frecuentemente empleado es la oclusión arterial con balones coronarios. Éste ofrece las ventajas comunes a las técnicas de tórax cerrado, requiere un periodo de preparación inferior al de los procedimientos quirúrgicos y permite controlar tanto la

localización como el tiempo de oclusión. En este sentido, en la bibliografía se han descrito tiempos de oclusión coronaria con balón de 30 (Suzuki y cols., 2008), 45 (Krombach y cols., 2005), 60 (Suzuki y cols., 2008), 75 (Pérez de Prado y cols., 2009; Regueiro-Purriños y cols., 2011), 90 (Angeli y cols., 2009), 120 (Schuleri y cols., 2008) y hasta 150 minutos (Sasano y cols., 2009). Asimismo se han descrito varias localizaciones, colocándose el balón en posición proximal (Suzuki y cols., 2008) (por encima de la primera rama diagonal) o en posición media, debajo de la primera (Angeli y cols., 2009) o la segunda rama diagonal (Schuleri y cols., 2008).

El abordaje para llevar a cabo la oclusión mediante balón se establece, en la mayoría de los estudios, a través de una de las dos arterias carótidas. Esta vía de acceso proporciona una ruta directa al corazón sin necesidad de navegar a través del arco aórtico. No obstante, la situación anatómica de estas arterias en el cerdo no permiten un acceso percutáneo, requiriéndose en su lugar una disección quirúrgica. El acceso femoral supone una alternativa menos invasiva al carotídeo. La dificultad de tomar el pulso en la zona de punción (en el caso del cerdo) y el menor calibre del vaso, sin embargo, han hecho que la arteria femoral no se considere el vaso ideal para llevar a cabo una punción percutánea (Mc Call y cols., 2012).

III. Material y Método

Aprobado el proyecto por parte del Comité Ético de Bienestar Animal (CEBA) del CCMIJU, así como por la Comisión de Bioética y Bioseguridad de la Universidad de Extremadura, el estudio se llevó a cabo en las instalaciones del CCMIJU, acreditado como Centro Usuario y de Cría de Animales de Experimentación (ES 100370001499), por la Consejería de Agricultura y Desarrollo Rural de la Junta de Extremadura.

Para la realización de la fase experimental se siguieron las pautas del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

El estudio de investigación se incluye dentro de los paquetes de trabajo y tareas realizadas en colaboración entre el CCMIJU y la empresa Coretherapix ubicada en Madrid, recibiendo financiación por la Comisión Europea en el contexto de su Séptimo Programa Marco (7FP HEALTH-2009-1.4-3:242038-CARE-MI).

3.1. Sujetos del estudio

Para llevar a cabo el presente estudio se emplearon un total de 30 hembras de

especie porcina (*Sus scrofa domestica*), de la raza Large White, con un peso medio de $30,93 \pm 2,48$ kg.

Tras un periodo de dos semanas de cuarentena y aclimatación, los animales fueron sometidos a una evaluación clínica con el fin de confirmar su buen estado de salud. Aquellos individuos considerados como aptos, se alojaron de forma individual en los cubículos del animalario del CCMIJU, administrándoles agua *ad libitum* y pienso de mantenimiento una vez al día.

Los sujetos del estudio recibieron el tratamiento farmacológico mostrado en la tabla 1, encaminado principalmente a evitar y combatir posibles infecciones, arritmias y procesos tromboembólicos, así como aliviar el dolor asociado a la intervención.

3.2. Método

3.2.1. Justificación del Método

Los resultados obtenidos en estudios preclínicos han mostrado que la implantación de una población específica de CMCs desencadena un potente proceso regenerativo endógeno mediante la activación de células madre cardíacas endógenas, restaurando la anatomía y función del miocardio (Urbanek y cols.,

PRINCIPIO ACTIVO	NOMBRE COMERCIAL	PRESENTACIÓN	POSOLÓGIA
AMIODARONA	TRANGOREX®	Comprimidos 200mg	400mg/24h vía oral (VO) desde 7 días antes y hasta 3 días después de la inducción del infarto
ÁCIDO ACETIL SALICÍLICO	ASPIRINA®	Comprimidos 500mg	500mg/24h VO desde 1 día antes de la inducción del infarto y hasta el fin de estudio
SUCRALFATO	URBAL®	Suspensión oral 1g	1sobre/24h VO hasta el fin de estudio
CLOPIDOGREL	PLAVIX®	Comprimidos 75mg	300mg/24 horas VO antes de la intervención;75mg/24h VO hasta el fin de estudio
CEFTIOFUR CLORHIDRATO	EXCENEL®	Inyectable 50mg/ml	3mg/kg vía intramuscular (IM) desde el día de la inducción del infarto y hasta 5 días después
FENTANILO	DUROGESIC®	Parche transdérmico de 25 µg/h	Colocación de un parche en quirófano tras la inducción del modelo
BUPRENORFINA	BUPREX®	Inyectable 0,3mg/ml	1 ampolla vía IM la tarde de la inducción del modelo, a la mañana siguiente y tras la inyección intracoronaria

Tabla 1: Tratamiento farmacológico administrado a los sujetos del estudio desde 1 semana antes y hasta la finalización de la investigación.

2005). Además, a estas células se les atribuye un elevado tropismo por el miocardio (Hofmann y cols., 2005; Schächinger y cols., 2008) y un bajo riesgo de provocar arritmias (Arsalan y cols., 2012).

La mayor parte de los ensayos, se han basado en el uso de células autólogas, es decir, células procedentes del propio paciente. A pesar de la eficacia encontrada, la terapia mediante células autólogas presenta ciertas limitaciones. En primer lugar, el aislamiento y la expansión del número necesario de células para tratar a un paciente en muchas ocasiones no se logra, sobre todo cuando se trata de donantes de edad avanzada. En segundo lugar, el aislamiento y la expansión de estas células es un proceso largo que requiere varios meses, por lo que no permite tratar a los pacientes en la fase aguda de un IM

(Johnston y cols., 2009; Nadal-Ginard y cols., 2003; Nadal-Ginard y cols., 2006).

Por consiguiente, parece más apropiado centrarse en los protocolos de terapia celular que se basan en la administración de células madre de origen alogénico, cumpliendo esta opción terapéutica con los criterios de coste, viabilidad y disponibilidad para un tratamiento de uso amplio y en fase aguda.

Es importante señalar que la eficacia de las CMCs ha sido demostrada sobre todo en modelos de infarto en pequeños mamíferos (Linke y cols., 2005; Dawn y cols., 2005). A pesar de su indudable valor como prueba de concepto, la extrapolación de datos obtenidos en roedores a la patología humana es discutible (Ellison y cols., 2011; Patten y Hall-Porter, 2009; Pérez de Prado y cols., 2009; Dixon y Spinale, 2009). Por ello es conveniente acumular suficientes

datos en un modelo animal cercano al humano, que utilice una dosis celular y una vía de administración compatible con la clínica.

En el presente estudio nos hemos decantado por la especie porcina, por ser ésta la más atractiva para validar protocolos de regeneración miocárdica, debido fundamentalmente a las similitudes existentes entre el cerdo y el humano (Ellison y cols., 2011; Oliveira y Angeli, 2006; Teramoto y cols., 2011; Ytrehus, 2000; Patten y Hall-Porter, 2009; Pérez de Prado y cols., 2009; Verdouw y cols., 1998). No obstante, no solo la especie animal, sino también la técnica utilizada para la inducción del modelo de patología son puntos a tener en cuenta. En este sentido, el modelo de infarto ideal debería combinar varios aspectos entre los que se encuentran la opción de poder seleccionar el tamaño del infarto y poder reproducirlo, mantener la permeabilidad de las arterias coronarias (en el modelo agudo) tras la producción de la necrosis y ser lo menos invasivo posible para reducir el número de variables que pueden influir en el resultado (Crisóstomo y cols., 2013 a).

El método de creación de IAM que más se acerca a este modelo ideal es la oclusión de la arteria interventricular paraconal mediante un balón de angioplastia pues, por un lado, la arteria correspondiente en el humano (la arteria coronaria descendente anterior) es dónde se produce el mayor

número de infartos (Zhang y cols., 1996) y, por otro lado, el patrón de remodelado ventricular tras la oclusión de dicha arteria es muy similar al que ocurre en la especie humana (Verdouw y cols., 1998). Asimismo, se ha descrito que este método de inducción de infarto permite estandarizar el tamaño del mismo controlando el tiempo y el lugar de oclusión. Otra ventaja fundamental de este modelo es que en casi todos los casos la arteria permanece permeable (Pérez de Prado y cols., 2009), tal y como ocurre en la mayoría de los pacientes tratados mediante angioplastia, lo que en nuestro caso fue un requisito indispensable para poder administrar las células por la ruta intracoronaria.

Esta vía de administración permite llevar a cabo la infusión celular de forma mínimamente invasiva (Johnston y cols., 2009). Se trata de una modalidad que se ha probado con éxito en diversos ensayos clínicos (Bolli y cols., 2011; Fischer-Rasokat y cols., 2009; Diederichsen y cols., 2010; Yao y cols., 2008; Seth y cols., 2006; Gao y cols., 2006; Blatt y cols., 2005). Para llevar a cabo una inyección intracoronaria tan sólo se requiere una sala de cateterización cardiaca, sin necesidad de un entrenamiento y/o equipamiento adicional al que se precisa para las técnicas de reperfusión mecánica como la angioplastia (Opie y Dib, 2006), lo que favorece un uso amplio en la clínica (Sanganalmath y Bolli, 2013).

La dosis celular empleada depende principalmente de dos factores: la vía de administración y el tipo celular. Así, se ha mostrado que la infusión de células madre mesenquimales puede provocar oclusión microvascular e infarto cuando es utilizada la vía intracoronaria (Vuliett y cols., 2004). El mismo problema se ha observado tras la inyección de mioblastos de células esqueléticas (Suzuki y cols., 2000) y células derivadas de cardioesferas (Johnston y cols., 2009). Esto se debe al elevado tamaño medio que presentan estos tipos celulares (20 μm), excediendo el diámetro de lumen capilar. *Johnston y cols.* han demostrado que, por la vía intracoronaria y tomando ciertas medidas, se pueden administrar hasta 25×10^6 de células derivadas de cardioesferas de origen porcino en cerdo sin causar efectos adversos (Johnston y cols., 2009). Las células utilizadas en la presente investigación tienen un tamaño medio inferior (13,5 μm) al de las células previamente mencionadas, por lo que cabe esperar que se pueda administrar una dosis celular superior a la de 25×10^6 sin provocar oclusión microvascular o infarto.

En cuanto al momento óptimo para la administración de células, se ha observado una mayor eficacia en términos de mejora de la funcionalidad cardíaca cuando se utilizan los días 4 y 7 post-IAM en comparación con inyecciones llevadas a cabo en las primeras 24 horas tras un infarto (van der Spoel y cols., 2011; Zhang y cols., 2009). Esto posiblemente se deba a la

presencia de una potente reacción inflamatoria inmediatamente tras el establecimiento de un IM (Ertl y Frantz, 2005; Bovini y cols., 2005), lo que podría limitar la supervivencia de las células administradas en fases muy agudas de la patología (Moelker y cols., 2007).

Según las guías actuales del American College of Cardiology y la European Society of Cardiology, los métodos más útiles para la detección de necrosis a nivel del miocardio son la determinación de biomarcadores en sangre, la valoración electrocardiográfica del paciente así como las técnicas de imagen no invasivas como la RM (Thygesen y cols., 2012). En nuestro caso, la elección ha recaído sobre la determinación de la Tpn I y la CK-MB, pues permiten una detección rápida y precoz del daño miocárdico. No obstante, la determinación de la Tpn en estudios experimentales se ha asociado a falsos positivos (Csonka y cols., 2010), por lo que la combinación con otra técnica más fiable es necesaria para establecer un diagnóstico definitivo.

En la mayoría de los estudios tanto preclínicos como clínicos, se han evaluado los cambios que se producen a nivel de la función ventricular tras la administración de una terapéutica a base de células madre (Nguyen y cols., 2011). Actualmente, la fracción de eyección (FE), el volumen sistólico final (VSF) y el volumen diastólico final (VDF) son los principales

parámetros para evaluar la eficacia de un determinado tratamiento regenerativo (Kurbanov y cols., 2013). La correcta y exacta evaluación de estos parámetros es crítica, pues los cambios observados tras la aplicación de una terapia a base de células madre son generalmente pequeños (Nguyen y cols., 2011). La RM permite además valorar la evolución del tamaño del infarto, lo que se está convirtiendo en un parámetro de gran interés en los ensayos clínicos (Kim y cols., 2010).

3.3. Planteamiento Experimental

Tras un periodo de aclimatación de dos semanas se indujo por vía endovascular un modelo de IAM en 23 de los 30 animales del estudio. Los 7 sujetos restantes sirvieron

como controles sanos. Una vez creado el modelo, las cerdas supervivientes fueron distribuidas de forma aleatoria en uno de los grupos de estudio (Figura 3). Siete días tras el infarto, cada uno de los ejemplares recibió (en función de su grupo) una inyección intracoronaria de vehículo de administración (grupo 1), una dosis de 25×10^6 (grupo 2) o una dosis de 50×10^6 (grupo 3) de CMCs de origen porcino.

3.4. Anestesia

Tras haber permanecido los animales en ayunas durante un periodo de 24 horas, recibieron, como medicación preanestésica, una inyección de 10mg/kg de ketamina por vía IM (Ketolar® 50mg/ml, Pfizer Ireland Pharmaceuticals, County Dublin, Irlanda)

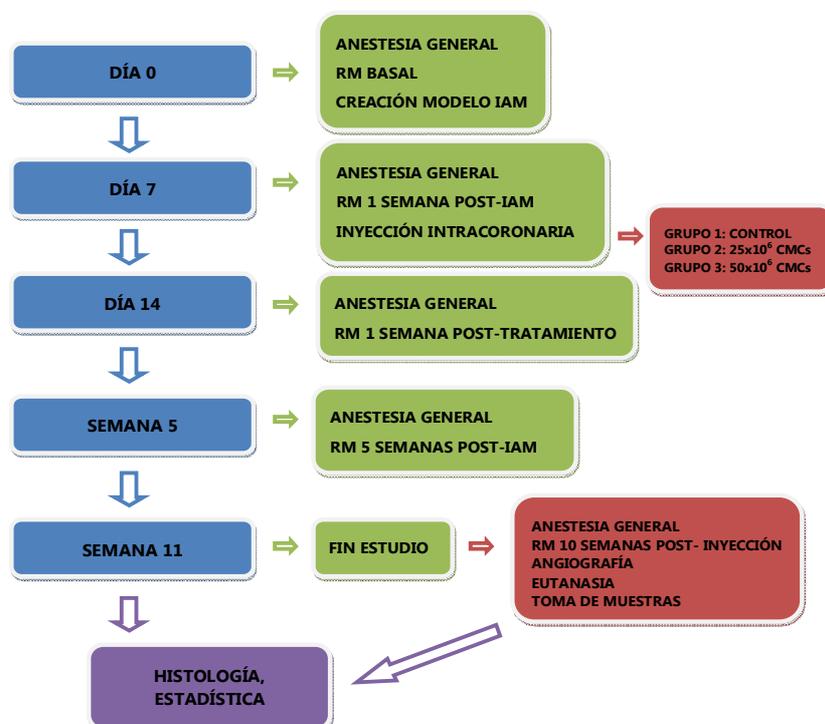


Figura 3: Protocolo experimental.

Transcurridos unos 15 minutos, se procedió a la inducción anestésica mediante la administración endovenosa de 2mg/kg de Propofol (Recofol® 10mg/ml, Bayer, Melsungen, Alemania), así como 1µg/kg de Remifentanilo (Ultiva® 2mg, Glaxo SmithKline S.A., Madrid) previa cateterización de la vena auricular marginal.

Seguidamente se llevó a cabo la intubación endotraqueal para facilitar la ventilación mecánica mediante la conexión a un equipo de anestesia (Leon®, Heinen & Löwenstein, Bad Ems, Alemania) aplicando un volumen tidal de 10ml/kg y una frecuencia respiratoria de 12 ventilaciones/minuto. El mantenimiento anestésico se efectuó mediante infusión continua de Propofol (10mg/kg/h) y Remifentanilo (0,3µg/kg/min).

3.5. Resonancia Magnética Basal

Bajo un plano profundo de anestesia, se evaluó morfológica y funcionalmente el

corazón de los 30 animales incluidos en la investigación haciendo uso de la RM, para lo cual se empleó un sistema de 1,5 Teslas (Intera 1,5 Teslas, Philips Medical Systems, Best, Países Bajos), con sistema de gradientes Nova (33mt/m; 160mT/m/ms), así como una antena multicanal de 4 elementos (SENSE body coil, Philips Medical Systems, Best, Países Bajos). Las imágenes se obtuvieron con sincronismo cardiaco basado en vectocardiograma y en apnea.

Este estudio incluyó secuencias en modo cine con estado estacionario de precesión libre para analizar la función ventricular (SENSEx2, TR 2,4ms, TE 1,2ms, resolución espacial de 1,6x2mm, 30 fases por ciclo, grosor de corte de 8mm sin espaciado). Se captaron imágenes en los planos de eje corto del VI (10-15 cortes consecutivos, cubriendo ambos ventrículos desde las válvulas aurículo-ventriculares hasta el ápex), 4 cámaras y 2 cámaras (eje largo de VI) (Figura 4).

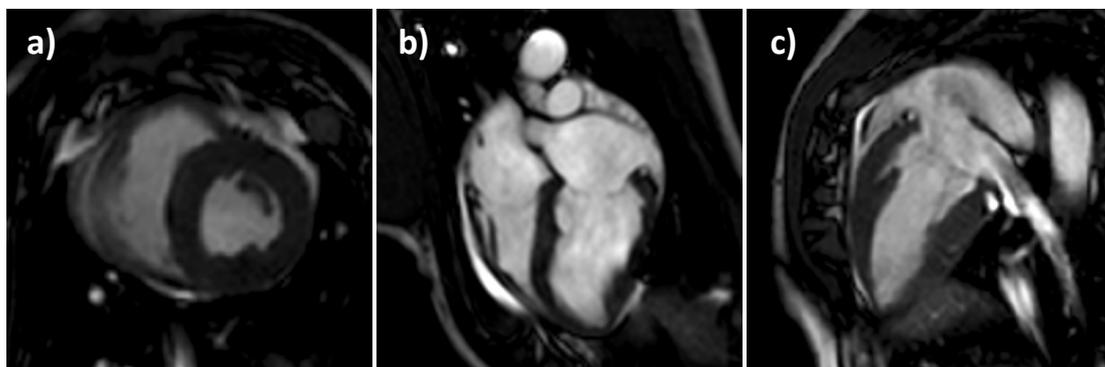


Figura 4: Imágenes de RM de los planos cardiacos de eje corto (a), cuatro cámaras (b) y eje largo (c).

3.6. Inducción del modelo de IAM

Para la creación del modelo de IAM, los animales se colocaron en decúbito dorsal, con extensión craneal y caudal de las extremidades. A continuación se procedió al rasurado y lavado quirúrgico de la zona infra-umbilical para colocar en una de las dos arterias femorales una vaina introductora de 7Fr (Terumo Corporation, Tokio, Japón), empleando la técnica de Seldinger modificada. Seguidamente se administraron 150UI/kg de heparina sódica endovenosa (Heparina Hospira® 5%, Laboratorios Farmacéuticos Rovi, Madrid), repitiéndose la mitad de la dosis correspondiente cada 60 minutos durante el periodo de la intervención.

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

En este momento se inyectó por vía intracoronaria una dosis de 100µg de nitroglicerina (Solinitrina®, Kern Pharma, Barcelona, España) diluida en 5ml de suero salino fisiológico al 0,9% (Braun Medical, Barcelona, España), con el fin de tratar

posibles espasmos vasculares. En caso de detectarse posteriores espasmos a nivel de la arteria coronaria, se inyectó una segunda dosis de nitroglicerina (100µg).

Se realizó una coronariografía basal mediante la inyección manual de medio de contraste diluido al 50% (Urografin®, Bayer, Berlin, Alemania) en la proyección Oblicuo Anterior Izquierdo (OAI) 40° (Figura 5 a), para medir a continuación el diámetro de la arteria interventricular paraconal por debajo del origen de la primera rama diagonal utilizando el catéter guía como referencia.

Se avanzó una guía de 0,014" y una longitud de 190cm (Spartacore 14®, Abbott Vascular, Santa Clara, EEUU) hasta la parte más distal de la arteria interventricular paraconal lo que permitió la colocación de un stent coronario balón-expandible (Apolo®, Iberhospitex S.A., Barcelona, España) de entre 2,5 y 3,5mm de diámetro (en función de la zona diana) distal a la primera rama diagonal (Figura 5 b).

Previo al inflado del balón se administraron por vía endovenosa lenta 150mg de amiodarona (Trangorex® 150mg/3ml, Sanofi Aventis, Barcelona, España) en 10ml de suero glucosado al 5% (Braun Medical SA, Barcelona, España). Además, inmediatamente antes de ocluir la arteria se inyectó una dosis de 1mg/kg de lidocaína a través de la misma vía.

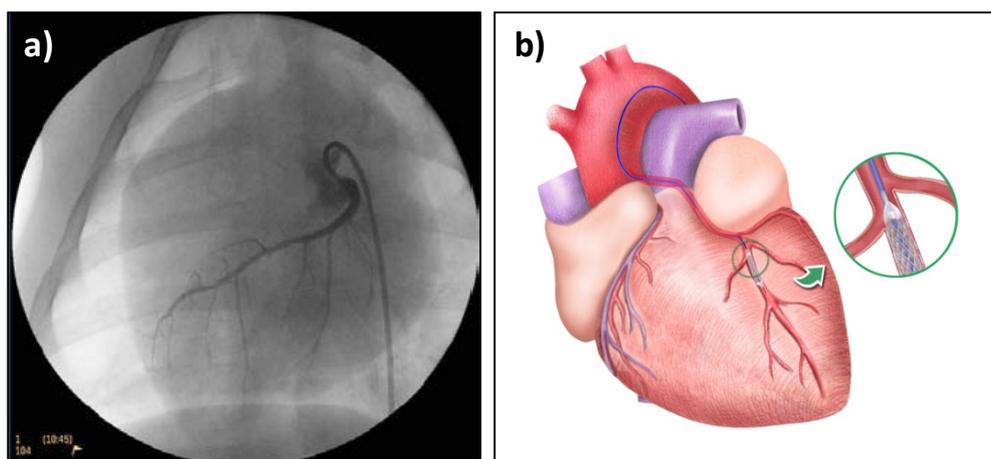


Figura 5: a) Coronariografía en proyección OAI 40°. b) Colocación del stent coronario inmediatamente distal a la primera rama diagonal de la arteria interventricular paraconal.

La insuflación del balón a presión nominal se realizó con ayuda de un manómetro (Encore®, Boston Scientific, Natick, EEUU) lo que facilitó la expansión del stent, interrumpiéndose a su vez el flujo coronario epicárdico desde el punto donde el balón se encontraba abocado (Figura 6 a).

La oclusión del vaso se comprobó mediante una coronariografía inmediatamente después de inflar el balón así como 90

minutos más tarde (Figura 6 b), justo antes de proceder al desinflado.

Durante el periodo de oclusión coronaria se extremó la vigilancia y monitorización de los animales con el objeto de tratar posibles arritmias o fibrilaciones con ayuda de un desfibrilador externo (Zoll M Series Bifásico 200J, Zoll Medical Corporation, Massachussets, EEUU) y masaje cardiaco (Nolan y cols., 2010).

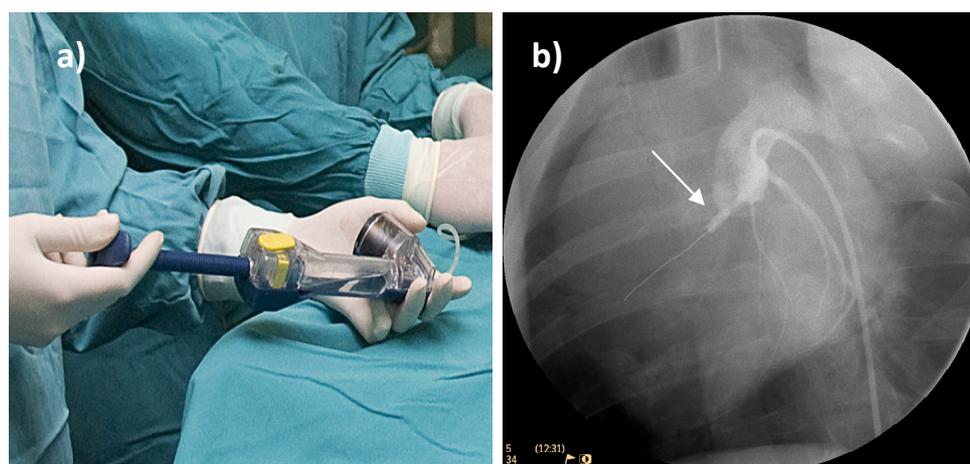


Figura 6: a) Insuflación del balón con ayuda de un manómetro. b) Se observa balón insuflado (flecha) inmediatamente distal a la primera rama diagonal de la arteria interventricular paraconal.

Una vez desinflado el balón, se retiraron tanto el catéter como la vaina femoral, realizándose hemostasia del punto de punción arterial mediante compresión manual durante un periodo mínimo de 10 minutos.

Los animales se mantuvieron monitorizados, bajo anestesia general, durante 60 minutos tras la inducción del infarto (periodo de reperfusión) tras lo cual se procedió a la recuperación anestésica y al traslado al animalario.

3.7. Seguimientos mediante RM

Bajo anestesia general se llevaron a cabo diferentes seguimientos mediante RM: 1 semana post-IAM (previa a la inyección intracoronaria), 1 semana post-inyección, 5 semanas post-IAM y 10 semanas post-inyección. Los 7 animales que sirvieron como controles sanos fueron evaluados con esta técnica de imagen al inicio del estudio, así como 10 semanas más tarde.

Los estudios de seguimiento incluyeron, además de las secuencias de cine previamente citadas en la RM basal, la adquisición de imágenes de realce tardío de la escara miocárdica (secuencia 3D de eco de gradiente potenciado en T1, inversión-recuperación; retraso del pulso optimizado para la máxima supresión de la señal miocárdica mediante secuencia look-locker; TR 3,4ms, TE 1,3ms, resolución espacial

1,4x1,7mm, grosor de corte 5mm, tiempo de inversión 200-300ms). Éstas se adquirieron en eje corto unos 6 a 10 minutos tras la administración de 0,2mmol/kg de gadobutrol (Gadovist®, Bayer, Berlin, Alemania).

3.8. Preparación del vehículo/ de la solución celular

Tanto el vehículo de administración como ambas dosis celulares fueron preparadas en el laboratorio de Terapia Celular del CCMIJU durante la cateterización cardiaca.

El vehículo se obtuvo de la mezcla de suero salino fisiológico (Braun Medical SA, Barcelona, España) con seroalbúmina humana (Grifols, Barcelona, España) a una concentración final del 5%.

Para la administración celular se utilizaron células procedentes de biopsias obtenidas de distintas localizaciones del miocardio, ápex, orejuelas derecha e izquierda y VI de cerdos machos donantes. Tras el procesado de las biopsias mediante digestión enzimática con collagenasa, se procedió a la inmunoselección magnética. Una vez expandidas y subcultivadas en varios pases, las células fueron alicuotadas en viales de criopreservación y congeladas en nitrógeno líquido por la empresa Coretherapix.

La preparación celular en el CCMIJU se llevó a cabo descongelando los viales de

criopreservación a 37°C. A continuación las células fueron diluidas en 20ml de vehículo de administración. Con el fin de retirar el dimetil sulfóxido (sustancia empleada como medio de congelación celular) se centrifugó la solución anterior a 600g durante 8 minutos re-suspendiéndose el pellet (sedimento celular) en el vehículo. Una vez pasadas las células por un filtro de 40µm, se realizó el recuento celular, ajustándose la concentración a $2,1 \times 10^6$ células/ml.

Inmediatamente antes de proceder a la infusión celular, así como 24 horas más tarde se comprobó la viabilidad de las CMCs, utilizándose para ello un contador de células automático (Countess®, Invitrogen).

3.9. Inyección intracoronaria

Una semana tras la inducción del modelo (e inmediatamente después de haber realizado

el primer seguimiento mediante RM) se procedió, bajo condiciones de esterilidad, a la cateterización de la arteria interventricular paraconal utilizando el mismo procedimiento que se empleó para la inducción del infarto.

Una vez colocada una guía de 0,014" y 300cm de longitud (Spartacore 14®, Abbott Vascular, Santa Clara, EEUU) en la parte distal de la arteria interventricular paraconal, se desplazó un microcatéter de infusión de 3Fr y 150cm de longitud (Microferret®, Cook, Bloomington IN) sobre ella. Tras colocar el microcatéter a la altura del stent coronario, se retiró la guía (Figura 7 a).

En este momento cada uno de los animales recibió, a través del microcatéter y en función del grupo de estudio, el siguiente tratamiento intracoronario (Figura 7 b):

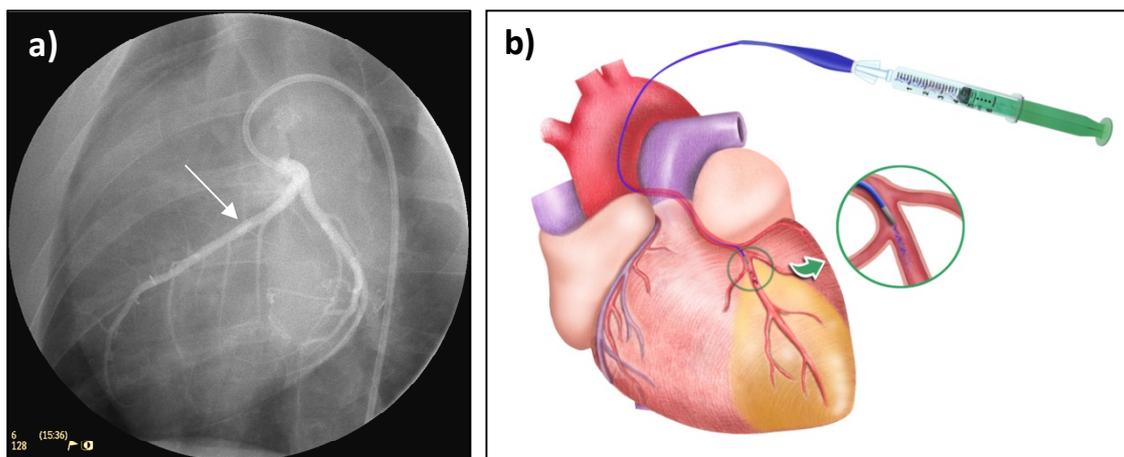


Figura 7: a) y b) Colocación del extremo del microcatéter inmediatamente distal a la primera rama diagonal.

- **Grupo 1 (Control):**
Se inyectaron 24ml de vehículo de administración dividido en 4 ciclos de inyección de 6ml cada uno. El ritmo de infusión empleado fue de 2ml/min, esperando 3 minutos entre dos inyecciones consecutivas.
- **Grupo 2 (25×10^6):**
Se infundieron 25×10^6 de CMCs de origen porcino contenidas en un volumen final de 12ml de vehículo de administración, empleando para ello 2 ciclos de inyección de 6ml cada uno a igual ritmo de infusión que en el grupo anterior.
- **Grupo 3 (50×10^6):**
Se administraron 50×10^6 de CMCs de origen porcino contenidas en un volumen final de 24ml de vehículo de administración, llevando a cabo 4 ciclos de inyección de 6ml cada uno utilizando el mismo ritmo de infusión y tiempo de espera entre cada dos inyecciones.

Tras finalizar la administración del vehículo/ de la solución celular, los animales se mantuvieron monitorizados bajo anestesia general durante una hora, con el fin de tratar posibles arritmias o fibrilaciones. Una vez recuperados los sujetos de la anestesia, se trasladaron a las dependencias del animalario.

3.10. Eutanasia y necropsia

La eutanasia de los animales se efectuó mediante la administración de una dosis letal de cloruro potásico por vía intravenosa, siempre bajo un plano profundo de anestesia general, siguiendo las recomendaciones del American Veterinary Medical Association Guidelines for the Euthanasia on Animals (Leary y cols., 2013).

Inmediatamente después se procedió a la realización de un estudio de necropsia y extracción del corazón. Se llevaron a cabo secciones transversales del mismo (desde el ápex hasta el borde inferior del stent coronario) a distintos niveles representativos de los cortes obtenidos mediante RM (Figura 8 a).

3.11. Procesado de muestras e histología

Con el fin de valorar el tamaño y localización del infarto, todas las secciones de corazón (a excepción de una) fueron sumergidas en una solución de Cloruro de Trifeniltetrazolio (TTC) (Fishbein y cols., 1981) a 37°C durante un periodo de tiempo de 10 minutos (Figura 8 b). La tinción con TTC resaltó las zonas de miocardio sano en un color rojo oscuro, mientras que las áreas infartadas aparecieron en un color blanco intenso, ayudando así a la localización de la zona infartada.

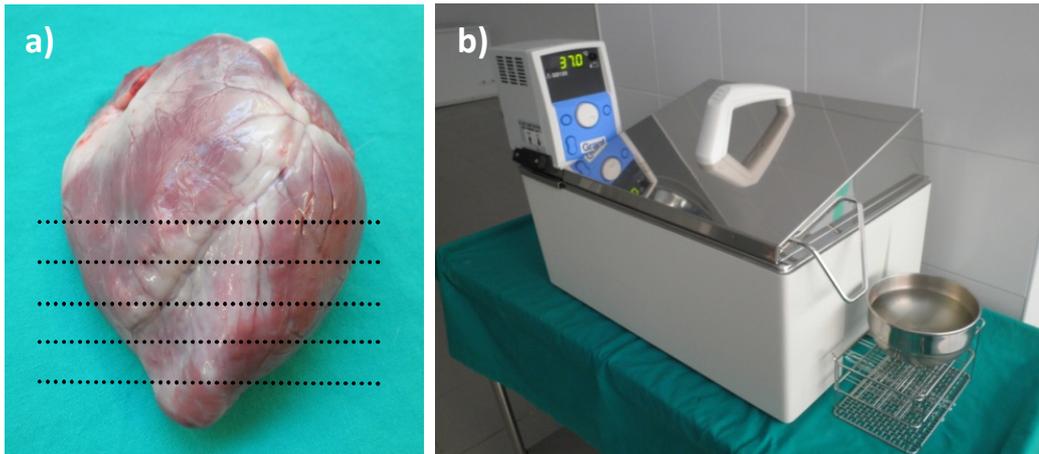


Figura 8: a) Niveles a los que se corta el corazón tras la extracción del mismo. b) Baño a 37°C para llevar a cabo la tinción con TTC.

La sección de corazón reservada anteriormente se utilizó para el procesado histológico. Se tomaron muestras del VI de la zona en la que macroscópicamente se apreciaba el infarto y se llevaron a cabo las tinciones de Hematoxilina-Eosina (HE) y Tricrómico de Masson (TCM), empleando para ello el protocolo estándar.

La técnica de HE trató de determinar la presencia de lesiones histológicas en los tejidos estudiados. Con la técnica de TCM se puso de manifiesto la presencia de fibrosis a nivel del miocardio, mostrándose el tejido conjuntivo de color azul, diferenciándose del músculo cardíaco que lo hizo de rojo anaranjado.

3.12. Parámetros estudiados

3.12.1. Evaluación del infarto

En todos los animales sometidos a la inducción del modelo se extrajeron

muestras de sangre de la vena cava craneal en el preoperatorio (T0), 2 horas tras el periodo de reperfusión (T1), así como a las 24 horas tras la creación del infarto (T2). Con el fin de valorar el daño miocárdico causado mediante la oclusión coronaria se determinaron los valores de CK-MB y Tpn I, utilizándose para ello un analizador de inmunoensayo AQT90 FLEX (Radiometer Ibérica, S.L. Madrid, España).

La permeabilidad de la arteria coronaria fue evaluada mediante la inyección intracoronaria de medio de contraste tras el desinflado del balón, empleándose para dicha valoración una puntuación del 0 al 3 según los denominados grados TIMI, en función de la calidad del flujo (Pérez de Prado, 2006).

Tanto durante el procedimiento de inducción del modelo de infarto como a lo largo del periodo de reperfusión se registraron los siguientes parámetros: frecuencia cardíaca (FC), saturación de

oxígeno (Sat. O₂), CO₂ exhalado (CO₂), presión arterial media (PAM) y ECG, prestándose especial atención a los cambios en el segmento ST y documentándose la aparición de arritmias y fibrilaciones.

Los parámetros estudiados mediante la RM basal fueron la FE, el VDF y el VSF. En los seguimientos de RM posteriores (1 semana post-infarto, 1 semana post-inyección, 5 semanas post-infarto y 10 semanas post-inyección) se comprobó además la presencia de IM en las imágenes de realce tardío.

Los parámetros de RM anteriormente citados se calcularon mediante la delineación de los bordes endocárdicos en las fases cardíacas correspondientes en eje corto, realizándose el análisis de las imágenes obtenidas en una estación de trabajo independiente y utilizando una herramienta informática para el procesado de las imágenes (View-Forum versión 6.3; Philips Medical Systems, Best, Países Bajos).

Aquellos animales que una semana post-IAM manifestaron un infarto inferior al 10% fueron excluidos de los cálculos para valorar la eficacia, evaluándose en estos casos únicamente la seguridad de la terapia.

3.12.2. Seguridad de la inyección intracoronaria

Los parámetros para valorar la seguridad de la administración intracoronaria de ambas dosis celulares frente al vehículo de administración incluyeron en primer lugar la valoración de la calidad del flujo coronario. Para ello se realizaron coronariografías antes, inmediatamente después y 10 semanas tras la infusión intracoronaria comparándose éstas entre sí y asignándose al flujo coronario una puntuación del 0 al 3, utilizando los grados de la escala TIMI.

Se prestó atención a los cambios en los parámetros de CO₂ exhalado, saturación de O₂, PAM y FC. Especialmente se tuvieron en cuenta las alteraciones electrocardiográficas como las subidas del segmento ST, arritmias/ fibrilaciones (o incluso muerte) durante y después de la infusión intracoronaria que pudieran indicar un posible efecto tóxico de las células.

De igual manera se comprobó el posible efecto nocivo de las células empleadas sobre el miocardio, comparándose los valores de CK-MB y Tpn I de muestras de sangre obtenidas previamente a la inyección, así como 24 horas más tarde.

3.12.3. Eficacia de la inyección intracoronaria

Con el fin de conocer la eficacia de la administración de ambas dosis celulares en comparación con el grupo control se utilizaron criterios funcionales derivados de los estudios de RM (1 semana post-IAM, 1 semana post-inyección, 5 semanas post-IAM y 10 semanas post-inyección) y parámetros morfológicos basados en el análisis histológico.

En cuanto a la RM se calcularon y evaluaron la FE, el VSF y el VDF, tomándose como indicadores de eficacia de la inyección intracoronaria la mejora en la función cardíaca (valorada mediante el porcentaje de FE), así como el menor grado de remodelado ventricular (evaluado a través de los parámetros VSF y VDF).

Con respecto a la histología, se comprobó la existencia de lesiones a nivel miocárdico y en su caso se comparó el grado de extensión de las mismas entre los 3 grupos del estudio. La ausencia de lesiones o cambios que entraban dentro de la normalidad recibieron un valor de 0. Cuando los cambios eran escasos pero superaban los considerados normales se les adjudicó el valor 1. Los valores 2, 3 y 4 se asignaron en función de la severidad de las lesiones identificadas clasificándose en severidad moderada, importante o muy grave, respectivamente.

El grado de extensión se consideró 0 cuando no se observaron lesiones relacionadas con el infarto en la totalidad de la muestra analizada; 1 cuando la distribución de las lesiones era focal o multifocal y de pequeña extensión (<25%); 2 cuando las lesiones tenían carácter multifocal con una extensión de entre el 25-50%, 3 cuando la lesión ocupaba entre el 50-75% de la muestra y 4 cuando la lesión se extendía sobre más del 75% de ella.

3.13. Análisis estadístico

Para el estudio y análisis estadístico de los datos recabados, se utilizó el paquete estadístico SPSS 15.0 statistical package for Windows (SPSS, Inc, Chicago, III, EEUU).

Los valores relativos a la funcionalidad cardíaca, la viabilidad celular, las enzimas cardíacas y constantes vitales obtenidos a lo largo de todos los seguimientos del estudio se han expresado mediante la media \pm desviación típica (DT).

La existencia de diferencias significativas entre medias de los diferentes grupos se comprobó mediante una prueba U de Mann-Whitney.

La comparación de las medias obtenidas para los diferentes tiempos un mismo grupo se realizó mediante una prueba de Wilcoxon. En ambos casos se utilizó un nivel de significación $p < 0,05$.

IV. Resultados

Los resultados de los análisis hematológicos y bioquímicos basales demostraron el correcto estado de salud de los 30 animales incluidos en esta investigación, encontrándose todos los parámetros dentro de los límites de normalidad descritos en la especie porcina.

Los resultados obtenidos se han dividido en 4 apartados: inducción del modelo de IAM, inyección intracoronaria, seguimientos mediante RM y fin de estudio.

4.1. Inducción del modelo de IAM

4.1.1. Mortalidad

De los animales sometidos a la inducción del modelo de IAM murieron dos sujetos (contemplando tanto el periodo de oclusión como el de reperfusión) antes de la aleatorización en grupos. Con el fin de partir de un total de 7 animales infartados por cada grupo de estudio, estos dos animales fueron sustituidos, practicándose así la intervención en un total de 23 sujetos. La mortalidad asociada al modelo se situó en un 8,7%.

El primero de los dos animales fallecidos entró en parada cardiaca 5 minutos tras el inflado del balón y a pesar de los intensos intentos de reanimación cardiopulmonar (56

descargas de desfibrilador a 200J acompañadas de masaje cardiaco y farmacoterapia según las guías del European Resuscitation Council) no pudo ser recuperado. En el segundo caso se desarrolló un episodio de arritmia maligna inmediatamente después del desinflado del balón. Este sujeto no respondió a los intentos de reanimación, muriendo finalmente tras 14 descargas a 200J y manejo de reanimación cardiopulmonar estándar.

4.1.2. Arritmias ventriculares

De los 21 animales que sobrevivieron a la creación del modelo de IAM se registraron acontecimientos arrítmicos en el 76,19% de los individuos. La mayoría de estas arritmias sucedieron en el periodo de oclusión coronaria (tabla 2). Se hizo uso del desfibrilador en 58 ocasiones durante la inducción del modelo con una media de $2,76 \pm 4,99$ descargas a 200J (mínimo 0 y máximo 23 descargas; Mediana: 1).

El sujeto P08 presentó un episodio único de FV tras detectarse un vasoespasma previo al inflado del balón. La fibrilación remitió tras una descarga de 200J, concluyéndose la inducción del modelo en ausencia de otras complicaciones.

ID ANIMAL	Nº DESCARGAS DEFIBRILADOR	MOMENTO APARICIÓN ARRITMIAS
P01	1	Oclusión
P02	0	Oclusión
P03	3	Oclusión
P04	1	Oclusión
P05	1	Oclusión
P06	0	Oclusión
P07	2	Oclusión
P08	1	Cateterización
P09	2	Oclusión
P10	2	Oclusión
P11	1	Oclusión
P12	3	Oclusión
P13	1	Oclusión
P14	2	Oclusión
P15	7	Oclusión
P16	0	Oclusión
P17	6 (+ 3)	Oclusión (+ 24 horas post-IAM)
P18	23	Oclusión
P19	2	Oclusión
P20	0	Oclusión
P21	0	Oclusión
MEDIA±DT	2,76±4,99	-
MEDIANA	1,00	-

Tabla 2: Número de descargas mediante desfibrilador y momento de aparición de FV por animal.

El animal P17, además de sufrir varios periodos de FV durante la oclusión, entró en parada cardiaca a las 24 horas tras la inducción del modelo resultando la reanimación exitosa (3 descargas a 200J) y completando este animal su tiempo de seguimiento sin presentar otras complicaciones asociadas.

4.1.3. Flujo coronario

La angiografía basal (previa a la colocación del balón) mostró una apariencia normal del flujo coronario (Figura 9 a) en todos los casos salvo en el animal P08. En este sujeto se evidenció durante la cateterización la presencia de un vasoespasmo que desapareció tras la administración de una dosis adicional de nitroglicerina (200µg), alcanzándose un

TIMI 3 tras un periodo de espera de 30 minutos, tras lo cual se inició la creación del modelo.

En los animales P03, P13, P15 y P17 se observó que la primera rama diagonal de la arteria interventricular paraconal se situaba muy próxima al origen de la arteria coronaria. En los restantes animales, sin embargo, dicha rama arterial se encontraba en una posición más distal (Figura 9 a flechas).

La angiografía post-inflado del balón demostró una correcta y completa oclusión de la arteria en todos los casos (Figura 9 b) a excepción del animal P18. En éste se detectó una pérdida de presión de inflado (de 9 a 2 atmósferas) que indicó un posible

defecto del balón colocado. Dicho balón fue sustituido por otro, tras lo cual se confirmó tanto la correcta oclusión del vaso como el mantenimiento de la presión de inflado.

La administración de contraste tras el desinflado evidenció un flujo coronario de apariencia normal en la totalidad de los

animales supervivientes, obteniendo todos ellos una puntuación de 3 en la escala TIMI (Figura 9 c). Por el contrario, el sujeto que murió inmediatamente tras el desinflado del balón manifestó una oclusión total (TIMI 0) de su arteria coronaria distal al punto de oclusión.

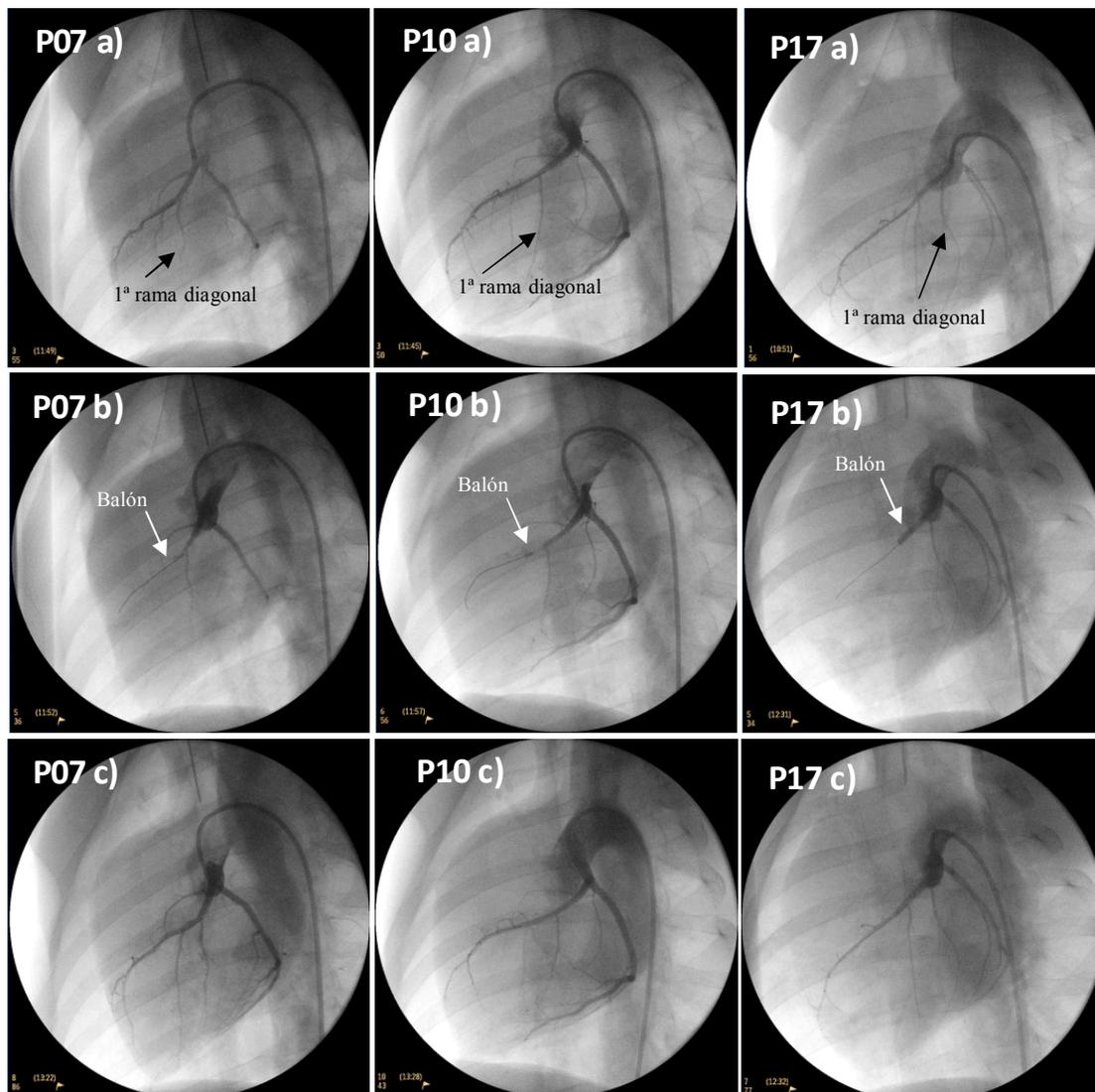


Figura 9: Angiografías en proyección OAI 40° correspondientes a los animales P07, P10 y P17. En a) Arteria interventricular paraconal previa al inflado del balón (la primera rama diagonal está señalada mediante flecha), en b) oclusión de la arteria mediante balón (flechas) y en c) aspecto del vaso tras el desinflado del balón.

4.1.4. Enzimas cardiacas

Las tablas 3 y 4 muestran los valores individuales, así como las medias referentes a las enzimas cardiacas Tpn I y CK-MB para los tiempos T0, T1 y T2.

El valor basal de Tpn I encontrado fue de $0,026 \pm 0,033 \mu\text{g/L}$. Tras el periodo de reperfusión así como a las 24 horas tras el infarto se detectó (en comparación con el valor inicial) una subida significativa en el nivel de Tpn I ($p=0,00$; *Wilcoxon*), superándose en todos los casos el límite superior de detección ($>25,00 \mu\text{g/L}$) del

analizador por lo que no se pudo determinar la existencia de diferencias entre los tiempos T1 y T2 (Figura 10).

Para el parámetro de la CK-MB el valor basal registrado fue de $8,14 \pm 6,82 \mu\text{g/L}$. Dicho valor aumentó de forma estadísticamente significativa en el tiempo T1 ($p=0,00$; *Wilcoxon*). Veinticuatro horas tras la inducción del infarto el valor de CK-MB fue significativamente inferior al observado en T1 ($p=0,00$; *Wilcoxon*), aunque superior al valor basal ($p=0,00$; *Wilcoxon*) (Figura 11).

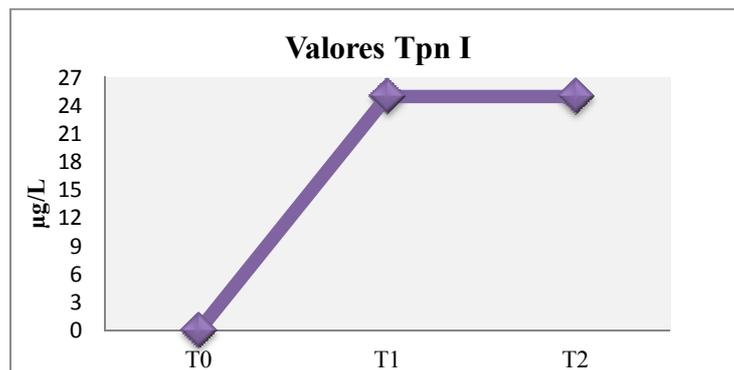


Figura 10: Valores medios de Tpn I \pm DT ($\mu\text{g/L}$) a los tiempos basal (T0), post-reperfusión (T1) y 24 horas post-infarto (T2) para el conjunto de los animales.

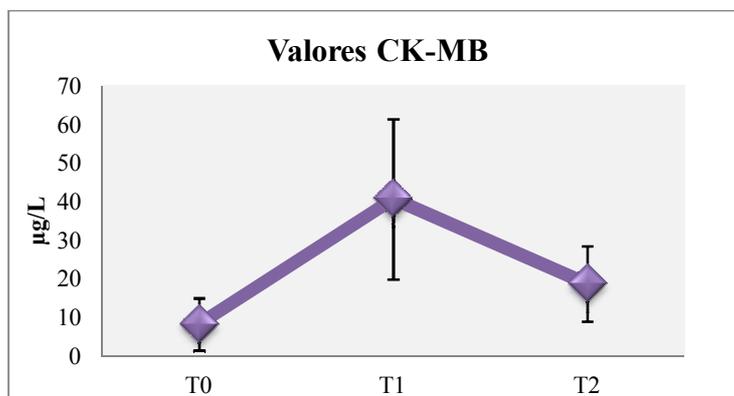


Figura 11. Valores medios de CK-MB \pm DT ($\mu\text{g/L}$) a los tiempos basal (T0), post-reperfusión (T1) y 24 horas post-infarto (T2) para el conjunto de los animales.

ID ANIMAL	T0	T1	T2
P01	0,140	>25,000	>25,000
P02	0,077	>25,000	>25,000
P03	0,062	>25,000	>25,000
P04	0,012	>25,000	>25,000
P05	<0,010	>25,000	>25,000
P06	<0,010	>25,000	>25,000
P07	0,015	>25,000	>25,000
P08	0,065	>25,000	>25,000
P09	<0,010	>25,000	>25,000
P10	<0,010	>25,000	>25,000
P11	<0,010	>25,000	>25,000
P12	<0,010	>25,000	>25,000
P13	0,023	>25,000	>25,000
P14	0,023	>25,000	>25,000
P15	<0,010	>25,000	>25,000
P16	<0,010	>25,000	>25,000
P17	<0,010	>25,000	>25,000
P18	<0,010	>25,000	>25,000
P19	<0,010	>25,000	>25,000
P20	<0,010	>25,000	>25,000
P21	<0,010	>25,000	>25,000
MEDIA±DT	0,026±0,033	25,000±0,000	25,000±0,000

Tabla 3: Valores individuales de Tpn I ($\mu\text{g/L}$) y Media \pm DT a los tiempos basal (T0), post-reperusión (T1) y 24 horas post-infarto (T2). Límite de detección inferior $<0,010 \mu\text{g/L}$ y superior $>25 \mu\text{g/L}$. Para el cálculo de las medias se han tomado los valores $0,010 \mu\text{g/L}$ y $25 \mu\text{g/L}$.

ID ANIMAL	T0	T1	T2
P01	8,40	78,00	20,00
P02	12,00	90,00	20,00
P03	9,60	59,00	19,00
P04	4,80	30,00	17,00
P05	8,20	34,00	14,00
P06	2,20	23,00	7,10
P07	3,40	20,00	7,20
P08	3,70	47,00	13,00
P09	4,30	16,50	33,00
P10	4,80	12,00	8,00
P11	2,70	48,00	45,00
P12	22,00	63,00	21,00
P13	4,90	34,00	25,00
P14	3,80	29,00	14,00
P15	3,80	43,00	14,00
P16	30,00	52,00	24,00
P17	5,70	37,00	14,00
P18	12,00	44,00	11,00
P19	3,70	57,00	26,00
P20	10,00	24,00	33,00
P21	11,00	14,00	7,50
MEDIA±DT	8,14±6,82	40,69±20,80	18,70±9,80

Tabla 4: Valores individuales de CK-MB ($\mu\text{g/L}$) y Media \pm DT a los tiempos basal (T0), post-reperusión (T1) y 24 horas post-infarto (T2).

4.1.5. Evaluación de las constantes vitales

En cuanto a las constantes vitales (Tabla 5) se observó un descenso de la FC en el momento de la oclusión coronaria ($p=0,034$; *Wilcoxon*). Tras el desinflado el valor de la FC sufrió un incremento significativo con respecto a T1 ($p=0,004$; *Wilcoxon*), aunque no significativo con respecto al valor basal ($p=0,486$; *Wilcoxon*). Hacia el final de la monitorización se detectó un nuevo ascenso, registrándose en T3 una FC significativamente superior que en T0, T1 y T2 ($p=0,000$; *Wilcoxon*) (Figura 12 a).

El valor de la Saturación de O₂ permaneció estable durante toda la intervención, observándose únicamente un ligero descenso a lo largo de la creación del IAM. Las diferencias con respecto al valor inicial no fueron significativas para ninguno de los

tiempos (T1: $p=0,651$; T2: $p=0,127$; T3: $p=0,384$; *Wilcoxon*) (Figura 12 b).

El CO₂ exhalado se mantuvo constante a lo largo de la inducción del modelo, por lo que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el valor basal y los distintos tiempos (T1: $p=0,197$; T2: $p=0,719$; T3: $p=0,051$; *Wilcoxon*) (Figura 12 c).

Con respecto a la PAM se registró un descenso significativo en T1 ($p=0,02$; *Wilcoxon*). Posteriormente se detectó un ligero ascenso en T2 ($p=0,626$; *Wilcoxon*) y T3 ($p=0,288$; *Wilcoxon*) con respecto a T1, permaneciendo, sin embargo, los valores de PAM por debajo del valor encontrado en T0. Las diferencias con respecto al valor basal no fueron estadísticamente significativas (T2: $p=0,125$; T3: $p=0,384$; *Wilcoxon*) (Figura 12 d).

TIEMPO	FC	Sat. O ₂	CO ₂	PAM
T0	52,86±11,84	99,29±1,34	38,19±2,50	65,62±15,26
T1	47,05±11,07	99,05±1,69	37,48±1,89	59,90±18,64
T2	55,14±14,50	98,57±2,01	37,90±1,26	61,52±12,65
T3	88,29±24,21	97,10±6,17	36,38±2,20	63,29±12,91

Tabla 5: Valores medios \pm DT de la frecuencia cardiaca (FC) (lpm), la saturación de oxígeno (Sat. O₂) (%), el CO₂ exhalado (CO₂) (mmHg) y la presión arterial media (PAM) (mmHg) a los tiempos basal (T0), inflado del balón (T1), desinflado del balón (T2), fin de la reperusión (T3).

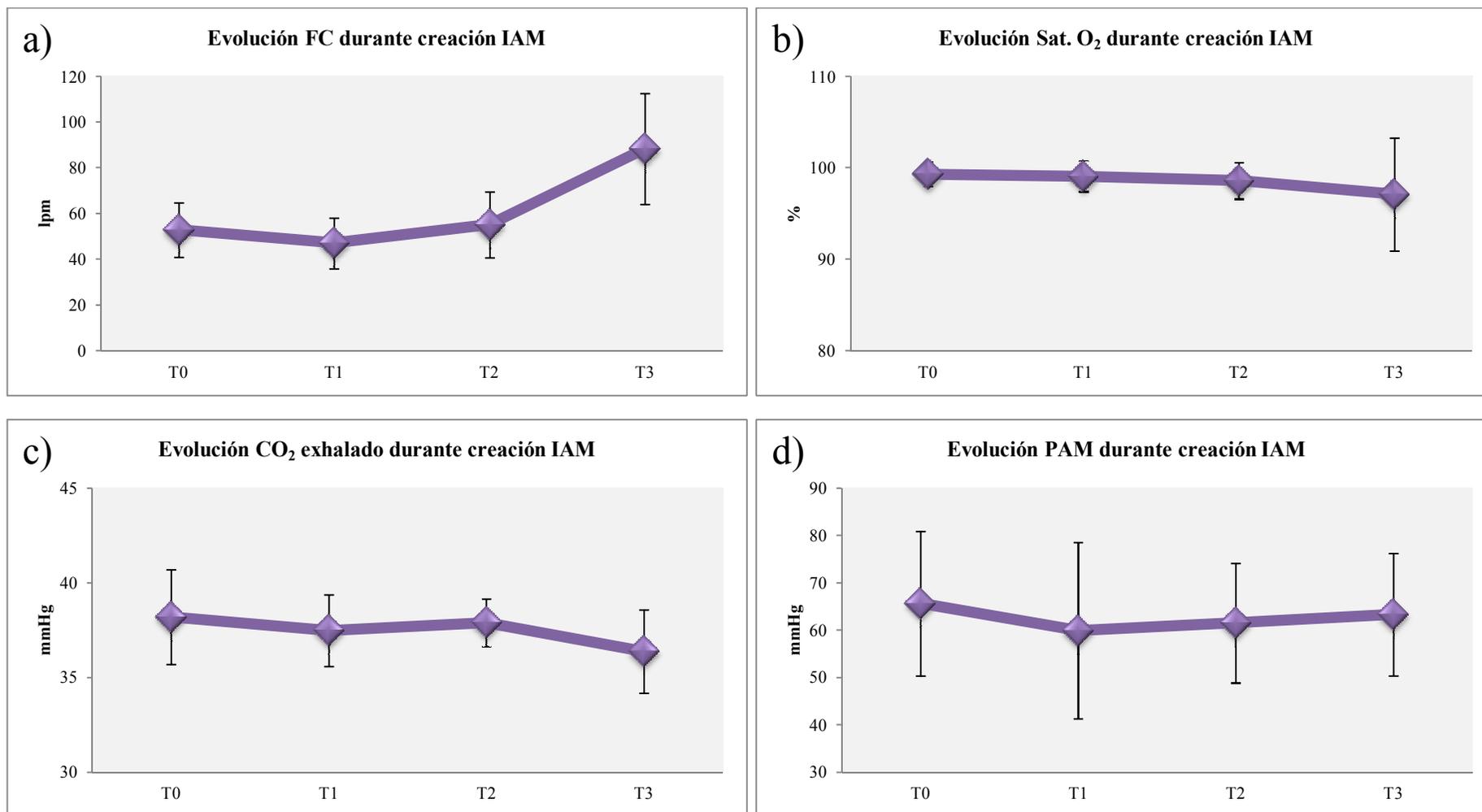


Figura 12: Evolución de los parámetros hemodinámicos y ventilatorios durante la inducción del infarto (Media \pm DT): **a)** frecuencia cardiaca (FC) (lpm), **b)** saturación de oxígeno (Sat. O₂) (%), **c)** CO₂ exhalado (CO₂) (mmHg) y **d)** presión arterial media (PAM) (mmHg) a los tiempos basal (T0), inflado del balón (T1), desinflado del balón (T2), fin de la reperusión (T3).

4.2. Inyección intracoronaria

4.2.1. Preparación del vehículo/ de la solución celular

Tanto la preparación del vehículo de administración como de la solución de células se llevaron a cabo en ausencia de complicaciones.

La viabilidad celular previamente a la inyección fue del $96,90 \pm 2,22\%$ para el grupo de 25×10^6 de CMCs. En el caso del grupo de 50×10^6 de CMCs la viabilidad alcanzó un $97,36 \pm 3,09\%$. Las diferencias entre los dos grupos no alcanzaron significación estadística ($p=0,298$; *U de Mann-Whitney*).

A las 24 horas, la viabilidad de las células fue inferior en el caso de grupo 2 ($79,00 \pm 22,68\%$) en comparación con el grupo 3 ($87,83 \pm 20,77\%$), aunque las diferencias entre ambos no fueron significativas ($p=0,272$; *U de Mann-Whitney*).

4.2.2. Flujo coronario

La infusión intracoronaria se llevó a cabo con éxito en la totalidad de los animales. Las angiografías coronarias a los tiempos pre-y post-inyección no desvelaron cambios en cuanto a la calidad del flujo en ninguno de los sujetos correspondientes a los grupos 1 y 2 (Figuras 13 y 14).

El animal P19 perteneciente al grupo 3, en cambio, manifestó inicialmente un empeoramiento del flujo coronario tras la inyección celular (TIMI 2). No obstante, tras la administración de $200 \mu\text{g}$ de nitroglicerina y un tiempo de espera de 5 minutos, el TIMI registrado fue de 3.

Los sujetos restantes de este último grupo no mostraron diferencias entre la calidad del flujo antes y después de la administración de CMCs (Figura 15).

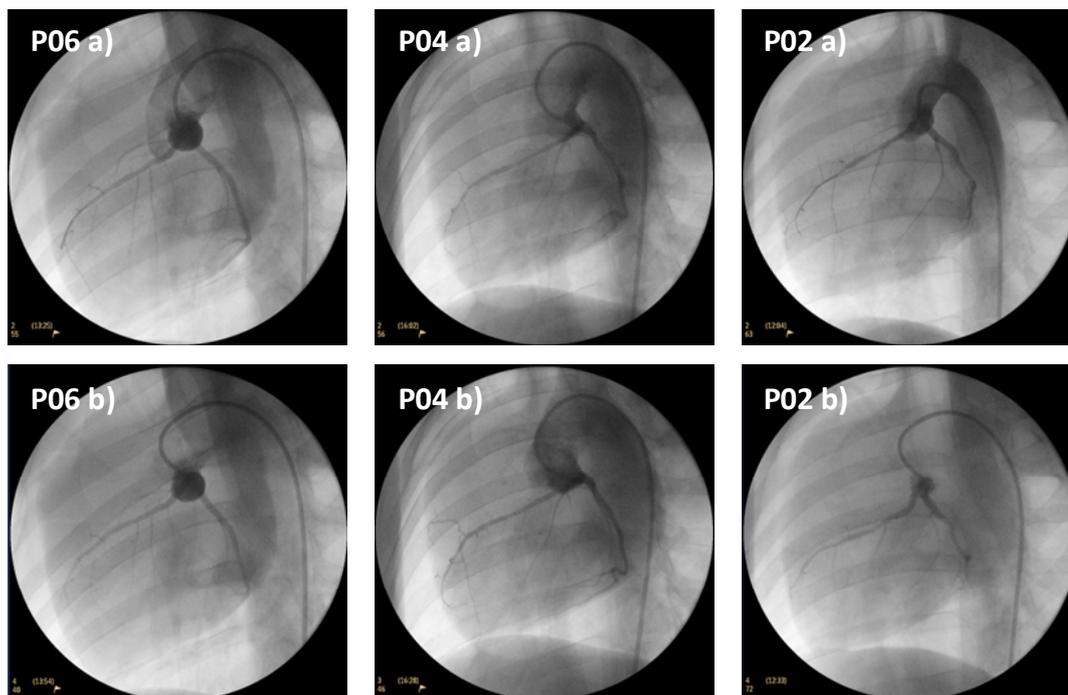


Figura 13: *a)* Angiografías pre-inyección en proyección OAI 40° correspondientes a 3 sujetos representativos del grupo 1 (animales P06, P04 y P02). *b)* Angiografías post-inyección correspondientes a los mismos animales mostrados en a). No se aprecian cambios en la calidad del flujo.

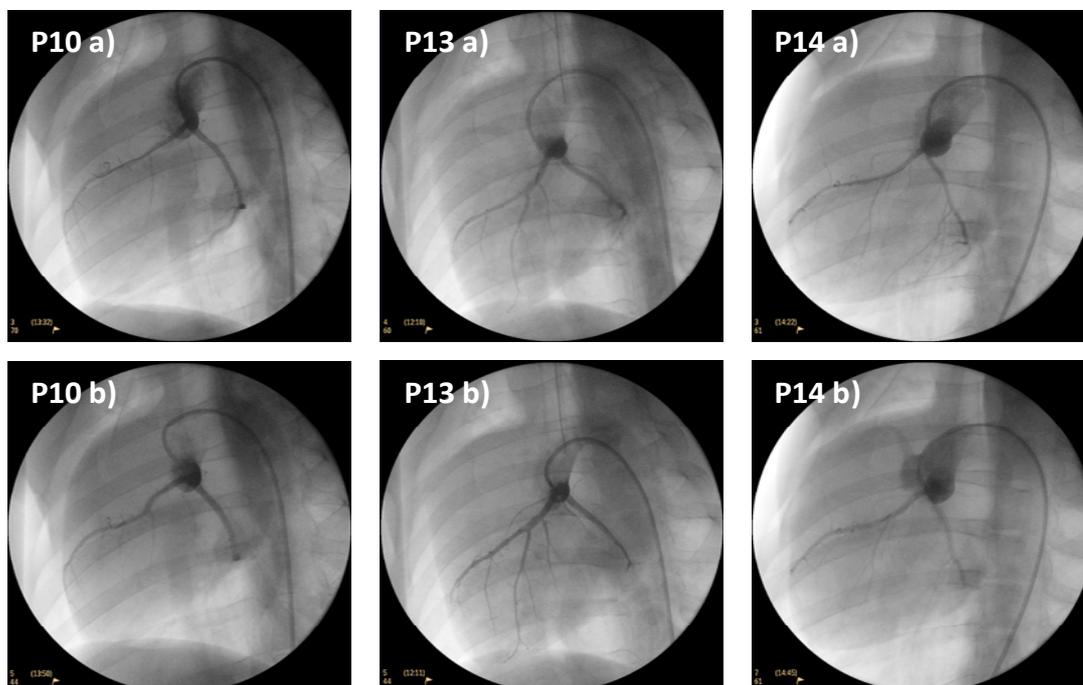


Figura 14: *a)* Angiografías pre-inyección en proyección OAI 40° correspondientes a 3 sujetos representativos del grupo 2 (animales P10, P13 y P14). *b)* Angiografías post-inyección en proyección OAI 40° correspondientes a los mismos animales mostrados en a). No se aprecian cambios en la calidad del flujo.

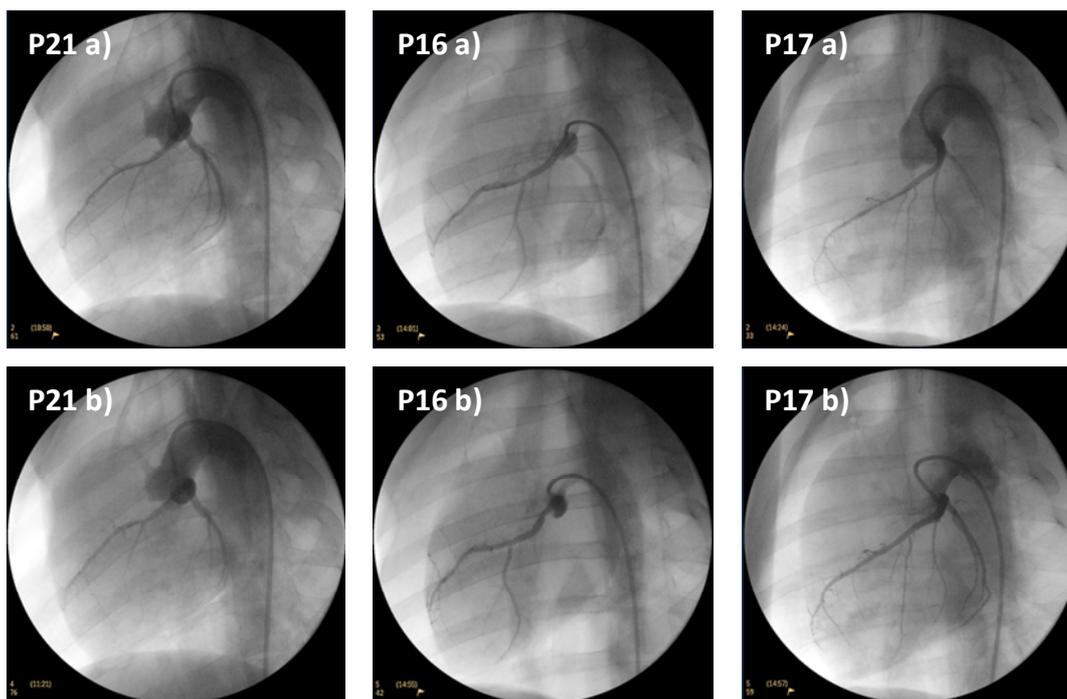


Figura 15: **a)** Angiografías pre-inyección en proyección OAI 40° correspondientes a 3 sujetos representativos del grupo 3 (animales P21, P16 y P17). **b)** Angiografías post-inyección en proyección OAI 40° correspondientes a los mismos animales mostrados en a). No se aprecian cambios en la calidad del flujo.

4.2.3. Enzimas cardíacas

Una semana tras el IAM (T3) la media del valor de Tpn I fue significativamente superior en el grupo 1 que en el grupo 3 ($p=0,04$; *U de Mann-Whitney*), aunque no se observaron diferencias significativas con respecto al grupo 2 ($p=0,37$; *U de Mann-Whitney*) (Tabla 6; Figura 16). Las diferencias en el valor de Tpn I a las 24 horas tras la administración (T4) no fueron significativas entre ninguno de los grupos (grupo 1-grupo 2: $p=0,85$; grupo 1-grupo 3: $p=0,85$; grupo 2-grupo3: $p=0,75$; *U de Mann-Whitney*).

La administración celular causó un incremento significativo en el valor medio de Tpn I en los grupos 2 (de

$0,103\pm 0,087\mu\text{g/L}$ a $0,475\pm 0,815\mu\text{g/L}$; $p=0,03$; *Wilcoxon*) y 3 (de $0,057\pm 0,054\mu\text{g/L}$ a $0,348\pm 0,480\mu\text{g/L}$; $p=0,02$; *Wilcoxon*). La inyección de solución de administración, por el contrario, no provocó cambios significativos (de $0,253\pm 0,281\mu\text{g/L}$ a $0,256\pm 0,256\mu\text{g/L}$; $p=0,87$; *Wilcoxon*).

Para el parámetro de la CK-MB (Tabla 7; Figura 17) no se encontraron diferencias significativas entre grupos para el tiempo T3 (grupo 1-grupo 2: $p=0,12$; grupo 1-grupo 3: $p=0,08$; grupo 2-grupo3: $p=0,05$; *U de Mann-Whitney*). Para el tiempo T4, en cambio, el valor medio de CK-MB fue significativamente superior en el grupo 3 que en los grupos 1 ($p=0,02$; *U de Mann-*

Whitney) y 2 ($p=0,03$; *U de Mann-Whitney*).

Se detectó una ligera disminución en el valor de CK-MB tras la inyección intracoronaria en los grupos 1 (de $7,900\pm 3,638$ $\mu\text{g/L}$ a $6,914\pm 3,580$ $\mu\text{g/L}$) y 2 (de $7,857\pm 11,655$ $\mu\text{g/L}$ a $7,043\pm 6,800$ $\mu\text{g/L}$). La administración celular en el

grupo 3, en cambio, causó un incremento en el valor de CK-MB (de $11,543\pm 4,442$ $\mu\text{g/L}$ a $12,143\pm 3,338$). No obstante, en ninguno de los grupos la inyección dio lugar a un cambio significativo en el valor de CK-MB con respecto al valor pre-inyección (grupo 1: $p=0,89$; grupo 2: $p=0,34$; grupo 3: $p=0,35$; *Wilcoxon*).

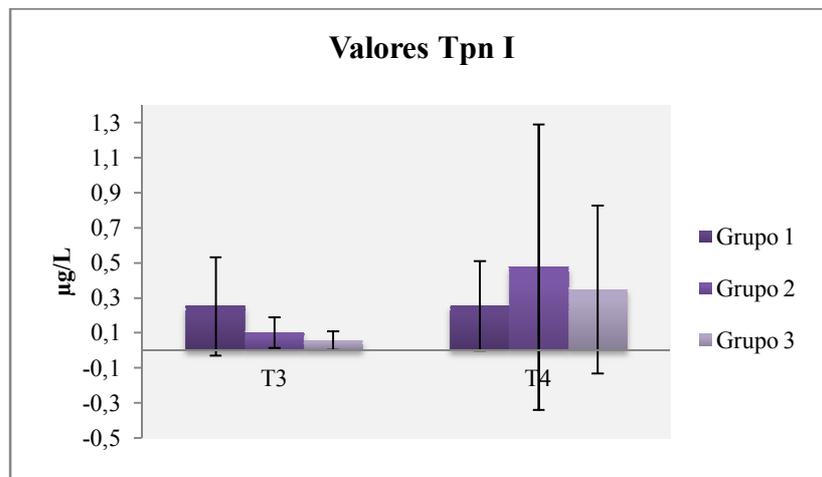


Figura 16: Valores medios de Tpn I \pm DT ($\mu\text{g/L}$) en los 3 grupos del estudio a los tiempos 1 semana post-infarto (T3) y 24 horas post-inyección (T4).

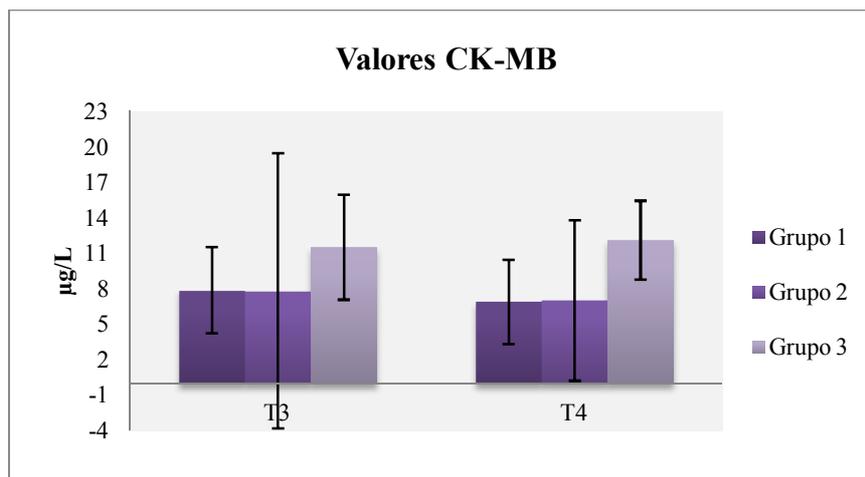


Figura 17: Valores medios de CK-MB \pm DT ($\mu\text{g/L}$) en los 3 grupos del estudio a los tiempos 1 semana post-infarto (T3) y 24 horas post-inyección (T4).

GRUPO	ID	T3	T4
1	P01	0,750	0,660
	P02	0,540	0,590
	P03	0,210	0,160
	P04	0,110	0,160
	P05	0,048	0,083
	P06	0,080	0,068
	P07	0,032	0,070
	Media±DT	0,253±0,281	0,256±0,256
2	P08	0,130	0,200
	P09	0,150	0,150
	P10	0,032	2,300
	P11	0,270	0,440
	P12	0,031	0,065
	P13	0,049	0,052
	P14	0,059	0,120
	Media±DT	0,103±0,087	0,475±0,815
3	P15	0,010	0,150
	P16	0,070	1,400
	P17	0,030	0,120
	P18	0,030	0,051
	P19	0,170	0,370
	P20	0,060	0,300
	P21	0,031	0,043
	Media±DT	0,057±0,054	0,348±0,480

Tabla 6: Valores individuales y medios \pm DT de Tpn I ($\mu\text{g/L}$) en los 3 grupos del estudio a los tiempos 1 semana post-IAM (T3) y 24 horas post-inyección (T4).

GRUPO	ID	T3	T4
1	P01	4,700	2,700
	P02	2,800	4,900
	P03	11,000	11,000
	P04	8,500	9,100
	P05	12,000	2,800
	P06	5,300	6,900
	P07	11,000	11,000
	Media±DT	7,900±3,638	6,914±3,580
2	P08	3,700	5,100
	P09	2,800	3,700
	P10	2,100	2,100
	P11	3,300	4,200
	P12	34,000	22,000
	P13	2,000	4,600
	P14	7,100	7,600
	Media±DT	7,857±11,655	7,043±6,800
3	P15	7,000	11,000
	P16	18,000	8,000
	P17	4,800	8,000
	P18	11,000	15,000
	P19	13,000	16,000
	P20	14,000	12,000
	P21	13,000	15,000
	Media±DT	11,543±4,442	12,143±3,338

Tabla 7: Valores individuales y medios \pm DT de CK-MB ($\mu\text{g/L}$) en los 3 grupos del estudio a los tiempos 1 semana post-IAM (T3) y 24 horas post-inyección (T4)

4.2.4. Evaluación de las constantes vitales

Las variaciones en los valores de los parámetros analizados fueron pequeñas en los 3 grupos a lo largo de la infusión intracoronaria (Tabla 8; Figura 18), de modo que entre el valor de T0 y T2 no se encontraron diferencias significativas en la FC ($p=0,47$; $p=0,59$; $p=0,67$; *Wilcoxon*), la Sat.O₂ ($p=0,68$; $p=0,56$; $p=0,29$; $p=0,06$; $p=0,58$; *Wilcoxon*), el CO₂ ($p=0,41$; *Wilcoxon*) y la PAM ($p=0,14$; $p=0,50$; $p=0,18$; *Wilcoxon*) en los grupos 1, 2 y 3, respectivamente.

La infusión intracoronaria no causó diferencias significativas entre grupos para ninguno de los parámetros evaluados ($p>0,05$; *U de Mann Whittney*).

4.2.5. Cambios electrocardiográficos

En cuanto al ECG, no se observaron cambios asociados a la inyección intracoronaria en el grupo control. De igual manera, los sujetos que fueron tratados con 25×10^6 de CMCs no manifestaron cambios electrocardiográficos durante o después de la administración celular. En contrapartida, en el grupo de 50×10^6 de CMCs se detectaron alteraciones en el trazado del ECG en un total de 4 ejemplares. Dos de ellos (P15 y P16) mostraron ligeras subidas en el segmento ST durante las inyecciones, que descendieron a su valor inicial durante el tiempo de espera entre dos inyecciones. Los dos animales restantes presentaron extrasístoles aisladas durante la primera (P20) o las 2 primeras inyecciones (P17).

GRUPO	TIEMPO	FC	Sat. O ₂	CO ₂	PAM
1	T0	63,00±21,42	97,33±2,34	37,83±1,33	77,67±14,61
	T1	60,00±21,95	98,00±2,90	37,83±1,17	80,33±13,11
	T2	61,00±19,91	97,83±2,04	38,17±0,98	84,50±7,94
2	T0	65,43±17,23	98,86±1,68	37,71±1,11	75,71±18,46
	T1	60,57±15,82	98,57±2,30	37,86±1,46	75,43±19,79
	T2	61,71±15,47	98,71±1,80	37,00±1,00	76,86±13,61
3	T0	67,71±30,63	97,29±2,56	38,00±0,82	66,57±18,86
	T1	69,71±26,69	98,29±1,70	38,29±1,11	69,14±14,60
	T2	69,71±27,36	98,14±1,57	37,71±1,11	71,14±14,74

Tabla 8: Valores medios \pm DT de la frecuencia cardiaca (FC) (lpm), la saturación de oxígeno (Sat. O₂) (%), el CO₂ exhalado (CO₂) (mmHg) y la presión arterial media (PAM) (mmHg) en los 3 grupos del estudio a los tiempos inicio de inyección intracoronaria (T0), mitad de dosis celular (T1) y post-inyección intracoronaria (T2).

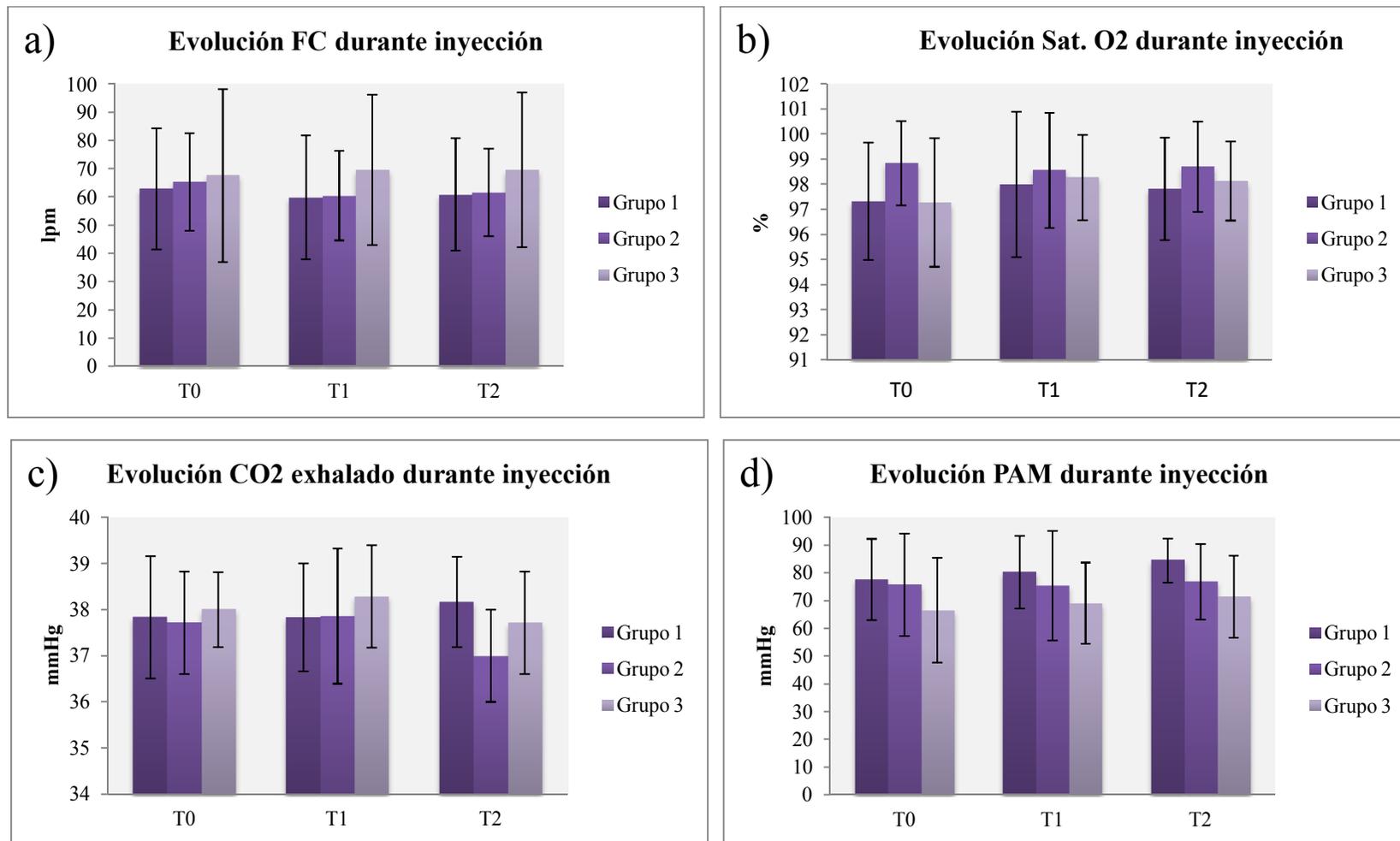


Figura 18: Evolución de los parámetros hemodinámicos y ventilatorios durante la inyección intracoronaria (Medias \pm DT): **a)** frecuencia cardiaca (FC) (lpm), **b)** saturación de oxígeno (Sat. O₂) (%), **c)** CO₂ exhalado (CO₂) (mmHg) y **d)** presión arterial media (PAM) (mmHg) en los 3 grupos del estudio a los tiempos inicio de inyección intracoronaria (T0), mitad de dosis celular (T1) y post-inyección intracoronaria (T2).

4.3. Seguimientos mediante RM

4.3.1. Evaluación del infarto

La RM una semana post-IAM demostró la presencia de necrosis miocárdica en todos los animales (Figuras 19-22). El sujeto P18 (grupo 3), sin embargo, presentó un infarto de muy pequeño tamaño (4%), por lo que fue excluido de los cálculos de efectividad. Los restantes sujetos mostraron tamaños de infarto entre un 10 y un 24%.

En T1 el tamaño medio de infarto más elevado se encontró en el grupo 2 (16,86±3,53%). No obstante, las diferencias con respecto a los grupos 1 (16,67±5,13%; $p=0,89$; *U de Mann-Whitney*) y 3 (14,83±4,07%; $p=0,39$; *U de Mann-Whitney*) no fueron significativas.

A lo largo del estudio se observó un descenso del porcentaje de infarto en los 3 grupos (Tabla 9). Así, en el grupo 1 se detectaron diferencias significativas en T2

($p=0,04$; *Wilcoxon*), T3 ($p=0,04$; *Wilcoxon*) y T4 ($p=0,04$; *Wilcoxon*) en comparación con T1. En el grupo 3 las diferencias se hicieron significativas a los tiempos T3 y T4 ($p=0,03$; *Wilcoxon*). En el caso del grupo 2 se mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al valor 1 semana post-infarto únicamente en T3 ($p=0,04$; *Wilcoxon*).

Al final del estudio, los porcentajes medios de infarto más bajos se encontraron en el grupo 3 (6,83±3,54% frente a 8,29±2,81% en el grupo 1 y 9,86±3,93% en el grupo 2), aunque las diferencias con respecto a los grupos 1 ($p=0,35$; *U de Mann Whittney*) y 2 ($p=0,13$; *U de Mann Whittney*) no alcanzaron significación estadística.

A pesar de que los infartos en T4 fueran de menor tamaño en el grupo 3, el grupo 1 fue el que experimentó el mayor descenso de tamaño (de 16,67±5,13% a 8,29±2,81%) mientras que el grupo 2 mostró la menor reducción de tamaño (de 16,86±3,53% a 9,86±3,93).

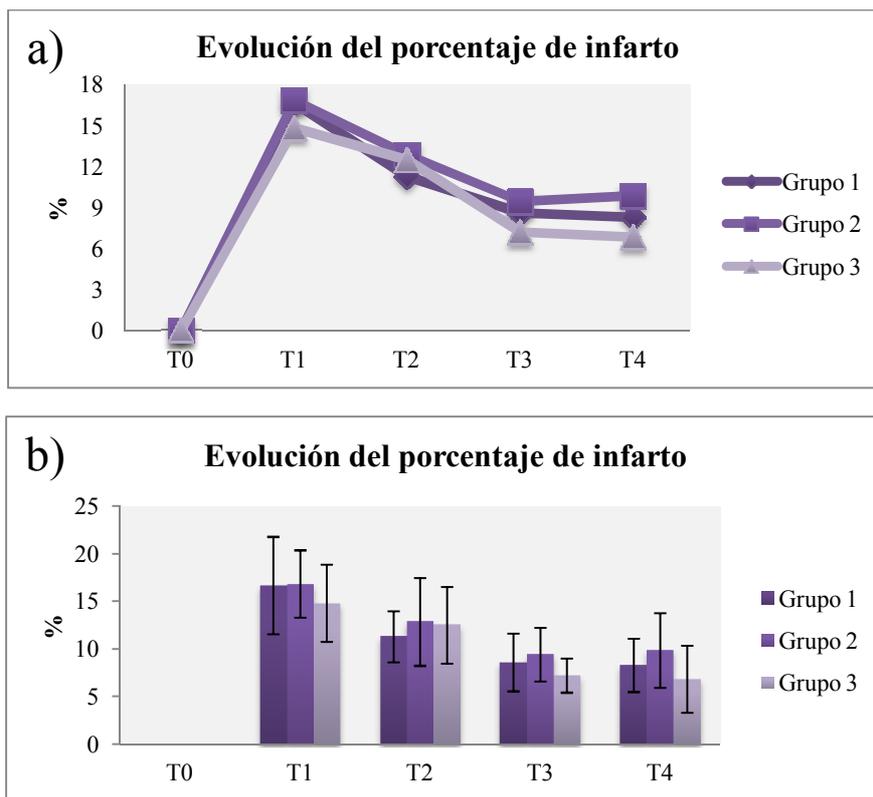


Figura 19: **a)** Evolución del valor medio del porcentaje de infarto en los 3 grupos del estudio a lo largo del estudio: tiempo basal (T0), 1 semana post-infarto (T1), 1 semana post-inyección (T2), 5 semanas post-infarto (T3) y 10 semanas post-inyección (T4). **b)** Porcentajes medios de infarto \pm DT en los 3 grupos del estudio a los tiempos basal (T0), 1 semana post-infarto (T1), 1 semana post-inyección (T2), 5 semanas post-infarto (T3) y 10 semanas post-inyección (T4).

GRUPO	TIEMPO	INFARTO
1	T0	0,00 \pm 0,00
	T1	16,67 \pm 5,13
	T2	11,29 \pm 2,69
	T3	8,60 \pm 3,05
	T4	8,29 \pm 2,81
2	T0	0,00 \pm 0,00
	T1	16,86 \pm 3,53
	T2	12,86 \pm 4,63
	T3	9,43 \pm 2,82
	T4	9,86 \pm 3,93
3	T0	0,00 \pm 0,00
	T1	14,83 \pm 4,07
	T2	12,50 \pm 4,04
	T3	7,20 \pm 1,79
	T4	6,83 \pm 3,54

Tabla 9: Valores medios \pm DT del tamaño del infarto (infarto) (%) en los grupos 1, 2, 3 para los tiempos basal (T0), 1 semana post-IAM (T1), 1 semana post-inyección (T2), 5 semanas post-IAM (T3) y 10 semanas post-inyección (T4).

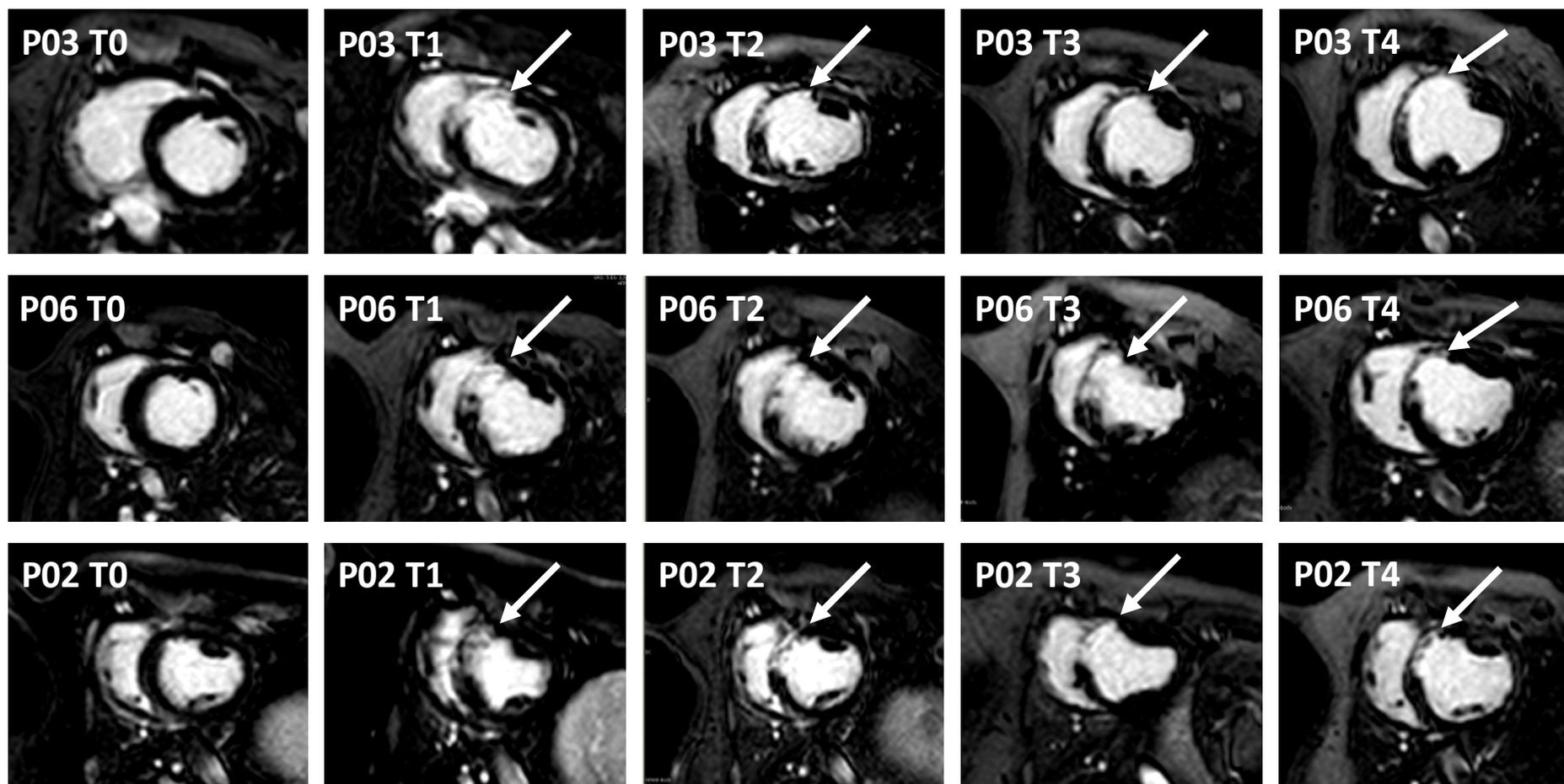


Figura 20: Evolución del infarto a lo largo del tiempo en 3 sujetos representativos del grupo 1 (animales P03, P06 y P02). Las imágenes de realce tardío se corresponden con los diferentes tiempos de seguimiento por RM, refiriéndose T0 al estudio basal, T1 al seguimiento 1 semana post-infarto, T2 a 1 semana post-inyección, T3 a 5 semanas post-infarto y T4 a 10 semanas post-inyección. Las flechas sitúan la zona de infarto.

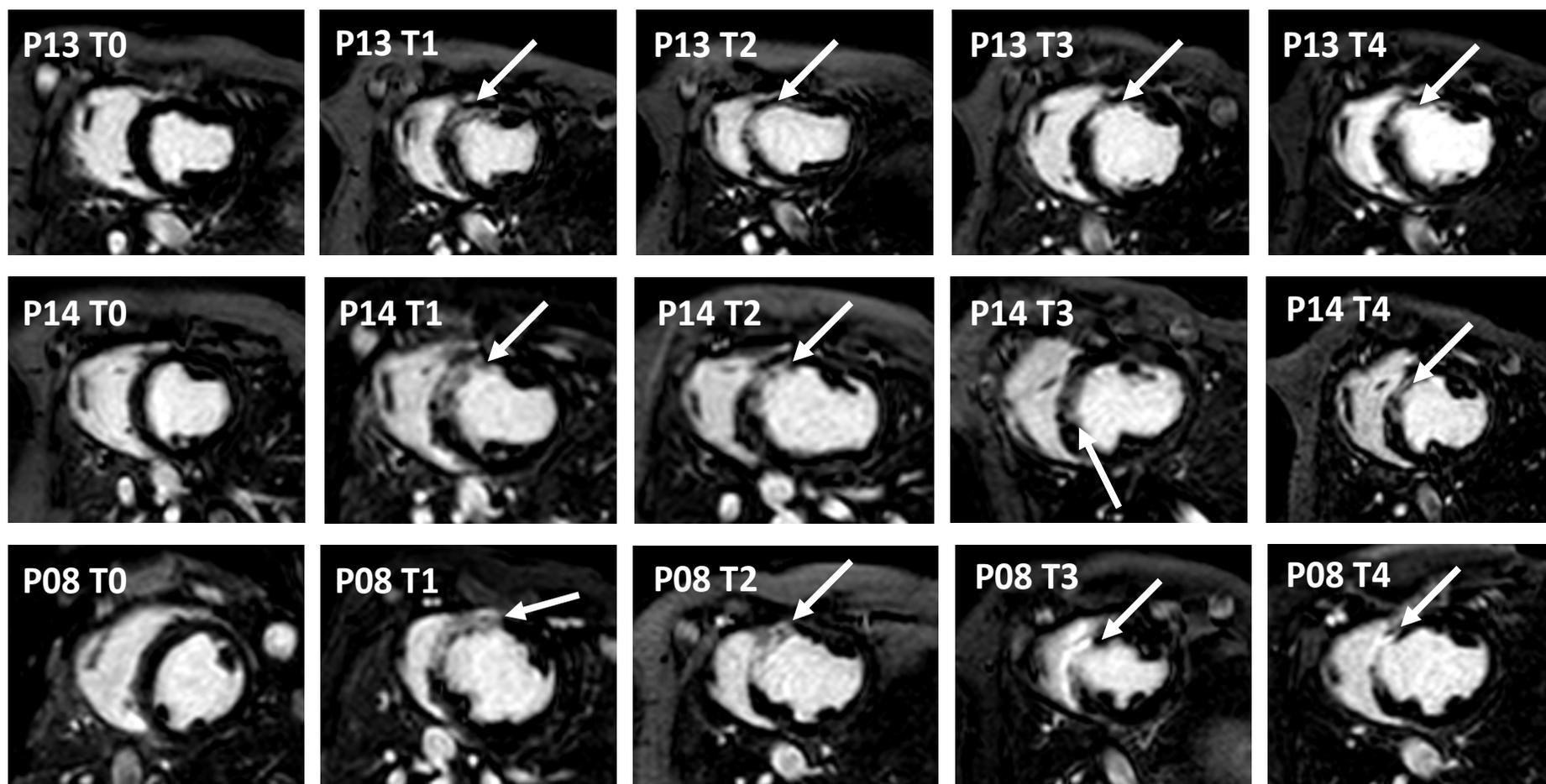


Figura 21: Evolución del infarto a lo largo del tiempo en 3 sujetos representativos del grupo 2 (animales P13, P14 y P08). Las imágenes de realce tardío se corresponden con los diferentes tiempos de seguimiento por RM, refiriéndose T0 al estudio basal, T1 al seguimiento 1 semana post-infarto, T2 a 1 semana post-inyección, T3 a 5 semanas post-infarto y T4 a 10 semanas post-inyección. Las flechas sitúan la zona de infarto.

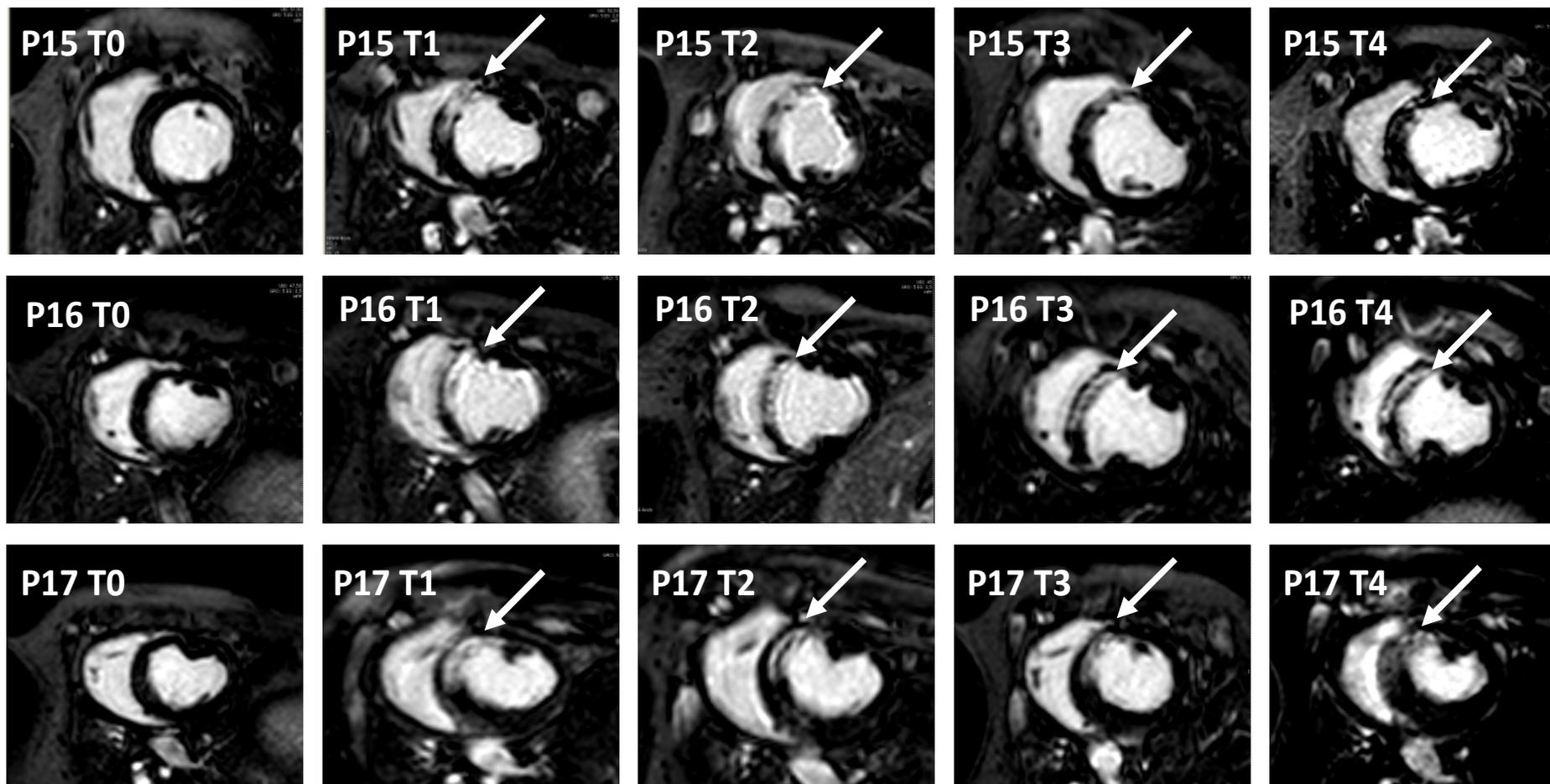


Figura 22: Evolución del infarto a lo largo del tiempo en 3 sujetos representativos del grupo 3 (animales P15, P16 y P17). Las imágenes de realce tardío se corresponden con los diferentes tiempos de seguimiento por RM, refiriéndose T0 al estudio basal, T1 al seguimiento 1 semana post-infarto, T2 a 1 semana post-inyección, T3 a 5 semanas post-infarto y T4 a 10 semanas post-inyección. Las flechas sitúan la zona de infarto.

4.4.2. Funcionalidad cardiaca

Al inicio del estudio, los porcentajes de FE fueron similares en todos los grupos, incluido el control sano (Tabla 10).

La inducción del modelo de IAM causó una reducción significativa del valor de la FE en los 3 grupos de estudio (grupos 1 y 2: $p=0,02$; grupo 3: $p=0,03$; *Wilcoxon*).

Posteriormente (a partir de T2) se registró un incremento progresivo en el porcentaje de este parámetro hasta el final del estudio (Figura 25), de modo que en T4 la FE fue significativamente superior que en T1 en los grupos 2 y 3 ($p=0,03$; *Wilcoxon*) y no significativamente mayor en el grupo 1 ($p=0,06$; *Wilcoxon*).

En el último seguimiento de RM el grupo 1 manifestó la FE más baja, aunque con respecto a los grupos 2 y 3 las diferencias no fueron significativas ($p=0,75$ y $p=0,32$; *U Mann-Whittney*, respectivamente).

La comparación de los porcentajes de FE al final del estudio con el grupo control sano mostró diferencias significativas con respecto a los grupos 1 y 2 ($p=0,01$; *U Mann-Whittney*) y no significativas con respecto al grupo 3 ($p=0,09$; *U Mann-Whittney*).

Al igual que en el caso de la FE, los valores de VSF y VDF en T0 fueron similares entre todos los grupos (Tabla 10).

En cuanto al VDF, tras la creación del modelo se observó un incremento significativo en este parámetro en los 3 (grupo 1: $p=0,02$; grupos 2 y 3: $p=0,03$; *Wilcoxon*).

Se observó una elevación continua del valor de VDF a lo largo del estudio, alcanzándose los valores más elevados en T4 (Figura 26). Para este tiempo de seguimiento el grupo 1 evidenció el nivel de VDF más alto. Las diferencias con respecto a los grupos 2 y 3, no obstante, no fueron significativas ($p=0,18$ y $p=0,32$; *U Mann-Whittney*, respectivamente).

Al final del estudio el valor del VDF fue significativamente inferior en el grupo control sano que en los 3 grupos restantes (grupo 1: $p=0,002$; grupos 2 y 3: $p=0,01$; *U Mann-Whittney*).

El VSF sufrió un incremento significativo tras la inducción del infarto en los 3 grupos (grupo 1: $p=0,02$; grupos 2 y 3: $p=0,03$; *Wilcoxon*). Además, el valor de este parámetro siguió ascendiendo hasta el final del estudio (Tabla 10; Figura 27), observándose el VSF más elevado en el grupo 1. Únicamente en este grupo se encontraron diferencias significativas entre T1 y T4 ($p=0,03$; *Wilcoxon*).

A pesar de que en el último seguimiento el grupo 1 manifestara el valor de VSF más elevado, éste no fue significativamente superior a los obtenidos para los grupos 2 y

GRUPO	TIEMPO	FE	VDF	VSF
1	T0	54,94±11,24	56,31±14,39	26,36±9,78
	T1	38,04±9,46	75,82±10,99	47,27±11,93
	T2	40,39±5,44	79,21±9,26	47,31±7,86
	T3	39,12±9,54	87,12±12,88	53,60±14,49
	T4	42,14±10,00	95,58±18,91	56,33±19,49
2	T0	51,14±7,01	53,90±9,80	24,43±6,48
	T1	39,86±7,56	67,01±13,31	40,18±8,56
	T2	40,87±5,83	72,56±8,37	42,80±5,57
	T3	40,07±5,16	77,76±13,38	46,86±10,94
	T4	44,33±5,91	83,37±10,20	45,54±7,05
3	T0	52,08±6,73	58,13±4,06	27,85±4,12
	T1	38,22±2,75	57,61±9,73	41,69±5,63
	T2	43,07±7,11	69,40±12,39	40,15±12,35
	T3	44,60±3,39	75,71±12,19	41,13±8,80
	T4	49,27±4,61	84,31±13,54	42,84±8,10
CONTROL SANO	Inicio	52,07±8,82	56,07±7,94	25,77±6,06
	Final	55,61±5,12	65,56±3,99	29,10±3,99

Tabla 10: Valores medios \pm DT de los parámetros de fracción de eyección (FE)(%), volumen diastólico final (VDF) (ml) y volumen sistólico final (VSF) (ml) en los grupos 1, 2, 3 para los tiempos basal (T0), 1 semana post-IAM (T1), 1 semana post-inyección (T2), 5 semanas post-IAM (T3) y 10 semanas post-inyección (T4) y en el grupo control sano para los tiempos inicio y final del estudio.

3 ($p=0,28$ y $p=0,20$, respectivamente; *U Mann-Whittney*).

En cambio, si se encontraron diferencias entre el grupo control sano y los 3 grupos de estudio. Así, el valor del VSF fue significativamente inferior en el grupo control sano que en los grupos 1, 2 ($p=0,003$; *U Mann-Whittney*) y 3 ($p=0,01$; *U Mann-Whittney*).

Con respecto a las imágenes captadas en las secuencias de cine, en el último seguimiento de RM se puso de manifiesto la presencia de un mayor adelgazamiento de la pared del ventrículo izquierdo en los animales pertenecientes al grupo 1 en comparación de los grupos 2, 3 y control sano (Figuras 23 y 24).

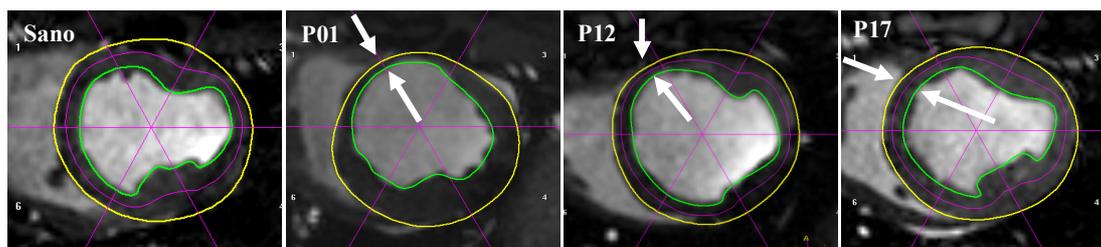


Figura 23: Imágenes captadas en eje corto durante el último seguimiento de RM correspondientes a un sujeto del grupo control sano y a los animales P01 (grupo 1), P12 (grupo 2) y P17 (grupo 3). Se aprecia un mayor adelgazamiento de la pared ventricular en el sujeto P01 (flechas).

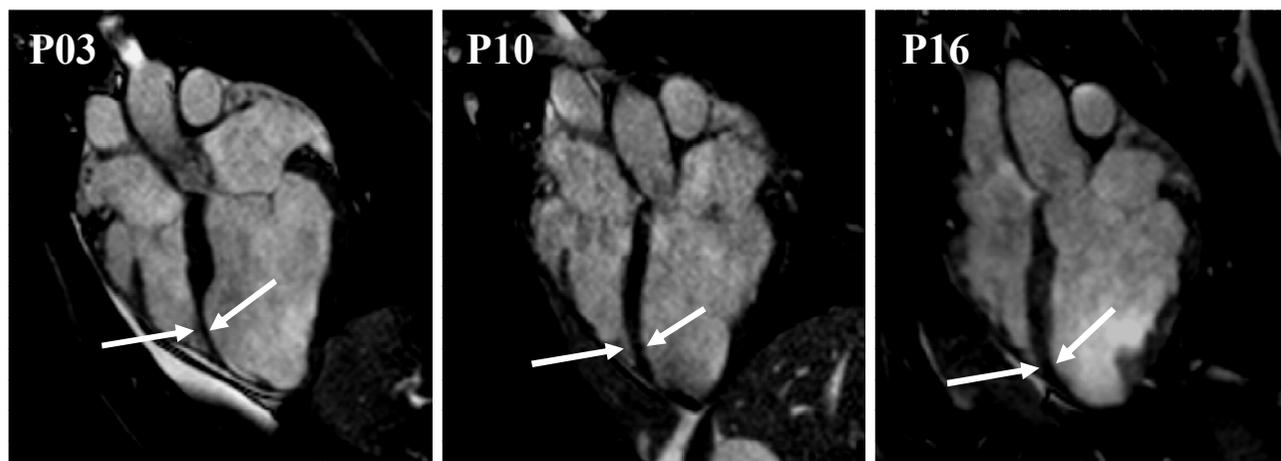


Figura 24: Imágenes captadas en cuatro cámaras durante el último seguimiento de RM correspondientes a los animales P03 (grupo 1), P10 (grupo 2) y P16 (grupo 3). Se aprecia un mayor adelgazamiento de la pared ventricular en el sujeto P03 (flechas).

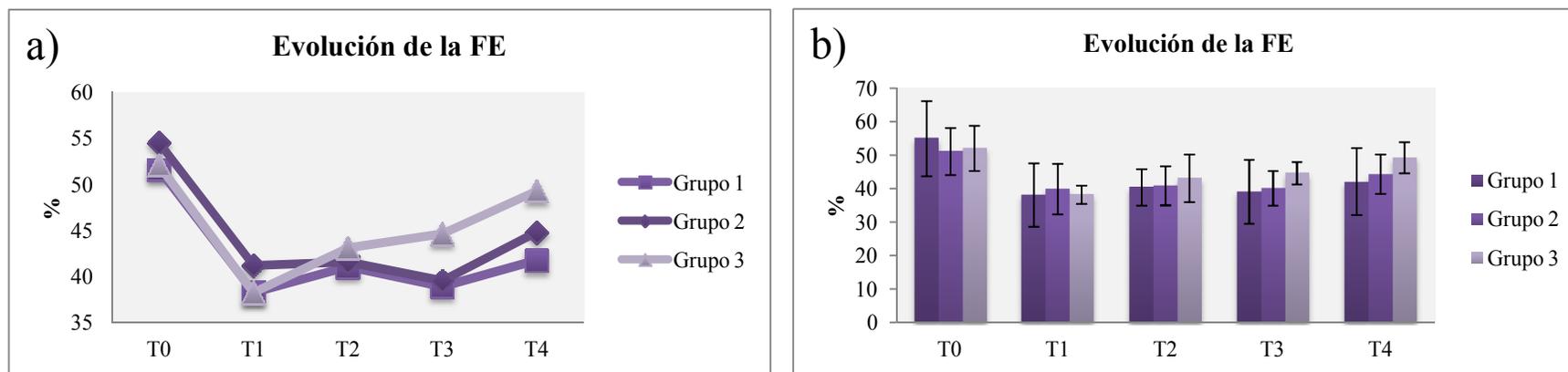


Figura 25: a) Evolución del valor medio de la fracción de eyección (FE) en los 3 grupos del estudio a los tiempos basal (T0), 1 semana post-infarto (T1), 1 semana post-inyección (T2), 5 semanas post-infarto (T3) y 10 semanas post-inyección (T4). b) Porcentajes medios de FE \pm DT en los 3 grupos del estudio a los tiempos basal (T0), 1 semana post-infarto (T1), 1 semana post-inyección (T2), 5 semanas post-infarto (T3) y 10 semanas post-inyección (T4).

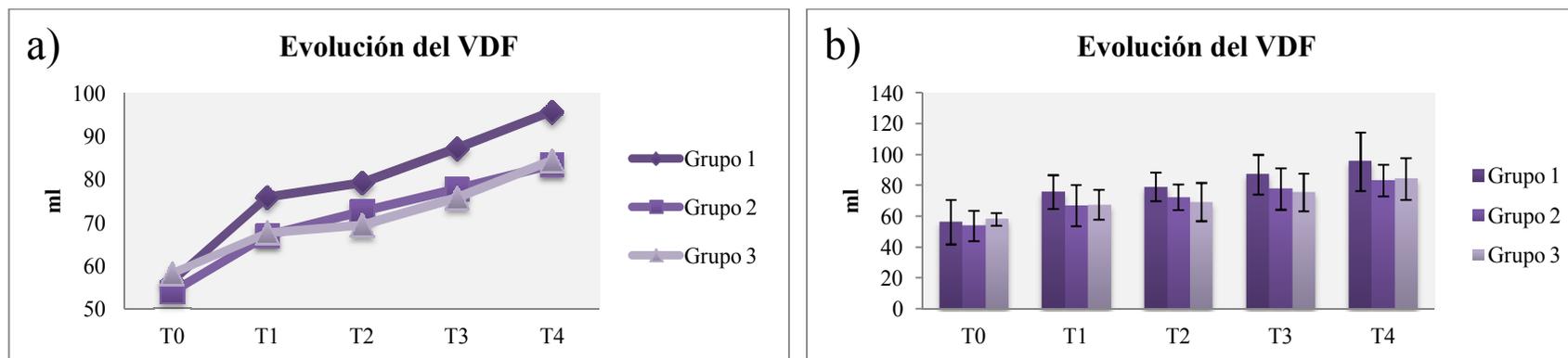


Figura 26: **a)** Evolución del valor medio del volumen diastólico final (VDF) en los 3 grupos del estudio a los tiempos basal (T0), 1 semana post-infarto (T1), 1 semana post-inyección (T2), 5 semanas post-infarto (T3) y 10 semanas post-inyección (T4). **b)** Valores medios del VDF \pm DT en los 3 grupos del estudio a los tiempos basal (T0), 1 semana post-infarto (T1), 1 semana post-inyección (T2), 5 semanas post-infarto (T3) y 10 semanas post-inyección (T4).

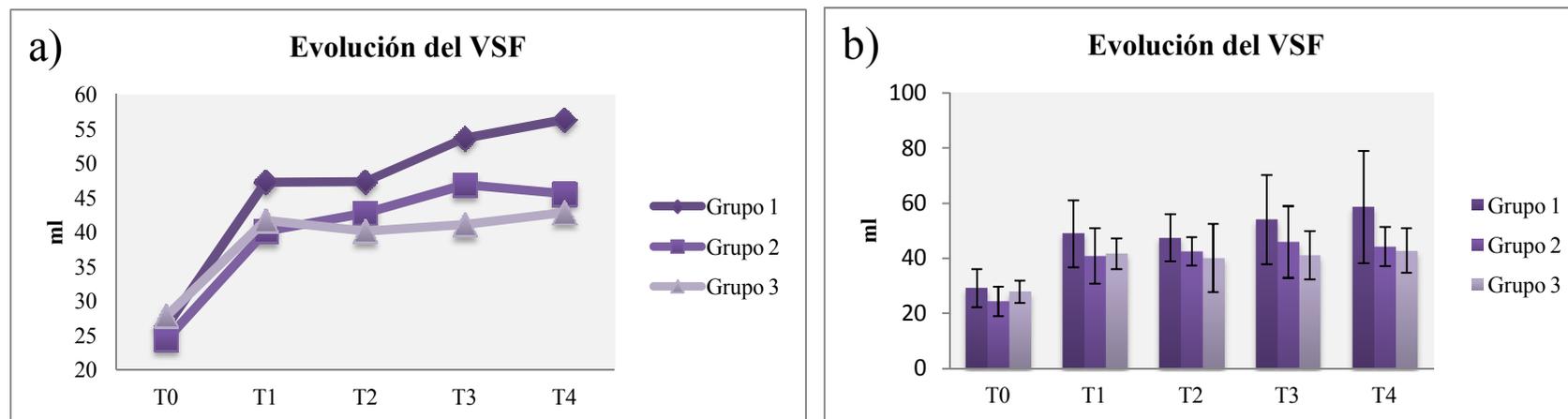


Figura 27: **a)** Evolución del valor medio del volumen sistólico final (VSF) en los 3 grupos del estudio a los tiempos basal (T0), 1 semana post-infarto (T1), 1 semana post-inyección (T2), 5 semanas post-infarto (T3) y 10 semanas post-inyección (T4). **b)** Valores medios del VSF \pm DT en los 3 grupos del estudio a los tiempos basal (T0), 1 semana post-infarto (T1), 1 semana post-inyección (T2), 5 semanas post-infarto (T3) y 10 semanas post-inyección (T4).

4.4. Fin de Estudio

4.4.1. Flujo coronario

La angiografía coronaria realizada inmediatamente antes de la eutanasia de los animales mostró puntuaciones del flujo coronario de TIMI 3 en todos los sujetos pertenecientes a los grupos de estudio 2 y 3 (Figuras 28 y 29).

En el grupo 1 (control), sin embargo, tan solo 4 animales manifestaron una calidad de flujo TIMI 3. Dos ejemplares de este grupo (P04 y P05) presentaron un relleno completo pero lento del lecho capilar (TIMI 2), mientras que el animal P03 mostró una oclusión completa de la arteria interventricular paraconal (TIMI 0) (Figura 30).

4.4.2. Necropsia

El estudio de necropsia practicado tras la muerte de los animales no reveló hallazgos dignos de mención en ninguno de los animales a excepción del sujeto P05 (grupo 1), en el que se observó la existencia de adherencias del corazón al pericardio (Figura 31).

4.4.3. Tinción con TTC

La tinción con TTC mostró la existencia de infartos de diversos tamaños y de localización anteroseptal (Figura 32). La comparación entre las imágenes obtenidas mediante RM y las secciones de corazón teñidas mediante TTC, mostró una buena correspondencia entre ambas técnicas en cuanto a tamaño y localización del infarto (Figuras 33, 34 y 35).

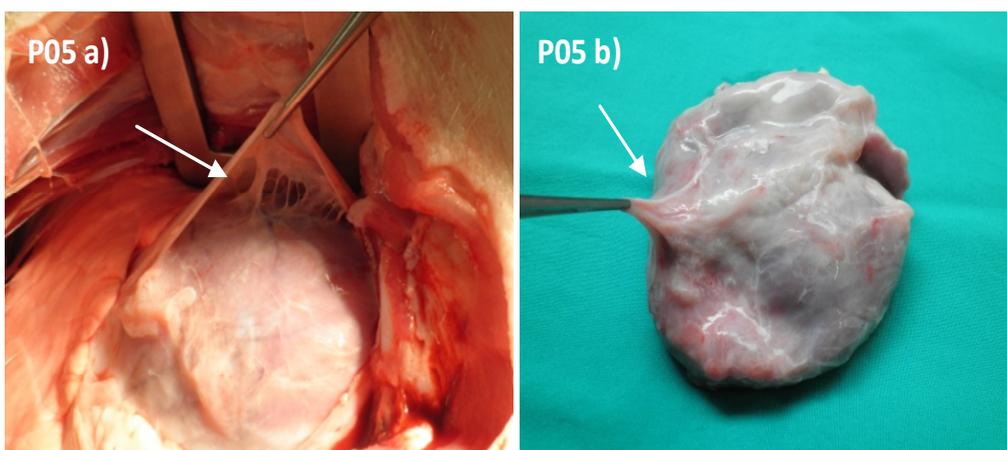


Figura 31: En a) y b) se muestran adherencias del corazón al pericardio en el animal P05, perteneciente al grupo 1.

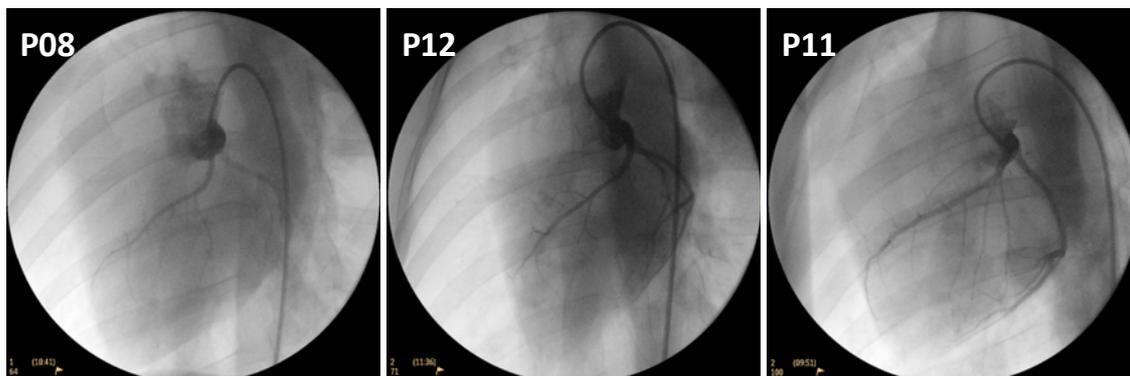


Figura 28: Angiografías previas a la eutanasia correspondientes a 3 individuos representativos del grupo 2 (animales P08, P12 y P11). Todos los animales presentaron una calidad del flujo coronario TIMI 3.



Figura 29: Angiografías previas a la eutanasia correspondientes a 3 individuos representativos del grupo 3 (animales P16, P17 y P19). Todos los animales presentaron una calidad del flujo coronario TIMI 3.



Figura 30: Angiografías previas a la eutanasia correspondientes a 3 individuos representativos del grupo 1. El animal P05 presenta un relleno lento del lecho capilar (TIMI 2) mientras que el individuo P03 muestra una oclusión completa del vaso (TIMI 0).

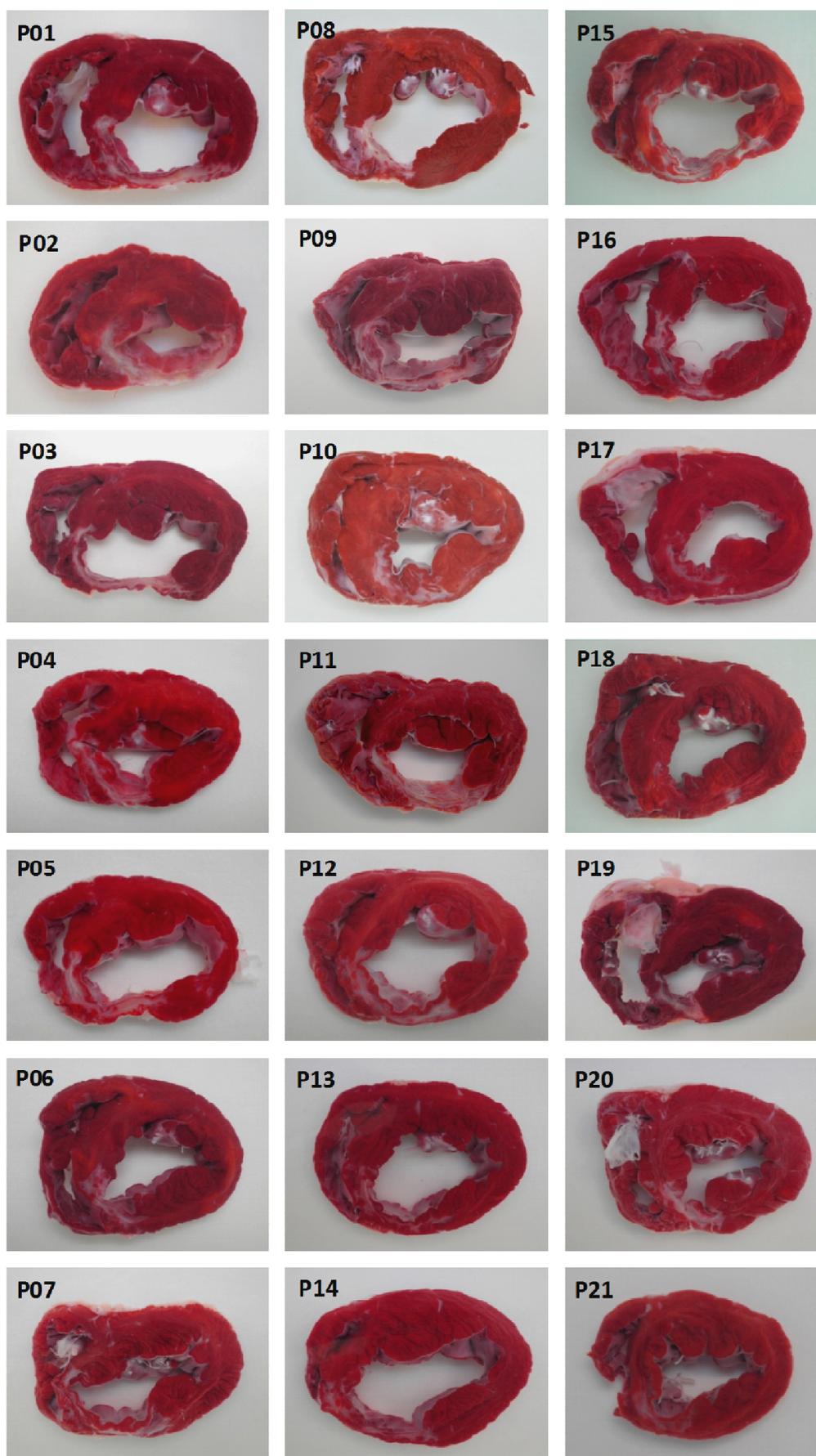


Figura 32: Secciones de corazón pertenecientes a cada uno de los animales del estudio tras la tinción con TTC. Columna izquierda corresponde al grupo 1, columna central al grupo 2, columna derecha al grupo 3.

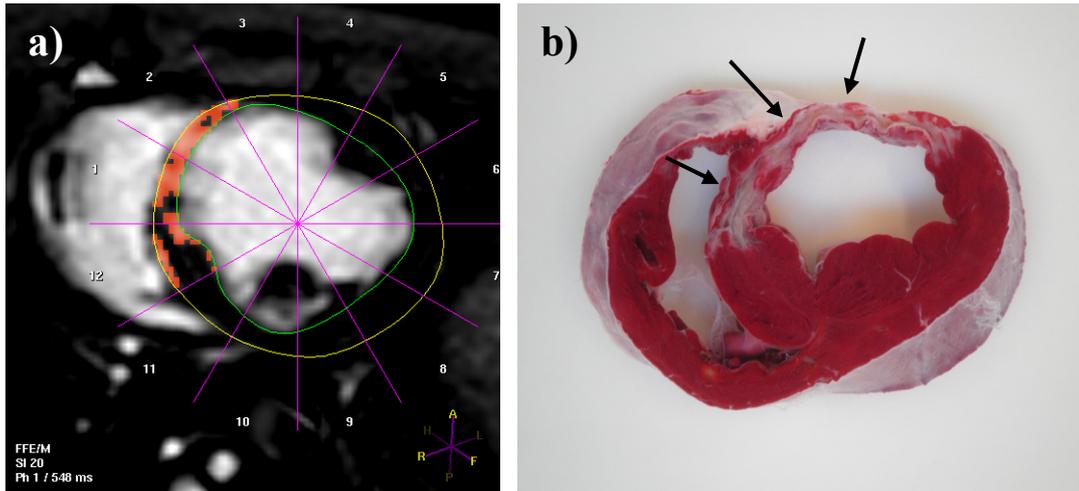


Figura 33: **a)** Imagen de realce tardío obtenida mediante RM correspondiente al animal P01 con zona de infarto realzada en rojo. **b)** Sección de corazón correspondiente al animal P01 tras la tinción con TTC (la zona de infarto está indicada mediante flechas).

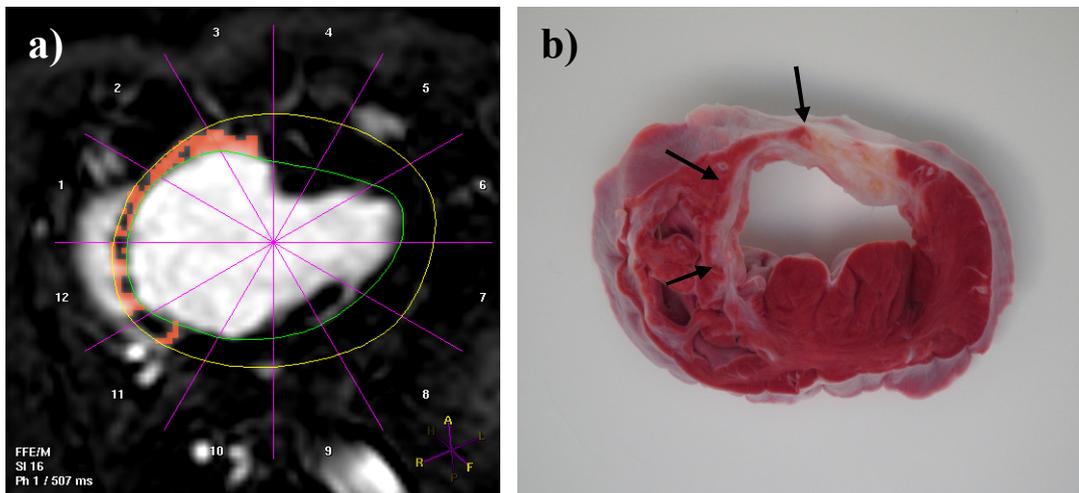


Figura 34: **a)** Imagen de realce tardío obtenida mediante RM correspondiente al animal P11 con zona de infarto realzada en rojo. **b)** Sección de corazón correspondiente al animal P11 tras la tinción con TTC (la zona de infarto está indicada mediante flechas).

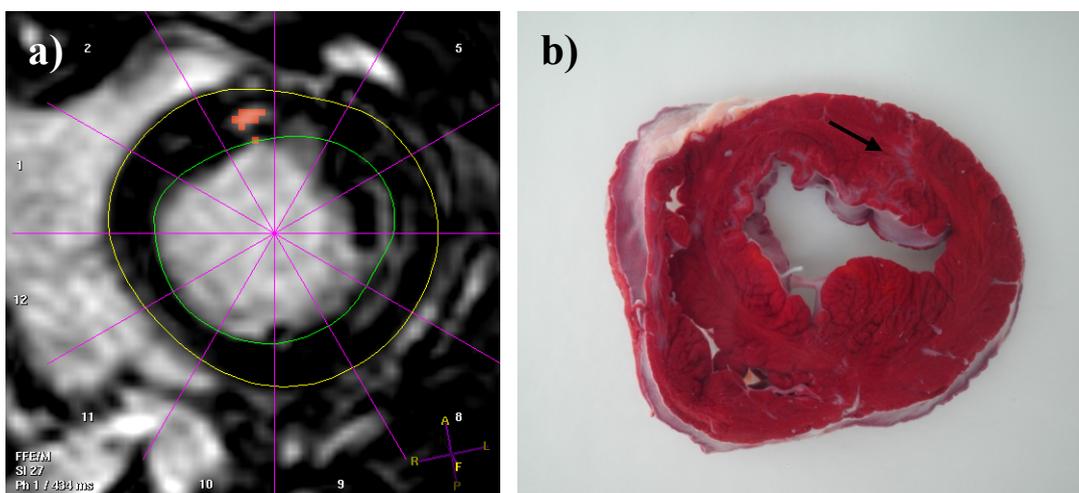


Figura 35: **a)** Imagen de realce tardío obtenida mediante RM correspondiente al animal P18 con zona de infarto realzada en rojo. **b)** Sección de corazón correspondiente al animal P18 tras la tinción con TTC (la zona de infarto está indicada mediante flecha).

4.4.4. Histología

Con respecto al estudio histológico, las lesiones predominantes en los 3 grupos de estudio fueron la fibrosis localizada entre los miocardiocitos, las zonas de necrosis y la neovascularización (Tabla 11).

El grupo que presentó las lesiones más severas fue el grupo 1. En la mayoría de las muestras de dicho grupo el porcentaje de tejido afectado fue superior al 50%, superando en 3 animales incluso el 75%. La fibrosis fue muy grave en 4 de los 7 casos (Figura 36 a y b), observándose la sustitución de los miocardiocitos por un tejido conjuntivo fibroso maduro y bien formado con fibroblastos de núcleos pequeños y citoplasmas amplios y alargados.

También se observó necrosis aunque en menor medida, caracterizada ésta por la aparición de vacuolas claras en los citoplasmas de los miocardiocitos (Figura 37 a y b).

La presencia de neovasos fue significativa sobre todo en las partes periféricas o donde la fibrosis aún no era completa. En el animal P01 se detectaron numerosos macrófagos cargados de hemosiderina lo que indicó la existencia de hemorragia previa (Figura 38).

En el grupo 2 se encontraron los niveles más bajos de lesión, observándose

diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo 1 en cuanto a la extensión del infarto ($p=0,02$), la fibrosis ($p=0,01$), la necrosis ($p=0,003$) y la suma de puntuaciones ($p=0,01$) (*U de Mann Whittney*). Las diferencias con respecto al grupo 3 no fueron significativas para ninguno de los parámetros evaluados (extensión del infarto: $p=0,30$; fibrosis: $p=0,36$; necrosis: $p=0,06$; calcificaciones: $p=1,00$; infiltrado inflamatorio: $p=0,76$; neovascularización: $p=0,71$; suma de scores: $p=0,25$; *U de Mann Whittney*).

En las muestras pertenecientes al grupo de 25×10^6 de CMCs la fibrosis estaba peor organizada que en el caso del grupo control y ésta fue además menos madura (Figura 39 a y b).

En cuanto a las zonas de necrosis, en muchas muestras ésta se caracterizaba por la aparición de espacios dilatados, sin contenido celular y con presencia de edema en lugar de la muerte de las células (Figura 40 a y b). Además se observaron numerosos neovasos (Figura 41 a y b).

A pesar de que en el grupo de 50×10^6 de CMCs las lesiones fueron menos severas que en el grupo 1, las diferencias entre ambos grupos tan sólo fueron significativas en el caso de la fibrosis ($p=0,04$; *U de Mann Whittney*). Ésta fue ligera en todas las muestras del grupo 3, salvo en el animal P19 en el que fue moderada (Figura 42 b).

La necrosis fue generalmente más evidente, aunque al igual que en el grupo 2 se manifestó como zonas de edema (Figura 43

a y b) y presencia de neovasos (Figura 44) en lugar de cómo una verdadera muerte celular.

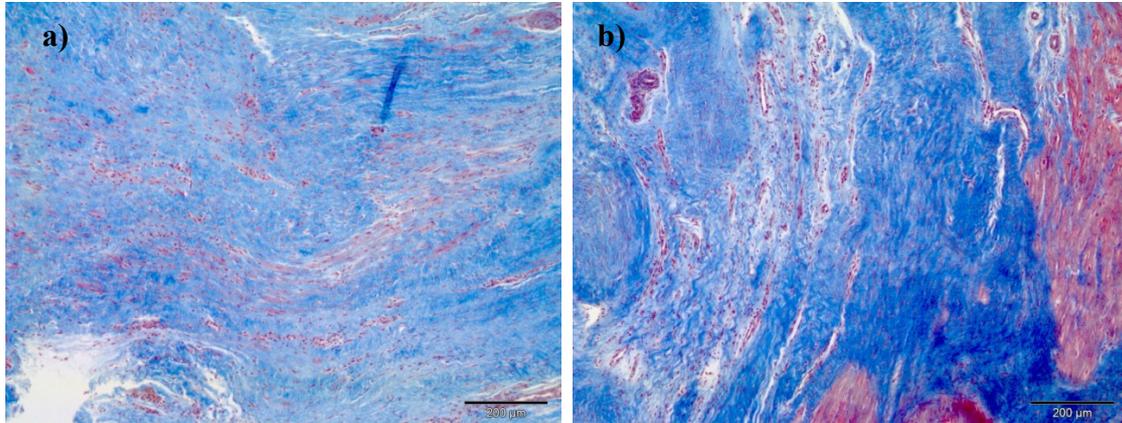


Figura 36: Tinción con TCM (200μm). En los animales P05(a) y P02 (b), ambos del grupo 1, las áreas de fibrosis ocupan la mayor parte de la muestra.

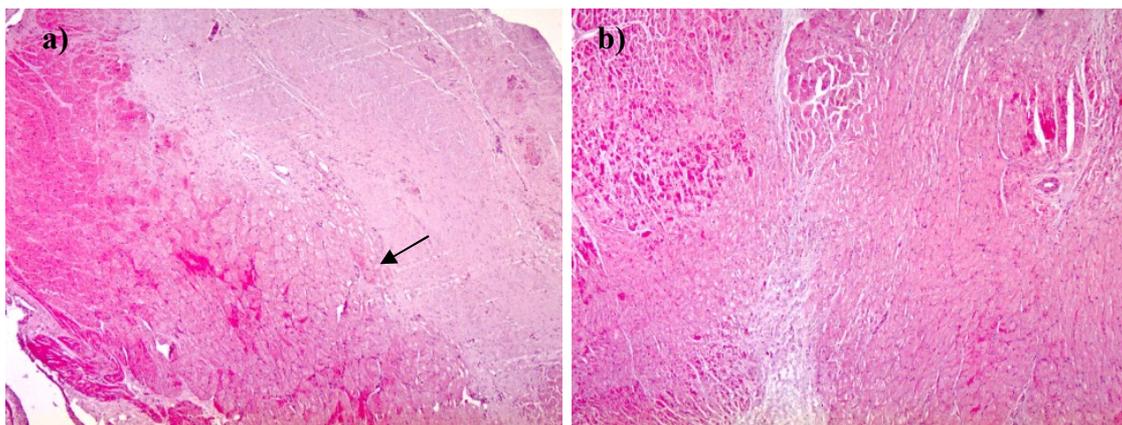


Figura 37: Tinción con HE. **a)** En el animal P04 (grupo 1) se observan extensas áreas de necrosis de las fibras musculares (flecha). **b)** En el sujeto P06 (grupo 1) se evidencian áreas de necrosis y fibrosis muscular.

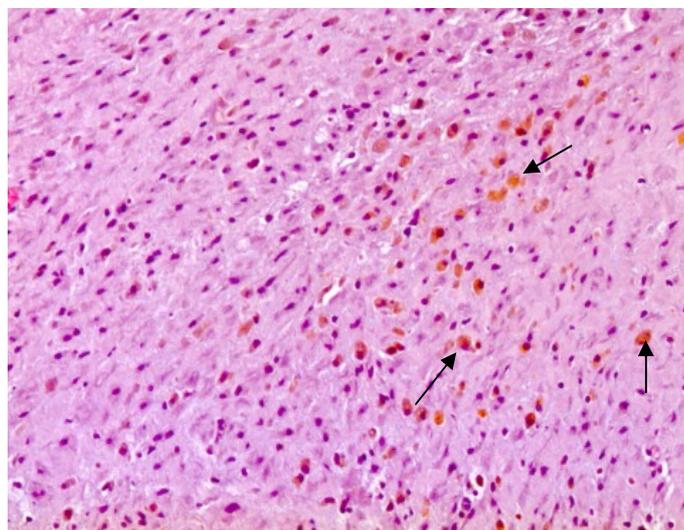


Figura 38: Tinción con HE. Imagen correspondiente al animal P01 del grupo control. Se observa fibrosis y aparecen numerosos macrófagos con hemosiderina (flechas).

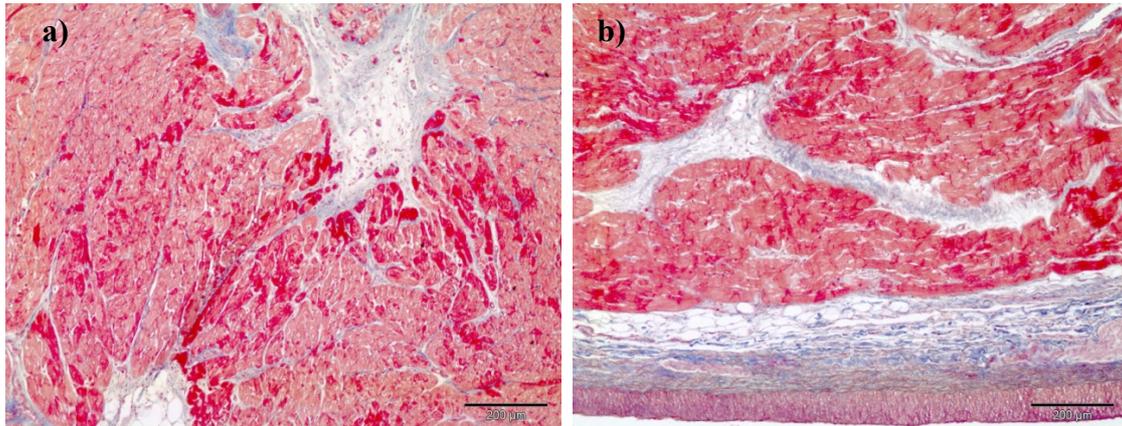


Figura 39: Tinción con TCM (200μm). Presencia de fibrosis poco severa en los animales P11 (A) y P09 (B) del grupo 2.

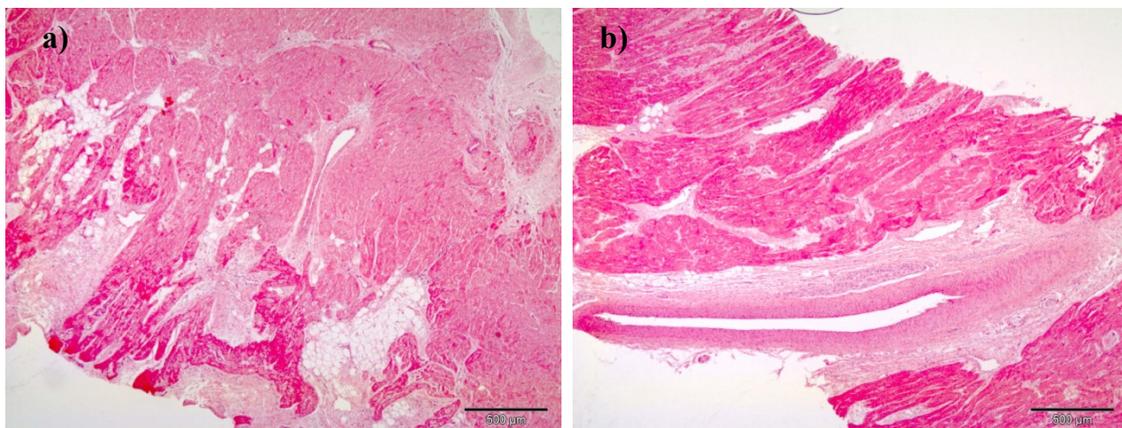


Figura 40: Tinción con HE (500μm). En las muestras de los animales P11 (a) y P09 (b) del grupo 2 las áreas de necrosis están ocupadas fundamentalmente por edema y algunas células inflamatorias, siendo la fibrosis escasa.

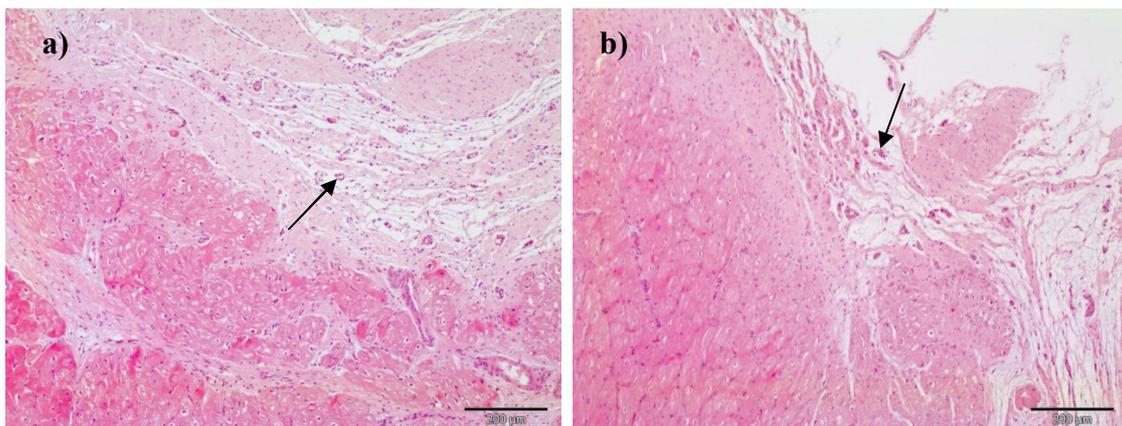


Figura 41: Tinción con HE (200μm). En los animales P13 (a) y P14 (b) del grupo 2 la formación de neovasos es elevada (flechas).

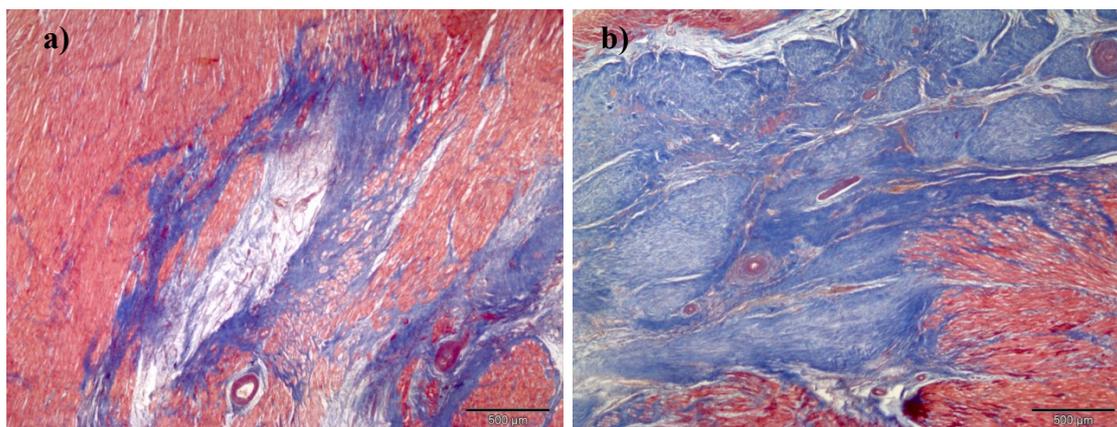


Figura 42: Tinción con TCM (500µm). **A)** Liger presencia de fibrosis en el animal P17 (grupo 3). **B)** En la muestra correspondiente al sujeto P19 (grupo 3) predomina la fibrosis sobre la necrosis.

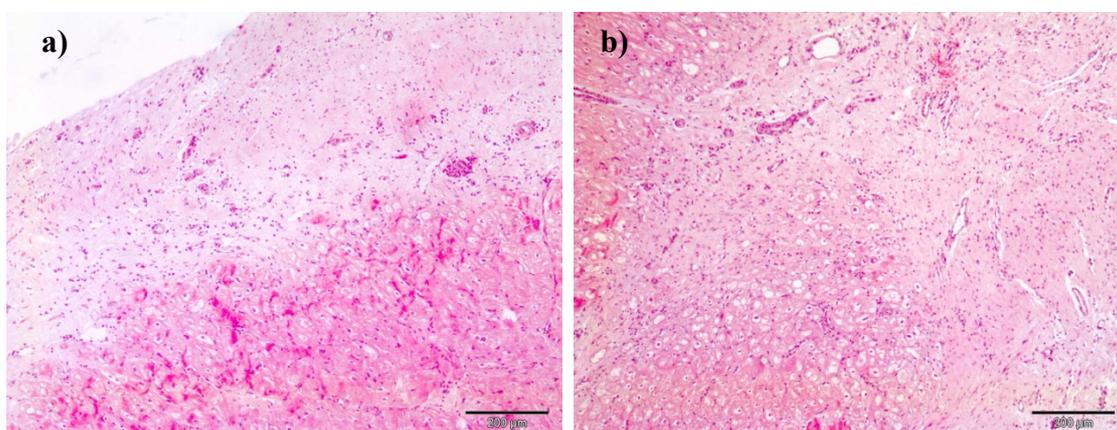


Figura 43: Tinción con HE (200µm). **a y b)** En las muestras de los animales P20 y P21 (grupo 3) las áreas de necrosis están ocupadas fundamentalmente por edema y algunas células inflamatorias, siendo la fibrosis escasa.

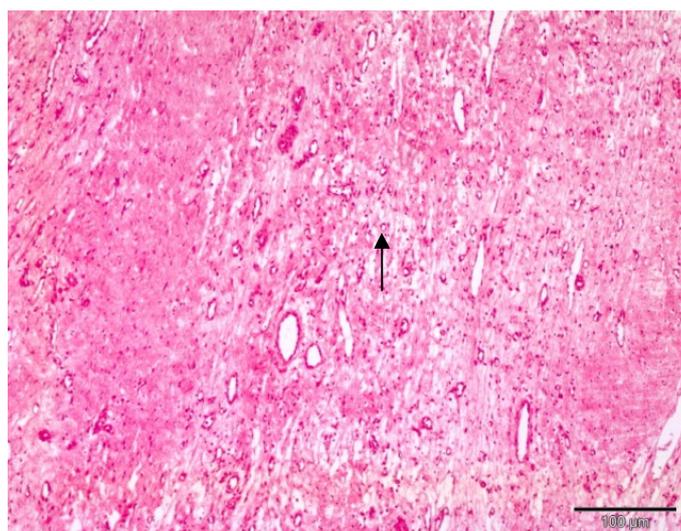


Figura 44: Tinción con HE (100µm). Elevada presencia de neovasos (flecha) en el animal P15 perteneciente al grupo 3.

Grupo	ID	Grado de extensión	Infiltrado Inflamatorio	Fibrosis	Necrosis	Metaplasia/ Calcificaciones	Neovascularización	Suma de Puntuaciones
1	P01	4	3	4	2	1	3	17
	P02	4	1	4	2	0	3	14
	P03	3	2	4	3	0	2	14
	P04	3	1	3	2	0	3	12
	P05	4	3	4	2	0	3	16
	P06	2	1	2	2	0	2	9
	P07	1	1	1	3	0	0	7
	MEDIA	3,00±1,15	1,71±0,95	3,14±1,21	2,29±0,49	0,14±0,38	2,29±1,11	12,71±3,64
2	P08	2	1	2	1	0	2	8
	P09	1	1	1	0	0	0	3
	P10	2	1	1	1	0	2	7
	P11	1	2	1	0	0	1	5
	P12	2	1	2	1	0	3	9
	P13	1	2	1	2	0	3	9
	P14	1	0	1	1	0	1	4
	MEDIA	1,43±0,53	1,14±0,69	1,29±0,49	0,86±0,69	0,00±0,00	1,71±1,11	6,43±2,44
3	P15	2	1	2	3	0	3	11
	P16	1	0	1	1	0	0	3
	P17	1	0	1	1	0	1	4
	P19	3	1	3	1	0	1	9
	P20	2	2	1	3	0	3	11
	P21	2	2	2	3	0	4	13
	MEDIA	1,83±0,75	1,00±0,89	1,67±0,82	2,00±1,10	0,00±0,00	2,00±1,55	8,50±4,09

Tabla 11: Valores individuales y medias \pm DT de los parámetros histológicos: grado de extensión, infiltrado inflamatorio, fibrosis, necrosis, metaplasia/calcificaciones, neovascularización y suma de puntuaciones.

V. Discusión

El modelo porcino de IM ha sido utilizado durante décadas en el campo de la cardiología experimental, debido ello fundamentalmente a las similitudes anatómicas y funcionales entre el corazón del cerdo y el humano (Ellison y cols., 2011; Oliveira y Angeli, 2006; Teramoto y cols., 2011; Ytrehus, 2000; Patten y Hall-Porter, 2009; Pérez del Prado y cols., 2009; Verdouw y cols., 1998). Una complicación indiscutible que presenta la especie porcina, no obstante, es la elevada incidencia de arritmias ventriculares y fibrilación asociada a la oclusión de alguna de sus arterias coronarias (Munz y cols., 2011; Pérez de Prado y cols., 2009; Regueiro-Purriños y cols., 2011; Krombach y cols., 2005; Naslund y cols., 1992; Reffelmann y cols., 2004).

Tanto el lugar como la duración de la oclusión coronaria juegan un papel importante en la incidencia de FV (Munz cols., 2011). En este sentido, *Suzuki y cols.* encontraron incidencias de hasta un 90% en animales en los que la oclusión se realizaba proximal a la primera rama diagonal de la arteria interventricular paraconal. Por el contrario, en animales en los que la oclusión se llevaba a cabo distal a dicha rama arterial, la incidencia observada era inferior al 20% (Suzuki y cols., 2008). Este hallazgo no coincide con los resultados

obtenidos en el presente estudio en el que se alcanzaron tasas de FV cercanas al 80%. Nuestros datos, sin embargo, se asemejan más a los publicados por *Krombach y cols.* y *Pérez de Prado y cols.* que encontraron tasas en torno al 60 y 90%, respectivamente, en un modelo de infarto similar al nuestro (Krombach y cols., 2005; Pérez de Prado y cols., 2009).

Asimismo se han descrito otros factores que favorecen la aparición de FV, como por ejemplo la sobre-dilatación de la arteria coronaria a consecuencia de la utilización de balones coronarios de tamaños no apropiados (McCall y cols., 2012; Pérez de Prado y cols., 2009). En nuestro caso, en concreto, una oclusión coronaria proximal pudo ser la responsable de los repetidos episodios de FV que sufrieron los animales P17 y P15 (ambos del grupo 3) durante la inducción del modelo. En ambos casos, la angiografía desveló que la primera rama diagonal de la arteria interventricular paraconal se situaba próxima al origen de la arteria coronaria. No obstante, el sujeto P13 (grupo 2) presentó un único episodio de FV a pesar de mostrar una anatomía coronaria similar a la de los dos animales mencionados anteriormente.

En los modelos de infarto reperfundido existe un mayor riesgo a padecer arritmias

asociadas al fenómeno de reperfusión. *Tennant y Wiggers* fueron los primeros en demostrar experimentalmente que el comienzo de una reperfusión tras un periodo de isquemia daba lugar a la aparición de arritmias ventriculares (Tennant y Wiggers, 1935). Después, *Harris y Rojas* observaron que dichas arritmias se producían tanto durante el periodo de oclusión como después de iniciar la reperfusión (Harris y Rojas, 1943). En el ámbito clínico, la relación entre la reperfusión y las arritmias no parece tan clara. Así *Hackett y cols.* encontraron que solo una minoría de arritmias se asociaban a la reperfusión, mientras que la mayoría de ellas se mostraban durante el periodo de isquemia (Hackett y cols., 1990). De acuerdo con estos resultados, en nuestro estudio se observó la aparición de FV durante el periodo de oclusión en un total de 20 animales, mientras que tan sólo uno de los dos sujetos que murieron presentó FV durante la reperfusión.

Por otro lado, *Grines y cols.* demostraron que el riesgo de padecer arritmias era mayor cuanto antes se restablecía el flujo coronario (Grines y cols., 1993). Este hecho podría explicar por qué en el animal P18, perteneciente al grupo 3, se produjeron múltiples fibrilaciones. En este caso el flujo coronario se restableció rápidamente tras el inicio del periodo de isquemia a consecuencia de un defecto en el balón coronario que se había colocado. *Ruiz-Ros y*

cols. observaron que la aparición de arritmias se asociaba con la severidad de los cambios metabólicos producidos por la isquemia (Ruiz-Ros y cols., 1997). Más tarde *Yoshida y cols.* identificaron la sobrecarga de calcio intracelular como mecanismo responsable de la aparición de las arritmias de reperfusión (Yoshida y cols., 2000).

La especie porcina es susceptible al estrés y a la muerte súbita por FV. *Skinner y cols.* encontraron que los cerdos conscientes con corazones isquémicos sometidos a situaciones de estrés eran vulnerables a padecer FV (Skinner y cols., 1981). En nuestro caso, el animal P17 (grupo 3) presentó una parada cardíaca al día siguiente de la creación del infarto. Es posible que ésta se produjera a causa de un episodio de estrés agudo (Pérez de Prado y cols., 2009), pues sucedió cuando el animal estaba siendo manipulado para la extracción de sangre.

La elevada susceptibilidad de la especie porcina a la aparición de arritmias malignas condiciona una alta mortalidad en el modelo (Regueiro-Purriños y cols., 2011). En la bibliografía se encuentran frecuentemente tasas de mortalidad de alrededor del 30% (Krombach y cols., 2005; Pérez de Prado y cols., 2009; Kraitchman y cols., 2000). En el presente estudio, sin embargo, la mortalidad fue significativamente inferior, suponiendo un 8,7%.

La tasa de mortalidad puede ser disminuida con un manejo adecuado. Se conocen varias estrategias encaminadas a disminuir la aparición de arritmias y por consiguiente la mortalidad. En este sentido, *Na y cols.* describieron que los periodos cortos de oclusión y perfusión inmediatamente tras el inicio de la reperfusión (mecanismo denominado postcondicionamiento) son capaces de reducir y prevenir la incidencia de FV inducida por el mecanismo de reperfusión (*Na y cols.*, 1996). De forma similar, *Halkos y cols.* observaron una disminución en la incidencia de FV post-reperfusión en perros sometidos a un postcondicionamiento (*Halkos y cols.*, 2004).

Asimismo, las propiedades antiarrítmicas de fármacos tales como la lidocaína y la amiodarona han sido ampliamente descritas en la bibliografía (*Chen y cols.*, 1999; *Zhou y cols.*, 1999; *Kraitichman y cols.*, 2000; *Tsagalou y cols.*, 2004). A pesar de que en algunos trabajos sobre modelos de infarto en la especie porcina no se mencione el uso de dichos fármacos (*Dubois y cols.*, 2010; *Schuleri y cols.*, 2008; *Kuster y cols.*, 2011; *Munz y cols.*, 2011; *McCall y cols.*, 2012), en la mayoría de ellos se realiza un tratamiento a base de amiodarona y/o lidocaína para controlar las arritmias ventriculares (*Angeli y cols.*, 2009) en el momento de la oclusión coronaria (*Pérez de Prado y cols.*, 2009; *Klein y cols.*, 1984; *Suzuki y cols.*, 2008; *Hashemi y cols.*, 2008; *Angeli y cols.*, 2009). A diferencia de

estos autores, *Doyle y cols.* describieron la administración de amiodarona desde 2 semanas antes de la inducción del infarto, continuando con el tratamiento hasta el final del estudio (*Doyle y cols.*, 2007). En la presente investigación, con el fin de disminuir el umbral de desfibrilación (*Pérez de Prado y cols.*, 2009) y por consiguiente la tasa de mortalidad, nos decantamos por el uso prolongado de amiodarona, iniciando el tratamiento una semana antes del evento isquémico. A pesar de que la aparición de arritmias malignas no pudo ser evitada, la supervivencia de los animales probablemente se viera afectada de forma positiva, resultando ello en una tasa de mortalidad inferior a la de otros estudios similares (*Kraitichman y cols.*, 2000; *Krombach y cols.*, 2003; *Pérez de Prado y cols.*, 2009).

Por otro lado, el sexo de los animales también ha sido relacionado con la tasa de mortalidad. Existen diferencias importantes entre el grosor del miocardio y la cantidad de tejido conectivo presente en el corazón de ambos sexos (*Berg y Mewes*, 1994; *Huang y cols.*, 2001), que predisponen al macho al fallo cardiaco y a la muerte (*Pérez de Prado y cols.*, 2009). A este respecto es importante recordar que en nuestro caso se emplearon únicamente hembras, lo que puede estar relacionado con la baja mortalidad. Debido a la mayor susceptibilidad del sexo masculino, en la actualidad, una gran parte de los estudios se centran en el uso de cerdas (*Hashemi y*

cols., 2008; Regueiro-Purriños y cols., 2011; McCall y cols., 2012; Gyöngyösi y cols., 2011). A pesar de ello, todavía se encuentran trabajos en los que se emplean ambos sexos (Pérez de Prado y cols., 2009, Moelker y cols., 2006) o incluso exclusivamente machos (Munz y cols., 2011).

La determinación de biomarcadores tales como la Tpn y la CK-MB es una técnica relativamente concreta para valorar la severidad de un IM (Csonka y cols., 2010). Los tests de Tpn son los más específicos y sensibles a la hora de detectar daño miocárdico (Jaffe, 2008). Existe una correlación entre el valor de ciertos biomarcadores y el tamaño de un infarto (Zacharowski y cols., 1999; Friedrich y cols., 2008). En nuestro caso, sin embargo, no fue posible comprobar la existencia de dicha correlación, por encontrarse los niveles de Tpn I tras la inducción del infarto por encima del nivel de detección del analizador y desconociéndose por tanto el valor exacto del biomarcador evaluado.

A pesar de que una elevación de Tpn indique daño en el miocardio, este incremento no da información sobre si éste es reversible o por el contrario irreversible (Wells y Sleeper, 2008). Asimismo, hay ciertas situaciones como la cardioversión, la angioplastia y la colocación de stents coronarios, que pueden causar un aumento de este biomarcador en ausencia de infarto (Bardají, 2005). Así, en el presente estudio

el animal P18 (grupo 3) manifestó un incremento significativo en su nivel de Tpn I tras el periodo de reperfusión, así como a las 24 horas tras la inducción del modelo observándose, sin embargo, un miocardio prácticamente intacto en las imágenes de realce tardío.

En dicho animal la ausencia de infarto pudo deberse al restablecimiento transitorio del flujo coronario que se produjo durante el intercambio del balón, por el cual se inició un corto periodo de reperfusión. A día de hoy los periodos breves de isquemia separados por reperfusión y seguidos de una isquemia miocárdica más sostenida son conocidos como precondicionamiento. Este fenómeno presenta un efecto cardioprotector, reduciendo la extensión de la necrosis (Moreu-Burgos y Macaya-Miguel, 2007). Concretamente, Schott y cols. describieron que la reperfusión durante los primeros 15 -20 minutos tras el comienzo de una isquemia continua y severa resultaba en la ausencia de daño irreversible (Schott y cols., 1990). La amplia reproducibilidad de este mecanismo en una gran variedad de especies incluida la humana, ha convertido el precondicionamiento isquémico en el *gold standard* de la cardioprotección (Ferdinandy y cols., 2007; Csonka y cols., 2010).

Otro posible mecanismo por el cual la extensión de la necrosis miocárdica puede ser reducida es la presencia de circulación

colateral a nivel coronario. El flujo residual al tejido isquémico es el principal determinante para el desarrollo de un infarto y el responsable de la extensión del mismo (Maxwell y cols., 1987). Cuando hay una oclusión total o subtotal de una arteria coronaria, el flujo puede llegar al miocardio por vasos colaterales (Moreu-Burgos y Macaya-Miguel, 2007), evitando el establecimiento del infarto. No obstante, el cerdo, al igual que el humano, presenta un desarrollo limitado de su circulación colateral (Verdouw y cols., 1998; Dixon y Spinale, 2009; Pérez de Prado y cols., 2009), por lo que parece poco probable que ésta pueda proteger frente al infarto.

La estandarización del tamaño de un infarto es importante en los estudios de terapia celular, permitiendo los infartos de similar extensión una mejor valoración de la eficacia atribuible a las células administradas (Huang y cols., 2010). Según la bibliografía consultada, la oclusión coronaria mediante balón de angioplastia permite estandarizar el tamaño del infarto controlando el tiempo y el lugar de oclusión (Pérez de Prado y cols., 2009). En el presente estudio, no obstante, la oclusión coronaria no resultó en infartos de similar extensión a pesar de haber utilizado en todos los animales el mismo protocolo de inducción, encontrándose en los animales porcentajes de infarto de entre un 4 y un 24%).

La mayoría de los estudios, como también el nuestro, se basan en las ramas diagonales como referencia para elegir el lugar de oclusión. La gran variabilidad existente entre la posición, el número y el diámetro de estas ramas diagonales, no obstante, parecen explicar las notables diferencias observadas entre los tamaños de infarto de los animales sometidos a la inducción del modelo. Por este motivo, *Huang y cols.* propusieron utilizar la longitud completa de la arteria como referencia para elegir el punto de oclusión en lugar de las ramas diagonales, dando lugar a infartos más estables y reproducibles (Huang y cols., 2010).

La manipulación excesiva con dispositivos endovasculares en el interior de un vaso sanguíneo puede producir vasoespasmos (McCall y cols., 2012). Así, durante el procedimiento de cateterización, el animal P08 (grupo 2) manifestó un espasmo de su arteria coronaria. En nuestro caso dicho espasmo probablemente se debió a la utilización de una microguía cuyo extremo se dañó durante el procedimiento. De acuerdo con los datos aportados por *McCall y cols.* la administración intracoronaria de 200µg de nitroglicerina resulta beneficiosa para provocar la dilatación de la arteria afectada (McCall y cols., 2012). De forma similar, *Schuleri y cols.* describieron la resolución de un vasoespasma coronario tras la inyección intracoronaria de la mitad de dicha dosis (Schuleri y cols., 2008).

En cuanto a los animales fallecidos durante la creación del infarto, uno de ellos mostró una oclusión coronaria completa tras el desinflado del balón. Este fenómeno es conocido como *no reflujo* y consiste en la incapacidad para reperfundir un tejido previamente isquémico a pesar de alcanzar la apertura de la arteria que irriga dicho territorio (Férez Santander y cols., 2004). No se conoce el mecanismo exacto por el cual se establece (Rezkalla y Kloner, 2002), sin embargo, se han propuesto varios mecanismos como responsables de su aparición. Entre ellos se cuentan el edema intracelular e intersticial que produce compresión extravascular de las arterias y arteriolas, el daño de las células de músculo liso coronario con aumento del tono vascular y falta de relajación frente al estímulo con acetilcolina, la liberación disminuida de óxido nítrico que se acompaña de un aumento del tono vascular y el bloqueo capilar por material tromboembólico (Férez Santander y cols., 2004).

A pesar de un restablecimiento satisfactorio del flujo sanguíneo en la arteria relacionada con el infarto, frecuentemente persiste una mala perfusión tisular (Kwong y Neilan, 2010). En nuestro caso los animales P03, P04 y P05 (todos del grupo control) manifestaron un flujo coronario aparentemente normal tras la instauración de la reperfusión así como después de la infusión intracoronaria de solución de administración. En la comprobación

angiográfica a las 10 semanas post-inyección, sin embargo, se observó la ausencia de flujo en el animal P03 (TIMI 0) y un relleno capilar completo pero lento en los sujetos P04 y P05 (TIMI 2). El fenómeno de falta de restablecimiento del flujo es una complicación derivada de la reperfusión que cada vez está más reconocida como indicador de posterior remodelado ventricular (Wu, 2012). Éste se caracteriza por una dilatación precoz de la región necrótica y periinfarto, con posterior extensión a zonas inicialmente sanas que conlleva cambios en la forma y el tamaño ventricular que desemboca en disfunción sistólica e insuficiencia cardiaca (Villa y cols., 2008). *Reffelmann y cols.* observaron en un modelo animal que las regiones anatómicas de mayor *no reflujo* se asociaban con un mayor adelgazamiento de pared (Reffelmann y cols., 2004). De acuerdo con estos resultados, el animal P03 mostró un adelgazamiento de la pared del VI muy marcado.

En relación a la vía de administración celular se ha elegido la ruta intracoronaria por tratarse de una vía frecuentemente utilizada en los ensayos clínicos (Histrov y Weber, 2005; Dib y cols., 2011) y ampliamente descrita en la bibliografía. A pesar de las indudables ventajas que presenta dicha ruta (Dimmeler y cols., 2005), entre las que se cuentan la distribución celular homogénea (Dib y cols., 2010) y su fácil aplicación (Dib y cols., 2011), la administración

intracoronaria de células madre conlleva el riesgo de causar disecciones de la íntima (Hirsch y cols., 2008; Meluzin y cols., 2006) e infartos (Freyman y cols., 2006; Vulliet y cols., 2004; Perin y cols., 2008; Toma y cols., 2009; Llano y cols., 2009). Así, *Vulliet y cols.* observaron microinfartos tras la inyección intracoronaria de células madre mesenquimales en perros (Vulliet y cols., 2004). De forma similar, *Johnston y cols.* describieron el mismo problema cuando administraban dosis superiores a 25×10^6 de células derivadas de cardioesferas de origen porcino en cerdos utilizando la misma vía (Johnston y cols., 2009).

En el presente estudio se valoró la seguridad de la administración intracoronaria de dos dosis distintas de CMCs alogénicas de origen porcino en un modelo de IAM reperfundido. Al tratarse de animales infartados previamente, la valoración histológica de un posible riesgo de oclusión del lecho vascular coronario es complicada, pues el daño miocárdico pre-existente podría enmascarar la presencia de microinfartos derivados de la inyección celular. Sin embargo, los resultados de un ensayo en cerdos sanos mostraron la ausencia de daño a nivel miocárdico tras la administración de una dosis celular de 35×10^6 de CMCs porcinas (Crisóstomo y cols., 2013 b).

Una posible explicación de la ausencia de lesiones miocárdicas en dicho experimento

pudo ser el tamaño de las células empleadas. Hay que tener en cuenta que tanto las células mesenquimales utilizadas por *Vulliet y cols.* como las cardioesferas inyectadas por *Johnston y cols.* presentaron un tamaño de alrededor de $20 \mu\text{m}$ (Vulliet y cols., 2004; Johnston y cols., 2009), mientras que las CMCs utilizadas en nuestro caso tenían un tamaño inferior ($13,5 \mu\text{m}$).

Se supone que las células administradas por vía intracoronaria desaparecen de la circulación coronaria tan solo unas pocas horas más tarde, migrando hacia el pulmón, hígado o riñón (Chin y cols., 2003; Tossios y cols., 2008; Freymann y cols., 2006). Con el fin de mejorar la retención celular, en la mayoría de ensayos clínicos se ha empleado la técnica de oclusión intermitente (Schächinger y cols., 2004; Meyer y cols., 2006; Janssens y cols., 2006) que consiste en alternar periodos de oclusión-infusión con periodos de perfusión. Con este método se pretende bloquear el flujo sanguíneo permitiendo un mayor contacto de las células con la microcirculación sin posibilidad de reflujo retrogrado hacia la aorta (Strauer y cols., 2002; Assmus y cols., 2002). A pesar de que se espera que la fijación de las células a la zona infartada sea mayor en estas condiciones (Sherman y cols., 2006; Dib y cols., 2011), *Moelker y cols.* encontraron que la inyección celular durante la oclusión coronaria no resultaba en una mejor fijación celular (Moelker y cols., 2006). Otro estudio experimental en

la especie porcina incluso mostró que la retención celular era superior cuando las células eran administradas preservando el flujo coronario (Doyle y cols., 2007). Este hallazgo pone en duda la eficacia del método de oclusión intermitente (Terrovitis y cols., 2010), por lo que en este trabajo se ha optado por la infusión celular a través de un microcateter manteniendo el flujo, disminuyéndose además de forma adicional el riesgo de arritmias y daño de la pared vascular ocasionados por las oclusiones repetidas (Baptista y cols., 1995; Balian y cols., 2006).

En los cerdos infartados la seguridad de la administración intracoronaria de las CMCs se valoró mediante la determinación de las enzimas cardíacas (Tpn I y CK-MB), la detección de cambios electrocardiográficos así como modificaciones en la calidad del flujo coronario (escala TIMI). A pesar de que la mayoría de los animales experimentaron un incremento en el valor de sus enzimas cardíacas tras la inyección intracoronaria (independientemente del grupo), en casi todos ellos los valores de Tpn I se mantuvieron cercanos a los considerados clínicamente aceptables ($\leq 0,5\mu\text{g/L}$) (Johnston y cols., 2009). Tan sólo los animales P10 (grupo de 25×10^6) y P16 (grupo 50×10^6) manifestaron aumentos de Tpn I más pronunciados, ascendiendo hasta $2,3\mu\text{g/L}$ y $1,4\mu\text{g/L}$, respectivamente.

Curiosamente, estos sujetos no mostraron un incremento simultáneo en el valor de

CK-MB, lo que hace pensar que la subida de Tpn I pueda deberse a un falso positivo (Csonka cols., 2010; Wells y cols., 2008). En este sentido hay que recordar que ciertas situaciones, tales como la propia cateterización cardíaca, pueden provocar una subida en el valor de dicha enzima (Bardají, 2005), sin que se trate de un aumento asociado a la infusión celular.

En el caso del animal P10 no se detectaron otros efectos adversos (arritmias, subidas del segmento ST, cambios en la calidad del flujo coronario) relacionados con la inyección celular, por lo que se puede asumir que la posibilidad de un falso positivo sea probable. En el animal P16, en cambio, además del incremento en el valor de Tpn I se registraron cambios electrocardiográficos, que hacen pensar en un posible efecto nocivo derivado de la inyección de la dosis superior de CMCs.

Mientras que en los grupos 1 y 2 no se observaron cambios en el ECG asociados a la inyección intracoronaria, en el grupo 3 un total de 4 animales manifestaron alteraciones, bien en forma de subidas puntuales del segmento ST (P15 y P16) o en forma de aparición de extrasístoles (P17 y P20). Asimismo, el único animal que presentó un empeoramiento de la calidad del flujo coronario inmediatamente tras la inyección (evidenciado por un flujo TIMI 2) (P19) perteneció a este grupo.

A pesar de que tanto los cambios en el ECG como la afectación del flujo coronario fueron temporales, regresando a la normalidad tan solo unos minutos tras la inyección celular, no podemos descartar que la dosis de 50×10^6 de CMCs presente cierto riesgo de causar microembolización. El hecho, no obstante, de tratarse de cambios pasajeros parece indicar que éstos podrían haberse evitado prolongándose el tiempo de espera entre dos inyecciones celulares consecutivas.

Los cambios electrocardiográficos asociados a la infusión intracoronaria de células madre han sido descritos previamente por Gyöngyösi y cols. debiéndose estos probablemente a una oclusión temporal de la arteria coronaria a consecuencia de la formación de agregados celulares o vasoespasma (Gyöngyösi y cols., 2009; Gyöngyösi y cols., 2010). A pesar de basarse los resultados de estos autores en la utilización de células mesenquimales, los hallazgos en cuanto a los parámetros hemodinámicos fueron similares a los nuestros, observándose fluctuaciones mínimas en la FC y la PAM durante la infusión de células.

En los últimos años se han aislado y caracterizado diferentes subtipos de CMCs, que han mostrado su utilidad en el contexto de la cardiopatía isquémica (Urbanek y cols., 2005; Beltrami y cols., 2003; Dawn y cols., 2005; Bolli y cols., 2006; Bearzi y cols., 2007; Wang y cols., 2006; Smith y cols., 2007; Koninckx y cols., 2013). En

este sentido, se ha demostrado que la inyección intramiocárdica de CMCs c-kit⁺ en las zonas adyacentes a un infarto producido mediante oclusión permanente en roedores produce una reducción del tamaño de infarto y una mejora de la función ventricular (Beltrami y cols., 2003; Messina y cols., 2004). De forma similar, Wang y cols. demostraron en un modelo de infarto en ratón que la administración de CMCs Sca-1⁺/CD31⁻ induce un incremento de la FE, una reducción del VDF y del VSF, así como un incremento de la neovascularización (Wang y cols., 2006).

A pesar de los efectos beneficiosos descritos, la ruta intramiocárdica ha sido cuestionada por presentar ciertas limitaciones en el ámbito clínico (Dawn y cols., 2005) como por ejemplo el riesgo de perforación del ventrículo en los puntos de inyección (Dib y cols., 2011). Además esta vía de inoculación se ha asociado a una pobre supervivencia de las células administradas (Zakharova y cols., 2010). Por otro lado, la inflamación del tejido asociada al procedimiento incrementa el riesgo de aparición de arritmias (Cheng y cols., 2009; Dib y cols., 2010).

Clínicamente, la vía de administración celular más práctica es la ruta intravascular (Dawn y cols., 2005), suponiendo la inyección intravenosa la ruta más simple y menos invasiva de todas (Dib y cols., 2011). A este respecto, Oh y cols. ensayaron la eficacia de las CMCs inyectadas por vía intravenosa. Sus

resultados, no obstante, fueron poco prometedores (Oh y cols., 2003) por producirse una limitada migración hacia el corazón y una baja retención celular (Barbash y cols., 2003).

Con respecto a la comparación de las vías de administración intravenosa e intracoronaria, durante el Third Annual CARE-MI Consortium Meeting se presentaron los resultados preliminares de un experimento de biodistribución aguda en cerdo infartado en el que se administraron las mismas células que en nuestro caso. Se observó mediante tomografía de emisión de positrones que tras la administración intracoronaria de células marcadas radiactivamente con Fluorodesoxiglucosa (^{18}F -FDG) un 20% de la señal emitida se localizaba en el corazón (principalmente en los bordes del infarto), mientras que el 80% restante se encontraba en vejiga en forma de ^{18}F -FDG libre. Por el contrario, cuando las células eran inyectadas por vía intravenosa, éstas se acumulaban en el pulmón (Janssens, 2013), lo que apoya los hallazgos de otros autores (Barbash y cols., 2003; Oh y cols., 2003).

La implantación de diferentes subtipos de CMCs de origen humano también ha mostrado su eficacia en modelos animales. De esta manera, *Bearzi y cols.* encontraron una mejora en la funcionalidad cardiaca de roedores tratados con dichas células (Bearzi y cols., 2007). De igual forma se ha demostrado que la inyección de células

derivadas de cardioesferas humanas en ratón infartado causa un incremento en la FE en comparación con animales control (Smith y cols., 2007).

Un punto a tener en cuenta a la hora de valorar la eficacia obtenida mediante la administración celular es el tipo de modelo animal utilizado. En la mayoría de trabajos en los que se ha mostrado un efecto beneficioso derivado de las CMCs, se ha empleado un modelo de infarto creado mediante oclusión permanente de una arteria coronaria (Bearzi y cols., 2007; Beltrami y cols., 2003; Rota y cols., 2008; Welt y cols., 2013). En nuestro caso y coincidiendo con otros autores (Dawn y cols., 2005, Johnston y cols., 2009; Lee y cols., 2011), hemos optado por un modelo de infarto reperfundido. Éste simula la situación clínica, en la que la mayoría de los infartos son reperfundidos (Tang y cols., 2010) bien sea de forma terapéutica o espontánea (Dawn y cols., 2005).

El fenómeno de reperfusión altera de forma significativa el ambiente en el corazón. El rápido restablecimiento del flujo sanguíneo en los corazones que han sido sometidos a un periodo isquémico produce radicales libres derivados del oxígeno que son capaces de dañar las membranas celulares (Vilar-Rojas y cols., 1996). Por otro lado, la reentrada de calcio al interior de los miocitos provoca un daño celular severo. Asimismo se produce un proceso inflamatorio que conlleva la liberación de

diversas sustancias tóxicas (radicales libres, proteasas, elastasas y colagenasas). Se produce además una activación plaquetaria capaz de inducir trombosis con el subsiguiente riesgo de reoclusión arterial (Férez Sandander y cols., 2004). Estos y otros cambios bioquímicos, estructurales y funcionales que se producen en el miocardio durante la reperfusión (Csonka y cols., 2010) causan un ambiente poco favorable para las células administradas que podrían determinar la muerte de las mismas.

Los ensayos preclínicos con CMCs publicados hasta el momento han mostrado una mejora significativa en cuanto a la funcionalidad cardíaca (Tang y cols., 2010; Chamuleau y cols., 2009). No obstante, hay que recordar que la mayoría de estos estudios se han llevado a cabo en roedores (Beltrami y cols., 2003; Messina y cols., 2004; Bearzi y cols., 2007, Dawn y cols., 2005, Wang y cols., 2006, Smith y cols., 2007; Rota y cols., 2008). Indudablemente, la utilización de los pequeños mamíferos es muy útil en el establecimiento de una prueba de concepto, la extrapolación de datos obtenidos en estas especies a la patología humana sin embargo, es discutible (Ellison y cols., 2011; Patten y Hall-Porter, 2009; Pérez de Prado y cols., 2009; Dixon y Spinale, 2009; Linke y cols., 2005).

Los trabajos en los que se han utilizado CMCs en modelos animales más afines al

ser humano son escasos. En este sentido, *Bolli y cols.* encontraron una mejora de la FE en un modelo de infarto porcino crónico (Bolli y cols., 2006). De igual manera, *Johnston y cols.* describieron efectos beneficiosos derivados de la infusión intracoronaria de células derivadas de cardioesferas en cerdos con infartos antiguos (Johnston y cols., 2009). Más tarde, *Lee y cols.* observaron mejoras significativas de la FE tras la aplicación intramiocárdica de cardioesferas y células derivadas de cardioesferas (Lee y cols., 2011). Recientemente, *Bolli y cols.* han descrito una mejora en la función regional y global del ventrículo izquierdo derivada de la administración intracoronaria de CMCs en cerdos con infarto de miocardio antiguo (Bolli y cols., 2013). De forma similar, se han observado efectos beneficiosos tras la aplicación de CMCs en la especie canina. Concretamente, la inyección intramiocárdica de estas células provoca un menor grado de remodelado ventricular y la preservación de la FE en perros con infarto crónico (Welt y cols., 2013).

Los prometedores datos preclínicos derivados de los estudios con CMCs ya han sido trasladados a la clínica humana. Así, los resultados de *Bolli y cols.* dieron lugar al ensayo SCIPPIO (Stem Cell In Patients with Ischemic cardiomyopathy) (NCT00474461), mientras que los de *Johnston y cols.* condujeron al ensayo CADUCEUS (CARDioshere-Derived aUtologous stem cElls to reverse

ventricular dysfunction) (NCT00893360) (Mazhari y Hare, 2012).

La gran mayoría de los ensayos preclínicos han mostrado la eficacia de CMCs autólogas (Beltrami y cols., 2003; Bolli y cols., 2006; Johnston y cols., 2009; Lee y cols., 2011; Bolli cols., 2013; Welt y cols., 2013) y/o humanas (Bearzi y cols., 2007; Smith y cols., 2007). La mayor extensión del uso de células autólogas frente a las alogénicas se debe principalmente a cuestiones inmunológicas (Lee y cols., 2011). Asimismo, se ha descrito que la capacidad regenerativa de las CMCs procedentes de corazones con patología no se encuentra afectada (Cheng y cols., 2011).

A pesar de las indudables ventajas que presenta la utilización de las células derivadas del propio paciente/animal (Strauer y Kornowsky, 2003), la terapia celular autóloga presenta también ciertas limitaciones (Nadal-Ginard y cols., 2006; Torella y cols., 2007; Ellison y cols., 2011). El largo proceso de aislamiento y expansión no permiten abordar el tratamiento de un infarto en su fase aguda, teniéndose que posponer la administración celular a fases más tardías (Malliaras y cols., 2012).

Por otro lado, el elevado coste derivado de la terapia celular autóloga limita su uso a unos pocos pacientes requeridos para la prueba de concepto así como para un pequeño número de pacientes con elevado poder adquisitivo (Ellison y cols., 2011). En

este estudio, por lo contrario, hemos apostado por el uso de CMCs de origen alogénico, cumpliendo esta opción terapéutica con los criterios de coste, viabilidad y disponibilidad para un tratamiento amplio y permitiendo además el abordaje del infarto en su fase aguda.

Los efectos beneficiosos de las CMCs alogénicas han sido probados con anterioridad, mostrando estas células una eficacia similar a las autólogas (Tseliou y cols., 2013). De igual manera, su aplicación ha demostrado ser segura, al menos en el ámbito preclínico (Malliaras y cols., 2012). En cuanto a la cuestión inmunológica, recientemente se ha descrito que las células progenitoras cardíacas humanas de origen alogénico presentan una baja inmunogenicidad (Lauden y cols., 2013).

Los métodos convencionales como la angiografía pueden carecer de la suficiente reproducibilidad y versatilidad para evaluar los cambios estructurales y funcionales que se producen tras la administración de una terapia celular. En cambio, los diferentes criterios de valoración evaluados mediante RM tales como la FE, el VSF y el VDF son medidas exactas y reproducibles que permiten la detección de incluso pequeños cambios (Fuster y cols., 2006).

Los incrementos en el VDF y el VSF tras un infarto están considerados como indicadores de remodelado ventricular (Makkar y cols., 2012). Sin embargo, hay

que subrayar que en el presente trabajo se han utilizado cerdos jóvenes. Estos animales están en crecimiento, por lo que los volúmenes ventriculares se incrementan fisiológicamente con el aumento de peso de los sujetos. Con el fin de diferenciar si los cambios en dichos parámetros se deben al incremento de peso corporal o por el contrario éstos exceden las variaciones derivadas del crecimiento normal de los animales, hemos hecho uso de un grupo control sano tal y como se ha descrito previamente por otros autores (Dubois y cols., 2010; Moelker y cols., 2006).

Mientras que en el grupo control sano se evidenció el incremento del VSF y el VDF asociado únicamente al crecimiento de los sujetos, en los grupos 1, 2 y 3 una parte de dicho incremento se debió a la presencia de remodelado ventricular. Al final del estudio, la mayor elevación en el valor de estos dos parámetros se detectó en el grupo control, indicando esto un mayor remodelado en aquellos animales que no fueron tratados mediante terapia celular o, dicho de otra manera, un limitado remodelado en los grupos tratados con CMCs, a pesar de no encontrarse diferencias significativas.

La determinación de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) es un fuerte predictor de mortalidad cardiovascular en pacientes con disfunción del VI (Solomon y cols.,

2005). Por este motivo se ha convertido en el criterio de valoración más frecuentemente empleado en los ensayos tanto clínicos como preclínicos de terapia celular post-infarto (Johnston y cols., 2009; Makkar y cols., 2012; Bolli y cols., 2011; Lee y cols., 2011). No obstante, el uso de este parámetro ha sido cuestionado debido a que la FEVI puede mejorar rápidamente durante la primera semana después de un infarto a causa de la resolución del aturdimiento miocárdico y la lesión atribuible al fenómeno de reperfusión (Traverse y cols., 2011), lo que podría confundirse con un efecto beneficioso de las células administradas.

En nuestro caso se observó una recuperación y un incremento progresivo en el valor de la FEVI a lo largo del estudio en los tres grupos. El hecho de que este incremento fuera significativo al final del estudio en los dos grupos tratados mediante CMCs y no significativo en el grupo que recibió la inyección de vehículo de administración, indica un posible efecto positivo derivado de las células, a pesar de que los porcentajes de FE en los grupos 2 y 3 permanecieran por debajo de los observados en el grupo control sano.

Un aspecto a tener en cuenta a la hora de valorar una disminución del porcentaje de infarto es la sobreestimación de su tamaño en las fases tempranas. La presencia de edema, hemorragia e inflamación pueden

incrementar el tamaño del infarto hasta un 25% en las fases agudas (Reimer y Jennings, 1979; Hundley y cols., 2010). Esto podría explicar, al menos en parte, la disminución del porcentaje de infarto que experimentaron los animales pertenecientes a los 3 grupos a lo largo del estudio, incluso en aquellos que no se trataron con CMCs.

La reducción del tamaño del infarto en el grupo control probablemente pudo atribuirse a una mayor expansión del infarto y en definitiva a un mayor remodelado ventricular. Dicha expansión, es decir, el adelgazamiento desproporcionado y la dilatación de la zona infartada, ocurre en la primera fase del remodelado ventricular (primeras 24-72 horas) (Hochman y Choo, 1987; Weisman y cols., 1988; Sutton y cols., 2000; Ertl y Frantz, 2005). A este proceso le sigue, en la fase tardía del remodelado, una dilatación del tejido infartado (Hochman y Choo, 1987; Sutton y cols., 2000), resultando todo ello en la formación de una cicatriz delgada que reemplaza el miocardio viable (Hirsch y cols., 2011; Makkar y cols., 2012). En los grupos tratados mediante terapia celular, en cambio, la reducción del tamaño podría deberse a un proceso regenerativo tal y como indican los restantes parámetros evaluados mediante RM.

A pesar de que los resultados obtenidos parecen indicar que las CMCs ejercen un efecto positivo sobre la funcionalidad cardíaca (recuperación de la FEVI) y el

remodelado ventricular (menor incremento del VSF y el VDF en los grupos tratados), las diferencias entre grupos no fueron significativas. La falta de significación podría deberse al limitado número de animales que se han incluido en el trabajo, componiéndose cada uno de los grupos tan sólo de 7 sujetos. En el caso del grupo 3, el número incluso se redujo a 6, debido a que el sujeto P18 no desarrolló un infarto lo suficientemente grande (<10%) para valorar la eficacia del tratamiento. Otro posible motivo por el cual los resultados no lleguen a alcanzar significación estadística podría ser un tiempo de seguimiento insuficiente. Este argumento, sin embargo, parece poco convincente pues *Bolli y cols.* encontraron una mejora en la función ventricular tan solo un mes tras la administración intracoronaria de CMCs, por lo que el seguimiento de 10 semanas utilizado en este estudio debería ser lo suficientemente largo (Bolli y cols., 2013).

El momento óptimo para la administración celular tras un infarto aún no está esclarecido totalmente. En nuestro caso decidimos administrar las células 7 días tras la inducción del infarto, por tratarse éste de un momento de inyección frecuentemente utilizado en ensayos clínicos de terapia celular, habiéndose demostrando una mayor eficacia en comparación con administraciones en fases mucho más agudas (van der Spoel y cols., 2011; Zhang y cols., 2009). Este hecho posiblemente se deba a la intensa reacción inflamatoria que

tiene lugar inmediatamente tras el suceso isquémico, esperándose una reducción significativa de dicha inflamación una semana más tarde (Ertl y Frantz, 2005; Bonvini y cols., 2005) y disponiéndose de esta forma de un ambiente menos hostil para las células inyectadas (Moelker y cols., 2006).

Cabe esperar que la implantación celular en fases más crónicas sea menos efectiva que en la aguda (Tang y cols., 2010), pues en el infarto antiguo la respuesta inflamatoria se ha resuelto completamente, sustituyéndose el tejido por una cicatriz. En estas condiciones la expresión de citoquinas y moléculas de adhesión es reducida, creándose un ambiente miocárdico muy diferente al de un IAM (Askari y cols., 2003; Yamaguchi y cols., 2003; Abbott y cols., 2004; Zhang y cols., 2007).

La mayoría de estudios con CMCs se han centrado en la búsqueda de mejoras a nivel funcional (Johnston y cols., 2009; Lee y cols., 2011; Bolli y cols., 2006); el papel de dichas células en el contexto de la cicatrización post-infarto, en cambio, ha recibido menor atención.

Antes de poder valorar la eficacia atribuible a un determinado tratamiento como es la terapia celular, es necesario disponer de un conocimiento amplio sobre las consecuencias histopatológicas que provoca un infarto. En este sentido, se observan variaciones en cuanto al color y el aspecto del tejido miocárdico dañado en función del

tiempo transcurrido desde la instauración del infarto. Así, en lesiones de unas 10 semanas de evolución (como es nuestro caso) se espera encontrar una cicatriz firme, blanquecina y generalmente más fina que el miocardio circundante (Pasotti y cols., 2006). A nivel microscópico se establece una cicatriz fibrosa y acelular que se caracteriza por la aparición de depósitos compactos y densos de colágeno. Esporádicamente se visualizan además agregados de miocitos vivos en la zona afectada (Chang y cols., 2012).

En nuestro estudio, el análisis histopatológico mediante las tinciones HE y TCM puso de manifiesto la existencia de lesiones compatibles con infarto en la totalidad de las muestras analizadas. No obstante, las muestras correspondientes a los animales del grupo 1 presentaron las lesiones más severas. En los grupos 2 y 3, en cambio, se detectaron lesiones de menor extensión, con una fibrosis peor organizada y necrosis generalmente menos desarrollada (presencia de edema en lugar de muerte celular), especialmente evidente en el caso de los sujetos que recibieron la dosis de 25×10^6 CMCs. Los hallazgos histológicos indicaron, en ambos grupos tratados, una posible disolución del tejido conjuntivo y el comienzo de una regeneración. A pesar de parecer ésta más importante en el grupo de animales tratados con la dosis inferior, las diferencias entre ambos grupos no fueron significativas, por lo que no pudo establecerse una clara relación dosis efecto.

La tinción con TTC ha sido frecuentemente utilizada para delinear el área de un IM (Holmborn y cols., 1993). Esta tinción permite la cuantificación del tamaño del mismo de forma mucho más temprana que las pruebas histológicas estándar, siendo a su vez igual de sensible y específica (Schaper y cols., 1979). Asimismo, su bajo coste, su alto rendimiento, su fiabilidad y su reproducibilidad han hecho que esta técnica esté ampliamente extendida (Csonka y cols., 2010).

Existe una relación casi idéntica entre el análisis histológico y las imágenes obtenidas mediante RM (Kim y cols., 1999; Rehwald y cols., 2002; Fieno y cols., 2000; Amado y cols., 2004; Wagner y cols., 2006; Kim y cols., 2010). La correlación obtenida entre la extensión de un infarto medido por RM y TTC es estrecha (Buecker y cols., 2005; Ojha y cols., 2008). En nuestro caso las imágenes de RM mostraron una buena correspondencia con las obtenidas tras la tinción con TTC. Así, por ejemplo, ambas técnicas fueron capaces de detectar el pequeño infarto que mostraba el animal P18. No obstante, no siempre es posible conseguir una correlación perfecta entre ambos métodos, pues en ocasiones, los cortes de RM no se corresponden exactamente con las secciones de corazón y el grosor de corte puede variar (Ojha y cols., 2008).

Con respecto a la traslación de los datos obtenidos en modelos animales a la clínica

humana, ya se dispone de datos de los primeros ensayos clínicos en los que se han empleado diferentes subtipos de CMCs autólogas para el tratamiento del IM (Bולי y cols., 2011; Makkar y cols., 2012; Yacoub y Terrovitis, 2013; Chugh y cols., 2012). Los ensayos SCİPIO, CADUCEUS y ALCADIA (AutoLogous human CARDioshere-Derived stem cells to treat Ischemic cArdiomyopathy) (NCT00981006) han mostrado la seguridad y viabilidad de la administración intracoronaria de CMCs en pacientes humanos. A su vez, las células inyectadas parecen tener efectos beneficiosos sobre el corazón infartado.

Debido a las limitaciones asociadas al uso de células autólogas anteriormente expuestas, es poco probable que el trasplante celular mediante CMCs autólogas se convierta en una opción terapéutica ampliamente disponible (Ellison y cols., 2011). Con el creciente interés de las células alogénicas, se ha diseñado otro ensayo clínico denominado ALLSTAR (ALLogeneic heart STem cells to Achieve myocardial Regeneration) (NCT01458405) que se basa en los resultados positivos del ensayo CADUCEUS. En este estudio se pretenden poner de manifiesto la seguridad y la eficacia de la administración intracoronaria de células derivadas de cardiosferas que proceden de donantes a diferencia de los ensayos previamente citados que testaron células obtenidas de los propios pacientes.

El ALLSTAR, sin embargo, al igual que los ensayos SCIPIO, CADUCEUS y ALCADIA, está enfocado al tratamiento de fases tardías del infarto, careciéndose a día de hoy de un ensayo clínico basado en el uso de CMCs para el abordaje del IAM.

Indudablemente el desarrollo de un ensayo clínico que tenga como objetivo la terapia del infarto mediante la administración de CMCs alogénicas en su fase aguda o subaguda sería de gran interés, por cumplir esta forma terapéutica con los criterios de coste, viabilidad y disponibilidad.

Antes de pasar a un ensayo con pacientes humanos, no obstante, es imprescindible acumular la suficiente cantidad de datos preclínicos a lo que se pretende contribuir con el presente trabajo. Solo de esta manera se podrán evitar los problemas surgidos con anterioridad por trasladar resultados a la clínica sin un conocimiento pleno de los procesos biológicos implicados en la regeneración miocárdica (Nadal-Ginard y cols., 2006; Nadal-Ginard y Fuster, 2007).

5.1. Limitaciones del estudio

A pesar de que para el desarrollo del presente estudio se haya elegido la especie animal que más se parece anatómica y funcionalmente al humano (Ellison y cols., 2011; Oliveira y Angeli, 2006; Teramoto y cols., 2011; Ytrehus, 2000; Patten y Hall-Porter, 2009; Pérez del Prado y cols., 2009;

Verdouw y cols., 1998) y se haya optado por el modelo de infarto lo más parecido posible a la situación clínica, no carece de ciertas limitaciones.

En primer lugar, hemos partido de animales sanos cuya circulación coronaria no estaba comprometida previamente por afecciones tales como la aterosclerosis, ni existieron otros factores de riesgo cardiovascular (Heusch y cols., 2012). En segundo lugar, en el modelo animal seleccionado, el inicio y el final del periodo de oclusión estuvieron claramente definidos. Esta situación es completamente diferente en el paciente humano, en el que una oclusión coronaria completa frecuentemente está precedida por variaciones cíclicas en el flujo sanguíneo asociadas a la presencia de microembolizaciones coronarias repetidas (Skyschally y cols., 2006).

Por otro lado, el hecho de tratarse de animales jóvenes implica que los mismos así como sus corazones, experimenten un incremento de tamaño y peso a lo largo del estudio. Los corazones en crecimiento no reflejan con exactitud el remodelado que se produce en pacientes adultos después de un infarto, lo que puede crear confusión a la hora de valorar la eficacia de un determinado tratamiento como puede ser la infusión de células madre. Asimismo, el rápido crecimiento de los sujetos complica su seguimiento a largo plazo, por lo que en los últimos años se ha fomentado el uso de

cerdos de razas miniatura (Schuleri y cols., 2008).

Otra limitación del presente estudio es la imposibilidad para determinar el valor exacto de Tpn I tras la inducción del modelo, debido a que la totalidad de los animales manifestaron valores superiores al nivel de detección de nuestro analizador ($>25\mu\text{g/L}$). Esta limitación nos impidió comprobar la correlación existente entre el valor del biomarcador evaluado y el tamaño del infarto (Zacharowski y cols., 1999; Friedrich, 2008).

Asimismo, este trabajo no permitió tomar muestras de tejido a diferentes tiempos del estudio, por lo que no se pudo determinar el tiempo exacto en el que se inició el posible proceso regenerativo.

Por último, el reducido número de animales que se ha empleado podría ser responsable

de la falta de resultados estadísticamente significativos entre los 3 grupos del estudio, a pesar de haberse encontrado una tendencia hacia una mejor funcionalidad cardiaca unida a un menor grado de remodelado ventricular en los grupos tratados mediante CMCs.

Las limitaciones respecto al empleo de sujetos en crecimiento, un número de animales reducido y un tiempo de seguimiento no muy extenso deben ser subsanadas en futuros trabajos.

Con este fin nos hemos propuesto la utilización de cerdos miniatura en edad adulta, lo que permitiría resolver las limitaciones derivadas del incremento de peso y tamaño de los animales (y sus corazones) empleados en la presente investigación, facilitándose así un seguimiento a más largo plazo.

VI. CONCLUSIONES

1. La administración intracoronaria de una dosis de 25×10^6 de CMCs es segura en un modelo porcino de IAM de 7 días de evolución. La infusión de 50×10^6 de CMCs puede inducir cambios electrocardiográficos y un empeoramiento pasajero del flujo coronario, si bien estos eventos no dan lugar a complicaciones permanentes.
2. Los grupos tratados con CMCs manifiestan una tendencia a la mejora de la funcionalidad cardíaca (recuperación de la FEVI) y un remodelado ventricular más limitado (menor incremento de VSF y VDF). Asimismo, las lesiones histológicas son menos severas en dichos grupos, en comparación con el grupo control, lo que sugiere la posible presencia de un proceso regenerativo.
3. Los resultados obtenidos mediante RM parecen indicar un mayor beneficio tras la inyección de la dosis celular superior. El análisis histopatológico, en cambio, muestra lesiones menos importantes en el grupo de animales tratados con la dosis inferior. Las reducidas diferencias entre ambos grupos, sin embargo, no permiten establecer una relación dosis efecto.
4. El conjunto de resultados derivados de este trabajo, en particular los referidos a la seguridad del producto celular, defenderían abiertamente el comienzo de los ensayos clínicos centrados en el tratamiento del IM en su fase aguda o subaguda mediante la infusión intracoronaria de CMCs, pudiendo servir de modelo para el diseño de los mismos.

VII. Resumen

Objetivo: El objetivo principal del presente estudio fue valorar la seguridad y eficacia de la administración intracoronaria de dos dosis diferentes de CMCs alogénicas de origen porcino en un modelo animal de IAM. Asimismo se pretendió establecer una relación dosis-efecto.

Material y Métodos: Se sometieron un total de 23 cerdas de raza Large White a la creación de un infarto, ocluyéndose mediante un balón de angioplastia la arteria interventricular paraconal por debajo de la primera rama diagonal durante 90 minutos. Siete animales adicionales sirvieron como controles sanos. A día 7 del IAM se llevó a cabo la administración intracoronaria de vehículo (n=7), 25×10^6 (n=7) o 50×10^6 de CMCs (n=7) en los animales supervivientes. La seguridad se valoró mediante la determinación de las enzimas cardíacas Tpn I y CK-MB (basal, 2 horas post-reperusión, 24 horas post- IAM, pre y post-inyección), a través de la calidad angiográfica del flujo coronario (pre y post-IAM, pre y post-inyección y al final del estudio) y mediante el registro de cambios electrocardiográficos durante la administración intracoronaria. La eficacia se evaluó por RM determinándose los parámetros de FE, porcentaje de infarto, VSF y VDF (basal, 1 semana post-IAM, 1 semana post inyección, 5 semanas post-IAM, 10 semanas post-inyección). Tras la eutanasia se realizó la tinción con TTC y un análisis histopatológico.

Resultados: Dos animales murieron durante la inducción del modelo. La creación del IAM causó un incremento significativo de las enzimas cardíacas en todos los animales. En cuanto a la seguridad, no se observaron diferencias significativas entre los valores de Tpn I de los 3 grupos tras la inyección de células/vehículo. Uno de los animales del grupo de 50×10^6 de CMCs mostró un empeoramiento del flujo coronario tras la inyección celular. Cuatro sujetos del mismo grupo manifestaron cambios en el ECG durante la infusión de CMCs. Con respecto a la eficacia, se observaron una tendencia a la recuperación de la FE, un menor incremento del VDF y del VSF y lesiones histológicas menos severas en los grupos tratados mediante terapia celular.

Conclusiones: La administración intracoronaria de 25×10^6 de CMCs se puede llevar a cabo de forma segura. La inyección de 50×10^6 de CMCs, por lo contrario, puede provocar cambios en el ECG y un empeoramiento temporal del flujo coronario. A pesar de carecer de significación estadística, el tratamiento con CMCs parece limitar el remodelado ventricular y mejorar la funcionalidad cardíaca. Las diferencias entre los dos grupos tratados son pequeñas, de modo que no se pudo establecer una relación dosis efecto.

VII. Summary

Purpose: The main objective of the present study was to evaluate in an animal model of acute myocardial infarction (AMI) the safety and efficacy of an intracoronary administration of two different allogeneic porcine cardiac stem cell (CSCs) doses. Additionally we tried to establish a dose-response relationship.

Material and Methods: An AMI was induced in 23 female Large White pigs by a 90 minutes balloon occlusion of the paraconal interventricular artery immediately distal to the origin of the first diagonal branch. Seven additional pigs served as healthy controls. At day 7 after AMI intracoronary administration of either vehicle (n=7), 25×10^6 (n=7) or 50×10^6 of CSCs (n=7) was carried out in all surviving animals. Safety was assessed by evaluating Troponin I and CK-MB (baseline, 2 hours post-reperfusion, 24 hours post-AMI, pre and post-injection), the angiographic quality of the coronary flow (pre and post-AMI, pre and post-injection, at the end of the study) and the presence of electrocardiographic (ECG) changes during intracoronary injection. Efficacy was assessed by magnetic resonance measuring ejection fraction (EF), infarct percentage, end diastolic (EDV) and systolic volumes (ESV) (baseline, 1 week post-AMI, 1 week post-injection, 5 weeks post-AMI, 10 weeks post-injection). After euthanasia TTC staining and histological examination was performed.

Results: Two animals died during model creation. AMI induction caused an increase in cardiac enzymes in all animals. Regarding safety, no significant differences between the Troponin I values of the 3 study groups were seen after intracoronary cell/vehicle injection. One of the animals belonging to the 50×10^6 cell group showed a reduction in coronary flow after cell delivery. Four subjects from the same group showed ECG changes during CSC administration. Regarding efficacy, a tendency towards recovered EF and a lower increase in EDV and ESV, as well as less severe histological lesions were observed in the groups treated with CSCs.

Conclusions: Administration of 25×10^6 of CSCs appears to be safe. The injection of 50×10^6 of CSCs, however, can cause ECG changes and a temporary reduction in coronary flow. Despite the lack of statistical significance, the treatment with CSCs seems to limit ventricular remodeling and to improve cardiac function. Differences between both cell administration groups were small, whereas we could not establish a dose-effect relationship.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott JD, Huang Y, Liu D, Hickey R, Krause DS, Giordano FJ. Stromal cell-derived factor-1alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. *Circulation* 2004;110:3300-3305
- Alonso-Gómez AM, Belló MC, Fernández MA, Torres A, Alfageme M, Aizpuru F, Martínez-Ferrer J, Díaz A, Arós F. Ecocardiografía de estrés en la detección de enfermedad de la arteria descendente anterior en pacientes con infarto de miocardio inferior y test de esfuerzo positivo. *Rev Esp Cardiol* 2006;59(6):545-52
- Amado LC, Gerber BL, Gupta SN, Rettmann DW, Szarf G, Schock R, Nasir K, Kraitchman DL, Lima JA. Accurate and objective infarct sizing by contrast-enhanced magnetic resonance imaging in a canine myocardial infarction model. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:2383-9
- Angeli FS, Shapiro M, Amabile N, Orcino G, Smith CS, Tacy T, Boyle AJ, Chatterjee K, Glantz SA, Grossman W, Yeghiazarians Y. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: characterization of a swine model on beta-blocker therapy. *Comp Med* 2009;59(3):272-9
- Anversa P y Kajstura J. Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart. *Circ Res* 1998;83:1-14
- Apple FS, Jesse RL, Newby LK, Wu AHB, Christenson RH. National Academy of Clinical Biochemistry and IFCC Committee for Standardization of Markers Cardiac Damage Laboratory Medicine Practice Guidelines: Analytical issues for biochemical markers of acute coronary syndromes. *Circulation* 2007;115:e352–e355
- Apple FS, Quist HE, Doyle PJ, Otto AP, Murakami MM. Plasma 99th percentile reference limits for cardiac troponin and creatine kinase MB mass for use with European Society of Cardiology/American College of Cardiology consensus recommendations. *Clin Chem* 2003;49:1331–1336

- Arsalan M, Woitek F, Adams V, Linke A, Barten MJ, Dhein S, Walther T, Mohr FW, Garbade J. Distribution of cardiac stem cells in the human heart. *ISRN Cardiol* 2012;2012:483407
- Askari AT, Unzek S, Popovic ZB, Goldman CK, Forudi F, Kiedrowski M, Rovner A, Ellis SG, Thomas JD, DiCorleto PE, Topol EJ, Penn MS. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet* 2003;362:697-703
- Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, Grunwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S, Zeiher AM. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002;106:3009-17
- Balian V, Galli M, Marcassa C, Cecchin G, Child M, Barlocco F, Petrucci E, Filippini G, Michi R, Onofri M. Intracoronary ST-segment shift soon after elective percutaneous coronary intervention accurately predicts periprocedural injury. *Circulation* 2006;114:1944-54
- Banegas JR, Villar F, Gracias A, Rodríguez-Artalejo F. Epidemiología de las enfermedades cardiovasculares en España. *Rev Esp Cardiol Supl* 2006;6:3G-12G
- Baptista J, Umans VA, di Mario C, Escaned J, de Feyter P, Serruys PW. Mechanisms of luminal enlargement and quantification of vessel wall trauma following balloon coronary angioplasty and directional atherectomy. *Eur Heart J* 1995;16:1603-12
- Barba Evia JR. Cardiomioplastia: El papel de las células madre en la regeneración miocárdica. *Rev Mex Patol Clin* 2009;56(1):50-65
- Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, Feinberg MS, Etzion S y cols. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation* 2003;108:863-868
- Bardají A. El papel de las troponinas en el diagnóstico y el pronóstico de los síndromes coronarios agudos. *Rev Esp Cardiol Supl* 2005;5:19C-25C

- Bartunek J, Dimmeler S, Drexler H, Fernández-Avilés F, Galinanes M, Janssens S, Martin J, Mathur A, Menasche P, Priori S, Strauer B, Tendera M, Wijns W, Zeiher A; Task force of the European Society of Cardiology. The consensus of the task force of the European Society of Cardiology concerning the clinical investigation of the use of autologous adult stem cells for repair of the heart. *Eur Heart J* 2006;27(11):1338-40
- 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* 2007;104(35):14068-73
- Bel A, Messas E, Agbulut O, Richard P, Samuel JL, Bruneval P, Hagege AA, Menasché P. Transplantation of autologous fresh bone marrow into infarcted myocardium: a word of caution. *Circulation* 2003;108 Suppl 1:II247-52
- Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003;114(6):763-76
- Berg R y Mewes J. Sex differences in the structure of the normal porcine myocardial wall. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 1994;107:325-327
- Blatt A, Cotter G, Leitman M, Krakover R, Kaluski E, Milo-Cotter O, Resnick IB, Samuel S, Gozal D, Vered Z, Slavin S, Shapira MY. Intracoronary administration of autologous bone marrow mononuclear cells after induction of short ischemia is safe and may improve hibernation and ischemia in patients with ischemic cardiomyopathy. *Am Heart J* 2005;150(5):986
- Bolli R, Chugh AR, D'Amario D, Loughran JH, Stoddard MF, Ikram S, Beache GM, Wagner SG, Leri A, Hosoda T, Sanada F, Elmore JB, Goichberg P, Cappetta D, Solankhi NK, Fahsah I, Rokosh DG, Slaughter MS, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet* 2011;378(9806):1847-57

- Bolli R, Jneid H, Tang XL, Dawn B, Rimoldi O, Mosna F, Loredi M, Gatti A, Kajstura J, Leri A, Bearzi C, Abdel-Latif A, Anversa P. Intracoronary Administration of Cardiac Stem Cells Improves Cardiac Function in Pigs with Old Infarction. *Circulation* 2006;114:II_239
- Bolli R, Tang XL, Sanganalmath SK, Rimoldi O, Mosna F, Abdel-Latif A, Jneid H, Rota M, Leri A, Kajstura J. Intracoronary delivery of autologous cardiac stem cells improves cardiac function in a porcine model of chronic ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 2013;128(2):122-31
- Bonvini RF, Hendiri T y Camenzind E. Inflammatory response post-myocardial infarction and reperfusion: a new therapeutic target? *Eur Heart J Suppl* 2005;7(suppl I):I27-I36
- Buecker A, Katoh M, Krombach GA, Spuentrup E, Bruners P, Günther RW, Niendorf T, Mahnken AH. A feasibility study of contrast enhancement of acute myocardial infarction in multislice computed tomography: comparison with magnetic resonance imaging and gross morphology in pigs. *Invest Radiol* 2005;40(11):700-4
- Chamuleau SA, Vrijnsen KR, Rokosh DG, Tang XL, Piek JJ, Bolli R. Cell therapy for ischaemic heart disease: focus on the role of resident cardiac stem cells. *Neth Heart J* 2009;17(5):199-207
- Chang J, Nair V, Luk A, Butany J. Pathology of myocardial infarction. *Diagnostic Histopathology* 2012;19:1
- Cheitlin MD, Armstrong WF, Aurigemma GP, Beller GA, Bierman FZ, Davis JL, Douglas PS, Faxon DP, Gillam LD, Kimball TR, Kussmaul WG, Pearlman AS, Philbrick JT, Rakowski H, Thys DM, Antman EM, Smith SC Jr, Alpert JS, Gregoratos G, Anderson JL, Hiratzka LF, Hunt SA, Fuster V, Jacobs AK, Gibbons RJ, Russell RO; American College of Cardiology; American Heart Association; American Society of Echocardiography. ACC/AHA/ASE 2003 guideline update for the clinical application of echocardiography: summary article: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (ACC/AHA/ASE Committee to Update the 1997 Guidelines for the Clinical Application of Echocardiography). *Circulation* 2003;108(9):1146-62

- Chen BP, White CM, Fan C, Kluger J, Chow MS. The effect of amiodarone on the ventricular fibrillation threshold. *Pharmacotherapy* 1999;19(7):832-7
- Cheng K, Malliaras K, Smith RR, Blusztajn A, De Robertis M, Sun B, Marbán L, Czer L, Trento A, Marbán E. Human Cardiosphere-Derived Cells From Advanced Heart Failure Patients Exhibit Augmented Functional Potency in a Mouse Model of Myocardial Infarction. *Circulation* 2011;124:A17146
- Cheng Y, Sherman W, Yi G, Conditt G, Sheehy A, Martens T y cols. Real time 3D echo guided intramyocardial delivery of mesenchymal precursor cells in a chronic myocardial infarct ovine model using a novel catheter. *J Am Coll Cardiol* 2009;53(10 Suppl A):A41
- Chin BB, Nakamoto Y, Bulte JW, Pittenger MF, Wahl R, Kraitchman DL. ¹¹¹In oxine labelled mesenchymal stem cell SPECT after intravenous administration in myocardial infarction. *Nucl Med Commun* 2003;24:1149-54
- Chorro FJ, Such-Belenguer L y López-Merino V. Modelos animales de enfermedad cardiovascular. *Rev Esp Cardiol* 2009;62(1):69-84
- Chugh AR, Beache GM, Loughran JH, Mewton N, Elmore JB, Kajstura J, Pappas P, Tautoles A, Stoddard MF, Lima JA, Slaughter MS, Anversa P, Bolli R. Administration of cardiac stem cells in patients with ischemic cardiomyopathy: the SCIPIO trial: surgical aspects and interim analysis of myocardial function and viability by magnetic resonance. *Circulation* 2012;126(11 Suppl 1):S54-64
- Crick SJ, Shephard MN, Ho SY, Gebstein L, Anderson RH. Anatomy of the pig heart: comparisons with normal human cardiac structure. *J Anat* 1998;193(Pt 1):105–119
- Crisóstomo V, Báez C, Maestre J, García Casado J, Rosado R, Sánchez B, Abad JL, Sánchez-Margallo FM. Safety of allogeneic pCSCs intracoronary delivery: a pathological and MR study assessment in the porcine model. Póster. XXIst European Society of Gene & Cell Therapy Congress. Madrid 25-28 October, 2013 (b)
- Crisóstomo V, Maestre J, Maynar M, Sun F, Báez-Díaz C, Usón J, Sánchez Margallo FM. Development of a closed chest model of chronic myocardial infarction in swine: Magnetic Resonance Imaging and pathological evaluation. *ISRN Cardiol*. In press (a).

- Csonka C, Kupai K, Kocsis GF, Novák G, Fekete V, Bencsik P, Csont T, Ferdinandy P. Measurement of myocardial infarct size in preclinical studies. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2010;61(2):163-170
- Cury RC, Shash K, Nagurney JT, Rosito G, Shapiro MD, Nomura CH, Abbara S, Bamberg F, Ferencik M, Schmidt EJ, Brown DF, Hoffmann U, Brady TJ. Cardiac magnetic resonance with T2-weighted imaging improves detection of patients with acute coronary syndrome in the emergency department. *Circulation* 2008;118(8):837-44
- Dawn B, Stein AB, Urbanek K, Rota M, Whang B, Rastaldo R, Torella D, Tang XL, Rezazadeh A, Kajstura J, Leri A, Hunt G, Varma J, Prabhu SD, Anversa P, Bolli R. Cardiac stem cells delivered intravascularly traverse the vessel barrier, regenerate infarcted myocardium, and improve cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(10):3766-71
- de Lemos JA, Drazner MH, Omland T, Ayers CR, Khera A, Rohatgi A, Hashim I, Berry JD, Das SR, Morrow DA, McGuire DK. Association of troponin T detected with a highly sensitive assay and cardiac structure and mortality risk in the general population. *JAMA* 2010;304:2503–2512
- Dib N, Khawaja H, Varner S, McCarthy M, Campbell A. Cell Therapy for Cardiovascular Disease: A Comparison of Methods of Delivery. *J Cardiovasc Transl Res* 2011; 4(2):177-181
- Dib N, Menasche P, Bartunek J, Zeiher AM, Terzic A y cols. Recommendations for successful training on methods of delivery of biologics for cardiac regeneration: a report of the International Society for Cardiovascular Translational Research. *JACC Cardiovasc Interv* 2010;3:265-275
- Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJV, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008. *Eur Heart J* 2008;29:2388-442
- Diederichsen AC, Møller JE, Thayssen P, Videbaek L, Saekmose SG, Barington T, Kassem M. Changes in left ventricular filling patterns after repeated injection of autologous bone marrow cells in heart failure patients. *Scand Cardiovasc J.* 2010;44(3):139-45

- Diercks DB, Kirk JD, Lindsell CJ, Pollack CV Jr, Hoekstra JW, Gibler WB, Hollander JE. Door-to-ECG time in patients with chest pain presenting to the ED. *Am J Emerg Med* 2006;24(1):1-7
- Dimmeler S, Zeiher AM y Schneider MD. Unchain my heart: the scientific foundations for cardiac repair. *J Clin Invest* 2005;115:572-83
- Dixon JA y Spinale FG. Large animal models of heart failure: a critical link in the translation of basic science to clinical practice. *Circ Heart Fail* 2009;2(3):262-71
- Douglas WR. Of pigs and men and research: a review of applications and analogies of the pig, *Sus scrofa*, in human medical research. *Space Life Sci* 1972; 3:226-234
- Doyle B, Kemp BJ, Chareonthaitawee P, Reed C, Schmeckpeper J, Sorajja P, Russell S, Araoz P, Riederer SJ, Caplice NM. Dynamic tracking during intracoronary injection of 18F-FDG-labeled progenitor cell therapy for acute myocardial infarction. *J Nucl Med* 2007;48(10):1708-14
- Dubois C, Liu X, Claus P, Marsboom G, Pokreisz P, Vandewijngaert S, Dépelteau H, Streb W, Chaothawee L, Maes F, Gheysens O, Debyser Z, Gillijns H, Pellens M, Vandendriessche T, Chuah M, Collen D, Verbeken E, Belmans A, Van de Werf F, Bogaert J, Janssens S. Differential effects of progenitor cell populations on left ventricular remodeling and myocardial neovascularization after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2010;55(20):2232-43
- Eldar M, Fitzpatrick AP, Ohad D, Smith MF, Hsu S, Whayne JG, Vered Z, Rotstein Z, Kordis T, Swanson DK, Chin M, Scheinman MM, Lesh MD, Greenspon AJ. Percutaneous multielectrode endocardial mapping during ventricular tachycardia in the swine model. *Circulation* 1996;94(5):1125-30
- Ellison GM, Torella D, Karakikes I, Purushothaman S, Curcio A, Gasparri C, Indolfi C, Cable NT, Goldspink DF, Nadal-Ginard B. Acute beta-adrenergic overload produces myocyte damage through calcium leakage from the ryanodine receptor 2 but spares cardiac stem cells. *J Biol Chem* 2007;282:11397-409 (a)
- Ellison GM, Torella D, Dellegrottaglie S, Perez-Martinez C, Perez de Prado A, Vicinanza C y cols. Endogenous Cardiac Stem Cell Activation by Insulin-Like Growth

- Factor-1/Hepatocyte Growth Factor Intracoronary Injection Fosters Survival and Regeneration of the Infarcted Pig Heart. *Am Coll Cardiol* 2011;58(9):977-986
- Ellison GM, Torella D, Karakikes I, Nadal-Ginard B. Myocyte death and renewal: modern concepts of cardiac cellular homeostasis. *Nat Clin Pract Cardiovascular Med* 2007;4:S52-9 (b)
 - Ertl G y Frantz S. Healing after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2005;66:22-32
 - Escobedo-Uribe CD, Monsiváis-Urenda AE, López-Quijano JM, Carrillo-Calvillo J, Leiva-Ponsc JL y Peña-Duque MA. La terapia celular en la cardiopatía isquémica. *Arch Cardiol Mex* 2012;82(3):218-229
 - European Cardiovascular Disease Statistics 2012. Disponible en: <http://www.escardio.org/about/what/advocacy/EuroHeart/Pages/2012CVDstatistics.asp>.
 - Ferdinandy P, Schulz R y Baxter GF. Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. *Pharmacol Rev* 2007;59:418–458
 - Férrez Santander SM, Márquez MF, Peña Duque MA, Ocaranza Sánchez R, de la Peña Almaguer E, Lidt GE. Daño moicárdico por reperusión. *Rev Esp Cardiol* 2004; 57(Supl 1):9-21
 - Fieno DS, Kim RJ, Chen EL, Lomasney JW, Klocke FJ, Judd RM. Contrast-enhanced magnetic resonance imaging of myocardium at risk: distinction between reversible and irreversible injury throughout infarct healing. *J Am Coll Cardiol* 2000;36(6):1985-91
 - Fischer-Rasokat U, Assmus B, Seeger FH, Honold J, Leistner D, Fichtlscherer S, Schächinger V, Tonn T, Martin H, Dimmeler S, Zeiher AM. A pilot trial to assess potential effects of selective intracoronary bone marrow-derived progenitor cell infusion in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy: final 1-year results of the transplantation of progenitor cells and functional regeneration enhancement pilot trial in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. *Circ Heart Fail* 2009;2(5):417-23

- Fishbein MC, Meerbaum S, Rit J, Lando U, Kanmatsuse K, Mercier JC, Corday E, Ganz W. Early phase acute myocardial infarct size quantification: validation of the triphenyl tetrazolium chloride tissue enzyme staining technique. *Am Heart J* 1981;101(5):593-600
- Freyman T, Polin G, Osman H, Crary J, Lu M, Cheng L, Palasis M, Wilensky RL. A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction. *Eur Heart J* 2006;27:1114–1122
- Friedrich, MG. Tissue characterization of acute myocardial infarction and by cardiac magnetic resonance. *J Am Coll Cardiol Cardiovasc Imaging* 2008;1:652–662
- Fuchs JR, Nasser BA, Vacanti JP y Fauza DO. Postnatal myocardial augmentation with skeletal myoblast-based fetal tissue engineering. *Surgery* 2006;140(1):100-7
- Fuster V, Sanz J, Viles-Gonzalez JF y Rajagopalan S. The utility of magnetic resonance imaging in cardiac tissue regeneration trials. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006;3 Suppl 1:S2-7
- Gao LR, Wang ZG, Zhu ZM, Fei YX, He S, Tian HT, Zhang NK, Chen Y, Xu HT, Yang Y. Effect of intracoronary transplantation of autologous bone marrow-derived mononuclear cells on outcomes of patients with refractory chronic heart failure secondary to ischemic cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 2006;98(5):597-602
- Garcia-Dorado D, Théroux P, Elizaga J, Galiñanes M, Solares J, Riesgo M, Gomez MJ, Garcia-Dorado A, Fernandez Aviles F. Myocardial reperfusion in the pig heart model: infarct size and duration of coronary occlusion. *Cardiovasc Res* 1987;21(7):537-44
- Geng YJ. “The Basics of Embryonic Stem Cells in Comparison to Adult Stem Cells” en Perin EC, Silva GV, Willerson JT (eds.) *An Essential Guide to Cardiac Cell Therapy*. Informa Healthcare, Oxon, cap. 2, pp.13-21
- Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, Bravata DM, Dai S, Ford ES, Fox CS, Franco S, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA, Howard VJ, Huffman MD, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Magid D, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, McGuire DK, Mohler ER, Moy CS, Mussolino ME, Nichol G, Paynter NP, Schreiner PJ, Sorlie PD, Stein J,

- Turan TN, Virani SS, Wong ND, Woo D, Turner MB; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2013;127(1):e6-e245
- Grines CL, Browne KF, Marco J, Rothbaum D, Stone GW, O'Keefe J y cols. A comparison of immediate angioplasty with thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. *N Eng J Med* 1993;328:673-9
 - Gyöngyösi M, Hemetsberger R, Wolbank S, Pichler V, Kaun C, Posa A, Petrasi Z, Petnehazy Ö, Hofer-Warbinek R, de Martin R, Gruber F, Benedek I, Benedek T, Kovacs I, Benedek I Jr, Plass CA, Charwat S, Maurer G. Delayed recovery of myocardial blood flow after intracoronary stem cell administration. *Stem Cell Rev* 2011;7(3):616-23
 - Gyöngyösi M, Lang I, Dettke M, Beran G, Graf S, Sochor H y cols. Comparison of early and late combined cardiac application of bone marrow mononuclear stem cells after myocardial infarction: final results from the MYSTAR prospective randomized study. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2009;6:70-81
 - Hackett D, McKenna W, Davies G y Maseri A. Reperfusion arrhythmias are rare during acute myocardial infarction and thrombolysis in man. *Int J Cardiol* 1990;29:205-13
 - Halkos ME, Kerendi F, Corvera JS, Wang NP, Kin H, Payne CS, Sun HY, Guyton RA, Vinten-Johansen J, Zhao ZQ. Myocardial protection with postconditioning is not enhanced by ischemic preconditioning. *Ann Thorac Surg* 2004;78(3):961-9
 - Hamm CW, Bassand JP, Agewall S, Bax J, Boersma E, Bueno H, et al. Guía de práctica clínica de la ESC para el manejo del síndrome coronario agudo en pacientes sin elevación persistente del segmento ST. *Rev Esp Cardiol* 2012;65(2):173e1-173e55
 - Hamm CW, Bassand JP, Agewall S, Bax J, Boerma E, Bueno H, Caso P, Dudek D, Gielen S, Huber K, Ohman M, Petrie MC, Sonntag F, Uva MS, Storey RF, Wijns W, Zahger D. ESC Committee for the Practice Guidelines. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute coronary syndromes

- (ASC) in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2011;32(23):2999-3054
- Harris SA y Rojas AG. The initiation of ventricular fibrillation due to coronary occlusion. *Exp Med Surg* 1943;1:105
 - Hashemi SM, Ghods S, Kolodgie FD, Parcham-Azad K, Keane M, Hamamdžić D, Young R, Rippey MK, Virmani R, Litt H, Wilensky RL. A placebo controlled, dose-ranging, safety study of allogenic mesenchymal stem cells injected by endomyocardial delivery after an acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2008;29(2):251-9
 - Hearse DJ y Sutherland FJ. Experimental models for the study of cardiovascular function and disease. *Pharmacol Res* 2000;41(6):597-603
 - Heldman AW y Hare JM. Cell Therapy for Myocardial Infarction: Special Delivery. *J Mol Cell Cardiol* 2008;44(3):473-47
 - Heusch G, Kleinbongard P, Skyschally A, Levkau B, Schulz R, Erbel R. The coronary circulation in cardioprotection: more than just one confounder. *Cardiovasc Res* 2012;94(2):237-45
 - Hirsch A, Nijveldt R, van der Vleuten PA, et al, and the HEBE Investigators. Intracoronary infusion of mononuclear cells from bone marrow or peripheral blood compared with standard therapy in patients after acute myocardial infarction treated by primary percutaneous coronary intervention: results of the randomized controlled HEBE trial. *Eur Heart J* 2011;32:1736-47
 - Hirsch A, Nijveldt R, Vleuten PA, Tio RA, Giessen WJ, Marques KMJ, Doevendans PA, Waltenberger J, Berg JM, Aengevaeren WRM, Biemond BJ, Tijssen JG, Rossum AC, Piek JJ, Zijlstra F. Intracoronary infusion of autologous mononuclear bone marrow cells in patients with acute myocardial infarction treated with primary PCI: pilot study of the multicenter HEBE trial. *Catheter Cardiovasc Interv* 2008;71:273-281
 - Hristov M y Weber C. The therapeutic potential of progenitor cells in ischemic heart disease: Past present and future. *Basic Res Cardiol* 2005;100:1-7

- Hochman JS y Choo H. Limitation of myocardial infarct expansion by reperfusion independent of myocardial salvage. *Circulation* 1987;75(1):299-306
- Hofmann M, Wollert KC, Meyer GP, Menke A, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Knapp WH, Drexler H. Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium. *Circulation* 2005;111(17):2198-202
- Holmbom B, Näslund U, Eriksson A, Virtanen I, Thornell LE. Comparison of triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining versus detection of fibronectin in experimental myocardial infarction. *Histochemistry* 1993;99(4):265-75
- Holmvang L, Jurlander B, Rasmussen C, Thiis JJ, Grande P, Clemmensen P. Use of biochemical markers of infarction for diagnosing perioperative myocardial infarction and early graft occlusion after coronary artery bypass surgery. *Chest* 2002;121:103-111
- Hosoda T. C-kit-positive cardiac stem cells and myocardial regeneration. *Am J Cardiovasc Dis* 2012;2(1):58-67
- Huang SY, Lin JH, Lin EC, Yang PC y Tsou HL. Effects of birth season, breed, sex and sire family on cardiac morphology determined in pigs by use of echocardiography. *Computer in Medicine* 2001;51:545-549
- Huang Z, Ge J, Sun A, Wang Y, Zhang S, Cui J, Zhang S, Qian J, Zou Y. Ligating LAD with Its Whole Length Rather than Diagonal Branches as Coordinates Is More Advisable in Establishing stable Myocardial Infarction in Model of Swine. *Exp Anim* 2010;59(4):431-439
- Hughes GC, Post MJ, Simons M y Annex BH. Translational Physiology: Porcine models of human coronary artery disease: implications for preclinical trials of therapeutic angiogenesis. *J Appl Physiol* 2003;94(5):1689-1701
- Hughes HC. Swine in cardiovascular research. *Laboratory Animal Science* 1986;36:348-350
- Hundley WG, Bluemke DA, Finn JP, Flamm SD, Fogel MA, Friedrich MG, Ho VB, Jerosch-Herold M, Kramer CM, Manning WJ, Patel M, Pohost GM, Stillman AE, White RD, Woodard PK. ACCF/ACR/AHA/NASCI/SCMR 2010 Expert Consensus

- Document on Cardiovascular Magnetic Resonance A Report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents. JACC 2010; 55(23):2614-62
- Hunold P, Schlosser T, Vogt FM, Eggebrecht H, Schmermund A, Bruder O, Schüler WO, Barkhausen J. Myocardial late enhancement in contrast-enhanced cardiac MRI: distinction between infarction scar and non-infarction-related disease. Am J Roentgenol 2005;184(5):1420-6
 - Ibrahim T, Bülow HP, Hackl T, Hörnke M, Nekolla SG, Breuer M, Schömig A, Schwaiger M. Diagnostic value of contrast-enhanced magnetic resonance imaging and single-photon emission computed tomography for detection of myocardial necrosis early after acute myocardial infarction. J Am Coll Cardiol 2007;49(2):208-16
 - Informe Sociedad Española de Cardiología (SEC), 2009. Disponible en: <http://www.secardiologia.es/libros-multimedia/biblioteca-virtual/187-informe-de-la-enfermedades-cardiovascular-en-espana-2009#>
 - Iwasaki H, Kawamoto A, Ishikawa M, Oyamada A, Nakamori S, Nishimura H, Sadamoto K, Horii M, Matsumoto T, Murasawa S, Shibata T, Suehiro S, Asahara T. Dose-dependent contribution of CD34-positive cell transplantation to concurrent vasculogenesis and cardiomyogenesis for functional regenerative recovery after myocardial infarction. Circulation 2006;113(10):1311-25
 - Jaffe AS, Babuin L y Apple FS. Biomarkers in acute cardiac disease: the present and the future. J Am Coll Cardiol 2006;48:1-11 (a)
 - Jaffe AS y Ordonez-Llanos J. Troponina cardiaca ultrasensible: de la teoría a la práctica clínica. Rev Esp Cardiol. 2013;66(9):687-91
 - Jaffe AS y Ordonez-Llanos J. Troponinas ultrasensibles en el dolor torácico y los síndromes coronarios agudos. ¿Un paso hacia delante? Rev Esp Cardiol. 2010;63(7):763-9
 - Jaffe AS. Chasing troponin: how low can you go if you can see the rise? J Am Coll Cardiol 2006;48:1763-1764 (b)

- Jaffe AS. The clinical impact of the universal diagnosis of myocardial infarction. *Clinical Chemistry and Laboratory and Laboratory Medicine* 2008;46:1485-1488
- Janssens S. Advances in Clinical Trial Development for myocardial regeneration. Third Annual CARE-MI Consortium and Scientific Progress Meeting, Carcavelos, Lisboa (Portugal). 20-21 Junio 2013.
- Janssens S, Dubois C, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W, Kalantzi M, Herbots L, Sinnaeve P, Dens J, Maertens J, Rademakers F, Dymarkowski S, Gheysens O, Van Cleemput J, Bormans G, Nuyts J, Belmans A, Mortelmans L, Boogaerts M, Van de Werf F. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 2006;367:113-21
- Jessup M y Brozena S. Heart failure. *N Engl J Med* 2003;348(20):2007-18
- Jessup M, Abraham W, Casey D, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, Konstam MA, Mancini DM, Rahko PS, Silver MA, Stevenson LW, Yancy CW. 2009 Focused update: ACCF/AHA Guidelines for the diagnosis and management of heart failure in adults: A report of the American College of Cardiology Foundation/American heart association task force on practice guidelines developed in collaboration with the international society for heart and lung transplantation. *J Am Coll Cardiol* 2009;53:1343-82
- Jiménez-Quevedo P, Sanz R y López J. “Patients with End-Stage Ischemic Heart Failure: a Growing Target Population for Cardiac Stem Cell Therapy” en Perin EC, Silva GV, Willerson JT (eds.) *An Essential Guide to Cardiac Cell Therapy*. Informa Healthcare, Oxon, cap.10, pp.105-115.
- Johnston PV, Sasano T, Mills K, Evers R, Lee ST, Smith RR, Lardo AC, Lai S, Steenbergen C, Gerstenblith G, Lange R, Marbán E. Engraftment, differentiation, and functional benefits of autologous cardiosphere-derived cells in porcine ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 2009;120(12):1075-83
- Katus HA, Remppis A, Neumann FJ, Scheffold T, Diederich KW, Vinar G, Noe A, Matern G, Kuebler W. Diagnostic efficiency of troponin T measurements in acute myocardial infarction. *Circulation* 1991;83(3):902-12

- Kawamoto A, Tkebuchava T, Yamaguchi J, Nishimura H, Yoon YS, Milliken C, Uchida S, Masuo O, Iwaguro H, Ma H, Hanley A, Silver M, Kearney M, Losordo DW, Isner JM, Asahara T. Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation* 2003;107(3):461-8
- Kim HW, Farzaneh-Far A, Kim RJ. Cardiovascular Magnetic Resonance in Patients With Myocardial Infarction. Current and Emerging applications. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:1-16
- Kim RJ y Farzaneh-Far A. Utilidad diagnóstica de la resonancia magnética cardiovascular en pacientes con dolor torácico, enzimas cardíacas elevadas y ausencia de obstrucción arterial coronaria. *Rev Esp Cardiol* 2009;62(9):966-71
- Kim RJ, Fieno DS, Parrish TB, Harris K, Chen EL, Simonetti O, Bundy J, Finn JP, Klocke FJ, Judd RM. Relationship of MRI delayed contrast enhancement to irreversible injury, infarct age, and contractile function. *Circulation* 1999;100(19):1992-2002
- Kim RJ, Shah DJ y Judd RM. How we perform delayed enhancement imaging. *J Cardiovasc Magn Reson* 2003;5(3):505-14
- Kim W, Jeong MH, Sim DS, Hong YJ, Song HC, Park JT, Ahn YK. A porcine model of ischemic heart failure produced by intracoronary injection of ethyl alcohol. *Heart Vessels* 2011;26(3):342-8
- Kim YJ, Choi BW, Hur J, Lee HJ, Seo JS, Kim TH, Choe KO, Ha JW. Delayed enhancement in hypertrophic cardiomyopathy: comparison with myocardial tagging MRI. *J Magn Reson Imaging* 2008;27(5):1054-60
- Klein HH, Schubothe M, Nebendahl K y Kreuzer H. Temporal and spatial development of infarcts in porcine hearts. *Basic Res Cardiol* 1984;79(4):440-7
- Klocke R, Tian W, Kuhlmann MT, Nikol S. Surgical animal models of heart failure related to coronary heart disease. *Cardiovasc Res* 2007;74(1):29-38
- Koninckx R, Daniëls A, Windmolders S, Mees U, Macianskiene R, Mubagwa K, Steels P, Jamaer L, Dubois J, Robic B, Hendriks M, Rummens JL, Hensen K. The cardiac

- atrial appendage stem cell: a new and promising candidate for myocardial repair. *Cardiovasc Res* 2013;97(3):413-23
- Koning MM, Krams R, Xiao CS, van Meegen JR, Bezstarosti K, Lamers JM, Verdouw PD. Intracoronary trimetazidine does not improve recovery of regional function in a porcine model of repeated ischemia. *Cardiovasc Drugs Ther* 1993;7(5):801-7
 - Kraitchman DL, Bluemke DA, Chin BB, Heldman AW, Heldman AW. A minimally invasive method for creating coronary stenosis in a swine model for MRI and SPECT imaging. *Invest Radiol* 2000;35(7):445-51
 - Kraitchman DL, Heldman AW, Atalar E, Amado LC, Martin BJ, Pittenger MF, Hare JM, Bulte JW. In vivo magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells in myocardial infarction. *Circulation* 2003;107(18):2290-3
 - Krombach GA, Kinzel S, Mahnken AH, Günther RW, Buecker A. Minimally invasive close-chest method for creating reperfused or occlusive myocardial infarction in swine. *Invest Radiol* 2005;40(1):14-8
 - Kumar D, Kamp T y LeWinter M. Embryonic stem cells: differentiation into cardiomyocytes and potential for heart repair and regeneration. *Coron Artery Dis* 2005;16(2):111-6
 - Kurbonov U, Dustov A, Barotov A, Khidirov M, Mirojov G, Rahimov Z, Navjuvonov N, Rizoev E, Olimov N, Goibov A, Karim-Zade B, Rakhmatov M, Muminjonov S, Didari A, Irgasheva J, Bobokhojaev O, Gulmuradov T, Therwath A, Rakhmonov S, Mirshahi M. Intracoronary Infusion of Autologous CD133(+) Cells in Myocardial Infarction and Tracing by Tc99m MIBI Scintigraphy of the Heart Areas Involved in Cell Homing. *Stem Cells Int.* 2013;2013:582527
 - Kuster DW, Merkus D, Kremer A, van Ijcken WF, de Beer VJ, Verhoeven AJ, Duncker DJ. Left ventricular remodeling in swine after myocardial infarction: a transcriptional genomics approach. *Basic Res Cardiol* 2011;106(6):1269-81
 - Kwong RY y Neilan TG. Caracterización de la obstrucción microvascular post-IM mediante ECG: podemos obtener más información de la resonancia magnética cardiaca. *Rev Esp Cardiol* 2010;63(10):1120-2

- Kwong RY, Schussheim AE, Rekhraj S, Aletras AH, Geller N, Davis J, Christian TF, Balaban RS, Arai AE. Detecting acute coronary syndrome in the emergency department with cardiac magnetic resonance imaging. *Circulation* 2003;107(4):531-7
- Lauden L, Boukouaci W, Borlado LR, López IP, Sepúlveda P, Tamouza R, Charron D, Al-Daccak R. Allogenicity of human cardiac stem/progenitor cells orchestrated by programmed death ligand 1. *Circ Res.* 2013;112(3):451-64
- Laugwitz KL, Moretti A, Lam J, Gruber P, Chen Y, Woodard S, Lin LZ, Cai CL, Lu MM, Reth M, Platoshyn O, Yuan JX, Evans S, Chien KR. Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature* 2005;433(7026):647-53
- Leary S, Underwood W, Anthony R, Cartner S, Corey D, Grandin T, Greenacre C, Gwaltney-Brant S, McCrackin MA, Meyer R, Miller D, Shearer J, Yanong R. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition. Disponible en: <https://www.avma.org/KB/Policies/Documents/euthanasia.pdf>
- Lee ST, White AJ, Matsushita S, Malliaras K, Steenbergen C, Zhang Y, Li TS, Terrovitis J, Yee K, Simsir S, Makkar R, Marbán E. Intramyocardial injection of autologous cardiospheres or cardiosphere-derived cells preserves function and minimizes adverse ventricular remodeling in pigs with heart failure post-myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2011;57(4):455-65
- Li TS, Cheng K, Malliaras K, Matsushita N, Sun B, Marbán L, Zhang Y, Marbán E. Expansion of human cardiac stem cells in physiological oxygen improves cell production efficiency and potency for myocardial repair. *Cardiovasc Res* 2011;89(1):157-65
- Linke A, Müller P, Nurzynska D, Casarsa C, Torella D, Nascimbene A, Castaldo C, Cascapera S, Böhm M, Quaini F, Urbanek K, Leri A, Hintze TH, Kajstura J, Anversa P. Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(25):8966-71

- Liu JX, Yu Z, Li XZ, Fu JH, Shang XH, Yan AG, Shi Y, Ma YL. Cardioprotective effects of diltiazem reevaluated by a novel myocardial ischemic model in Chinese miniature swine. *Acta Pharmacol Sin* 2007;28(1):52-7
- Llano R, Epstein S, Zhou R, Zhang H, Hamamdzic D, Keane MG, Freyman T, Wilensky RL. Intracoronary delivery of mesenchymal stem cells at high flow rates after myocardial infarction improves distal coronary blood flow and decreases mortality in pigs. *Catheter Cardiovasc Interv* 2009;73(2):251-7
- Lüdemann L, Schmitt B, Podrabsky P, Schnackenburg B, Böck J, Gutberlet M. Usage of the T1 effect of an iron oxide contrast agent in an animal model to quantify myocardial blood flow by MRI. *Eur J Radiol* 2007;62(2):247-56
- MacRae AR, Kavsak PA, Lustig V, Bhargava R, Vandersluis R, Palomaki GE, Yerna M-J, Jaffe AS. Assessing the requirement for the six-hour interval between specimens in the American Heart Association classification of myocardial infarction in epidemiology and clinical research studies. *Clin Chem* 2006;52:812-818
- Mahrholdt H, Wagner A, Judd RM, Sechtem U, Kim RJ. Delayed enhancement cardiovascular magnetic resonance assessment of non-ischaemic cardiomyopathies. *Eur Heart J* 2005;26(15):1461-74
- Makkar RR, Smith RR, Cheng K, Malliaras K, Thomson LE, Berman D, Czer LS, Marbán L, Mendizabal A, Johnston PV, Russell SD, Schuleri KH, Lardo AC, Gerstenblith G, Marbán E. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet* 2012;379(9819):895-904
- Malliaras K, Li TS, Luthringer D, Terrovitis J, Cheng K, Chakravarty T, Galang G, Zhang Y, Schoenhoff F, Van Eyk J, Marbán L, Marbán E. Safety and efficacy of allogeneic cell therapy in infarcted rats transplanted with mismatched cardiosphere-derived cells. *Circulation* 2012;125(1):100-12
- Martin CM, Meeson AP, Robertson SM, Hawke TJ, Richardson JA, Bates S, Goetsch SC, Gallardo TD, Garry DJ. Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, *Abcg2*, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart. *Dev Biol* 2004;265(1):262-75

- Matsuura K, Nagai T, Nishigaki N, Oyama T, Nishi J, Wada H, Sano M, Toko H, Akazawa H, Sato T, Nakaya H, Kasanuki H, Komuro I. Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes. *J Biol Chem* 2004;279(12):11384-91
- Maxwell MP, Hearse DJ y Yellon DM. Species variation in the coronary collateral circulation during regional myocardial ischaemia: a critical determinant of the rate of evolution and extent of myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 1987;21(10):737-46
- Mazhari R y Hare JM. Translational findings from cardiovascular stem cell research. *Trends Cardiovasc Med* 2012;22(1):1-6
- Mazo M, Planat-Bénard V, Abizanda G, Pelacho B, Léobon B, Gavira JJ, Peñuelas I, Cemborain A, Pénicaud L, Laharrague P, Joffre C, Boisson M, Ecay M, Collantes M, Barba J, Casteilla L, Prósper F. Transplantation of adipose derived stromal cells is associated with functional improvement in a rat model of chronic myocardial infarction. *Eur J Heart Fail.* 2008;10(5):454-62
- McCall FC, Telukuntla KS, Karantalis V, Suncion VY, Heldman AW, Mushtaq M, Williams AR, Hare JM. Myocardial infarction and intramyocardial injection models in swine. *Nat Protoc* 2012;7(8):1479-96
- McCrohon JA, Moon JC, Prasad SK, McKenna WJ, Lorenz CH, Coats AJ, Pennell DJ. Differentiation of heart failure related to dilated cardiomyopathy and coronary artery disease using gadolinium-enhanced cardiovascular magnetic resonance. *Circulation* 2003;108(1):54-9
- Meluzin J, Mayer J, Groch L, Janousek S, Hornacek I, Hlinomaz O, Kala P, Panovsky R, Prasek J, Kaminek M, Stanicek J, Klabusay M, Koristek Z, Navratil M, Dusek L, Vinklarkova J. Autologous transplantation of mononuclear bone marrow cells in patients with acute myocardial infarction: the effect of the dose of transplanted cells on myocardial function. *Am Heart J* 2006;152:975
- Menasché P, Hagege AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, Schwartz K, Vilquin JT, Marolleau JP. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001; 357(9252):279-80

- Messina E, De Angelis L, Frati G, Morrone S, Chimenti S, Fiordaliso F, Salio M, Battaglia M, Latronico MV, Coletta M, Vivarelli E, Frati L, Cossu G, Giacomello A. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res* 2004;95(9):911-21
- Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, Steffens J, Lippolt P, Fichtner S, Hecker H, Schaefer A, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrOw transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial. *Circulation* 2006;113(10):1287-94
- Moelker AD, Baks T, van den Bos EJ, van Geuns RJ, de Feyter PJ, Duncker DJ, van der Giessen WJ. Reduction in infarct size, but no functional improvement after bone marrow cell administration in a porcine model of reperfused myocardial infarction. *Eur Heart J* 2006;27(24):3057-64
- Morcillo C, Valderas JM, Roca JM, Oliveró R, Núñez C, Sánchez M, Bechich S. La determinación de calcio coronario con tomografía computarizada en la evaluación del riesgo cardiovascular: un estudio descriptivo. *Rev Esp Cardiol.* 2007;60(3):268-75
- Moreu-Burgos J y Macaya-Miguel C. Fisiopatología del miocardio isquémico. Importancia de la frecuencia cardiaca. *Rev Esp Cardiol.* 2007;7(Supl D):19-25
- Morrow DA, Cannon CP, Jesse RL, Newby LK, Ravkilde J, Storrow AB, Wu AHB, Christenson RH. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: Clinical characteristics and utilization of biochemical markers of acute coronary syndromes. *Circulation* 2007;115(13):e356-75
- Munz MR, Faria MA, Monteiro JR, Águas AP, Amorim MJ. Surgical Porcine Myocardial Infarction Model through Permanent Coronary Occlusion. *Comp Med* 2011;61(5):445-452
- Na HS, Kim YI, Yoon YW, Han HC, Nahm SH, Hong SK. Ventricular premature beat-driven intermittent restoration of coronary blood flow reduces the incidence of reperfusion-induced ventricular fibrillation in a cat model of regional ischemia. *Am Heart J* 1996;132(1 Pt 1):78-83

- Nadal-Ginard B, Fuster V. Myocardial cell therapy at the crossroads. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2007;4(1):1
- Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A y Anversa P. Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res* 2003;92(2):139-50
- Nadal-Ginard B, Torella D y Ellison GM. Cardiovascular regenerative medicine at the crossroads. Clinical trials of cellular therapy must now be based on reliable experimental data from animals with characteristics similar to human's. *Rev Esp Cardiol* 2006;59:1175-89
- Näslund U, Häggmark S, Johansson G, Marklund SL y Reiz S. A closed-chest myocardial occlusion-reperfusion model in the pig: techniques, morbidity and mortality. *Eur Heart J* 1992;13(9):1282-1289
- Neubauer S. The failing heart- an engine out of fuel. *N Engl J Med* 2007;356(11):1140-1151
- Nguyen PK, Lan F, Wang Y, Wu JC. Imaging: Guiding the clinical translation of cardiac stem cell therapy. *Circ Res* 2011;109(8):962-79
- Nolan JP, Soar J, Zideman DA, Biarent D, Bossaert LL, Deakin C, Koster RW, Wyllie J, Böttiger B; ERC Guidelines Writing Group. European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2010 Section 1. Executive summary. *Resuscitation* 2010; 81(10):1219-76
- Oettgen P, Boyle AJ, Schulman SP, Hare JM. Cardiac stem cell therapy. Need for optimization of efficacy and safety monitoring. *Circulation* 2006;114(4):353-8
- Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussin V, Mishina Y, Pocius J, Michael LH, Behringer RR, Garry DJ, Entman ML, Schneider MD. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(21):12313-8
- Ojha N, Roy S, Radtke J, Simonetti O, Gnyawali S, Zweier JL, Kuppusamy P, Sen CK. Characterization of the structural and functional changes in the myocardium following

- focal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;294(6):H2435-43
- Oliveira EM y Angeli FS. “Large Animal Models of Myocardial Ischemia for Cardiac Cell Therapy” en Perin EC, Silva GV, Willerson JT (eds.) *An Essential Guide to Cardiac Cell Therapy*. Informa Healthcare, Oxon, cap.6, pp 56-66
 - Opie R y Dib N. “Overview of the Clinical Applications of Stem Cells in Ischemic Heart Disease” en Perin EC, Silva GV, Willerson JT (eds.) *An Essential Guide to Cardiac Cell Therapy*. Informa Healthcare, Oxon, cap9, pp 93-104
 - Organización Mundial de la Salud: Enfermedades cardiovasculares. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/index.htm>
 - Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium. *Pediatr Transplant* 2003;7:86-88
 - Ou L, Li W, Liu Y, Zhang Y, Jie S, Kong D, Steinhoff G, Ma N. Animal Models of Cardiac Disease and Stem Cell Therapy. *Open Cardiovasc Med J*. 2010;4:231-239
 - Pasotti M, Prati F, y Arbustini E. The pathology of myocardial infarction in the pre- and post-interventional era. *Heart* 2006; 92(11): 1552–1556.
 - Patten RD y Hall-Porter MR. Small Animal Models of Heart Failure: Development of Novel Therapies, Past and Present. *Circ Heart Fail* 2009;2:138-144
 - Pérez de Prado A, Cuellas-Ramón C, Regueiro-Purriños M, Gonzalo-Orden JM, Pérez-Martínez C, Altónaga JR, García-Iglesias MJ, Orden-Recio MA, García-Marín JF, Fernández-Vázquez F. Closed-chest experimental porcine model of acute myocardial infarction-reperfusion. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2009; 60(3):301-6
 - Pérez de Prado A, Fernández-Vázquez F, Cuellas-Ramón JC, Gibson M. Coronariografía: más allá de la anatomía coronaria. *Rev Esp Cardiol*. 2006;59(6):596-608
 - Perin EC y Silva GV. Stem cell therapy for cardiac diseases. *Curr Opin Hematol* 2004;11(6):399-403

- Perin EC, Silva GV, Assad JA, Vela D, Buja LM, Sousa AL, Litovsky S, Lin J, Vaughn WK, Coulter S, Fernandes MR, Willerson JT. Comparison of intracoronary and transendocardial delivery of allogeneic mesenchymal cells in a canine model of acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2008;44(3):486-95
- Pfister O, Mouquet F, Jain M, Summer R, Helmes M, Fine A, Colucci WS, Liao R. CD31- but Not CD31+ cardiac side population cells exhibit functional cardiomyogenic differentiation. *Circ Res* 2005;97:52-61
- Prasad A, Stone GW, Holmes DR y Gersh B. Reperfusion injury, microvascular dysfunction, and cardioprotection: the “dark side” of reperfusion. *Circulation* 2009;120(21):2105-12
- Reffelmann T, Sensebat O, Birnbaum Y, Stroemer E, Hanrath P, Uretsky BF, Schwarz ER. A novel minimal-invasive model of chronic myocardial infarction in swine. *Coron Artery Dis* 2004;15(1):7-12
- Regueiro-Purriños M, Fernández-Vázquez F, Perez de Prado A, Altónaga JR, Cuellas-Ramón C, Ajenjo-Silverio JM, Orden A, and Gonzalo-Orden JM. Ventricular Arrhythmias and Mortality Associated with Isoflurane and Sevoflurane in a Porcine Model of Myocardial Infarction. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2011;50(1):73–78
- Rehwald WG, Fieno DS, Chen EL, Kim RJ, Judd RM. Myocardial magnetic resonance imaging contrast agent concentrations after reversible and irreversible ischemic injury. *Circulation* 2002;105(2):224-9
- Reimer KA y Jennings RB. The changing anatomic reference base of evolving myocardial infarction. Underestimation of myocardial collateral blood flow and overestimation of experimental anatomic infarct size due to tissue edema, hemorrhage and acute inflammation. *Circulation* 1979;60(4):866-76
- Rezkalla SH y Kloner RA. No-Reflow Phenomenon. *Circulation* 2002;105(5):656-662
- Robey TE, Saiget MK, Reinecke H, Murry CE. Systems approaches to preventing transplanted cell death in cardiac repair. *J Mol Cell Cardiol* 2008;45(4):567-81

- Rodrigues M, Silva AC, Aguas AP, Grande NR. The coronary circulation of the pig heart: Comparison with the human heart. *Eur J Anat* 2005;9(2):67-87
- Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, Bravata DM, Dai S, Ford ES, Fox CS, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA, Howard VJ, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Makuc DM, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, Moy CS, Mozaffarian D, Mussolino ME, Nichol G, Paynter NP, Soliman EZ, Sorlie PD, Sotoodehnia N, Turan TN, Virani SS, Wong ND, Woo D, Turner MB. American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics - 2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2012;125(1):e2-e220
- Rota M, Padin-Iruegas ME, Misao Y, De Angelis A, Maestroni S, Ferreira-Martins J, Fiumana E, Rastaldo R, Arcarese ML, Mitchell TS, Boni A, Bolli R, Urbanek K, Hosoda T, Anversa P, Leri A, Kajstura J. Local activation or implantation of cardiac progenitor cells rescues scarred infarcted myocardium improving cardiac function. *Circ Res* 2008;103(1):107-16
- Ruiz-Ros JA, Martínez JA, Tovar I, Nicolás F, Villegas M, Nuño de la Rosa JA, Fuentes M, Ruipérez JA. Arritmias de reperusión en pacientes valvulares operados con cirugía extracorpórea y pretratados con captopril. *Rev Esp Cardiol* 1997;50(7):491-7
- Russell JC y Proctor SD. Small animal models of cardiovascular disease: tools for the study of the roles of metabolic syndrome, dyslipidemia, and atherosclerosis. *Cardiovasc Pathol* 2006;15(6):318-30
- Ryan T, Armstrong WF, Khandheria BK, American Society of Echocardiography. Task Force 4: Training in echocardiography endorsed by the American Society of Echocardiography. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51(3):361-7
- Sahni D, GDK Harjeet y Jit I. Anatomy & distribution of coronary arteries in pig in comparison with man. *Indian J Med Res* 2008;127(6):564-70
- Sanganalmath SK y Bolli R. Cell therapy for heart failure a comprehensive overview of experimental and clinical studies, current challenges, and future directions. *Circ Res* 2013;113(6):810-34

- Sasano T, Kelemen K, Greener ID y Donahue JK. Ventricular tachycardia from the healed myocardial infarction scar: validation of an animal model and utility of gene therapy. *Heart Rhythm* 2009;6(8 Suppl):S91-7
- Saunders JT, Nambi V, de Limos JA, Chambless LE, Virani SS, Boerwinkle E, Hoogeveen RC, Liu X, Astor BC, Mosley TH, Folsom AR, Heiss G, Coresh J, Ballantyne CM. Cardiac troponin T measured by a highly sensitive assay predicts coronary heart disease, heart failure, and mortality in the atherosclerosis risk in communities study. *Circulation* 2011;123:1367-1376
- Schächinger V, Aicher A, Döbert N, Röver R, Diener J, Fichtlscherer S, Assmus B, Seeger FH, Menzel C, Brenner W, Dimmeler S, Zeiher AM. Pilot Trial on Determinants of Progenitor Cell Recruitment to the Infarcted Human Myocardium. *Circulation* 2008;118(14):1425-32
- 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 TOPCARE-AMI Trial. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:1690-1699
- Schaper W, Frenzel H, y Hort W. Experimental coronary artery occlusion. I. Measurement of infarct size. *Basic Res Cardiol* 1978;74(1):46-53
- Schott RJ, Rohmann S, Braun ER, Schaper W. Ischemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium. *Circ Res.* 1990;66(4):1133-42
- Schuleri KH, Boyle AJ, Centola M, Amado LC, Evers R, Zimmet JM, Evers KS, Ostbye KM, Scorpio DG, Hare JM, Lardo AC. The adult Göttingen minipig as a model for chronic heart failure after myocardial infarction: focus on cardiovascular imaging and regenerative therapies. *Comp Med* 2008;58(6):568-79
- Seth S, Narang R, Bhargava B, Ray R, Mohanty S, Gulati G, Kumar L, Reddy KS, Venugopal P; AIIMS Cardiovascular Stem Cell Study Group. Percutaneous intracoronary cellular cardiomyoplasty for nonischemic cardiomyopathy: clinical and histopathological results: the first-in-man ABCD (Autologous Bone Marrow Cells in Dilated Cardiomyopathy) trial. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48(11):2350-1

- Sherman W, Martens TP, Viles-Gonzalez JF, Siminiak T. Catheter-based delivery of cells to the heart. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2006;3 Suppl 1:S57-64
- Silva GV, Perin EC, Heintz-Green AC, Clague J y and Alton EW. “Stem Cell Delivery Modalities” en Perin EC, Silva GV, Willerson JT (eds.) *An Essential Guide to Cardiac Cell Therapy.* Informa Healthcare, Oxon, cap. 11, pp117-128
- Silva GV, Litovsky S, Assad JA, Sousa AL, Martin BJ, Vela D, Coulter SC, Lin J, Ober J, Vaughn WK, Branco RV, Oliveira EM, He R, Geng YJ, Willerson JT, Perin EC. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation* 2005;111(2):150-6
- Simonetti OP, Kim RJ, Fieno DS, Hillenbrand HB, Wu E, Bundy JM, Finn JP, Judd RM. An improved MR imaging technique for the visualization of myocardial infarction. *Radiology* 2001;218(1):215–223
- Skinner JE y Reed JC. Blockade of frontocortical-brain stem pathway prevents ventricular fibrillation of ischemic heart. *Am J Physiol* 1981;240(2):H156-63
- Skyschally A, Leineweber K, Gres P, Haude M, Erbel R, Heusch G. Coronary microembolization. *Basic Res Cardiol* 2006;101(5):373-82
- Smith RR, Barile L, Cho HC, Leppo MK, Hare JM, Messina E, Giacomello A, Abraham MR, Marbán E. Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. *Circulation* 2007;115(7):896-908
- Solomon SD, Anavekar N, Skali H, McMurray JJ, Swedberg K, Yusuf S, Granger CB, Michelson EL, Wang D, Pocock S, Pfeffer MA. Candesartan in Heart Failure Reduction in Mortality (CHARM) Investigators. Influence of ejection fraction on cardiovascular outcomes in a broad spectrum of heart failure patients. *Circulation* 2005;112(24):3738-44
- Steg PG, James SK, Atar D, Badano LP, Blömmström-Lundqvist C, Borger MA, Di Mario C, Dickstein K, Ducrocq G, Fernandez-Aviles F, Gershlick AH, Giannuzzi P, Halvorsen S, Huber K, Juni P, Kastrati A, Knuuti J, Lenzen MJ, Mahaffey KW,

- Valgimigli M, van't Hof A, Widimsky P, Zahger D. ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Eur Heart J* 2012;33(20):2569-619
- Strauer B y Kornowsky R. Stem cell therapy in perspective. *Circulation* 2003;107:929-34
 - Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kosterling M, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G, Wernet P. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002;106(15):1913-8
 - Sutton MGSJ y Sharpe N. Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction: Pathophysiology and Therapy. *Circulation* 2000;101(25):2981-2988
 - Suzuki Y, Lyons JK, Yeung AC, Ikeno F. In vivo porcine model of reperfused myocardial infarction: in situ double staining to measure precise infarct area/area at risk. *Catheter Cardiovasc Interv* 2008;71(1):100-7
 - Suzuki K, Brand NJ, Smolenski RT, Jayakumar J, Murtuza B, Yacoub MH. Development of a novel method for cell transplantation through the coronary artery. *Circulation*. 2000 ;102(19 Suppl 3):III359-64
 - Swindle MM y Smith AC. Comparative anatomy and physiology of the pig. *Scand J Lab Anim Sci* 1998;25(Suppl 1):1-10
 - Tang XL, Rokosh G, Sanganalmath SK, Yuan F, Sato H, Mu J, Dai S, Li C, Chen N, Peng Y, Dawn B, Hunt G, Leri A, Kajstura J, Tiwari S, Shirk G, Anversa P, Bolli R. Intracoronary administration of cardiac progenitor cells alleviates left ventricular dysfunction in rats with a 30-day-old infarction. *Circulation* 2010;121(2):293-305
 - Taylor DA y Ott HC. "Cardiovascular Cell Therapy Overview: Realistic Targets in 2006" en Perin EC, Silva GV, Willerson JT (eds.) *An Essential Guide to Cardiac Cell Therapy*. Informa Healthcare, Oxon, cap. 8, pp.83-92
 - Taylor DO, Edwards LB, Boucek MM, Trulock EP, Aurora P, Christie J, Dobbels F, Rahmel AO, Keck BM, Hertz MI. Registry of the International Society for Heart and

- Lung Transplantation: twenty-fourth official adult heart transplant report - 2007. *J Heart Lung Transplant* 2007;26(8):796-781
- Tennant R y Wiggers CJ. The effect of coronary occlusion on myocardial contraction. *Am J Physiol* 1935;112:351
 - Teramoto N, Koshino K, Yokoyama I, Miyagawa S, Zeniya T, Hirano Y, Fukuda H, Enmi J, Sawa Y, Knuuti J, Iida H. Experimental pig model of old myocardial infarction with long survival leading to chronic left ventricular dysfunction and remodeling as evaluated by PET. *J Nucl Med* 2011;52(5):761-8
 - Terrovitis JV, Ruckdeschel Smith R y Marbán E. Assessment and Optimization of Cell Engraftment after Transplantation into the Heart. *Circ Res* 2010;106(3):479-494
 - Thomas SP, Thiagalingam A, Wallace E, Kovoov P, Ross DL. Organization of myocardial activation during ventricular fibrillation after myocardial infarction. *Circulation* 2005;112(2):157-163
 - Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282(5391):1145-7
 - Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD; the Writing Group on behalf of the Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Universal Definition of Myocardial Infarction. Third Universal Definition of Myocardial Infarction. *Circulation* 2012;126(16):2020-2035
 - Thygesen K, Alpert JS, White HD, Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction. Universal definition of myocardial infarction. *Circulation* 2007;116:2634 -2653
 - Thygesen K, Mair J, Katus H, Plebani M, Venge P, Collinson P, Lindahl B, Giannitsis E, Hasin Y, Galvani M, Tubaro M, Alpert JS, Biasucci LM, Koenig W, Mueller C, Huber K, Hamm C, Jaffe AS. Study Group on Biomarkers in Cardiology of the ESC Working Group on Acute Cardiac Care. Recommendations for the use of cardiac troponin measurement in acute cardiac care. *Eur Heart J* 2010;31:2197-2204

- Toma C, Wagner WR, Bowry S, Schwartz A, Villanueva F. Fate of culture-expanded mesenchymal stem cells in the microvasculature: in vivo observations of cell kinetics. *Circ Res* 2009;104(3):398-402
- Tomita, S, Mickle DA, Weisel RD, Jia ZQ, Tumati LC, Allidina Y, Liu P, Li RK. Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002;123(6):1132-1140
- Torella D, Ellison GM, Karakikes I, Nadal-Ginard B. Resident cardiac stem cells. *Cell Mol Life Sci* 2007;64:661-73
- Torella D, Ellison GM, Méndez-Ferrer S, Ibañez B, Nadal-Ginard B. Resident human cardiac stem cells: role in cardiac cellular homeostasis and potential for myocardial regeneration. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006;3(1):S8-13
- Tossios P, Krausgrill B, Schmidt M, Fischer T, Halbach M, Fries JWU, Fahnenstich S, Frommolt P, Heppelmann I, Schmidt A, Schomacker K, Fischer JH, Bloch W, Mehlhorn U, Schwinger RHG, Muller-Ehmsen J. Role of balloon occlusion for mononuclear bone marrow cell deposition after intracoronary injection in pigs with reperfused myocardial infarction. *Eur Heart J* 2008;29:1911-1921
- Traverse JH, Henry TD, Moye' LA. Is the measurement of left ventricular ejection fraction the proper end point for cell therapy trials? An analysis of the effect of bone marrow mononuclear stem cell administration on left ventricular ejection fraction after ST-segment elevation myocardial infarction when evaluated by cardiac magnetic resonance imaging. *Am Heart J* 2011;162(4):671-7
- Tsagalou EP, Anastasiou-Nana MI, Charitos CE, Siafakas CX, Drakos SG, Ntalianis A, Terrovitis JV, Mavrikakis EM, Doufas A, Nanas JN. Time course of fibrillation and defibrillation thresholds after an intravenous bolus of amiodarone - An experimental study. *Resuscitation* 2004;61(1):83-89
- Tse HF, Kwong YL, Chan JK, Lo G, Ho CL, Lau CP. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet* 2003;361(9351):47-9

- Tseliou E, Pollan S, Malliaras K, Terrovitis J, Sun B, Galang G, Marbán L, Luthringer D, Marbán E. Allogeneic cardiospheres safely boost cardiac function and attenuate adverse remodeling after myocardial infarction in immunologically mismatched rat strains. *J Am Coll Cardiol* 2013;61(10):1108-19
- Urbanek K, Torella D, Sheikh F, De Angelis A, Nurzynska D, Silvestri F, Beltrami CA, Bussani R, Beltrami AP, Quaini F, Bolli R, Leri A, Kajstura J, Anversa P. Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(24):8692-7
- van der Spoel TIG, Jansen of Lorkeers SJ, Agostoni P, van Belle E, Gyöngyösi M, Sluijter JPG, Cramer MJ, Doevendans PA, Chamuleau SAJ. Human relevance of pre-clinical studies in stem cell therapy: Systematic review and meta-analysis of large animal models of ischaemic heart disease. *Cardiovasc Res* 2011;91:649-658
- Verdouw PD, van den Doel MA, de Zeeuw S, Duncker DJ. Animal models in the study of myocardial ischaemia and ischaemic syndromes. *Cardiovasc Res* 1998; 39:121-135
- Vieira TH, Moura PC Jr, Vieira SR, Moura PR, Silva NC, Wafae GC, Ruiz CR, Wafae N. Anatomical indicators of dominance between the coronary arteries in swine. *Morphologie* 2008;92(296):3-6
- Vilar-Rojas C, Guzmán-Grenfell AM, Hicks JJ. Participation of oxygen-free radicals in the oxido-reduction of proteins. *Arch Med Res* 1996;27:1-6
- Villa A, Tejedor-Viñuela P, Sánchez PL, Tapia C, Arnold R, Gómez-Salvador I, García-Frade LJ, Sánchez A, Fernández-Avilés F, San Román JA. Impacto de la obstrucción microvascular persistente en el remodelado ventricular postinfarto tras el implante intracoronario de células mononucleadas de médula ósea: un estudio de cardiorresonancia con contraste. *Rev Esp Cardiol* 2008;61:602-10
- von Ziegler F, Schenzle J, Schiessl S, Greif M, Helbig S, Tittus J, Becker C, Becker A. Use of multi slice computed tomography in patients with chest-pain submitted to the emergency department. *Int J Cardiovasc Imaging* 2013 (Epub).

- Vulliet PR, Greeley M, Halloran SM, MacDonald KA, Kittleson MD. Intra-coronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs. *Lancet* 2004;363(9411):783-4
- Wagner A, Mahrholdt H, Holly TA, Elliott MD, Regenfus M, Parker M, Klocke FJ, Bonow RO, Kim RJ, Judd RM. Contrast-enhanced MRI and routine single photon emission computed tomography (SPECT) perfusion imaging for detection of subendocardial myocardial infarcts: an imaging study. *Lancet* 2003;361(9355):374-9
- Wagner A, Mahrholdt H, Thomson L, Hager S, Meinhardt G, Rehwald W, Parker M, Shah D, Sechtem U, Kim RJ, Judd RM. Effects of time, dose, and inversion time for acute myocardial infarct size measurements based on magnetic resonance imaging-delayed contrast enhancement. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:2027-33
- Waksman R, Fournadjiev J, Baffour R, Pakala R, Hellinga D, Leborgne L, Yazdi H, Cheneau E, Wolfram R, Seabron R, Horton K, Kolodgie F, Virmani R, Rivera E. Transepocardial autologous bone marrow-derived mononuclear cell therapy in a porcine model of chronically infarcted myocardium. *Cardiovasc Radiat Med.* 2004;5(3):125-31
- Wang X, Hu Q, Nakamura Y, Lee J, Zhang G, From AH, Zhang J. The role of the sca-1+/CD31- cardiac progenitor cell population in postinfarction left ventricular remodeling. *Stem Cells* 2006;24(7):1779-88
- 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(12):907-17
- Weisman HF, Bush DE, Mannisi JA, Weisfeldt ML y Healy B. Cellular mechanisms of myocardial infarct expansion. *Circulation* 1988;78(1):186-201
- Welch TD, Yang EH, Reeder GS, Gersh BJ. Modern management of acute myocardial infarction. *Curr Probl Cardiol* 2012;37(7):237-310
- Wells SM y Sleeper M. Cardiac Troponins. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 2008; 18(3):235-245

- Welt FG, Gallegos R, Connell J, Kajstura J, D'Amario D, Kwong RY, Coelho-Filho O, Shah R, Mitchell R, Leri A, Foley L, Anversa P, Pfeffer MA. Effect of cardiac stem cells on left-ventricular remodeling in a canine model of chronic myocardial infarction. *Circ Heart Fail* 2013;6(1):99-106
- 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 randomized controlled clinical trial. *Lancet* 2004;364(9429):141-8
- Wu KC. CMR of microvascular obstruction and hemorrhage in myocardial infarction. *J Cardiovasc Magn Reson* 2012;14:68
- Yacoub MH y Terrovitis J. CADUCEUS, SCPIO, ALCADIA: Cell therapy trials using cardiac-derived cells for patients with post myocardial infarction LV dysfunction, still evolving. *Global Cardiology Science & Practice* 2013:3
- Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, Kawamoto A, Silver M, Murasawa S, Bosch-Marce M, Masuda H, Losordo DW, Isner JM, Asahara T. Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation* 2003;107:1322–1328
- Yao K, Huang R, Qian J, Cui J, Ge L, Li Y, Zhang F, Shi H, Huang D, Zhang S, Sun A, Zou Y, Ge J. Administration of intracoronary bone marrow mononuclear cells on chronic myocardial infarction improves diastolic function. *Heart* 2008;94(9):1147-53
- Yoshida Y, Hirai M, Yamada T, Tsuji Y, Kondo T, Inden Y, Akahoshi M, Murakami Y, Tsuda M, Tsuboi N, Hirayama H, Okamoto M, Ito T, Saito H, Toyama J. Antiarrhythmic efficacy of dipyridamole in treatment of reperfusion arrhythmias: evidence for cAMP-mediated triggered activity as a mechanism responsible for reperfusion arrhythmias. *Circulation* 2000;101(6):624-30
- Ytrehus K. The ischemic heart-experimental models. *Pharmacol Res* 2000;42(3):193-203

- Zacharowski K, Otto M, Hafner G, Marsh HC y Thiernemann C. Reduction of myocardial infarct size with sCR1sLe(x), an alternatively glycosylated form of human soluble complement receptor type 1 (sCR1), possessing sialyl Lewis x. *Br J Pharmacol* 1999;128:945-952
- Zakharova L, Mastroeni D, Mutlu N, Molina M, Goldman S, Diethrich E, Gaballa MA. Transplantation of cardiac progenitor cell sheet onto infarcted heart promotes cardiogenesis and improves function. *Cardiovasc Res* 2010;87(1):40-9
- Zaragoza C, Gomez-Guerrero C, Martin-Ventura JL, Blanco-Colio L, Lavin B, Mallavia B, Tarin C, Mas S, Ortiz A, Egido E. Animal Models of Cardiovascular Diseases. *J Biomed Biotechnol* 2011. Article ID 497841
- Zhang J, Wilke N, Wang Y, Zhang Y, Wang C, Eijgelshoven MH, Cho YK, Murakami Y, Ugurbil K, Bache RJ, From AH. Functional and bioenergetic consequences of postinfarction left ventricular remodeling in a new porcine model: MRI and 31P-MRS Study. *Circulation* 1996;94(5):1089-1100
- Zhang M, Mal N, Kiedrowski M, Chacko M, Askari AT, Popovic ZB, Koc ON, Penn MS. SDF-1 expression by mesenchymal stem cells results in trophic support of cardiac myocytes after myocardial infarction. *FASEB J* 2007;21:3197–3207
- Zhang S, Sun A, Xu D, Yao K, Huang Z, Jin H, Wang K, Zou Y, Ge J. Impact of timing on efficacy and safety of intracoronary autologous bone marrow stem cells transplantation in acute myocardial infarction: a pooled subgroup analysis of randomized controlled trials. *Clin Cardiol* 2009;32(8):458-66
- Zhou L, White CM, Chen BP, Chow MS, Fan C y Kluger J. A comparison of the antifibrillatory effects of desethylamiodarone to amiodarone in a swine model. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999;34(3):440-445

IX. Trabajos más relevantes del doctorando relacionados con la temática de la Tesis Doctoral

Máster Universitario en Iniciación a la Investigación en Ciencias de la Salud (Especialidad Veterinaria)

Trabajo Fin de Máster titulado: Validación mediante resonancia magnética y cartografía electroanatómica de un modelo animal de taquicardia ventricular inducible post-infarto de miocardio. 6 de julio de 2011. Calificación: Sobresaliente

Artículos científicos

1. Fei Sun, Francisco M. Sánchez, Javier Fernández-Portales; Verónica Crisóstomo, Idoia Díaz-Güemes, **Claudia Báez-Díaz**, Jesús Usón, Manuel Maynar. Chronic Intrapericardial Catheterization for Repeated Drug Delivery: Technical Feasibility Study in the Göttingen Minipig. *Journal of Invasive Cardiology* 2012; 24(5):210-214
2. Javier Fernández Portales, Fei Sun, Verónica Crisóstomo, **Claudia Báez** y Armando Pérez de Prado. Modelos animales en el aprendizaje de cardiología intervencionista. *Rev Esp Cardiol Supl.* 2013; 13(E):39-45
3. A. Arenal, E. Pérez-David, P. Ávila, J. Fernández-Portales, V. Crisostomo, **C. Baez-Díaz**, J. Jiménez-Candil, JL. Rubio-Guivernau, MJ. Ledesma-Carbayo, J. Bermejo, F. Fernández-Avilés. Non-invasive Identification of Epicardial Substrate of Post-infarction Ventricular Tachycardias by Magnetic Resonance-Based Transmural Signal Intensity Mapping. *JACC.* Under review.
4. Verónica Crisóstomo, Juan Maestre, Manuel Maynar, Fei Sun, **Claudia Báez-Díaz**, Jesús Usón, Francisco M. Sánchez Margallo. Development of a closed chest model of chronic myocardial infarction in swine: Magnetic Resonance Imaging and pathological evaluation. *ISRN Cardiology.* In press.

Comunicaciones a congresos

1. Crisóstomo V, Maestre J, Maynar M, Sun F, **Báez C**, Usón J, Sánchez FM. Endovascular induction of a large animal model of chronic heart failure: Feasibility study and MRI evaluation. 36th Annual Scientific Meeting of the Society of Interventional Radiology (SIR 2011). Chicago, Ill, USA. 26 – 31 Marzo, 2011. Abstract in: J Vasc Interven Radiol 2011; 22(Suppl): S25-S26.
2. Javier Fernández Portales, Verónica Crisóstomo Ayala, Fabiola Pérez Reyes, **Claudia Báez Díaz**, Javier Jiménez-Candil, Juan Luis Monroy Montaña, Rosa Porro Fernández y Ángel Arenal Maíz. Validación de un modelo animal de taquicardia ventricular mediada por cicatriz, con dos métodos de infarto. SEC 2011. El Congreso de las Enfermedades Cardiovasculares. Maspalomas, Gran Canaria. 22-23 Octubre 2011.
3. Gómez-Mauricio G, Bernard A, Crisóstomo V, Martín-Cancho MF, Celdrán D, **Báez C**, Casado JG, Álvarez V, Sánchez-Margallo FM. “Intramyocardial Administration of Different Treatments with ASCs in a Porcine Model of Acute Myocardial Infarction: Study of Cardiac Function and Monitoring by MRI”. Póster. Noveno Simposio Internacional Terapia Celular e Innovaciones Cardiovasculares. Madrid. 7-8 Junio 2012.
4. **Báez, Claudia**; Crisóstomo, Verónica; Luis Abad, José; Nunes, Virginia; Palacios, Itziar; García-Lindo, Mónica; González, Manuel; Sun, Fei; Gómez-Mauricio, Guadalupe; Casado, Javier G; Sánchez-Margallo, Francisco Miguel. “Intracoronary administration of porcine cardiac stem cells in a porcine model of acute myocardial infarction: A preclinical safety evaluation”. Póster y publicación de abstract. Collaborative Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy/ French Society of Cell and Gene Therapy. Versailles, Francia. 25-29 Octubre 2012. Human Gene Therapy 2012; 23(10):A103-A103
5. Gómez-Mauricio, Guadalupe; Bernad, Antonio; Crisóstomo, Verónica; Fernanda Martín-Cancho, María Fernanda; Celdrán, Diego; **Báez, Claudia**; Mijares, José; Martínez-Caballero, Sonia; Álvarez, Verónica; Casado, Javier G; Sánchez-Margallo, Francisco Miguel. “Histological and immunohistochemical studies after intramyocardial administration of different treatments with ASCS in a porcine AMI model”. Póster y publicación de abstract. Collaborative Congress of the European Society of Gene and

- Cell Therapy/ French Society of Cell and Gene Therapy. Versailles, Francia. 25-29 Octubre 2012. Human Gene Therapy 2012; 23(10):A103-A103
6. Gómez-Mauricio, Guadalupe; Bernad, Antonio; Crisóstomo, Verónica; Martín-Cancho, María Fernanda; Celdrán, Diego; **Báez, Claudia**; Mijares, José; Martínez-Caballero, Sonia; Álvarez, Verónica; Casado, Javier G; Sánchez-Margallo, Francisco Miguel. "Evaluation of different parameters involved in cardiac function by MRI after intramyocardial administration of treatments with ASCS in a porcine AMI model". Póster y publicación de abstract. Collaborative Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy/ French Society of Cell and Gene Therapy. Versailles, Francia. 25-29 Octubre 2012. Human Gene Therapy 2012; 23(10):A102-A103
 7. García-Lindo M, **Báez C**, Crisóstomo V, Lima JR, Maestre J, Sánchez-Margallo FM. Tiempos de aparición de episodios de fibrilación ventricular durante la inducción de infarto agudo de miocardio en modelo experimental mínimamente invasivo. Comunicación oral. IX Congreso Nacional SEAAV. Complicaciones en anestesia. 30 Mayo-1 Junio 2013
 8. **Báez-Díaz C.**, Crisóstomo V., García-Lindo M., García-Casado J., Álvarez V., Palacios I., Rodríguez-Borlado L., Sánchez-Margallo F.M. Intracoronary delivery of different pCSC doses in a porcine model of acute myocardial infarction: Magnetic resonance and histopathological evaluation. Póster. Decimo Simposio Internacional Terapia Celular e Innovaciones Cardiovasculares. Madrid. 6-7 Junio 2013.
 9. Verónica Crisóstomo, **Claudia Báez**, Juan Maestre, Javier García Casado, Rosalba Rosado, Belén Sánchez, José Luis Abad, Francisco M. Sánchez-Margallo. Intracoronary delivery of allogeneic pCSCs in swine: A pathological and MR study for safety assessment. Póster. Decimo Simposio Internacional Terapia Celular e Innovaciones Cardiovasculares. Madrid. 6-7 Junio 2013.
 10. Javier G Casado, R Blázquez, V Crisóstomo, **C Báez**, J Maestre, G Gómez-Mauricio, V Álvarez, FM Sánchez-Margallo. Intrapericardial administration of bone marrow mesenchymal stem cells in a porcine model: cell tracking by MRI, histology and Y-chromosome detection. Póster. Decimo Simposio Internacional Terapia Celular e Innovaciones Cardiovasculares. Madrid. 6-7 Junio 2013.

11. R Blázquez, V Crisóstomo, **C Báez**, G Gómez-Mauricio, V Álvarez, A Arenal, FM Sánchez-Margallo, Javier G Casado. Characterization of porcine cardiosphere-derived stem cells leading to preclinical studies for post-myocardial infarction. Póster. Decimo Simposio Internacional Terapia Celular e Innovaciones Cardiovasculares. Madrid. 6-7 Junio 2013.
12. **Báez-Díaz C.**, Crisóstomo V., García-Lindo M., Maestre-Antequera J., Pérez-David E., Sun F., Sánchez-Margallo F.M. The closed-chest porcine model of reperfused myocardial infarction: Comparison between different occlusion regimes. Póster. 12th FELASA Congress. 10-13 Junio 2013. Barcelona
13. **Báez-Díaz C.**, Sánchez-Margallo F.M., Gómez-Mauricio, G., García-Casado, J., Abad J.L., Nunes V., Palacios I., Sun, F., Crisóstomo V. Intracoronary administration of porcine cardiac stem cells in a swine model of acute myocardial infarction: Evaluation of safety and efficacy. Póster. 12th FELASA Congress. 10-13 Junio 2013. Barcelona
14. Belén Moreno-Naranjo, Idoia Díaz-Güemes Martín-Portugués, Verónica Crisóstomo Ayala, Javier García Casado, Fei Sun, Juan Maestre Antequera, **Claudia Báez Díaz**, Francisco Miguel Sánchez-Margallo. Administración toracoscópica de células madre mesenquimales en el saco pericárdico para el tratamiento del infarto agudo de miocardio. Valencia, 24-26 octubre 2013
15. Javier G Casado, R Blázquez, V Crisóstomo, **C Báez**, J Maestre, G Gómez-Mauricio, V Álvarez, FM Sánchez-Margallo. Intrapericardial delivery of bone marrow mesenchymal stem cells in a porcine model: in vivo cell tracking by MRI and histological analysis. Póster. European Society of Gene & Cell Therapy Congress. Madrid 25-28 October, 2013.
16. **Báez C.**, Crisóstomo V., García-Lindo M., García-Casado J., Álvarez V., Blázquez R., Palacios I., Rodríguez-Borlado L., Sánchez-Margallo F.M. Benefits of intracoronary delivery of pCSCs in a swine model of acute myocardial infarction. Póster. European Society of Gene & Cell Therapy Congress. Madrid 25-28 October, 2013.
17. Verónica Crisóstomo, **Claudia Báez**, Juan Maestre, Javier Garcia Casado, Rosalba Rosado, Belén Sánchez, José Luis Abad, Franciso M. Sánchez-Margallo. Safety of allogeneic pCSCs intracoronary delivery: a pathological and MR study assessment in the porcine model. Póster. European Society of Gene & Cell Therapy Congress. Madrid 25-28 October, 2013.

18. **Báez C.**, Crisóstomo V., García-Lindo M., García-Casado J., Blázquez R., Álvarez V., Palacios I., Rodríguez-Borlado L., Sánchez-Margallo F.M. Intracoronary delivery of pCSCs in a porcine AMI model: MRI and histological evaluation. XIX Congreso de la Sociedad Española de Intervenciones Quirúrgicas. Madrid 21-22 Noviembre, 2013. (Enviado)

Participación en proyectos de investigación

- Proyectos concedidos:
 - Título del proyecto: “Validación de la utilización de la Resonancia Magnética Cardiovascular para la caracterización del sustrato de las arritmias ventriculares mediante cartografía de intensidad de señal endo-epicárdica en un modelo animal de infarto de miocardio”. Financiación: Plan Regional de Investigación de Extremadura. Fecha inicio-fin: 2010-2012.
 - Título del proyecto: “Cardio Repair European Multidisciplinary Initiative”. Financiación: Séptimo Programa Marco (Unión Europea). Fecha inicio-fin: 2010-2015.
 - Título del proyecto: “Estudio de Viabilidad y Eficacia de Distintas Vías de Inoculación de Células Madre Multipotenciales en la Resolución de Infarto Agudo de Miocardio.” Financiación: CCMIJU (proyecto interno). Fecha inicio-fin: 2011-2012.
- Proyectos pendientes de resolución:
 - Título del proyecto: “Ablación del sustrato de las TVMS en un modelo porcino de cicatriz post-infarto mediante terapia celular.” Financiación: Convocatoria de Ayudas en Proyectos de Investigación en Salud. Duración: 3 años

Pertenencia a estructuras estables de investigación cooperativa

- Red de Investigación Cardiovascular (RIC) Programa de Arritmias (RD12/0042/0025)

Estancias de formación

- Gasthuisberg University Hospital. Universidad Lovaina (Bélgica). Enero 2011