

Universitat de València
Facultat de Medicina i Odontologia
Departament de Medicina



**Papel de PGC-1 α en la viabilidad miocárdica
y el remodelado ventricular tras infarto
agudo de miocardio**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:
D. Óscar Fabregat Andrés

Dirigida por los Doctores:

Dr. D. Francisco Ridocci Soriano

Dr. D. María Monsalve Pérez

Dr. D. José Antonio Barrabés Riu

Siendo Tutor:

Dr. D. Francisco Javier Chorro Gascó

Valencia, 2017

Universitat de València
Facultat de Medicina i Odontologia
Departament de Medicina



**Papel de PGC-1 α en la viabilidad miocárdica
y el remodelado ventricular tras infarto
agudo de miocardio**

Memoria que presenta para optar
al grado de Doctor en Medicina el
Licenciado en Medicina D. Óscar
Fabregat Andrés

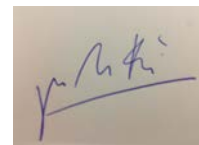
Valencia, 17 enero de 2017

Don FRANCISCO RIDOCCI SORIANO, Médico Adjunto del Servicio de Cardiología del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia, Profesor Asociado de Medicina de la Universitat de València; Doña MARÍA MONSALVE PÉREZ, Doctora en Bioquímica y Biología Molecular, Científico Titular del CSIC y jefe de grupo de investigación en el IIBm (CSIC-UAM), Madrid; y JOSÉ ANTONIO BARRABÉS RIU, Médico Adjunto del Servicio de Cardiología del Hospital Vall d'Hebrón de Barcelona, Profesor Asociado de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona.

CERTIFICAN: Que la presente tesis, “Papel de PGC-1 α en la viabilidad miocárdica y el remodelado ventricular tras infarto agudo de miocardio”, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Servicio de Cardiología del Hospital General Universitario de Valencia, por el Licenciado en Medicina D. ÓSCAR FABREGAT ANDRÉS, para optar al grado de Doctor en Medicina.

Y para que así conste, expiden la presente certificación.

Valencia, a 17 de enero de 2017



Dr. Francisco Ridocci Soriano Dra. María Monsalve Pérez Dr. José Barrabés Riu

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis no podría haberse realizado sin la colaboración de muchas personas, a quienes deseo mostrar mi más sincera gratitud. En primer lugar, a los doctores D. Francisco Ridocci Soriano, D^a María Monsalve Pérez, y D. José Antonio Barrabés Riu, por despertar con su trayectoria personal y su trabajo diario mi interés por la investigación cardiovascular, y por supuesto, por ofrecerse como mentores de esta tesis. También quiero agradecer al profesor D. Francisco Javier Chorro Gascó su cercanía y amabilidad al aceptar la tutoría del trabajo.

A los profesores de la Facultad de Medicina, a los compañeros del Hospital General de Valencia y la Fundación para la Investigación del hospital, y a todos los que en algún momento profesional en el cual hemos coincidido me han mostrado con su labor el camino a seguir.

A mis hermanos Iván, David y Sara por la infancia compartida y la confianza que permite la progresión personal. A mi abuela Enriqueta, por lanzarme al abismo de los estudios de Medicina con un comentario que en el momento justo resultó trascendente. A mi otra familia, Maribel, Marcos, Alicia, Álvaro, Yolanda y Vanesa, por hacerme sentir uno más desde el principio.

Con cariño muy especial, a mi mujer Miriam, por la confianza ciega en mi capacidad, la paciencia sin límite, y las horas prestadas que ya no volverán. A mi hija Sofía, por centrarme en lo que importa, y a mis hijas Blanca y Carlota, que con la noticia de su venida me han empujado a concluir esta tesis. A Francisco, por ser referente profesional y luz espiritual, por las conversaciones inacabables de los noches de verano que la enfermedad nos ha robado.

La dedicatoria más especial es para mis padres, que desde bien pequeño han fomentado mi autonomía, el gusto por las cosas bien hechas y el respeto a los demás. Por permitir equivocarme tantas veces, por levantarme cuando no tenía fuerzas, por corregirme con amor. A mi madre, por respetar siempre mis vuelos a pesar de su sufrimiento, por insuflarme cada noche la dosis necesaria de aliento, por arroparme en mis vacilaciones. A mi padre, por seguir llevándome de la mano allá donde me aventuro, por seguir siendo simplemente reflejo diario del camino.

Óscar Fabregat Andrés

Indice

INDICE

1.- Introducción	25
1.1. Prevalencia de las enfermedades cardiovasculares	25
1.2. Aterotrombosis como mecanismo etiopatogénico	25
1.2.1. Arteriosclerosis: lecho común de las enfermedades cardiovasculares	
1.2.2. Endotelio vascular entendido como órgano	
1.2.3. Los radicales libres de oxígeno como causantes de disfunción endotelial	
1.2.4. Producción excesiva de radicales libres	
1.3. Regulación del estrés oxidativo mitocondrial	28
1.3.1. PGC-1 α : regulador maestro mitocondrial	
1.3.2. PGC-1 α y óxido nítrico	
1.4. Papel de PGC-1α en la isquemia miocárdica	31
1.4.1. Estudios de experimentación básica	
1.4.2. Sistema regulado por PGC-1 α como potencial diana farmacológica	
1.5. Lesión por isquemia-reperfusión en el síndrome coronario agudo	36
1.5.1. Magnitud del problema	
1.5.2. Base histológica de la lesión por reperfusión	
1.5.3. Ensayos clínicos centrados en la lesión por isquemia-reperfusión	
1.6. Necesidad de un nuevo enfoque traslacional	41
1.6.1. Protocolos en estudios traslacionales de cardioprotección	
1.6.2. Bases metodológicas de nuestro enfoque traslacional	

1.7. Estudios de imagen cardiaca por resonancia magnética.....	44
1.7.1. <i>Papel de la resonancia en la cardiopatía isquémica</i>	
1.7.2. <i>Viabilidad miocárdica tras infarto de miocardio</i>	
1.7.3. <i>Edema miocárdico y miocardio salvado</i>	
1.7.4. <i>Utilidad clínica en cardiopatía isquémica</i>	
2.- Hipótesis de trabajo.....	51
3.- Objetivos.....	55
4.- Métodos.....	59
4.1. Fases del estudio.....	59
4.1.1. <i>Primera fase: protocolo de análisis no invasivo de expresión de PGC-1α y su participación en el síndrome coronario agudo</i>	
4.1.2. <i>Segunda fase: repercusión clínica del grado de expresión de PGC-1α en la evolución post-infarto</i>	
4.1.2. <i>Tercera fase: correlación de la expresión de PGC-1α a nivel miocárdico y periférico</i>	
4.2. Estudio Preclínico.....	60
4.2.1. <i>Animales</i>	
4.2.2. <i>Obtención y procesado de muestras celulares en animales</i>	
4.2.3. <i>Análisis mitocondrial en animales</i>	
4.2.4. <i>Preparación de células mononucleares de sangre periférica</i>	
4.2.5. <i>Adquisición de biopsias de tejido miocardio</i>	
4.2.6. <i>Análisis de biología molecular</i>	
4.2.7. <i>Estado antioxidante</i>	
4.3. Investigación clínica.....	64
4.3.1. <i>Población de estudio</i>	
4.3.2. <i>Protocolo de recogida de las muestras</i>	
4.3.3. <i>Datos clínicos durante el ingreso</i>	
4.3.4. <i>Estudios de resonancia cardiaca</i>	
4.4. Análisis estadístico.....	74

5.- Resultados	79
5.1. Primera fase: Detección de inducción de PGC-1α en pacientes con infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST	79
5.1.1. Estudio preclínico.....	79
5.1.2. Investigación clínica.....	82
5.1.2.1. Análisis descriptivo	
5.1.2.2. Inducción de PGC-1 α tras el infarto	
5.1.2.3. Implicación funcional de la inducción de PGC-1 α	
5.1.2.4. Activación inmunológica tras el infarto	
5.2. Segunda fase: La inducción de PGC-1α puede detectarse en muestras sanguíneas de pacientes con infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST	93
5.2.1. Expresión basal de PGC-1 α	
5.2.2. Inducción de PGC-1 α tras IAMEST	
5.2.3. Respuesta inmune y PGC-1 α	
5.2.4. Actividad molecular de PGC-1 α	
5.2.5. Sobreexpresión de ANT-1 mediada por PGC-1 α	
5.2.6. Inducción de PGC-1 α , obstrucción microvascular y remodelado ventricular	
5.3. Tercera fase: La inducción de PGC-1α puede detectarse en muestras sanguíneas de pacientes con infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST	102
5.2.1. Características basales de los pacientes	
5.2.2. Correlación en la expresión de PGC-1 α en sangre periférica y miocardio	
5.2.3. Genes diana y genes reguladores de PGC-1 α	
5.2.4. Autofagia y estado antioxidante total	
5.2.5. Respuesta inmune	

6.- Discusión	113
6.1. Primera fase: PGC-1 como biomarcador en pacientes con infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST	113
6.2. Segunda fase: PGC-1 predice miocardio salvado y remodelado ventricular tras infarto agudo de miocardio	117
6.3. Tercera fase: Correlación en la expresión de PGC-1 en sangre periférica y tejido miocárdico	121
90 Conclusiones	127
-Financiación del proyecto	135
-Bibliografía	139
-Anexo: Artículos Científicos	145

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Regulación de PGC-1 α : factores reguladores de su actividad y cofactores dependientes. PGC-1 α participa en la regulación de la biogénesis mitocondrial, el metabolismo de la glucosa y los ácidos grasos, y los procesos de detoxificación.....	29
Figura 2. Representación esquemática de los mecanismos que conducen a la muerte celular durante los primeros minutos de repercusión.....	39
Figura 3. Información que puede obtenerse a través de las diferentes secuencias de resonancia cardiaca en el infarto agudo de miocardio. Ejemplo de pacientes con infarto de localización inferior.....	47
Figura 4. Clasificación de los 17 segmentos del ventrículo izquierdo en la imagen de ojo de buey y en los cortes ecocardiográficos paraesternal eje corto y apical de cuatro y dos cámaras.....	72
Figura 5. Representación del área en riesgo a partir de imágenes potenciadas en T2-STIR, área de necrosis obtenida a partir de imágenes de realce tardío de gadolinio, y miocardio salvado calculado a partir de la diferencia entre ambas.....	73
Figura 6. Expresión de PGC-1 α en esplenocitos y timocitos de muestras murinas.....	80
Figura 7. <i>Western-blot</i> de esplenocitos murinos, procedentes de extractos celulares procesados.....	80
Figura 8. Niveles de PGC-1 α y citocromo C en esplenocitos murinos en situación basal (0 horas) y tras estimulación con inmunoglobulina M (3 horas).....	81
Figura 9. Inducción de PGC-1 α tras SCACEST. Muestra agrupada en función de los niveles de RNA al ingreso y a las 72 horas, determinados por RT-PCR.....	85
Figura 10. Inducción de MnSOD y CytC tras SCACEST estimada en base a los niveles de RNA al ingreso y a las 72 horas, determinados por RT-PCR. Distribución de la muestra en función de la inducción de PGC-1 α	86
Figura 11. Inducción de los niveles de proteína CytC tras SCACEST. Muestra agrupada en función del nivel de inducción de PGC-1 α	86
Figura 12. La inducción de PGC-1 α tras SCACEST se correlaciona negativamente con los niveles basales de PGC-1 α . La gráfica muestra el promedio de los niveles de RNA de CytC y PGC-1 α en el momento del ingreso en los tres grupos de inducción de PGC-1 α	87
Figura 13. La inducción de PGC-1 α tras SCACEST se relaciona positivamente con niveles plasmáticos pico de TnI y CKMB más elevados y con mayores cifras de PCR no ultrasensible (CRP) al ingreso.....	88
Figura 14. La inducción de PGC-1 α tras SCACEST se relaciona con mayores áreas de necrosis, estimada mediante RTG en estudios de CRM. %LGE: porcentaje de RTG respecto a masa miocárdica total.....	89
Figura 15. La inducción de PGC-1 α tras SCACEST es más frecuente en pacientes con metabolismo glucídico alterado. Los valores de glucosa expresan la media de tres determinaciones en ayunas durante el ingreso.....	89
Figura 16. Los pacientes con inducción de PGC-1 α tras SCACEST presentan en la evolución clínica peor FEVI (LVEF) y mayor ICS (índice de contractilidad segmentaria o <i>ventricular contractility index</i>).....	90
Figura 17. FEVI (LVEF) y RTG (LGE) de los pacientes del estudio en función de la localización del infarto: anterolateral e inferoposterior. FEVI como indicador de función y RTG como indicador de tamaño del infarto.....	91

Figura 18. Recuento de leucocitos, linfocitos y monolitos al ingreso y a las 72 horas. Análisis comparativo entre grupos en función de la inducción de PGC-1 α	92
Figura 19. Miocardio salvado según la expresión basal de PGC-1 α : comparativa en estudio inicial, en el control a los 6 meses, y variación porcentual entre ambos estudios.....	95
Figura 20. Variación de los volúmenes ventriculares y la función sistólica a los 6 meses. (A-B) Variación según la expresión basal de PGC-1 α . (C-D) Variación según la inducción de PGC-1 α tras IAMEST.....	95
Figura 21. Miocardio salvado según la inducción de PGC-1 α tras IAMEST: comparativa en estudio inicial, en el control a los 6 meses, y variación porcentual entre ambos estudios.....	98
Figura 22. Expresión relativa de RNA de difentes dianas de PGC-1alpha: citocromo C, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa.....	101
Figura 23. Correlación en la expresión de ARNm de PGC-1alpha en sangre periférica y miocardio. Los pacientes se dividieron en función del punto de corte de 2-fold en sangre periférica. Se utilizó el índice Kappa para evaluar el grado de correlación entre las muestras.....	106
Figura 24. Expresión relativa de ARNm de los genes diana de PGC-1alpha y el estado antioxidante total, en función de la expresión basal de PGC-1alpha en sangre periférica.....	107

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Datos demográficos, bioquímicos y parámetros de la resonancia magnética cardiaca de los pacientes de la muestra. La población se dividió en dos grupos en función de la presencia o no de inducción en la expresión de PGC-1 α tras infarto agudo de miocardio.....	84
Tabla 2. Recuento total y relativo de leucocitos, linfocitos y monocitos al ingreso y a las 72 horas. Análisis comparativo entre grupos en función de la inducción de PGC-1 α	92
Tabla 3. Características de la muestra según nivel de expresión basal de PGC-1 α : factores de riesgo cardiovascular, características del infarto y bioquímica general.....	94
Tabla 4. Características de la muestra según inducción de PGC-1 α tras el infarto: factores de riesgo cardiovascular, características del infarto y bioquímica general.....	97
Tabla 5. Área de necrosis y miocardio salvado: muestras pareadas en función de la inducción de PGC-1 α en fase aguda del infarto. Comparación de porcentajes mediante test t-Student para muestras pareadas.....	98
Tabla 6. Subtipos celulares de leucocitos según inducción de PGC-1 α tras IAMEST: muestra sanguínea al ingreso y a las 72 horas.....	100
Tabla 7. Características de la muestra según la inducción PGC-1 α tras IAMEST y la presencia de OMV en el estudio de RMC inicial: valoración por RMC de la FEVI, VTDVI y tamaño del infarto (estimado por valores máximos de TnI y área de necrosis según RTG).....	102
Tabla 8. Características basales de los pacientes en función de la expresión basal de PGC-1 α en sangre periférica.....	103
Tabla 9. Variables de la cirugía cardiaca en función de la expresión de PGC-1 α en sangre periférica.....	104
Tabla 10. Respuesta inmune desencadenada por la cirugía, según el valor basal periférico de la PGC-1 α	109
Tabla 11. Expresión basal de PGC-1 α según la presencia de trastornos del metabolismo glucídico..	110

ABREVIATURAS

- AMPK: AMP-activated protein kinasa
- ANT-1: *adenine nucleotide traslocase 1*
- ARN: ácido ribonucleico
- cyt c: citocromo C
- FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo
- MS: miocardio salvado
- OMV: obstrucción microvascular
- qRT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
- PGC-1 α : *Peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator-1 α*
- RMC: resonancia magnética cardiaca
- ROS: *reactive oxygen species*
- RTG: realce tardío de gadolinio
- SCA: síndrome coronario agudo
- SCACEST: síndrome coronario agudo con elevación del segmento ST
- SIRT-1: silent information regulator 2 homolog 1
- SOD: enzima Mn superóxido dismutasa 2
- VTDVI: volumen telediastólico de ventrículo izquierdo

1.- Introducción

1.- Introducción

1.1. Prevalencia de las enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) siguen siendo la primera causa de muerte en las sociedades occidentales¹⁻². A pesar del descenso en las tasas ajustadas de mortalidad, su prevalencia se ha mantenido constante en las últimas décadas, y las predicciones indican que va a producirse un fuerte incremento en los próximos años, en parte debido al aumento de la esperanza de vida y sobre todo a la prevalencia creciente de diabetes y obesidad³. Las ECV suponen además la principal causa de ingresos hospitalarios y de muerte prematura, siendo un origen importante de invalidez y contribuyendo de forma significativa al incremento del coste sanitario⁴.

Dentro de las ECV, la cardiopatía isquémica es la principal etiología identificable de mortalidad y morbilidad en el mundo occidental⁵. Su traducción clínica fundamental es el síndrome coronario agudo (SCA), cuyo sustrato etiopatogénico es la enfermedad aterotrombótica⁶, que representa la culminación súbita, mediante la formación de un trombo, de un proceso de evolución lenta y prolongada en los años como es la aterosclerosis.

1.2. Aterotrombosis como mecanismo etiopatogénico

1.2.1. Arteriosclerosis: lecho común de las enfermedades cardiovasculares

La arteriosclerosis debe considerarse una enfermedad sistémica, heterogénea y multifactorial. En primer lugar, es una enfermedad en muchas ocasiones global, ya que supone la afectación simultánea de diferentes territorios vasculares (coronario, cerebral, periférico). En segundo lugar, su evolución es multiforme, ya que pueden encontrarse

arteriales en estadios diferentes en varios lechos arteriales de un mismo sujeto. Y finalmente, se considera plurietiológica, pues se han identificado múltiples factores de riesgo que participan en su desarrollo.

Desde la iniciación de la placa ateromatosa en la infancia hasta su desarrollo en la etapa adulta y su posible complicación producida por rotura de la capa fibrosa, todos sus mecanismos fisiopatológicos están basados en la interacción recíproca entre el sistema inmune y los fenómenos de trombosis, y todo este proceso se origina con la aparición de disfunción endotelial⁷.

1.2.2. Endotelio vascular entendido como órgano

El endotelio vascular es un órgano polivalente capaz de percibir los estímulos del ambiente y responder modificando su estado funcional para mantener la homeostasis de la pared vascular⁸. En circunstancias fisiológicas, la superficie endotelial mantiene su microambiente con propiedades antitrombóticas, suprimiendo la migración de células musculares lisas y limitando la permeabilidad a leucocitos circulantes. Bajo la exposición continuada a factores de riesgo cardiovascular, el fenotipo de las células endoteliales cambia, de forma que se hace permeable a las células sanguíneas y macromoléculas, aumenta su afinidad por los macrófagos, promueve la migración de células musculares lisas vasculares y potencia las reacciones protrombóticas. Todas estas respuestas se desencadenan con la producción excesiva de radicales libres de oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*) y se asocian a la pérdida de la bioactividad normal del óxido nítrico (NO), molécula inhibidora de la agregación plaquetaria, con elevada actividad vasodilatadora y una importante función antiinflamatoria.

1.2.3. Los radicales libres de oxígeno como causantes de disfunción endotelial

Los ROS son responsables tanto de la iniciación como de la perpetuación del proceso patológico. Todos y cada uno de los factores de riesgo para el desarrollo de aterosclerosis (dislipemia, hipertensión arterial, diabetes, tabaquismo) son generadores de estrés oxidativo vascular. El inicio del proceso aterosclerótico como tal, es debido al depósito de lípidos oxidados en la pared vascular, que es también consecuencia directa de la excesiva producción de ROS en el endotelio. En este sentido, cabe recordar que la eliminación de colesterol oxidado es mucho más lenta que la del colesterol normal⁹.

Una cuestión clave en medicina cardiovascular es determinar cómo los factores de riesgo causan disfunción metabólica y cómo ésta potencia el estrés oxidativo a nivel endotelial. Los ROS son producidos de forma fisiológica por las mitocondrias como un producto del metabolismo aerobio, desempeñando un papel importante en la señalización y proliferación celular. Sin embargo, cuando sus niveles son excesivos, debido a su gran reactividad, son capaces de dañar de forma irreversible los diferentes componentes celulares, incluyendo proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Esto puede modificar la función celular de forma definitiva, ocasionando mutaciones oncogénicas o incluso muerte celular apoptótica.

1.2.4. Producción excesiva de radicales libres

En la actualidad, por tanto, el papel fundamental que desempeñan los ROS endoteliales en el inicio y desarrollo del proceso aterosclerótico está claramente establecido. Sin embargo, su origen está todavía en debate. Hace ya algunos años quedó demostrado que los niveles altos de glucosa alteran la función mitocondrial, como consecuencia del metabolismo mitocondrial del piruvato, e inducen la producción de ROS mitocondriales en el complejo II¹⁰. Este trabajo promovió múltiples estudios que

establecieron claramente el papel fundamental desempeñado por la disfunción mitocondrial y la producción de ROS en la etiopatogenia de múltiples enfermedades, como trastornos neurodegenerativos comunes (enfermedad de Parkinson¹¹, enfermedad de Alzheimer¹², enfermedad de Huntington¹³, epilepsia¹⁴), arterioesclerosis sistémica¹⁵, diabetes¹⁶, daño por isquemia-reperfusión¹⁷, cáncer¹⁸ y envejecimiento¹⁹. Es por ello crucial el estudio de las causas que desencadenan la producción excesiva de ROS mitocondriales y/o el fallo de los sistemas de detoxificación para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

1.3. Regulación del estrés oxidativo mitocondrial

1.3.1. Peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator-1 α : regulador maestro mitocondrial

Uno de los objetivos fundamentales del estudio de las enfermedades asociadas a disfunción mitocondrial es el conocimiento de la regulación del sistema de protección frente a estrés oxidativo. Se ha propuesto que en esta regulación intervienen varios factores de transcripción y biomoléculas como el óxido nítrico (NO), que formarían parte de los sistemas de detoxificación celulares. Sin embargo, la existencia de un mecanismo coordinado de regulación no se había descrito hasta la publicación de un trabajo²⁰ que mostraba como “*Peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator-1 α* ” (PGC-1 α), un coactivador transcripcional conocido por su función reguladora de la biogénesis mitocondrial y del catabolismo lipídico²¹⁻²², se comporta como un regulador maestro del sistema de protección frente a estrés oxidativo mitocondrial en células endoteliales, un papel que es probablemente crítico para la protección del vaso frente al desarrollo de la aterosclerosis. Es probable que dicha

regulación tenga carácter sistémico y puede ser particularmente relevante en sistemas celulares con altas tasas metabólicas donde PGC-1 α es fundamental para el control del metabolismo energético. Es sabido que PGC-1 α coordina al menos parcialmente la expresión de genes que controlan la biogénesis mitocondrial en varios órganos con alta actividad metabólica. Además, regula la termogénesis en tejido adiposo marrón, la gluconeogénesis hepática y la actividad contráctil de las fibras musculares esqueléticas y cardíacas.

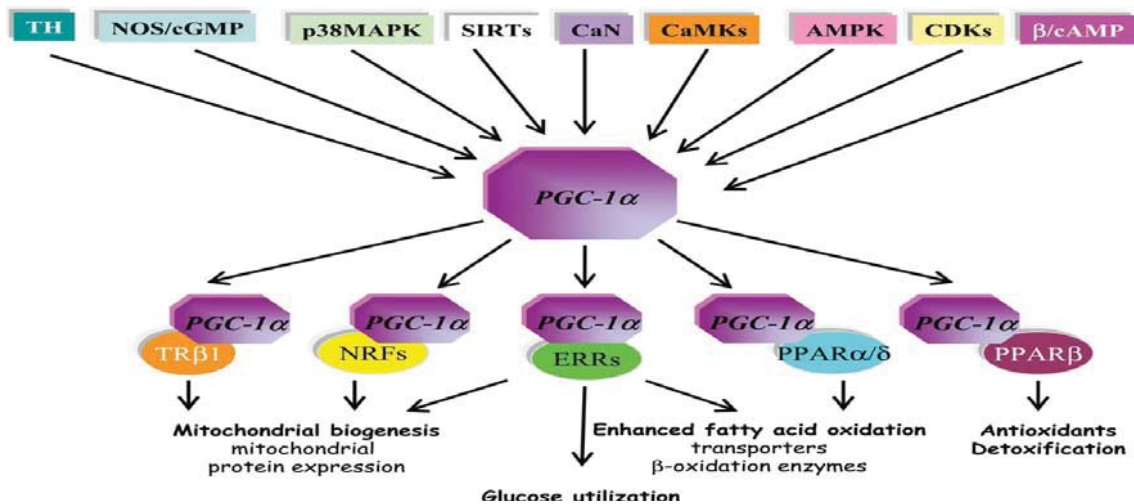


Figura 1. Regulación de PGC-1 α : factores reguladores de su actividad y cofactores dependientes. PGC-1 α participa en la regulación de la biogénesis mitocondrial, el metabolismo de la glucosa y los ácidos grasos, y los procesos de detoxificación. Ventura-Clapier R et al²³

Así, en el músculo cardíaco, PGC-1 α se ha mostrado determinante en la regulación de varios puntos críticos de su metabolismo energético, incluyendo acciones moduladoras a nivel transcripcional^{24,25}. La evidencia científica indica que tanto PPAR α como principal coactivador fisiológico PGC-1 α , especialmente abundante en el miocardio, desempeñan un papel crucial en el control transcripcional de la homeostasis

energética cardíaca. El eje PPAR α -PGC-1 α controla, por una parte, la expresión de los genes implicados en la síntesis de enzimas responsables del metabolismo glucídico y de los ácidos grasos, y por otra, de extrema importancia para el objeto del presente estudio, regula tanto la biogénesis mitocondrial como la transcripción de varias dianas génicas de protección de la organela. Además, la actividad del complejo se ve modificada en diversas situaciones fisiopatológicas como la hiperglucemia, la hipoxia o el estrés por sobrecarga de volumen²⁶, y dicha alteración puede ser determinante en la regulación del remodelado cardíaco que se desarrolla en las entidades nosológicas relacionadas con dichas condiciones adversas, como son la diabetes, la cardiopatía isquémica o la insuficiencia cardíaca. Por tanto, la modulación metabólica miocárdica a través de estas potenciales dianas terapéuticas resulta muy atractiva, y podría modificar en parte la evolución clínica y el pronóstico de dichas enfermedades²⁷.

1.3.2. PGC-1 α y óxido nítrico

Es importante señalar en este momento la interacción de PGC-1 α con el NO, fundamentalmente conocido por su acción vasodilatadora, aunque bien es sabido que sus funciones en la fisiología de la pared vascular van mucho más allá. Se ha propuesto que el preconditionamiento con NO protege a las células miocárdicas del daño por isquemia-reperusión, un proceso relacionado con la generación de ROS en la mitocondria²⁸, protegiendo también a las células endoteliales del efecto de agentes generadores de estrés. Sin embargo, los mecanismos moleculares implicados eran desconocidos hasta el descubrimiento que el NO regula también la expresión del sistema completo mitocondrial de protección frente a estrés a través de la regulación de la expresión de PGC-1 α , siguiendo la vía sGC (guanilato ciclasa soluble)/PKG (protein

kinasa G), una regulación que probablemente es responsable de la actividad protectora/antioxidante del NO^{29,30}. Así, ambas moléculas interactúan de forma estrecha, como lo indican los hallazgos siguientes: NO modula la expresión de PGC-1 α tanto positiva como negativamente, la inhibición de la expresión de los niveles PGC-1 α es mediada por PKG, NO regula la expresión del sistema de protección mitocondrial frente a estrés oxidativo, la regulación del sistema de protección dependiente de NO es mediada directamente por PGC-1 α , y PGC-1 α induce la expresión de eNOS (sintetasa endotelial de NO).

1.4. Papel de PGC-1 α en la isquemia miocárdica

Por tanto, siendo PGC-1 α un coactivador transcripcional maestro en la regulación de genes de protección mitocondrial frente a estrés oxidativo, y una vez demostrada su importancia en la inhibición de la apoptosis celular en situaciones de isquemia-reperfusión, el presente estudio evaluó su potencial papel regulador en el SCA con elevación del segmento ST (SCACEST), situación clínica concreta en la cual el tejido miocárdico afectado es sometido a un estado de isquemia mantenida por oclusión de la arteria coronaria responsable de su perfusión.

1.4.1. Estudios preclínicos

Varios estudios previos de investigación básica han creado el escenario necesario para iniciar la presente investigación. Como punto de partida, debemos recordar que el rol esencial de PGC-1 α en el control del estado energético y la función contráctil del cardíaco ha sido demostrado sólidamente en la literatura^{31,32}. Varios estudios de experimentación animal han demostrado como los ratones *knock-out* para PGC-1 α , a pesar de mantener el mismo volumen mitocondrial que los individuos *wild-type*, tanto

en el músculo esquelético como en el cardíaco, ven reducida la expresión de los diferentes genes que participan en el proceso de fosforilación oxidativa. Con ello, por tanto, la actividad enzimática mitocondrial y los niveles de ATP decrecen significativamente. Esto se traduce en una menor capacidad para incrementar el trabajo cardíaco en respuesta a estímulos químicos y eléctricos. Todos estos datos indican que PGC-1 α es esencial en el desarrollo de una respuesta adecuada del músculo cardíaco al aumento de las demandas de ATP y contractilidad que siguen a los diferentes estímulos fisiológicos del organismo.

La expresión de PGC-1 α es, como vemos, dinámica, y puede inducirse por factores fisiológicos como el frío, el ayuno o el ejercicio físico. Pero además, en el corazón, donde el balance entre la producción de energía y su consumo es literalmente vital, existen ciertas situaciones patológicas de sobrecarga de trabajo prolongada que precisan de una respuesta coordinada a nivel transcripcional. En este sentido, diversos estudios^{26,33,34} han conseguido determinar el papel fundamental de PGC-1 α en modelos animales de insuficiencia cardíaca, en los cuales se lleva a cabo una constricción aórtica parcial mínimamente invasiva con el fin de aumentar la postcarga cardíaca. El fallo cardíaco desencadenado por esta sobrecarga de presión mantenida en el tiempo se asocia en las células miocárdicas con el desarrollo de disfunción mitocondrial, caracterizada a su vez por la inhibición de la expresión de PGC-1 α y por una capacidad oxidativa reducida. Por tanto, la regulación a la baja de PGC-1 α puede explicar en parte la patogénesis de esta entidad en los animales *knock-out* para la molécula. La evidencia creciente atribuye, así, un rol cada vez más importante a los procesos metabólicos y los defectos en su regulación acaecidos en la mitocondria en la patofisiología de la insuficiencia cardíaca.

1.4.2. Sistema regulado por PGC-1 α como potencial diana farmacológica

A partir de estos hallazgos, es creciente el valor potencial de PGC-1 α y los diferentes PPAR como dianas terapéuticas en insuficiencia cardíaca y cardiopatía isquémica. Así por ejemplo, un reciente estudio con el fármaco WY14643, potente agonista PPAR α , demostró por primera vez su potencial efecto cardioprotector en un modelo murino de insuficiencia cardíaca desencadenada por miocarditis aguda viral, a través de la inoculación de EMV (*encephalomyocarditis virus*) según protocolo establecido. Se atribuyó este efecto protector a su papel inmunomodulador, reduciendo citocinas inflamatorias y aumentando los niveles de adiponectina y la expresión de UCP3 (uncoupling protein 3), proteína mitocondrial de membrana que regula el transporte transmembrana de protones y se ha relacionado positivamente con el consumo energético miocárdico³⁵.

Otros trabajos centrados en el estudio de la cardiopatía isquémica, de especial interés para nuestro trabajo, han demostrado la eficacia de fármacos agonistas de los receptores PPAR, como las tiazolidinedionas, comúnmente conocidas como glitazonas, en disminuir el daño por isquemia-reperfusión en ratones con trastornos metabólicos³⁶, en la atenuación del remodelado ventricular tras modelos experimentales de isquemia miocárdica³⁷, e incluso, en la reducción de la necrosis miocárdica en un modelo animal de infarto agudo de miocardio^{38,39}.

El primero de estos estudios evaluó inicialmente cómo los ratones diabéticos desarrollan una peor respuesta a la isquemia-reperfusión, con mayor tamaño de infarto y mayor infiltrado de células inflamatorias en miocardio. Posteriormente, estudió el efecto del tratamiento oral con pioglitazona durante los 14 días previos al procedimiento de isquemia coronaria, y observó que es capaz de reducir tanto el tamaño del infarto como

el infiltrado inflamatorio, atenuando a su vez la respuesta inflamatoria mediante la reducción en la secreción de ciertas citocinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Basándose en estos hallazgos, los autores sugieren que el fármaco puede modular, al menos parcialmente, la disregulación inflamatoria que ocurre generalmente durante los procesos de isquemia-reperfusión en los síndromes metabólicos, y que esta respuesta farmacológica podría tener efecto cardioprotector.

El segundo estudio, basado también en el uso de pioglitazona, demostró una mejoría significativa de la función cardíaca y el remodelado post-infarto, evaluados por ecocardiografía, en un modelo de isquemia aguda en ratones. Además, los hallazgos en la regulación de proteínas inflamatorias son similares al texto previo. Concluyen igualmente que el efecto protector probablemente se deba a la atenuación en la expresión de citocinas en el ventrículo izquierdo.

En el siguiente de estos estudios, se evaluó de forma más minuciosa la repercusión morfológica de la intervención farmacológica. En ratas sometidas a ligadura transitoria (durante 30 minutos) de la arteria descendente anterior, el uso de rosiglitazona, otro agonista de los receptores PPAR γ , fue capaz de reducir el tamaño del área necrótica, medido por tinción histológica, en un 24% si se administraba de forma oral durante los 7 días previos al evento, y en un 30% y 37% si se administraba durante el procedimiento de forma intravenosa, a dosis de 1 y 3 mg/kg respectivamente. Además, el fármaco mejoró de forma significativa el grado de disfunción sistólica post-infarto. Los autores encuentran una inhibición precoz de la respuesta inflamatoria a través de un menor acúmulo de neutrófilos y macrófagos en el miocardio reperfundido, y una inhibición en la secreción de ciertas citocinas de regulación inmune, atribuyendo el efecto beneficioso de la rosiglitazona a esta capacidad inmunomoduladora.

Finalmente, el último de los estudios investigó el efecto de varios agonistas de estos receptores PPAR: gamma, como rosiglitazona, ciglitazona y pioglitazona, y varios ligandos endógenos; y alfa, como clofibrato y otros ligandos endógenos. Utilizó también un modelo *in vivo* de isquemia miocárdica regional y reperfusión en ratas, y encontró que todas las moléculas analizadas mostraban un efecto favorable reduciendo el tamaño del infarto, siendo éste más llamativo con el ligando endógeno 15D-PGJ2, agonista de PPAR γ . Sus efectos cardioprotectores incluyeron: la activación de PPAR-alfa y gamma, la sobreexpresión de hemooxigenasa 1, una menor formación de quemocina MCP-1, la inhibición en la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1 y P-selectina y la inhibición de la activación isquémico-dependiente de NF- κ B, que a su vez produce reducción en la expresión de iNOS. Por tanto, el estudio concluyó que los diferentes ligandos analizados reducen la necrosis producida por la isquemia transitoria, y que este efecto es secundario a la modulación de la respuesta inflamatoria, siendo probablemente más trascendente en pacientes diabéticos.

Aparte del grupo de las tiazolidinedionas, se ha evaluado el efecto de otros fármacos que modulan la expresión de PGC-1 α sobre el área de necrosis en modelos animales de infarto de miocardio. Así, *Sun et al*⁴⁰ analizó el efecto de losartan, antagonista de los receptores de la angiotensina II, sobre el miocardio en riesgo tras isquemia inducida. La administración del fármaco por vía oral durante los 14 días posteriores a la ligadura temporal de la arteria coronaria izquierda disminuyó el grado de apoptosis en el área ventricular izquierda subsidiaria de la arteria afectada a través de un aumento en la expresión de PGC-1 α y una mejora consecuente en la integridad de las uniones intercelulares. Además, la fracción de eyección fue significativamente menor en el grupo no tratado.

A partir de los resultados de estos estudios experimentales, surge la necesidad de estudios con claro enfoque traslacional que complementen los datos obtenidos en el laboratorio de investigación básica y ayuden a determinar en un escenario clínico habitual el potencial papel protector de PGC-1 α frente al daño miocárdico producido por la isquemia, como podría ser tras un evento coronario.

1.5. Lesión por isquemia-reperfusión en el síndrome coronario agudo

1.5.1. Magnitud del problema

El daño miocárdico por isquemia-reperfusión es un tema de interés creciente en cardiología. Es bien conocido que la extensión de la necrosis post-infarto es el principal determinante de la supervivencia y calidad de vida de los pacientes con historia de cardiopatía isquémica, y que una parte significativa de esta muerte celular se produce durante la fase de restauración del flujo coronario⁴¹.

En los últimos años se ha producido un gran avance en la supervivencia y calidad de vida de los pacientes con enfermedad coronaria, debido esencialmente a la capacidad de restaurar el flujo coronario de forma precoz mediante estrategias de reperfusión. Pero a pesar de haber reducido de forma progresiva el tiempo de isquemia, factor esencial en la supervivencia de la célula, y siendo la revascularización coronaria la única alternativa para rescatar al miocárdico de su situación de anoxia, los pacientes con diagnóstico de SCACEST siguen presentando con frecuencia infartos extensos. Ello es debido en parte al daño por reperfusión, según el cual, la propia restauración del flujo sanguíneo desencadena una serie de procesos moleculares en la célula en riesgo que precipitan su muerte.

1.5.2. Base histológica de la lesión por reperfusión

El daño por reperfusión tiene unas características específicas cuyo conocimiento resulta esencial para su comprensión. Estudios en modelos celulares han demostrado el desarrollo de hipercontractura en los miocitos, que supone una desorganización de la citoarquitectura típica formando en el tejido la imagen histológica de necrosis en bandas de contracción, con acortamiento masivo de los miocitos y desestructuración sarcomérica por rotura de membranas celulares y liberación al medio extracelular de enzimas citosólicas⁴². Se considera que esta “hipercontractura” está causada por la coincidencia de la reenergización, la cual reactiva la actividad contráctil de las miofibrillas dependiente de ATP, en presencia de una concentración anormalmente elevada de calcio intracelular, producida por la pérdida de su homeostasis durante la isquemia previa, y todo ello genera en presencia de ATP una fuerza contráctil incontrolada y excesiva⁴³.

Podemos simplificar el estudio del daño por isquemia-reperfusión a través de un enfoque compartimentalizado: cambios a nivel citosólico, alteraciones en la estructura celular y reacciones en la mitocondria. En el citosol, los desequilibrios iónicos iniciales durante la isquemia incluyen, por un lado, la acidificación progresiva del citoplasma por glucólisis anaerobia, y por otro, el aumento sostenido de la concentración intracelular de calcio por fallo de la bomba Na^+/K^+ del sarcolema, que no opera en ausencia de energía y obliga a la célula a corregir el aumento de Na^+ intracelular a través del intercambiador de membrana Na^+/Ca^+ en su modo reverso, que no requiere energía para su funcionamiento. La restauración del flujo sanguíneo en este contexto celular produce un lavado rápido de catabolitos del medio extracelular, fundamentalmente H^+ , que da lugar a un gradiente de pH entre las células y su entorno, activando mecanismos de corrección

que incluyen de nuevo el intercambiador Na^+/Ca^+ , produciendo un influjo adicional de calcio intracelular. Como resultado de todos estos procesos de corrección en cadena, la célula reoxigenada acumula gran cantidad de calcio en su interior, comprometiendo en muchas ocasiones su integridad.

A nivel estructural, las alteraciones celulares pueden resumirse en tres acontecimientos fundamentales: en primer lugar, el desarrollo de edema celular por creación de un gradiente osmótico transarcolema secundario al lavado de metabolitos acumulados en el espacio extracelular, que favorece la entrada de agua en el miocito, con aumento de volumen y tendencia a la pérdida de integridad del mismo por fragilidad de la membrana celular; en segundo lugar, la activación de calpaínas, proteasas activadas por calcio, que producen proteólisis de estructuras del citoesqueleto subsarcolemal, y que se hallaban inhibidas por la acidosis durante la fase de isquemia⁴⁴; y en último lugar, la transmisión de la hipercontractura a los miocitos adyacentes a través de las uniones intercelulares tipo *gap junctions*, que facilitan la propagación célula a célula del daño por reperfusión y contribuyen de forma importante al tamaño final de los infartos⁴⁵.

Finalmente, en las mitocondrias destaca el cambio brusco que se produce en la permeabilidad de sus membranas, fenómeno conocido como transición de permeabilidad mitocondrial, que produce desacoplamiento de la respiración celular y un colapso energético incompatible con la supervivencia celular. Esto se traduce, entre otros procesos, en liberación del citocromo C (cyt c), que pone en marcha la cadena de señalización que conduce a la apoptosis celular^{46,47}. La sobreexpresión de iNOS en animales transgénicos tiene efectos cardioprotectores en modelos de isquemia mediante la disminución en la formación de ROS inducidos durante la fase de reperfusión y a través de la inhibición de la transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP)⁴⁸.

Recordemos que PGC-1 α y NO comparten rutas en la regulación de los mecanismos de protección mitocondrial frente a estrés oxidativo.

Otro componente del complejo mPTP que se ha estudiado en modelos de isquemia ha sido *adenine nucleotide traslocase 1* (ANT1), con expresión regulada por PGC-1 α y cuya actividad podría mediar la apoptosis celular miocárdica en situaciones de hipoxia mantenida⁴⁹. Así, los resultados de este estudio sugieren que la inducción transitoria de PGC-1 α podría atenuar la capacidad de recuperación miocárdica tras lesión por isquemia-reperfusión, y que la regulación al alza de ANT1 sería una condición esencial en este proceso. El rol fundamental de ANT1 en la tolerancia a procesos de estrés oxidativo se ve reforzado por el hecho que las células *knockdown* para ANT1 no presentan esta respuesta deletérea a la injuria por anoxia-reperfusión.

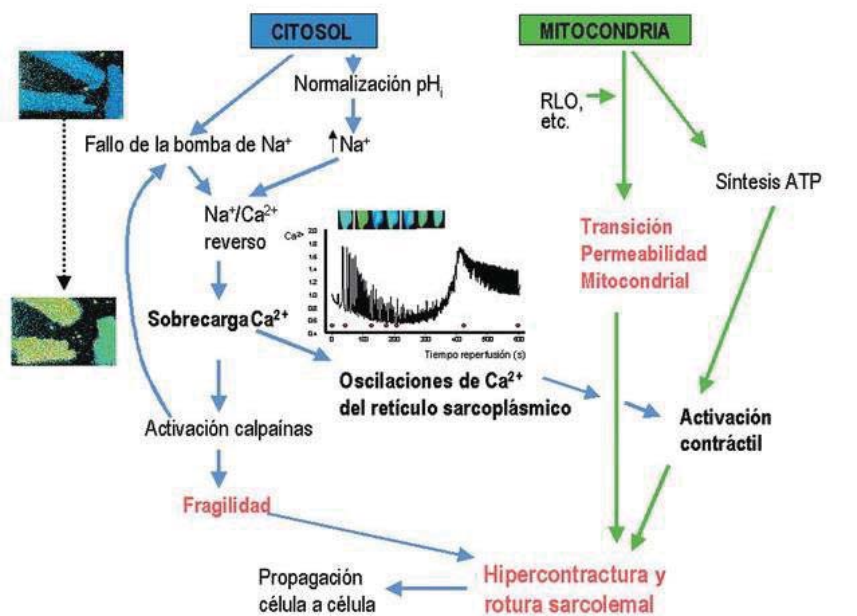


Figura 2. Representación esquemática de los mecanismos que conducen a la muerte celular durante los primeros minutos de reperusión. Ruiz-Meana M et al⁴¹

1.5.3. Ensayos clínicos centrados en la lesión por isquemia-reperfusión

Con todo esto, y a pesar del avance en el conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en el daño por isquemia-reperfusión, los intentos de la investigación biomédica por trasladar estos hallazgos a la práctica clínica han resultado generalmente un fracaso⁵⁰. Casos paradigmáticos incluyen el uso de cariporide o eniporide, inhibidores del intercambiador Na^+/H^+ , en ensayos clínicos multicéntricos a gran escala con pacientes diagnosticados de infarto agudo de miocardio o sometidos a cirugía de revascularización coronaria⁵¹⁻⁵³, o el uso de fármacos de ingeniería molecular que inhiben la formación de radicales libres de oxígeno, como la enzima superóxido dismutasa 2 (SOD) recombinante⁵⁴. Otros estudios a pequeña escala sí han logrado resultados más esperanzadores. Así, el empleo de ciclosporina A como inhibidor de la mPTP en pacientes con SCACEST sometidos a intervención coronaria percutánea consiguió reducir de forma significativa el tamaño del infarto, estimado por niveles plasmáticos de enzimas miocárdicas y también mediante resonancia cardíaca⁵⁵. También mediante una pequeña muestra, otro estudio demostró la importancia del postcondicionamiento isquémico sin uso concomitante de fármacos, en pacientes sometidos a revascularización percutánea primaria. Estos pacientes se beneficiaron del inflado transitorio y repetido del balón de angioplastia previo a la intervención definitiva, ya que presentaron una menor liberación de CK en las 72 horas siguientes, indicativa de un menor tamaño de infarto⁵⁶. Estudios similares de pequeño tamaño muestral obtuvieron resultados en el mismo sentido^{57,58}. Sin embargo, su traslación a un escenario clínico mediante la puesta en práctica de un ensayo aleatorizado resultó nuevamente desalentador. Así, *Bodí et al*⁵⁹ demostraron recientemente que el postcondicionamiento isquémico no consiguió reducir la presencia de obstrucción microvascular estimada por resonancia cardíaca en pacientes con SCACEST, en un

estudio bien diseñado, con las técnicas de imagen de mayor rendimiento diagnóstico, y asociando un modelo porcino (con la misma metodología) que tampoco halló diferencias significativas entre los grupos. Además, el postcondicionamiento no mejoró la fracción del eyección del ventrículo izquierdo ni el remodelado ventricular. Los resultados de este ensayo supusieron un punto de inflexión en la investigación clínica de las técnicas de condicionamiento isquémico.

1.6. Necesidad de un nuevo enfoque traslacional

1.6.1. Protocolos en estudios traslacionales de cardioprotección

El análisis de los motivos de este fracaso permite establecer una serie de conclusiones, que a modo de lección deberían tenerse en cuenta a la hora de enfocar una investigación orientada hacia la cardioprotección post-isquémica⁶⁰. En primer lugar, la necesidad de utilizar modelos animales de isquemia miocárdica que mimeticen en lo posible la presentación clínica de los pacientes con SCACEST, utilizando por ejemplo animales con hipercolesterolemia o diabetes mellitus inducidas. En segundo lugar, es esencial que los ensayos clínicos recluten pacientes dentro de una ventana temporal sintomática estrecha, idealmente entre 2 y 6 horas tras el inicio de la clínica. Con ello se consigue el objetivo de maximizar los cambios de un efecto positivo terapéutico, ya que pacientes revascularizados de forma muy precoz probablemente presenten infartos pequeños y el beneficio adicional de técnicas adjuntas sea mínimo, y por otro lado, pacientes con tiempos de isquemia muy prolongados poseen poco miocardio en riesgo susceptible de ser rescatado. En tercer lugar, y con la misma meta, es fundamental seleccionar pacientes que vayan a desarrollar infartos extensos, ya que a diferencia de los estudios con animales donde la dimensión del infarto puede ser estimada de forma sencilla a través de técnicas histológicas, en humanos probablemente

pequeños cambios en el tamaño de la necrosis no puedan ser discriminados con las técnicas de imagen actuales⁶¹. En cuarto lugar, debe tenerse en cuenta que el tamaño del infarto variará en gran medida en función de la arteria responsable del mismo y la presencia o no de circulación colateral, así como de la eficacia de la angioplastia percutánea. Por tanto, deberían incluirse sólo pacientes con enfermedad significativa del mismo vaso, sin circulación colateral, con la arteria ocluida antes de aplicar el tratamiento y con flujo TIMI (*Thrombolysis in myocardial infarction*) 3 tras la intervención. Por último, el diseño de los estudios clínicos no debería enfocarse hacia disminución de la mortalidad como objetivo primario, pues dada la eficacia actual del tratamiento del SCACEST y sus bajas tasas de mortalidad en el seguimiento, sería necesario un gran tamaño muestral para alcanzar dicho objetivo.

Así, aunque el reto de llevar a cabo estudios clínicos con el propósito de validar hallazgos de experimentación básica en el campo de la protección miocárdica tras la isquemia-reperfusión resulta ciertamente desafiante, la base científica establecida sugiere con fuerza que el objetivo de la cardioprotección en estos pacientes es alcanzable. Por tanto, adecuadamente orientados, los estudios que persigan este fin son prometedores y de gran relevancia clínica.

1.6.2. Bases metodológicas de nuestro enfoque traslacional

Teniendo en cuenta el carácter sistémico de la regulación mitocondrial en situaciones de estrés oxidativo, se creó en una primera fase del estudio desarrollada en el laboratorio de experimentación básica, un modelo animal para establecer un protocolo de medición de los niveles de expresión de PGC-1 α en células sanguíneas circulantes, en concreto en población linfocitaria. De esta manera, este protocolo

permitió estimar posteriormente en pacientes la inducción de la molécula a partir de las mediciones realizadas en muestras de sangre periférica.

Dado que los ratones no desarrollan de forma espontánea placas de ateroma, el estudio de la aterosclerosis en esta especie requiere el uso de modelos *knock-out* para ApoE, polipéptido básico de las lipoproteínas de alta y baja densidad, cuya disfunción o ausencia genera aterosclerosis de manera espontánea por acúmulo de colesterol circulante^{62,63}. Además, tratando de aproximar el papel de la disfunción mitocondrial causada por factores de riesgo cardiovascular como la dislipemia o la hiperglucemia en el desarrollo de aterosclerosis, los ratones son sometidos a dietas ricas en grasa y colesterol, o tratados con estreptozotina para inducir diabetes tipo I. Estas condiciones tratan de mimetizar en lo posible la experimentación animal con la clínica, y son esenciales para la reproducibilidad de los resultados, dado que la diabetes fundamentalmente, pero también otros factores de riesgo clásicos capaces de inducir un síndrome metabólico, se asocian con una disminución en la expresión de PGC-1 α ^{64,65}.

Tras esta fase experimental previa, se diseñó un estudio clínico en pacientes con diagnóstico de SCACEST. De esta forma, obteniendo muestras de sangre a la llegada de los pacientes al centro hospitalario, y analizando inmediatamente el nivel de expresión basal de PGC-1 α en la población linfocitaria aislada, se consigue una información indirecta sobre los procesos moleculares que ocurren en el tejido cardíaco durante el infarto. Con el objetivo de evaluar cambios significativos en el nivel de expresión y analizar si existe inducción de la molécula en ciertos pacientes, resultó necesario la obtención de una segunda muestra sanguínea tras la fase aguda del evento.

Por otra parte, evaluar el daño miocárdico tras la isquemia por métodos no invasivos resulta todavía un reto tecnológico en la actualidad. Afortunadamente, con el desarrollo y expansión de la resonancia magnética cardíaca (RMC) como método de evaluación de

la función y la estructura cardíaca se ha conseguido solventar en alto grado este problema.

Una tercera fase del proyecto trató de evaluar de forma directa la correlación en el nivel de expresión de PGC-1 α entre muestras sanguíneas y tejido miocárdico. Para ello, se diseñó un nuevo estudio en pacientes sometidos a cirugía cardíaca que permitió comparar de forma simultánea la expresión de la molécula y sus dianas génicas en biopsias cardíacas y linfocitos de sangre periférica. Los resultados de este trabajo tuvieron como objetivo validar los hallazgos de los estudios previos y reforzar el valor del protocolo de estimación no invasiva de la expresión de PGC-1 α en pacientes con enfermedad cardiovascular.

1.7. Estudios de imagen cardíaca por resonancia magnética

1.7.1. Papel de la resonancia en la cardiopatía isquémica

En los últimos años diversos estudios han examinado el papel de la RMC en la estimación tanto del tamaño del infarto como del área de miocardio en riesgo en los pacientes con SCA^{66,67}. Tras un evento coronario, en el miocardio afectado podemos encontrar dos situaciones bien diferenciadas. Por un lado, tejido necrótico sin posibilidad de recuperación, y por otro, músculo viable, que puede haber recuperado incluso

la contractilidad o permanecer disfuncionante pero con potencial de recuperación. La disfunción contráctil secundaria a la lesión isquémica a pesar de una adecuada repercusión se conoce como contusión o aturdimiento miocárdico, que se diferencia clásicamente de la hibernación, otra forma de disfunción contráctil reversible, en la cual la disfunción es debida a la reducción mantenida del flujo coronario, con la consiguiente

reducción del metabolismo tisular. Debido a la posibilidad de recuperación de este tejido, la capacidad de detectarlo mediante técnicas no invasivas puede ser de gran utilidad en el manejo de estos pacientes.

1.7.2. Viabilidad miocárdica tras infarto de miocardio

La RMC tiene la habilidad única de evaluar diferentes patrones de viabilidad miocárdica de probado valor. La valoración de la escara necrótica, de la perfusión coronaria y de la reserva contráctil puede llevarse a cabo de forma fiable y reproducible⁶⁸⁻⁷⁰. La imagen directa de la necrosis miocárdica es posible mediante el uso de secuencias en T1 tras la administración de gadolinio intravenoso, un tipo de contraste que permite visualizar áreas de tejido brillantes o “con realce”, comúnmente conocidas como zonas de realce tardío de gadolinio (RTG), y que representan en el contexto del SCA, necrosis cardíaca sin posibilidad de recuperación, y por tanto, no viables. Resulta asimismo útil el asesoramiento de la RMC en la evaluación de la reserva contráctil a través de la administración de fármacos inotrópicos como la dobutamina. Además, la RMC se ha convertido en los últimos años en una excelente técnica de imagen para la realización de tests de isquemia, utilizando fármacos como el dipiridamol cuya base diagnóstica se fundamenta en el fenómeno de robo de flujo coronario de las arterias sanas sobre aquellas con estenosis.

1. 7.3. Edema miocárdico y miocardio salvado

Pero quizá el mayor avance de la RMC en el contexto de la investigación sobre protección miocárdica en los SCA haya sido la identificación del miocardio en riesgo basada en la detección de edema cardíaco utilizando secuencias especiales potenciadas en T2^{71,72}. El edema miocárdico es la consecuencia directa del fenómeno inflamatorio

desencadenado por el evento isquémico agudo, y representa un aumento del agua intersticial secundario a daño por reperfusión, por afectación del mecanismo de transporte iónico transmembrana que conduce a un aumento celular de sodio⁷³. Puede evaluarse en la mayoría de pacientes tras un SCACEST, de forma fácilmente integrada en el estudio habitual de RMC, y aún siendo un hallazgo transitorio, su presencia es casi constante en las fases evolutivas precoces. Por tanto, puede utilizarse para detectar daño miocárdico reciente, pues el RTG no diferencia entre infarto de miocardio agudo y crónico. Pero la principal ventaja del estudio del edema miocárdico es su estrecha correlación con el área de miocardio que ha permanecido con isquemia incluso una vez se ha producido la reperfusión, por lo que la cuantificación del tejido necrótico en relación al tejido con edema permite diferenciar el miocardio salvado tras la reperfusión⁷⁴. Además, la extensión del edema se ha relacionado con mayores volúmenes ventriculares y mayor disfunción sistólica en la evolución post-infarto, con infartos más extensos y mayor OMV, y mayor incidencia de eventos cardiovasculares mayores⁷⁵. Asimismo, el índice de miocardio salvado se relaciona bien con parámetros pronósticos utilizados habitualmente en el contexto del SCA: tanto clínicos, como puede ser el tiempo de retraso en la implantación de la terapia de reperfusión; como angiográficos, , por ejemplo el flujo TIMI; y electrocardiográficos, como la resolución de la elevación del segmento ST.

1.7.4. Utilidad clínica en cardiopatía isquémica

En resumen, el estudio de RMC permite, por un lado y a través de secuencias en T1, determinar el tamaño de la necrosis tras el SCA, constituida por tejido no viable y que formará en la evolución la escara del infarto. Y por otro lado, a través de secuencias especiales potenciadas en T2, permite estimar el área de edema miocárdico, que incluye

todo el miocardio en riesgo, viable y no viable. Por tanto, la relación entre ambos parámetros permite estimar la cantidad de miocardio salvado por la estrategia de reperfusión.

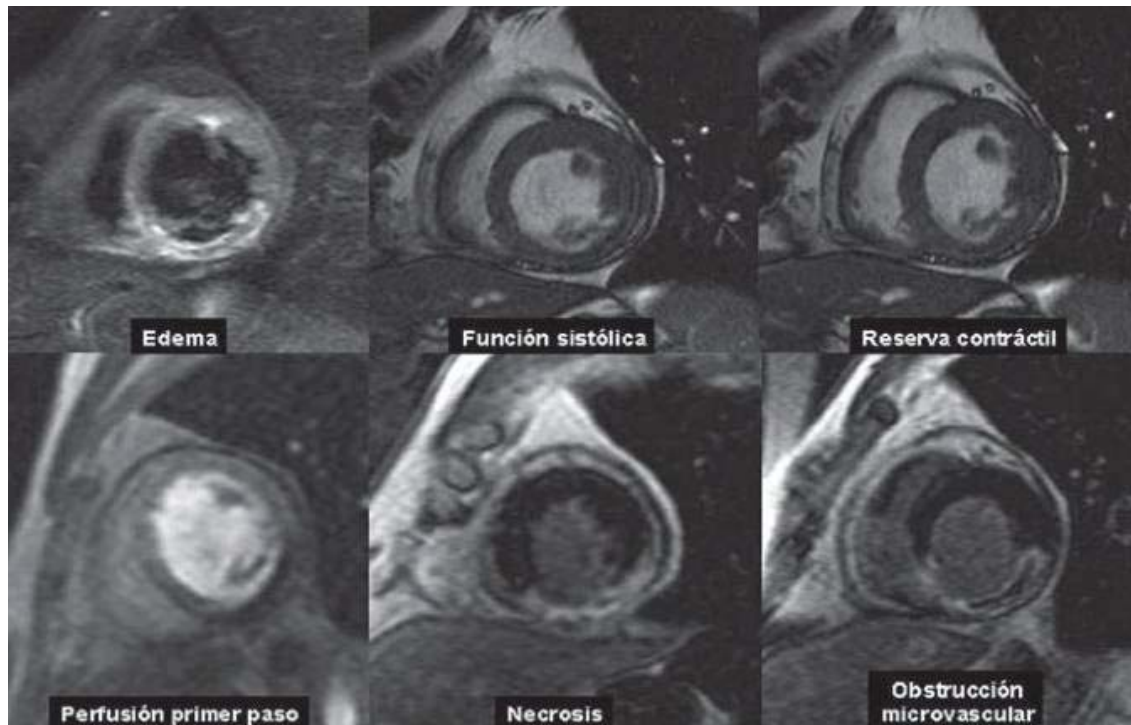


Figura 3. Información que puede obtenerse a través de las diferentes secuencias de resonancia cardíaca en el infarto agudo de miocardio. Ejemplo de pacientes con infarto de localización inferior. Monmeneu JV et al⁷²

2.- Hipótesis de trabajo

2.- Hipótesis de trabajo

PGC-1 α es un coactivador transcripcional que regula múltiples genes implicados en el metabolismo energético y la biogénesis mitocondrial, y ejerce un papel fundamental como regulador maestro en la defensa celular frente a situaciones de estrés oxidativo. En este contexto, se ha demostrado en estudios de experimentación básica su rol central en la respuesta celular al daño por isquemia-reperfusión en modelos de infarto de miocardio e incremento de poscarga cardiaca. Sin embargo, su participación en un escenario clínico no ha sido evaluada previamente.

Con esto, y asumiendo su papel en la regulación de la respuesta celular frente a estrés oxidativo en el tejido miocárdico tras un SCA, se planteó el presente trabajo clínico. La evaluación de la molécula se basó en dos pilares fundamentales: por una parte, la determinación del nivel de expresión en células sanguíneas, como estimación indirecta tanto de la expresión basal de la molécula como su inducción en el miocardio tras el evento coronario, a través de análisis de biología molecular; y por otro lado, la estimación tanto del tamaño de la necrosis como del área de miocardio en riesgo según los estudios de RMC.

El desarrollo del estudio implicó, por tanto, una primera fase experimental para elaborar un protocolo de extracción y análisis de muestras, una segunda fase clínica en pacientes con SCA para la generación de resultados que permitieran corroborar o descartar la hipótesis en un escenario de práctica habitual, y una tercera fase desarrollada en pacientes sometidos a cirugía cardiaca que permitiera validar la correlación en la expresión de PGC-1 α entre el miocardio y las muestras sanguíneas obtenidas según el protocolo establecido en la primera fase.

3.- Objetivos

3.- Objetivos

El presente trabajo se diseñó con el objetivo de evaluar el papel de PGC-1 α en la protección miocárdica durante los procesos de isquemia-reperfusión, basándonos en el papel maestro de la molécula en la regulación de la actividad mitocondriales y el control del estrés oxidativo celular.

Se plantearon los siguientes objetivos:

- Determinar si el grado de expresión sistémica de PGC-1 α puede estimarse de forma no invasiva a partir de aislados de células mononucleares procedentes de sangre periférica, a través de un protocolo sencillo y reproducible de obtención de muestras.
- Evaluar la variabilidad en la expresión de PGC-1 α en función de las características clínicas del paciente, especialmente según la prevalencia de enfermedades metabólicas.
- Evaluar si los niveles de expresión basal de PGC-1 α y la inducción de la molécula tras un síndrome coronario agudo con elevación del segmento ST se correlacionan con el tamaño del infarto, el área miocárdica en riesgo, la función sistólica y el remodelado ventricular en la evolución a largo plazo.
- Determinar si la expresión tanto de PGC-1 α como de sus dianas génicas en sangre periférica utilizando el protocolo del estudio se correlaciona con la expresión en tejido miocárdico, analizando variaciones en expresión en función de la prevalencia de enfermedades metabólicas y el estado inflamatorio.

4.- Métodos

4.- Métodos

4.1. Fases del estudio

La línea de investigación del estudio se desarrolló en varias fases diferenciadas, con diseños ajustados a objetivos intermedios bien definidos, y con el fin último de caracterizar clínicamente el papel de PGC-1 α en tejido miocárdico en el contexto de SCA.

4.1.1. Primera fase: desarrollo de un protocolo de análisis no invasivo para la evaluación de la actividad de PGC-1 α y estudio de su papel en el síndrome coronario agudo.

En la fase inicial del estudio, de marcado carácter experimental, se evaluó el grado de expresión de PGC-1 α en sangre periférica en un modelo animal y se seleccionó la población celular con mayor nivel de expresión. Posteriormente se elaboró un protocolo de extracción y análisis de muestras en humanos, y se evaluaron en un contexto clínico bien definido (pacientes con primer episodio de SCACEST) las variaciones del grado de expresión de PGC-1 α y sus dianas, y su posible implicación en la evolución del mismo.

4.1.2. Segunda fase: evaluación clínica de la correlación entre la expresión de PGC-1 α y la evolución post-infarto.

En esta segunda fase del proyecto, se reclutó una nueva muestra de pacientes con SCACEST, seleccionando en este caso sólo aquellos con infartos de localización anterior para obtener una muestra más homogénea, y se trataron de correlacionar los

distintos patrones de activación de PGC-1 α durante el infarto con las consecuencias estructurales en la evolución a corto y medio plazo, evaluando la extensión tanto del edema como de la necrosis miocárdica, así como el desarrollo de remodelado ventricular a largo plazo.

4.1.3. Tercera fase: correlación de la expresión de PGC-1 α a nivel miocárdico y periférico

La fase final del estudio se planteó con el objetivo de confirmar la correlación en el grado de expresión de PGC-1 α y sus dianas entre el tejido miocárdico y en leucocitos circulantes procedentes de sangre periférica, pues esta premisa resultaba fundamental para consolidar los hallazgos de los estudios previos. Para ello, se seleccionó una muestra de pacientes sometidos a cirugía cardíaca que permitiera la obtención simultánea de ambos tipos de muestras (sangre y miocardio).

4.2. Estudio preclínico

4.2.1. Animales

Ratones *knock-out* para PGC-1 α (PGC-1 α ^{-/-}) C57BL6 fueron suministrados originalmente por el laboratorio del Dr Bruce Spiegelman (Dana Farber Cancer Institute, Boston, Massachusetts, Estados Unidos). Posteriormente, se creó una colonia en el animalario del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC) de Madrid.

Se utilizaron para los experimentos animales macho C57BL6 PGC-1 α ^{+/+} y PGC-1 α ^{-/-} de 6 a 8 semanas de vida. Los animales fueron sacrificados según los protocolos del Comité de Uso y Cuidado de Animales del CNIC, y mediante disección aséptica se obtuvo el bazo y el timo.

4.2.2. Obtención y procesamiento de muestras celulares en animales

Las suspensiones celulares de tejido tímico y esplénico se obtuvieron por lisado mecánico de los órganos utilizando el émbolo de jeringas que contenían una solución fría de PBS suplementado con EDTA (2 mM) y FBS (0.1%). Los eritrocitos de las muestras se eliminaron incubando las células en un búfer (ACK Lysing) durante 5 minutos a 4°C.

Los esplenocitos y timocitos obtenidos así, se procesaron posteriormente mediante lavado en un medio de cultivo específico (RPMI 1640, suplementado con 10% de FBS, 10 mM de HEPES, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato sódico, 1% de aminoácidos no esenciales, 100 U/mL de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomicina) y filtrado a través de tamiz de nylon de 70 μ m. Finalmente, las células se ajustaron a una concentración final uniforme de 10⁶ células/mL. La estimulación de células esplénicas se realizó con el fragmento F(ab')₂ de anticuerpo anti-IgM (1 μ M/ml; Jackson immunoresearch).

4.2.3. Análisis mitocondrial en animales

La masa mitocondrial se estimó utilizando marcador fluorescente MitoTracker Green. De forma resumida, se incubaron durante 30 minutos a 37°C 2.5 x 10⁵ esplenocitos en placas de 96 pocillos con una solución de PBS con 0.1 micromoles de MitoTracker

Green (Invitrogen). Posteriormente se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4% durante 15 minutos. Finalmente, se utilizó un citómetro FACSCanto II (Becton Dickinson) para medir la intensidad de fluorescencia. Los datos se analizaron con el software FACSDiva (Becton Dickinson).

4.2.4. Preparación de células mononucleares de sangre periférica

En todos los pacientes, las muestras de sangre periférica se obtuvieron mediante tubos VacutainerTM con EDTA (6-8 mL). Se aislaron células mononucleares por centrifugación en gradiente de densidad mediante técnica de Ficoll-Hypaque (Ficoll-PaqueTM, Miltenyi Biotec). Los aislados celulares resultantes se procesaron utilizando citocentrifugación y tinción rápida panóptica (Panreac). Solo se utilizaron para el análisis los preparados con más del 90% de células mononucleares.

4.2.5. Adquisición de biopsias de tejido miocardio

En la última fase del estudio, se obtuvieron biopsias endomiocárdicas durante la cirugía de recambio valvular aórtico. De forma resumida, tras el clampaje de la aorta y la canulación del sistema de circulación extracorpórea, el corazón se sometió a cardioplejía con solución fría. El acceso endoventricular se realizó a través de aortomía oblicua a 10-15 mm sobre la unión sinotubular. Los especímenes endomiocárdicos se escindieron con bisturí frío del septo ventricular basal izquierdo, y se conservaron inmediatamente en solución *RNAlater*[®].

4.2.6. Análisis bioquímicos

El ARN total procedente de los aislados celulares y las biopsias cardíacas se aisló utilizando el reactivo Trizol™ (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se analizó la calidad del ARN mediante Bioanalyzer y se cuantificó en un Nanodrop. Se utilizó para los análisis ARN con una tasa de absorbancia entre 260 y 280 $\geq 1,8$ y un número de integridad de ARN (RIN) ≥ 8 . Se determinó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa de ADNc retrotranscrito (qRT-PCR) la expresión relativa de ARN tanto de PGC-1 α como de algunas de sus dianas génicas, lo que permitió una comparación interindividual de la misma a través de un análisis por pares (estimación de la cantidad de molécula en función del nivel de detección de la misma en los ciclos de PCR, hasta un máximo de cuarenta ciclos). Se analizó la expresión de dianas génicas de PGC-1 α como cyt c (componente de la cadena de transporte electrónico mitocondrial), SOD y glutatión peroxidasa (GPx) (componentes importantes del sistema de protección frente al estrés oxidativo mitocondrial), θ y adenine nucleotide translocator 1 (ANT1) (proteína mitocondrial-implicada en la inducción de apoptosis en situaciones de isquemia), utilizando sondas específicas. Además, en la última fase del estudio, se evaluó también la expresión de *AMP-activated protein kinase* (AMPK) and *silent information regulator 2 homolog 1* (SIRT-1), dos importantes activadores de PGC-1 α en respuesta a estrés metabólico y oxidativo. AMPK y SIRT-1 son sensores metabólicos que pueden modificar directamente la actividad de PGC-1 α mediante modificaciones postranscripcionales⁷⁶. AMPK se activa en respuesta a un aumento en AMP, cuando bajan los niveles de ATP disponibles, y SIRT-1 se activa cuando disminuye la biodisponibilidad de equivalentes reductores (NADH⁺) y aumentan los niveles de NAD⁺, es decir cuando la fuente de energía metabólica esta restringida y está alterado el equilibrio redox. De esta manera, la fosforilación mediada

por AMPK y la deacilación mediada por SIRT-1 resulta en un incremento de los niveles y actividad PGC-1 α al aumentar su vida media y facilitar su interacción con cofactores.

Por otra parte, con el objetivo de confirmar el impacto funcional de los cambios en expresión génica en algunos casos se determinaron así mismo los niveles proteicos tanto de PGC-1 α como de sus dianas mediante *Western-Blot* convencional ó mediante análisis masivo por Zeptosens, según el caso.

4.2.7. Evaluación del estado REDOX.

En la última fase del proyecto se evaluó el estado general REDOX en muestras de plasma de los pacientes mediante la técnica TroloxTM (Equivalent Antioxidant Capacity assay). Trolox es un análogo soluble de la vitamina E. El método se basa en la función como scavenger del radical 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS \bullet), cromógeno soluble que se convierte en un producto incoloro cuando reacciona con el radical ferril de la mioglobina (un producto de la reacción entre el peróxido de hidrógeno y la metamioglobina). La determinación de la concentración de Trolox, es un método ampliamente utilizado para la evaluación del estado REDOX en estudios tanto clínicos como preclínicos.

4.3. Investigación clínica

4.3.1. Población de estudio

- *Primera fase:* Se seleccionaron de forma prospectiva 49 pacientes atendidos en nuestro centro hospitalario con diagnóstico de SCACEST y estrategia reperfusión,

durante el período comprendido entre marzo y septiembre de 2009. Los criterios de inclusión fueron: episodio coronario de debut, edad inferior a 80 años, y terapia de reperfusión farmacológica o mecánica (trombolisis efectiva y coronariografía precoz, angioplastia primaria, o trombolisis fallida seguida de angioplastia de rescate). Siguiendo las guías de práctica clínica de la Sociedad Europea de Cardiología⁷⁷, se estableció el diagnóstico de infarto agudo de miocardio con elevación persistente del segmento ST en aquellos pacientes que presentaban síntomas sugestivos de isquemia coronaria, elevación persistente del segmento ST en el electrocardiograma y elevación típica de biomarcadores de necrosis miocárdica. Inicialmente los pacientes fueron informados verbalmente de su participación en el estudio, firmando posteriormente el correspondiente consentimiento informado, aprobado por el Comité de Investigación y Ensayos Clínicos del hospital. Los criterios iniciales de exclusión fueron: antecedentes de cardiopatía isquémica documentada o de clínica anginosa previa sugerente de enfermedad no filiada, con el fin de evitar sesgos en la determinación de la extensión de la necrosis miocárdica en los estudios de RMC; evolución del evento superior a 150 minutos, desde el inicio del dolor o la sintomatología de sospecha hasta la extracción de la primera muestra sanguínea para el análisis molecular, evitando así en la medida de lo posible que los procesos moleculares de transcripción de ARN y síntesis proteica interfirieran en la situación basal de expresión de las diferentes dianas génicas; y/o finalmente, negativa del paciente a participar en el estudio o a la firma del consentimiento informado.

- *Segunda fase:* Se incluyeron prospectivamente 31 pacientes con diagnóstico de SCACEST exclusivamente de localización anterior y sometidos a estrategia de

reperfusión en el periodo comprendido entre junio de 2009 y mayo de 2011. Los criterios de inclusión fueron: primer episodio de SCACEST, localización anterior del infarto con lesión responsable en segmento proximal o medio de la arteria coronaria descendente anterior, y terapia de reperfusión mediante angioplastia primaria o de rescate. Al igual que en el estudio previo, se tuvieron en cuenta las guías de práctica clínica de la Sociedad Europea de Cardiología⁷⁷. Inicialmente los pacientes fueron informados verbalmente de su participación en el estudio, y luego firmaron el correspondiente consentimiento informado, aprobado por el comité ético y de investigación del hospital. Los criterios de exclusión fueron: antecedentes de cardiopatía isquémica documentada, con el fin de evitar sesgos en la determinación de la extensión de la necrosis miocárdica en los estudios de resonancia magnética cardiaca; estenosis significativa de cualquier arteria principal excepto la causal del infarto en el estudio angiográfico; evolución del infarto agudo de miocardio sin elevación del segmento ST > 150 min desde el inicio del dolor o síntomas de sospecha y la extracción de la primera muestra sanguínea para el análisis molecular, para evitar que los procesos moleculares de transcripción de ARN y síntesis proteica interfirieran en la estimación de la expresión basal de las diferentes dianas génicas en el sujeto de estudio, y/o, finalmente, negativa del paciente a participar en el estudio. Asimismo se excluyó a los pacientes con reinfarcto en las primeras 72 h, contraindicación para el estudio de cardiorresonancia magnética ó negativa del paciente.

- *Tercera fase:* Se utilizó una cohorte prospectiva de 35 pacientes remitidos a nuestro centro de forma electiva para recambio valvular aórtico entre junio y diciembre de 2014. Los criterios de inclusión fueron: diagnóstico de estenosis aórtica grave con indicación quirúrgica, con o sin enfermedad coronaria

concomitante; no episodios de descompensación de insuficiencia cardiaca ni eventos coronarios agudos en los 3 meses previos; y ser mayor de edad con capacidad para firmar el consentimiento informado. Se seleccionaron sólo pacientes estables con enfermedad valvular aórtica con el objetivo de homogeneizar en lo posible la población de estudio, en relación tanto a características clínicas y quirúrgicas como a protocolo de extracción de muestras.

4.3.2. Protocolo de recogida de las muestras

- *Primera fase:* A su llegada al centro, previo a cualquier intervención terapéutica, se obtuvo una muestra de sangre periférica en un volumen no inferior a 6 mL, conservada en tubo con EDTA y en un lugar refrigerado, con una temperatura mantenida entre 4-8°C, hasta su análisis posterior, siempre antes de las 12 horas. Con el fin de evaluar cambios dinámicos en la expresión de la molécula, la extracción sanguínea se repitió a las 72 horas (+/- 12 horas), siguiendo la misma metodología.
- *Segunda fase:* Se siguió la misma metodología en la extracción de muestras.
- *Tercera fase:* En este estudio, dado que el objetivo final fue evaluar el grado de correlación en la expresión de PGC-1 α en un momento determinado, sólo se obtuvo una muestra de sangre periférica (siguiendo el protocolo previamente detallado), en el momento de la intervención quirúrgica. Las biopsias de músculo cardiaco se obtuvieron de forma simultánea a las muestras sanguíneas según el método descrito más arriba.

4.3.3. Datos clínicos durante el ingreso

- *Primera fase.* A nivel clínico, se recogió la siguiente información de los individuos de la muestra durante su ingreso en el servicio de cardiología: datos de filiación, procedentes de la unidad de documentación del hospital; historia clínica del paciente, con todos los antecedentes médicos y quirúrgicos de interés; datos antropométricos incluyendo peso, talla e índice de masa corporal; factores de riesgo cardiovascular clásicos: hipertensión arterial, dislipemia, diabetes, tabaquismo y otros hábitos tóxicos, antecedentes familiares de cardiopatía; medicación habitual domiciliaria, por principio activo y dosis; valores analíticos rutinarios como glucosa en ayunas (media de tres valores, obtenidos durante el ingreso, idealmente en días no consecutivos, y determinada en mg/dL), hemoglobina y hematocrito (media de dos valores durante el ingreso, en mg/dL y % respectivamente), fórmula leucocitaria, incluyendo leucocitos, linfocitos y monocitos (valores en admisión de urgencias y a las 72 horas, en valores absolutos -miles/mL- y relativos -porcentaje-), proteína C reactiva no ultrasensible (valor en admisión de urgencias, en mg/dL), creatinina y filtrado glomerular según la fórmula MDRD (media de dos valores durante el ingreso, expresado en mg/dL y en mL/kg/minuto respectivamente), perfil lipídico (medida única durante el ingreso, incluyendo colesterol total, HDLc, LDLc y triglicéridos, expresados en mg/dL), hemoglobina glicada o Hb1Ac (medida única durante el ingreso, expresada en porcentaje) y enzimas de daño miocárdico (valores pico, expresados en microgramos/mL), incluyendo troponina I no ultrasensible (TnI), creatinquinasa (CK) y creatinquinasa-MB masa (CKMB); localización de la elevación del segmento ST en el momento de la admisión a urgencias, así como la aparición de

BRIHH o fibrilación auricular en el electrocardiograma en cualquier momento del ingreso; estrategia de reperfusión utilizada: trombolisis y coronariografía precoz, ACTP primaria o ACTP de rescate; número de arterias coronarias enfermas y grado de estenosis en las mismas, considerando estenosis significativa >50% de la luz del vaso en el caso del tronco de la arteria coronaria izquierda, o bien >75% del lumen arterial en el caso de los vasos epicárdicos (arteria descendente anterior, arteria circunfleja y arteria coronaria derecha) o sus ramos principales; datos del estudio ecocardiográfico, realizado durante el ingreso (entre el tercer y séptimo día tras el evento) de forma indistinta por dos cardiólogos acreditados y experimentados en la técnica; se analizaron medidas referentes al estudio en modo M y 2D (diámetros de ventrículo izquierdo y derecho y aurículas, volúmenes de ventrículo izquierdo y aurícula izquierda, diámetros de grandes vasos); la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) estimada por la fórmula de Simpson, y expresada en porcentaje; el índice de contractilidad segmentaria (ICS), que reconoce 17 segmentos ventriculares izquierdos y puntúa cada uno de ellos del 1 al 4 en función de su movilidad: normal, hipocinesia, acinesia y discinesia respectivamente; también se anotó la presencia de valvulopatías significativas; datos de la ergometría en tapiz rodante (en caso de realizarse): se anotaron los METS finales (unidades que representan equivalentes metabólicos de consumo de oxígeno, reproducibles y reconocidas universalmente; 1 MET es igual a 3.5 mL O₂/kg·min), el doble producto basal y máximo (entendido como la multiplicación de la frecuencia cardíaca por la cifra de tensión arterial al inicio y en el pico de esfuerzo), y el resultado clínico (aparición de angina o disnea franca, hipotensión con el esfuerzo o cuadro vegetativo intenso que impide la continuación de la prueba) y eléctrico (descenso del segmento ST de >1 mm (0,1 mV) en dos o más

derivaciones precordiales consecutivas, siguiendo un trayecto horizontal o descendente y medido a 80 ms del punto J; así como la elevación del ST o la aparición de arritmias ventriculares)^{78,79}.

- *Segunda fase:* a excepción del método de reperfusión, que en este estudio fue en todos los casos angioplastia primaria, y los datos de la ergometría, que no se tuvieron en cuenta, el resto de variables se obtuvieron siguiendo la misma metodología descrita previamente.
- *Tercera fase:* se obtuvieron las mismas características clínicas que en fases previas, con especial interés en la recogida detallada de parámetros analíticos relacionados con la respuesta inmune: fórmula leucocitaria previa a la cirugía y a las 48h, proteína C reactiva basal, a las 24h y 48h, y lactato basal, a las 8h, 24h y 48h.

4.3.4. Estudios de resonancia cardiaca

Todos los estudios de RMC se realizaron con una unidad de 1.5 teslas (T) (Magnetom Sonata, Siemens, Erlangen, Alemania) en la sección de imagen cardiaca del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia.

Las imágenes funcionales de eje corto y eje largo se obtuvieron utilizando secuencias sincronizadas con electrocardiograma de superficie SSFP (*Steady State Free Precession*), con los siguientes parámetros: corte de 8 mm de grosor con 2 mm de separación entre las secuencias en eje corto, según práctica clínica habitual. Mediante el trazado manual de los bordes endocárdico y epicárdico en todos los cines en eje corto se cuantificaron los volúmenes de ambos ventrículos de forma indexada (por superficie

corporal, en mL/m²), la fracción de eyección biventricular por el método de Simpson (en %), y la masa miocárdica de ambos ventrículos (en gramos/m²).

La detección de edema miocárdico se llevó a cabo usando imágenes en eje corto de sangre negra, potenciadas en T2 en los mismos cortes que los utilizados en las secuencias cine, usando una detección multisección HASTE (*Half-Fourier Acquisition Single-shot Turbo spin Echo*), con los siguientes parámetros: intervalo de 2 R-R, con ET de 33 ms e IT de 170 ms, grosor de corte de 8 mm con 2 mm de separación entre los mismos, ángulo de giro de 160°, matriz de 256x151 y ancho de banda de 781 Hz/píxel. En caso de obtener imágenes de pobre calidad, se utilizaron secuencias segmentadas en TSE (*Turbo Spin-Echo*), con los siguientes parámetros: intervalo de 2 R-R, ET de 100 ms y tiempo de inversión (IT) de 170 ms, grosor del corte de 8mm con separación entre los mismos de 2 mm, ángulo de giro de 180°, matriz de 256x146 y ancho de banda de 235 Hz/píxel.

Las imágenes de RTG fueron adquiridas tras administración intravenosa de 0.15 mL/kg de dimeglubina gadobenato 0.5 M. Se obtuvieron secuencias SSFP en apnea sincronizadas con electrocardiograma de superficie en eje corto siguiendo los mismos planos que en las secuencias cine, entre uno y dos minutos después de la administración del contraste, permitiendo discriminar así miocardio normal de miocardio necrótico. Esta condición permite además determinar áreas de OMV. Diez minutos después del contraste, los mismos cortes en eje corte se repitieron ajustando el IT a miocardio normal y usando secuencias SSFP de disparo simple, en apnea, sincronizadas con electrocardiograma, y posteriormente secuencias en apnea 2D y 3D turbo-FLASH (*Fast Low Angle Shot*).

Tanto para la descripción de las alteraciones de la contractilidad como para definir la localización de las áreas de edema y las imágenes de RTG obtenidas en los cortes de eje corto y eje largo, se utilizó un modelo cardíaco estándar de 17 segmentos⁸⁰.

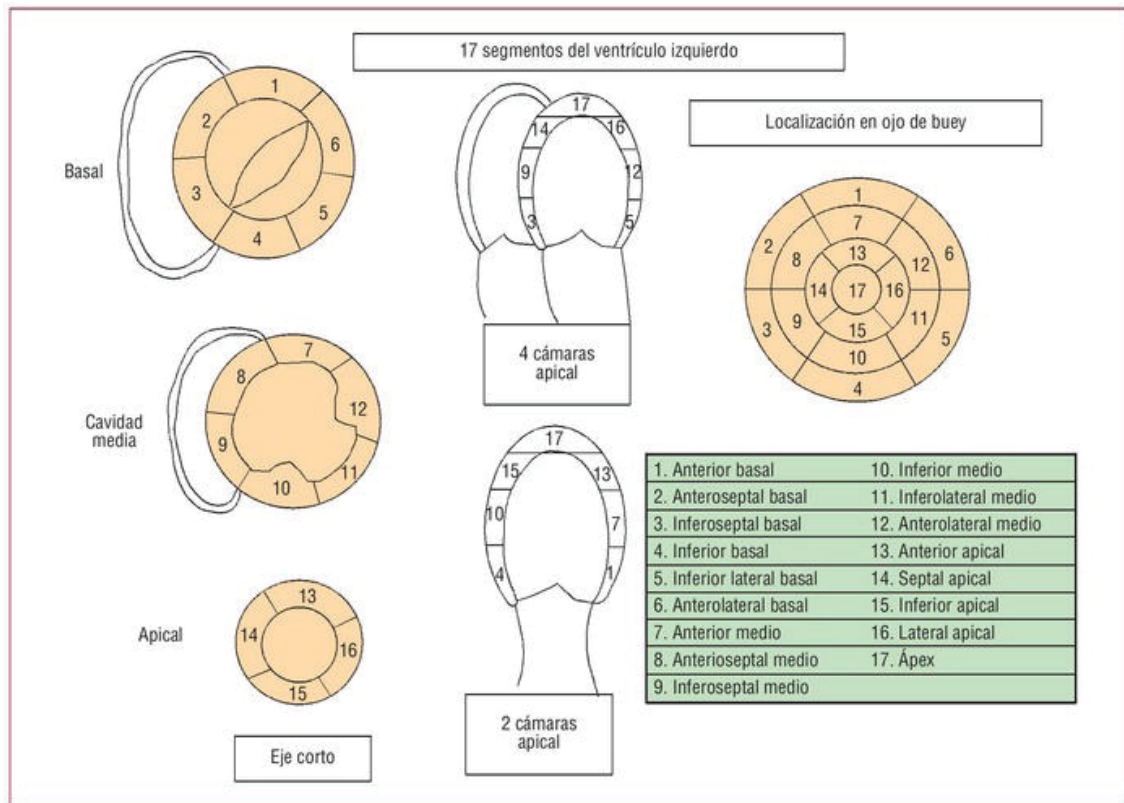


Figura 4. Clasificación de los 17 segmentos del ventrículo izquierdo en la imagen de ojo de buey y en los cortes ecocardiográficos paraesternal eje corto y apical de cuatro y dos cámaras⁸⁰.

Los defectos de perfusión se describieron visualmente en función del déficit persistente de primer paso de contraste. Se identificaron áreas de alta intensidad en T2 por inspección visual. El hallazgo de áreas de baja intensidad rodeadas de zonas de alta intensidad de señal en estas imágenes se consideró indicativo de OMV. También se determinó presencia de OMV ante la existencia de regiones sin señal dentro áreas de RTG, según inspección visual.

Se consideró transmuralidad la necrosis de >50% del espesor de miocardio. El edema miocárdico y las áreas de RTG se estimaron trazando manualmente las regiones,

expresando los valores en porcentaje respecto a la masa miocárdica total, calculada a su vez por el trazado mediante contornos del epicardio y el endocardio.

Para la cuantificación del área miocárdica en riesgo se utilizaron las imágenes en T2-STIR (*short tau inversion recovery*) turbo-spin echo de recuperación para la inversión, adquiriendo imágenes en idénticas proyecciones que los cines (en mesodiástole). Se consideraron aquellas imágenes con intensidad de señal >2 desviaciones estándar por encima de la señal del miocardio remoto no infartado. Se definió miocardio salvado como la diferencia entre el área en riesgo y el área de necrosis, expresada como porcentaje respecto a la masa miocárdica total (Figura 5).

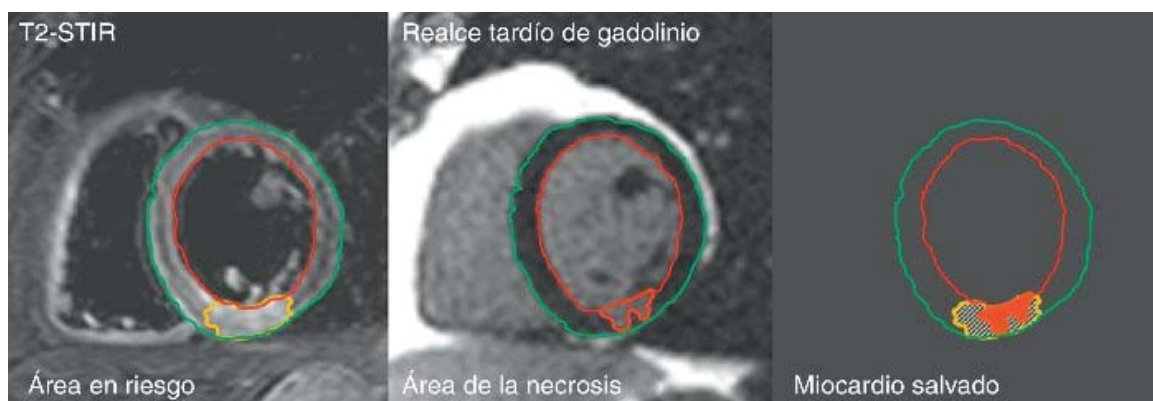


Figura 5. Representación del área en riesgo a partir de imágenes potenciadas en T2-STIR, área de necrosis obtenida a partir de imágenes de realce tardío de gadolinio, y miocardio salvado calculado a partir de la diferencia entre ambas. *Monmeneu et al*⁸¹.

Todas estas mediciones se llevaron a cabo por un mismo cardiólogo en una estación de trabajo especializada (Argus, Siemens, Erlangen, Germany).

Los estudios de RMC se realizaron en las dos primeras fases del estudio. En la *primera fase*, se practicó una única exploración a los pacientes durante el ingreso por SCACEST, entre el tercer y quinto día post-infarto. En la *segunda fase*, se realizaron dos estudios. Una primera exploración en el mismo período tras el infarto que en la fase

previa, con el fin de evaluar el porcentaje de miocardio salvado, y un estudio de control a los seis meses, para evaluar la cicatriz miocárdica ya establecida. Asimismo, el análisis comparativo entre el área de edema en fase aguda y el área de necrosis a los seis meses permitió estimar el miocardio salvado a largo plazo. Este estudio de control permitió además estudiar la presencia de remodelado ventricular izquierdo, definido como el incremento superior al 10% en el volumen telediastólico del ventrículo izquierdo a los 6 meses respecto a la exploración inicial^{82,83}.

4.4. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el paquete de *software* IBM SPSS Statistics (versión 22.0, SPSS Inc., Chicago, Illinois, Estados Unidos). La significación estadística se estableció para un valor $p < 0,05$. Las variables continuas se expresan como media \pm desviación estándar, mientras que las variables categóricas se presentan como porcentajes.

Mediante el test de Kolmogorov-Smirnov se comprobó la normalidad en la distribución de las variables cuantitativas. El análisis comparativo se realizó mediante las pruebas adecuadas en función del tipo de variable (dicotómicas, cualitativas o continuas) y de que su distribución fuera normal o no: test de la χ^2 y la prueba exacta de Fisher para variables cualitativas (no continuas), t de Student para variables cuantitativas, y U de Mann-Whitney para variables con distribución no normal.

En todas las fases del estudio, los pacientes se dividieron en dos grupos en función de la detección basal de expresión de PGC-1 α en sangre periférica. En las dos primeras fases del estudio, además, de forma adicional en función del desarrollo de inducción en

la expresión de la molécula tras el infarto (en base al valor de ARNm en la segunda muestra obtenida a las 72 horas).

En la *segunda fase* del estudio, de forma específica, se estudió el porcentaje de miocardio salvado en cada uno de los grupos definidos, así como el remodelado ventricular, y se compararon las medias mediante la prueba de la t de Student para muestras independientes. El análisis de las variaciones en el tamaño de la necrosis y el miocardio salvado a largo plazo en cada paciente se realizó mediante la prueba de la t de Student para muestras apareadas. Se representó en diagramas de barras de error el cambio porcentual en los diferentes subgrupos.

En la *última fase* del estudio, la correlación entre la expresión periférica de PGC-1 α y su expresión en las biopsias cardíacas se realizó mediante el índice Kappa.

El estudio se ajusta a los principios establecidos en la Declaración de Helsinki y a la Ley de Protección de Datos Personales.

Todos los pacientes firmaron consentimiento informado y los diferentes proyectos de investigación que conforman el presente trabajo fueron aprobados por el Comité de Investigación y el Comité de Ensayos e Investigación Clínica del Hospital General Universitario de Valencia.

5.- Resultados

5.- Resultados

5.1. *Primera fase: La inducción de PGC-1 α puede detectarse en muestras sanguíneas de pacientes con infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST*

5.1.1. Estudio preclínico

En primer lugar, con objeto de determinar la población celular óptima para estimar cuantitativamente la expresión de PGC-1 α en muestras periféricas, se utilizó un modelo animal con ratones. Se estudió si el RNA de PGC-1 α podía detectarse en esplenocitos y timocitos procedente de lisado de células de muestras murinas. Encontramos que aunque el RNA de PGC-1 α se detecta en ambas preparaciones, los niveles de la molécula en los preparados de timocitos era 15 veces superior a las muestras de esplenocitos (Figura 6).

Posteriormente, se analizó si la proteína PGC-1 α podía asimismo ser detectada en las muestras procesadas de esplenocitos. Se observó la presencia de una banda proteica del peso molecular esperado para PGC-1 α al realizar *western-blot* con el anticuerpo específico. Con objeto de asegurar que dicha banda pertenecía a material proteico de PGC-1 α , utilizamos como control negativo una preparación de esplenocitos procedentes de ratones *knock-out* para la molécula (PGC-1 α ^{-/-}), y confirmamos que la banda desaparecía al realizar el *western-blot* con estos procesados celulares. Concluimos, por tanto, que la proteína de PGC-1 α está presente en los esplenocitos de ratones (Figura 7).

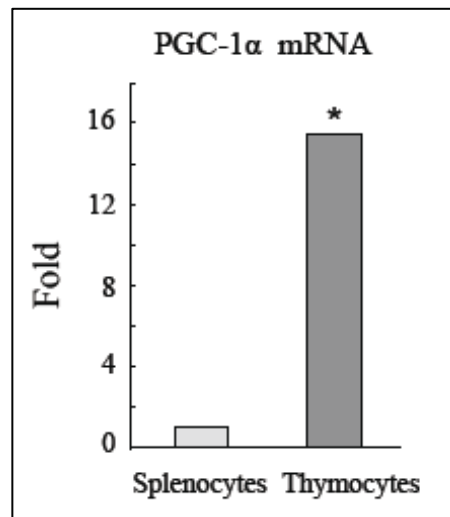


Figura 6. Expresión de PGC-1 α en esplenocitos y timocitos de muestras murinas. *Splenocytes*: esplenocitos; *thymocytes*: timocitos; *Fold*: análisis por pliegues del resultado de la PCR

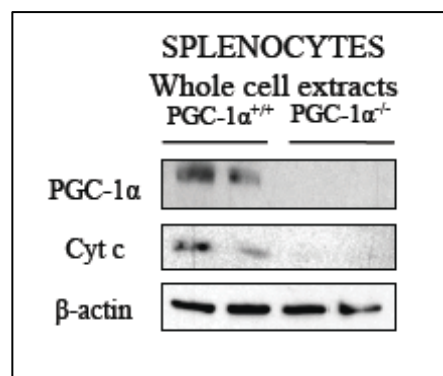


Figura 7. *Western-blot* de esplenocitos murinos, procedentes de extractos celulares procesados. *Splenocytes*: esplenocitos; *cyt c*: citocromo C, utilizado como control de diana génica de PGC-1 α ; *β -actin*: β -actina, utilizada como control de carga

Además, para evaluar la actividad de la proteína PGC-1 α en el control metabólico de los esplenocitos, se analizó simultáneamente mediante *western-blot* el nivel de expresión de *cyt c*, diana molecular de PGC-1 α ampliamente caracterizada. *cyt c* es una

proteína que forma parte de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (ETC), y encontramos que su expresión se hallaba también reducida en ratones PGC-1 $\alpha^{-/-}$, lo que sugiere que PGC-1 α no sólo está presente en esplenocitos murinos, sino que tiene un papel activo en el control metabólico mitocondrial (Figura 7).

Finalmente, se evaluó si los niveles de PGC-1 α se modificaban tras activación linfocitaria. Para ello, examinamos los cambios en los niveles de expresión de PGC-1 α tras estimulación específica de los linfocitos B mediante inmunoglobulina M (α -IgM). Los esplenocitos estimulados con α -IgM mostraron un incremento significativo tanto de los niveles de RNA de PGC-1 α como de cyt c, a las 3 horas de la estimulación (Figura 8). Concluimos, por tanto, que la expresión de la molécula y su diana específica se induce por estimulación de linfocitos B.

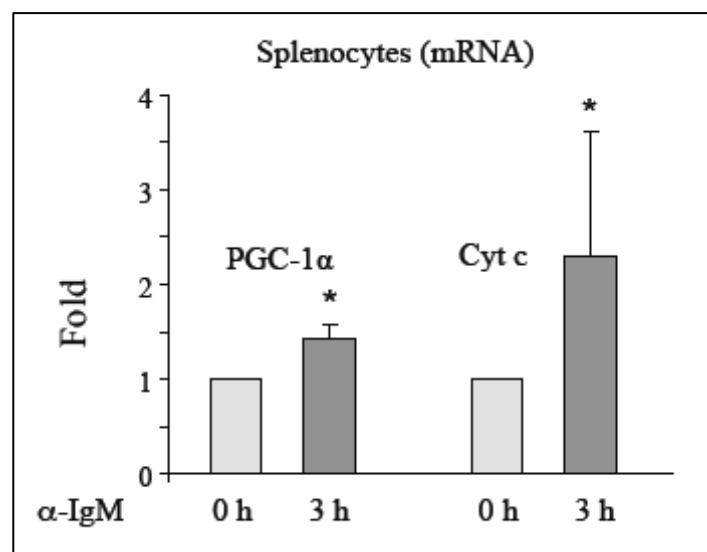


Figura 8. Niveles de PGC-1 α y citocromo C en esplenocitos murinos en situación basal (0 horas) y tras estimulación con inmunoglobulina M (3 horas). *Splencocytes*: esplenocitos; *Cyt c*: citocromo C; α -IgM: inmunoglobulina M específica; *Fold*: análisis de la inducción relativa de la expresión mediante qRT-PCR por número de veces

5.1.2. Investigación clínica

5.1.2.1. Análisis descriptivo

La muestra final incluyó 38 pacientes. Se perdieron en el seguimiento 11 individuos por diferentes causas: 1 muerte antes de las 72 horas de evolución; 3 pacientes con cardiopatía isquémica previa; 5 pacientes sin estudio de CRM por distintos motivos; y finalmente, 2 pacientes a los cuales no se les pudo evaluar la expresión de PGC-1 α en las muestras.

La edad media de los individuos del estudio fue 60.9 +/- 10.3 años, siendo el 84.2% varones. El 55.2% eran fumadores y el 23.7% exfumadores, el 52.6% tenían antecedentes de dislipemia, el 34.2% diabetes y el 71.1% diagnóstico de hipertensión arterial. El índice de masa corporal medio fue 27.41 kg/m².

Ningún paciente presentó durante el estudio anemia ni insuficiencia renal significativa (hemoglobina 13.6 +/- 2.1 g/dL y creatinina basal 1.1 +/- 0.2 mg/dL). No fue incluido ningún paciente con bloqueo completo de rama izquierda del haz de His (BCRIHH) ni en fibrilación auricular (FA).

A pesar de la prevalencia de factores de riesgo cardiovascular en la muestra, el tratamiento domiciliario previo de los pacientes no era óptimo. Sólo el 14.8% tomaba hipolipemiantes, el 25.9% tomaba IECA o ARA-II, el 14.8% algún diurético y el 25.9% tratamiento betabloqueante o calcioantagonista. De hecho, casi la mitad de los pacientes dados de alta con diagnóstico de diabetes no era conocedor de esta patología antes del ingreso.

Todos los individuos de la muestra fueron sometidos a estrategia de reperfusión. El 44.4% de los pacientes recibió tratamiento trombolítico con éxito a su llegada al centro

hospitalario, al 25.9% angioplastia primaria, y el 29.7% restante fue derivado, tras trombolisis fallida, a hemodinámica para angioplastia de rescate.

En cuanto a la localización de los infartos y su gravedad, casi la mitad fue de predominio anterior (44.7%), siendo el porcentaje de enfermedad multivaso (3 ó más vasos con estenosis significativas) del 11.1%. Por arterias, sólo un paciente presentó afectación significativa del tronco común, el 50% de la arteria descendente anterior, el 26.9% de la arteria circunfleja, y el 46.2% de la arteria coronaria derecha.

Se realizó revascularización percutánea en la fase aguda del infarto (con implantación de algún *stent* durante el procedimiento) al 93% de los pacientes, con un tiempo medio de isquemia (dolor-reperusión) aproximado de tres horas.

En relación a la función ventricular post-infarto, un tercio de los pacientes presentó disfunción ventricular moderada (fracción de eyección del ventrículo izquierdo <45%), y el 7.4% disfunción grave (<35%), según los valores estimados por ecocardiografía transtorácica. Si tomamos las determinaciones realizadas en los estudios de CRM, la distribución de disfunción sistólica es similar.

5.1.2.2. Inducción de PGC-1 α tras el infarto

Con el objetivo de evaluar si podíamos detectar inducción en la expresión de PGC-1 α tras un SCACEST, aislamos el RNA de las muestras sanguíneas obtenidas en el momento de admisión a urgencias y a las 72 horas. Los niveles de la molécula se monitorizaron por qRT-PCR.

Al analizar los resultados, encontramos que la muestra se segregaba en dos grupos claramente diferenciados. Por un lado, aquellos pacientes en los cuales podía observarse inducción de PGC-1 α , con valores a las 72 horas por encima de la unidad respecto al valor basal obtenido al ingreso. Y por otro lado, el grupo muestral en el cual no se

apreciaban cambios en el nivel de expresión de la molécula. Además, los pacientes con inducción de la molécula, podían a su vez subdividirse en dos grupos: aquellos con un nivel de inducción inferior a 10 veces el valor basal, y aquellos con una inducción mayor (Figura 9).

	PGC-1 α mRNA 72 h/ 0 h \leq 1 (n= 12)	PGC-1 α mRNA 72 h/ 0 h $>$ 1 (n= 26)	p value
Base line characteristics			
Age (years)	61.08 (SD +/- 3.03)	60.88 (SD +/- 2.33)	0.959
Males sex (%)	10 (83.3 %)	22 (84.6 %)	0.924
Diabetes (%)	5 (41.7 %)	8 (30.8 %)	0.541
Hypertension (%)	9 (75 %)	18 (69.2 %)	0.722
Hypercholesterolemia (%)	6 (50 %)	14 (53.8 %)	0.834
Current smoker (%)	6 (50 %)	15 (57.7 %)	0.674
Coronary event			
Mean time to reperfusion (minutes)	189 (137-242)	184 (160-208)	0.942
Median troponin I peak value (ng/mL)	119.87 (97-143)	63.01 (52-74)	0.039
Median creatine kinase MB peak value (ng/mL)	474.08 (264-684)	170.73 (148-193)	0.043
Elective ACTP (%)	3 (25%)	10 (38 %)	0.417
Rescue ACTP (%)	7 (58.4 %)	4 (16 %)	0.006
Reperfusion by thrombolysis (%)	2 (16.6 %)	12 (46 %)	0.084
Anterior infarction (%)	8 (66.6 %)	9 (34.6 %)	0.075
Biochemistry (plasma)			
Creatinine (mg/dL)	1.03 (0.95-1.11)	1.01 (0.97-1.05)	0.811
Haemoglobine (mg/dL)	13.10 (12.6-13.6)	13.86 (13.4-14.3)	0.249
Cholesterol (mg/dL)	177.08 (165-189)	180.92 (170-191)	0.812
LDLc (mg/dL)	116.50 (107-126)	122.19 (115-130)	0.642
HDLc (mg/dL)	38.58 (37-40)	36.23 (35-38)	0.269
Glucose (mg/dL)	120.83 (113-128)	105.26 (102-109)	0.091
CRP (mg/dL)	0.98 (0.71-1.25)	0.64 (0.57-0.71)	0.126
Magnetic resonance			
Ejection fraction by echocardiography (%)	47.41 (SD +/- 2.2)	53.96 (SD +/- 1.6)	0.025
Score regional wall motion abnormalities	1.79 (SD +/- 0.1)	1.43 (SD +/- 0.1)	0.013
Left ventricle ejection fraction $<$ 35% (%)	16.6 (SD +/- 11.2)	3.8 (SD +/- 0.4)	0.136
Late gadolinium enhancement by CMR (%)	24.91 (SD +/- 6.3)	10.90 (SD +/- 2.1)	0.012

Tabla 1. Datos demográficos, bioquímicos y parámetros de la resonancia magnética cardiaca de los pacientes de la muestra. La población se dividió en dos grupos en función de la presencia o no de inducción en la expresión de PGC-1 α tras infarto agudo de miocardio. ACTP: angioplastia coronaria trasluminal percutánea. CRP: proteína C reactiva. Significativo si $p < 0.05$

Con la finalidad de monitorizar la actividad de PGC-1 α , se determinó también la inducción de diferentes genes diana de la molécula, como cyt c y SOD. Encontramos que tras el evento coronario, no sólo los valores de PGC-1 α aumentaban en el grupo de inducción, sino que también se incrementaban los niveles de mRNA de las dos dianas (Figura 10). Esto sugiere que no sólo aumenta la transcripción de PGC-1 α tras el infarto, sino que su actividad en la regulación transcripcional de otros genes mitocondriales lo hace forma proporcional. Este hecho puede sustentarse en la observación que la inducción tanto de cyt c como de SOD es significativamente mayor en los pacientes con inducción de la expresión de PGC-1 α superior a 10 veces el valor basal.

Con el objeto de confirmar la significación de esta observación, se monitorizaron los niveles proteicos de cyt c, y encontramos que tras el SCACEST, sólo el grupo con mayor inducción de PGC-1 α presentaba elevaciones significativas de la proteína (Figura 11). Por tanto, esto indica que la inducción de PGC-1 α se traduce en regulación molecular de sus dianas hasta un nivel funcional, como lo es la síntesis proteica.

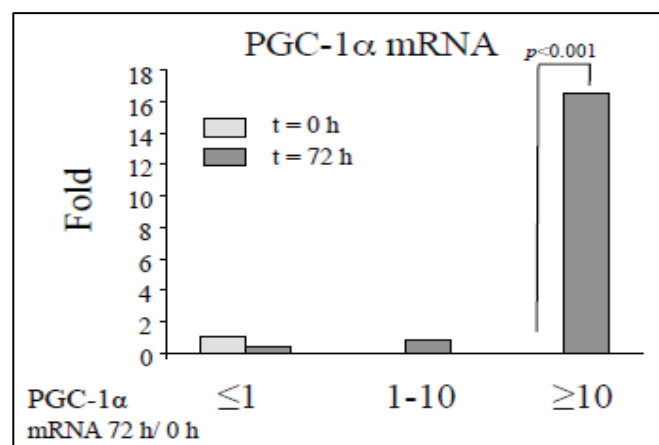


Figura 9. Inducción de PGC-1 α tras SCACEST. Muestra agrupada en función de los niveles de RNA al ingreso y a las 72 horas, determinados por qRT-PCR. t = tiempo, h = horas. Significativo si $p < 0.05$

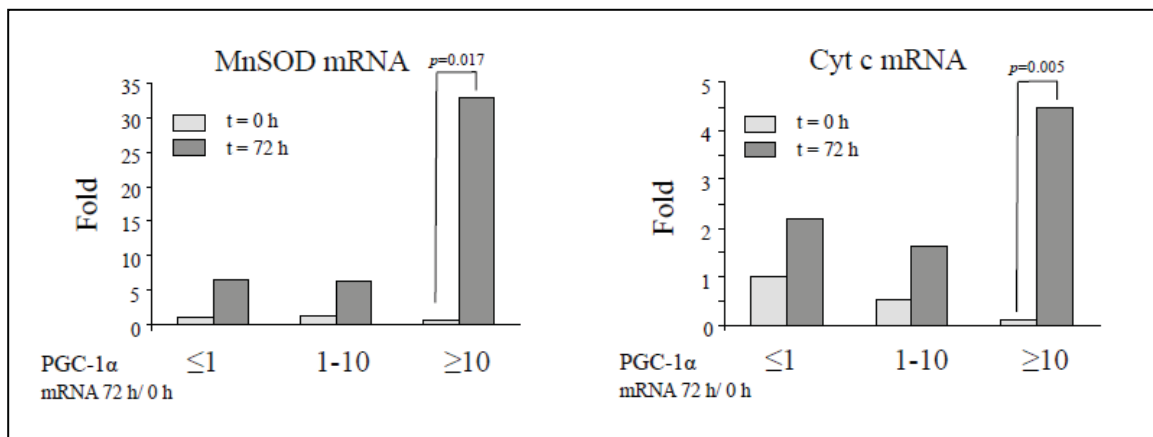


Figura 10. Inducción de SOD y cyt c tras SCACEST estimada en base a los niveles de RNA al ingreso y a las 72 horas, determinados por qRT-PCR. Distribución de la muestra en función de la inducción de PGC-1 α . t = tiempo, h = horas. Significativo si $p < 0.05$

El análisis de la inducción de PGC-1 α y sus dianas tras SCACEST, nos muestra además que el grado de inducción de la molécula se relaciona de forma inversa con los niveles de PGC-1 α y cyt c en el ingreso, sugiriendo que la actividad basal reducida de PGC-1 α implicaría una mayor inducción tras el evento coronario (Figura 12).

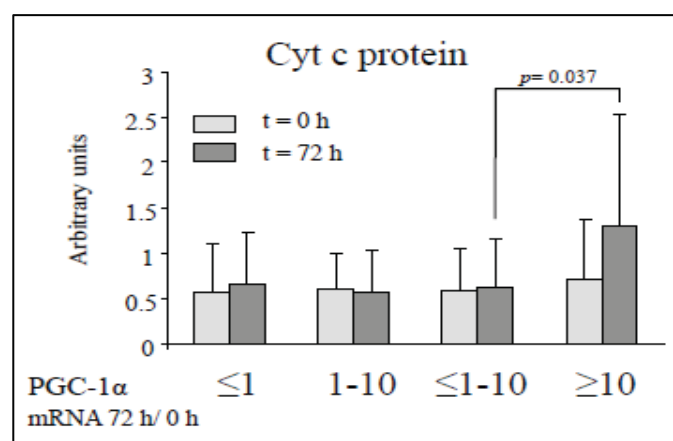
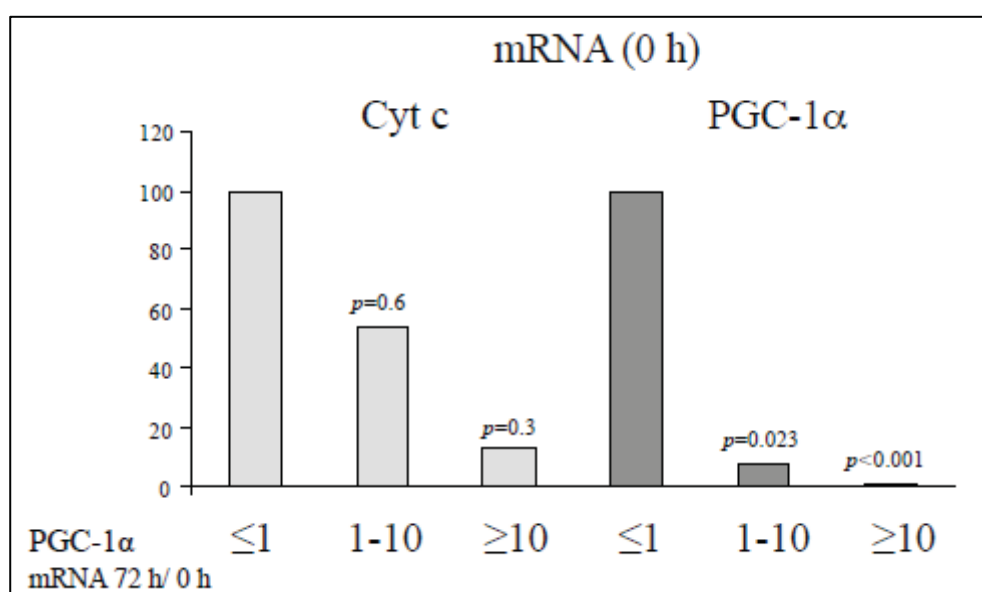


Figura 11. Inducción de los niveles de proteína cyt c tras SCACEST. Muestra agrupada en función del nivel de inducción de PGC-1 α . Significativo $p < 0.05$



PGC-1α mRNA 72 h/0 h	≤1	1-10	p	≤1	≥10	p
PGC-1α 0 h	100 %	8.29 %	0.023	100 %	0.32 %	0.95e-8
Cyt c 0 h	100 %	54.45 %	0.6	100 %	13.09 %	0.3

Figura 12. La inducción de PGC-1α tras SCACEST se correlaciona negativamente con los niveles basales de PGC-1α. La gráfica muestra el promedio de los niveles de RNA de Cyt c y PGC-1α en el momento del ingreso en los tres grupos de inducción de PGC-1α. Significación $p < 0.05$

5.1.2.3. Implicación funcional de la inducción de PGC-1α

Con la finalidad de determinar la repercusión funcional de la inducción de PGC-1α, se comparó el grado de expresión de la molécula con el tamaño del infarto, en base a las siguientes variables: niveles plasmáticos máximos de TnI y creatinquinasa, FEVI e ICS determinados por ecocardiografía, y porcentaje de necrosis miocárdica estimado a través de estudios de RMC por el área de RTG.

Encontramos que la inducción de PGC-1α tras SCACEST se relacionó con picos enzimáticos más elevados (TnI 119.87 vs 63.01 ng/mL, $p=0.039$ y CKMB 474.08 vs. 170.73 ng/mL, $p=0.043$; véase figura 13) y áreas de necrosis estimadas por RTG en

CRM mayores (porcentaje de área necrótica respecto a masa miocárdica total: 24.91 vs 10.90%; $p=0.012$; Figura 14), sugiriendo que la inducción de la molécula forma parte de la respuesta celular frente a la isquemia tras el evento coronario.

De forma interesante, observamos además que la inducción de PGC-1 α tiende a ser más frecuente en pacientes con metabolismo de la glucosa alterado (Figura 15) y en aquellos con niveles de proteína C reactiva al ingreso más elevados (Figura 13), aunque esta tendencia no es estadísticamente significativa.

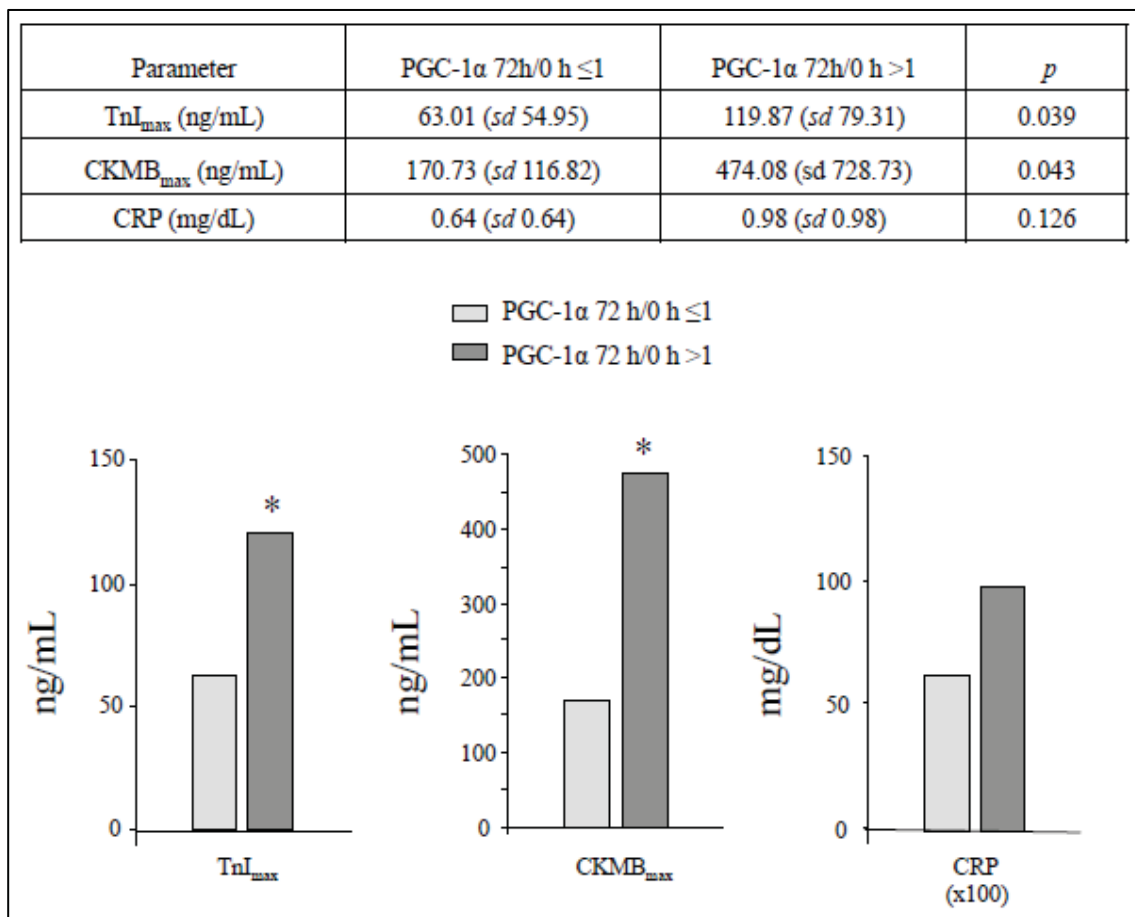


Figura 13. La inducción de PGC-1 α tras SCACEST se relaciona positivamente con niveles plasmáticos pico de TnI y CKMB más elevados y con mayores cifras de PCR no ultrasensible (CRP) al ingreso.

Significativo si $p < 0.05$

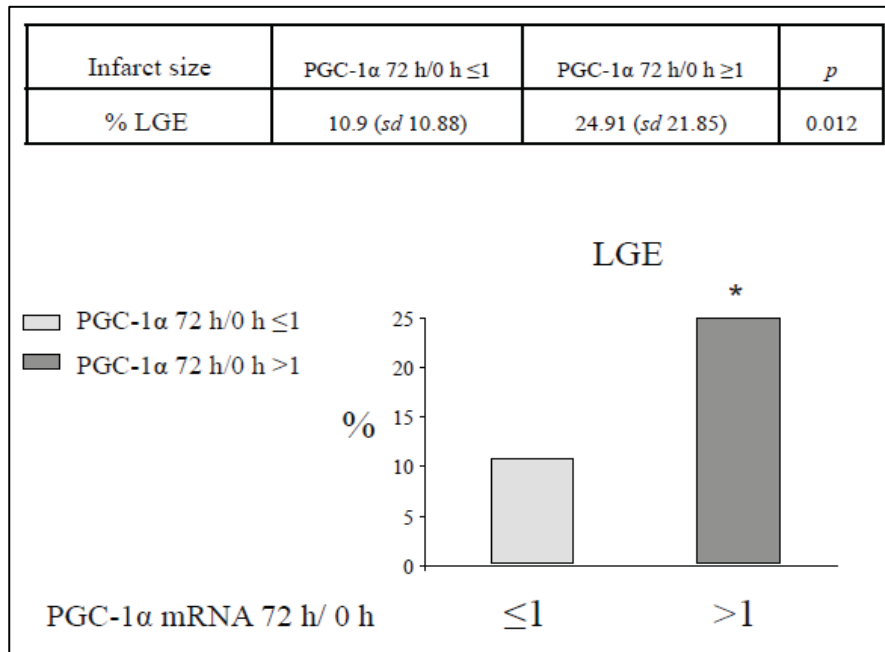


Figura 14. La inducción de PGC-1 α tras SCACEST se relaciona con mayores áreas de necrosis, estimada mediante RTG en estudios de CRM. %LGE: porcentaje de RTG respecto a masa miocárdica total.

Significativo si $p < 0.05$

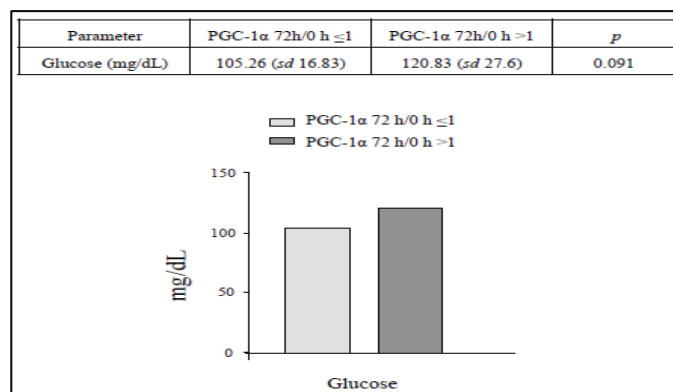


Figura 15. La inducción de PGC-1 α tras SCACEST es más frecuente en pacientes con metabolismo glucídico alterado. Los valores de glucosa expresan la media de tres determinaciones en ayunas durante el ingreso. Significativo si $p < 0.09$

Al estudiar los parámetros funcionales ecocardiográficos determinados tras el infarto, encontramos que los pacientes con inducción de PGC-1 α presentaban peor FEVI (47.41 vs 53.96 %, $p=0.025$) y mayor ICS (1.79 vs 1.43, $p=0.013$, rango valores 1-4) (Figura 16). De forma llamativa, observamos que la disfunción ventricular izquierda es más frecuente en pacientes con intensa inducción de la molécula, independiente de la localización del infarto y a pesar del mayor tamaño de los infartos anteriores en nuestros pacientes (Figura 12).

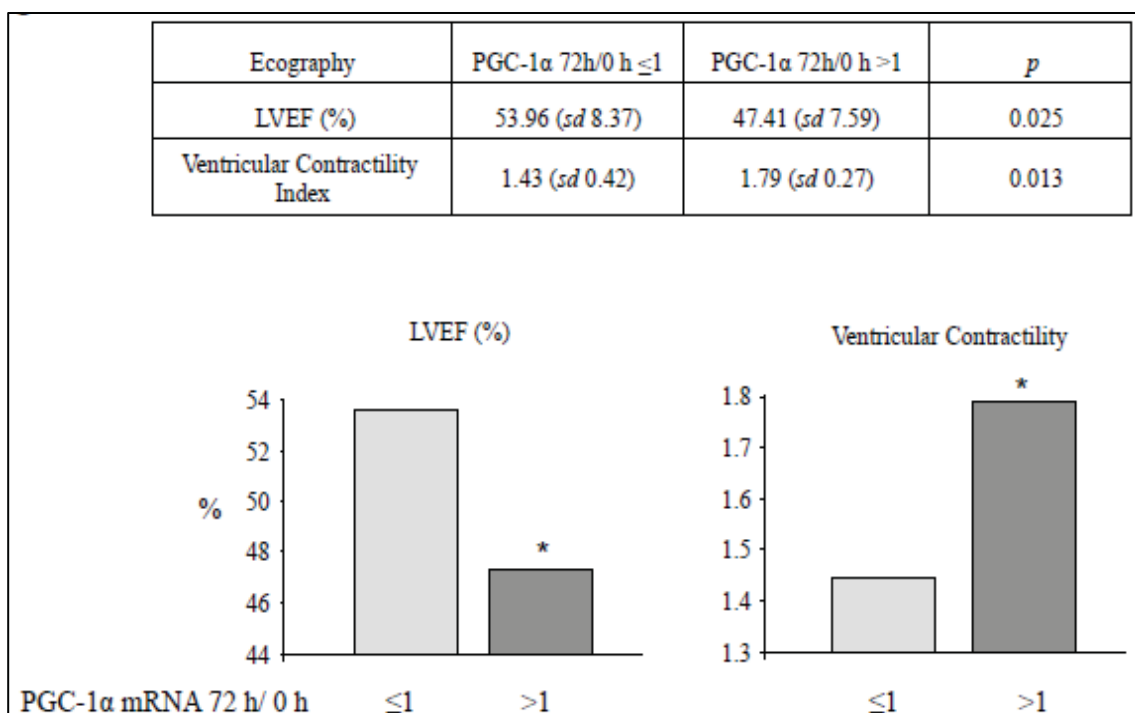


Figura 16. Los pacientes con inducción de PGC-1 α tras SCACEST presentan en la evolución clínica peor FEVI (*LVEF*) y mayor ICS (índice de contractilidad segmentaria o *ventricular contractility index*).

Significativo si $p < 0.05$

5.1.2.4. Activación inmunológica tras el infarto

Con el objeto de evaluar si la inducción observada monitorizaba en algún sentido la respuesta inmune tras el síndrome coronario agudo, decidimos analizar el recuento total de leucocitos, linfocitos y monocitos al ingreso y a las 72 horas. Encontramos, como ya está descrito previamente, que el recuento relativo de linfocitos disminuía en la evolución post-infarto, mientras el recuento de monocitos se veía incrementado en la muestra global. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos de pacientes, sugiriendo que la respuesta observada en PGC-1 α se debe a una regulación específica, y su expresión no es un reflejo de los cambios acontecidos en el número de leucocitos tras el infarto.

No obstante, deben destacarse algunas diferencias entre los grupos de carácter menor, ya que el grupo de inducción de la molécula presentó concentraciones de linfocitos mayores, y el incremento de monocitos a las 72 horas fue también más elevado (Figura 18 y Tabla 2).

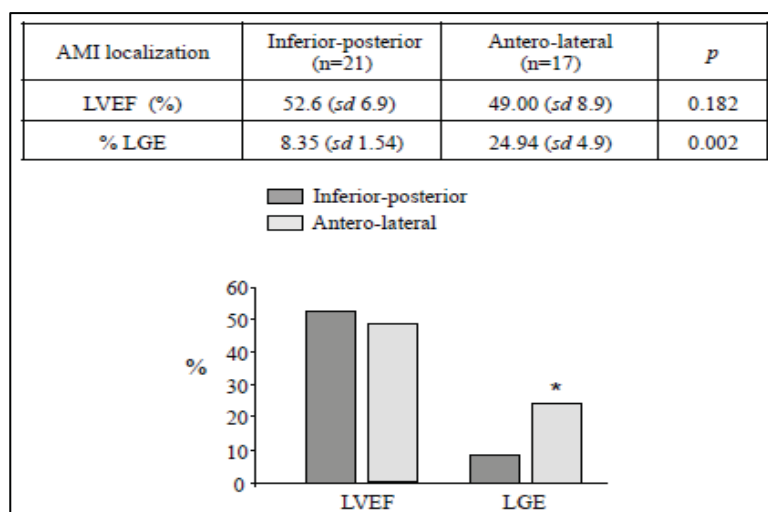


Figura 17. FEVI (LVEF) y RTG (LGE) de los pacientes del estudio en función de la localización del infarto: anterolateral e inferoposterior. FEVI como indicador de función y RTG como indicador de tamaño del infarto. Significativo si $p < 0.05$

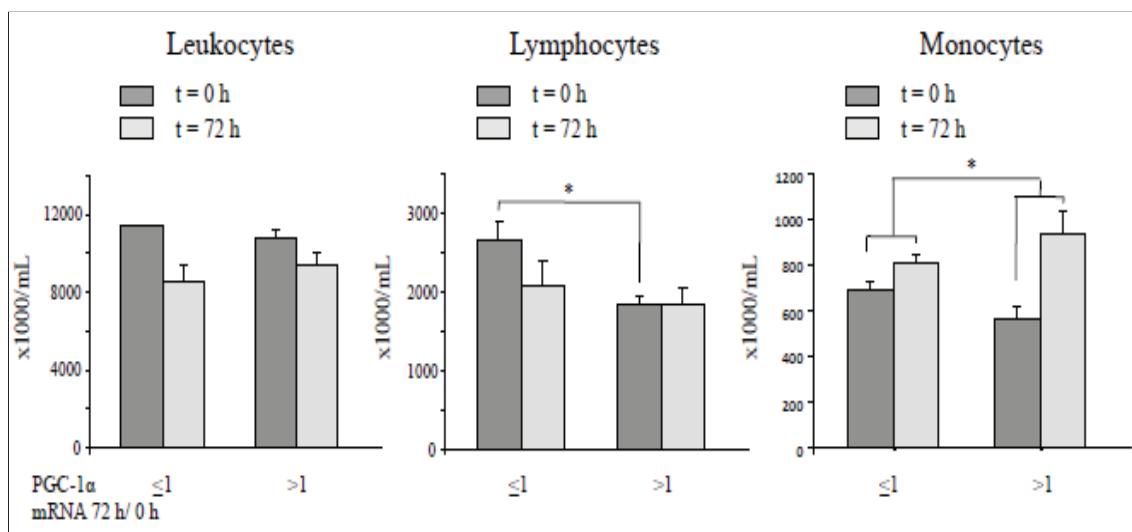


Figura 18. Recuento de leucocitos, linfocitos y monocitos al ingreso y a las 72 horas. Análisis comparativo entre grupos en función de la inducción de PGC-1 α .

	PGC-1 α mRNA 72 h/ 0 h ≤ 1 (n= 26)	PGC-1 α mRNA 72 h/ 0 h >1 (n= 12)	p value
<i>White blood cell subtypes</i>			
Leukocytes 0 h (x1000/mL)	11426 (sd 820)	10775 (sd 826)	n.s.
Leukocytes 72 h (x1000/mL)	8584 (sd 413)	9408 (sd 683)	n.s.
(leuko. 72 h –leuco. 0 h)/ leuco. 0 h (%)	-34.3	-19.8	n.s.
Lymphocytes 0 h (x1000/mL)	2665 (sd 227)	1850 (sd 327)	0.04
Lymphocytes 72 h (x1000/mL)	2076 (sd 92)	1825 (sd 245)	n.s.
(lym. 72 h –lym. 0 h)/ lym. 0 h (%)	-29.1	-5.1	n.s.
Monocytes 0 h (x1000/mL)	684 (sd 44)	566 (sd 41)	n.s.
Monocytes 72 h (x1000/mL)	807(sd 48)	933 (sd 97)	n.s.
(mono. 72 h –mono.0 h)/ mono. 0 h (%)	10.9	32.1	0.05
Lymphocytes 0 h (%)	24.5 (sd 1.7)	18 (sd 3.2)	n.s.
Lymphocytes 72 h (%)	24.9 (SD +/- 1.33)	19.7 (SD +/- 2.3)	0.04
Monocytes 0 h (%)	6.2 (SD +/- 0.3)	6.1 (SD +/-0.6)	n.s.
Monocytes 72 h (%)	9.3 (SD +/- 0.3)	9.9 (SD +/- 0.5)	n.s.

Tabla 2. Recuento total y relativo de leucocitos, linfocitos y monocitos al ingreso y a las 72 horas. Análisis comparativo entre grupos en función de la inducción de PGC-1 α . *White blood cell subtypes*: subtipo de leucocitos; *leukocytes*: leucocitos; *lymphocytes*: linfocitos ; *monocytes* : monocitos.

Significativo si $p < 0.05$; n.s. : no significativo

5.2. Segunda fase: La inducción de PGC-1 α puede detectarse en muestras sanguíneas de pacientes con infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST

5.2.1. Expresión basal de PGC-1 α

Al dividir la muestra en función de la expresión basal de PGC-1 α en la muestra sanguínea al ingreso, establecimos dos grupos claramente diferenciados: pacientes con expresión constitutiva y pacientes sin expresión basal detectable. Así, encontramos que la ausencia de detección periférica de PGC-1 α en el momento inicial tendía a ser más frecuente en pacientes diabéticos y se correlacionaba positivamente con valores más elevados de proteína C reactiva, aunque sin alcanzar significación estadística. El análisis de factores de riesgo cardiovascular y características del infarto no halló diferencias entre los grupos (Tabla 3).

Con el fin de evaluar qué implicación tenía la activación basal de PGC-1 α en la recuperación del miocardio tras el infarto, decidimos comparar el MS a largo plazo entre los dos grupos. De esta forma, se observó que si bien no se hallaron diferencias en MS al comparar los grupos en la exploración inicial, los pacientes con niveles de expresión de PGC-1 α elevados al ingreso presentaron mayor índice de MS en el estudio de control (porcentaje de MS a los 6 meses: 39.3 \pm 4.5 vs 23.2 \pm 5.6%, p=0.033) (Figura 19).

CARACTERÍSTICAS MUESTRA	Niveles basales elevados de PGC-1alpha (n=16)	Ausencia de detección basal de PGC-1alpha (n=15)	p valor
Características de los pacientes			
Edad (años)	61.1 (± 13.6)	57.5 (± 12.5)	0.452
Sexo masculino, n (%)	12 (75)	13 (86.6)	0.172
Diabetes, n (%)	2 (12.5)	4 (26.6)	0.335
Hipertensión arterial, n (%)	6 (37.5)	7 (46.6)	0.620
Dislipemia, n (%)	7 (43.7)	6 (40)	0.839
Tabaquismo, n (%)	10 (62.5)	5 (33.3)	0.111
Índice masa corporal (kg/m ²)	26.15 (± 2.4)	27.79 (± 3.7)	0.158
Características infarto			
Tiempo isquemia (minutos)	214 (± 32)	242 (± 51)	0.482
Pico troponina I (ng/mL)	63.4 (± 52.7)	92.9 (± 63.3)	0.172
Pico CK-MB (ng/mL)	145.9 (± 79.1)	246 (± 221.6)	0.116
Angioplastia primaria, n(%)	10 (62.5)	7 (46.7)	
Angioplastia de rescate, n (%)	6 (37.5)	8 (53.3)	
Bioquímica sanguínea			
Hemoglobina (mg/dL)	14.0 (± 2.3)	14.6 (± 1.7)	0.380
Creatinina (mg/dL)	0.86 (± 0.20)	0.94 (± 0.27)	0.402
Colesterol total (mg/dL)	169.2 (± 46.3)	178.8 (± 34.1)	0.510
LDLc (mg/dL)	109.5 (± 39.1)	111.7 (± 28.3)	0.862
HDLc (mg/dL)	42.5 (± 12.5)	38.3 (± 10.5)	0.368
Glucemia ayunas (mg/dL)	113.5 (± 33.4)	129.5 (± 48.3)	0.298
H1Ac (%)	5.92 (± 1.5)	6.21 (± 1.7)	0.609
Proteína C reactiva (mg/dL)	0.50 (± 0.29)	0.94 (± 1.34)	0.207
Ecocardiografía y RMC inicial			
FEVI por ecocardiografía (%)	48.7 (± 9.3)	51.13 (± 9.0)	0.464
RTG por RMC (%)	16.9 (± 11.3)	19.0 (± 10.8)	0.609
Edema por RMC (%)	20.7 (± 11.9)	23.3 (± 13.0)	0.576
Miocardio salvado en RMC (%)	21.0 (± 18.9)	18.6 (± 14.0)	0.693
OMV en RMC, n (%)	7 (43.7)	8 (53.3)	0.624

Tabla 3. Características de la muestra según nivel de expresión basal de PGC-1α: factores de riesgo cardiovascular, características del infarto y bioquímica general. Significación estadística: p <0.05. *CK-MB*: creatinquinasa MB. *FEVI*: fracción de eyección del ventrículo izquierdo. *Hb1c*: hemoglobina glicosilada. *OMV*: obstrucción microvascular. *RMC*: resonancia magnética cardíaca. *RTG*: realce tardío de gadolinio.

Además, en el estudio del volumen ventricular, se observó una tendencia hacia mayor RV en el grupo de pacientes sin expresión basal detectable de PGC-1α (variación porcentual del VTDVI: 15.2±9.2 vs 2.3±6.5%, p=0.26), mientras en los pacientes con mayor actividad basal de PGC-1α mejoró la función sistólica a los 6 meses, aunque las diferencias no fueron significativas (variación porcentual de la FEVI: 6.9±4.7 vs -0.5±3.2 %, p=0.20) (Figura 20).

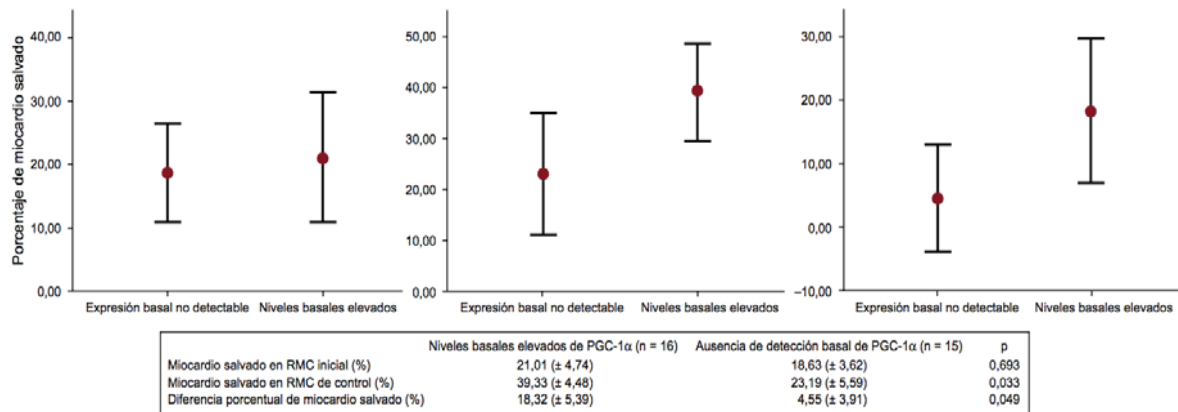


Figura 19. Miocardio salvado según la expresión basal de PGC-1 α : comparativa en estudio inicial, en el control a los 6 meses, y variación porcentual entre ambos estudios.

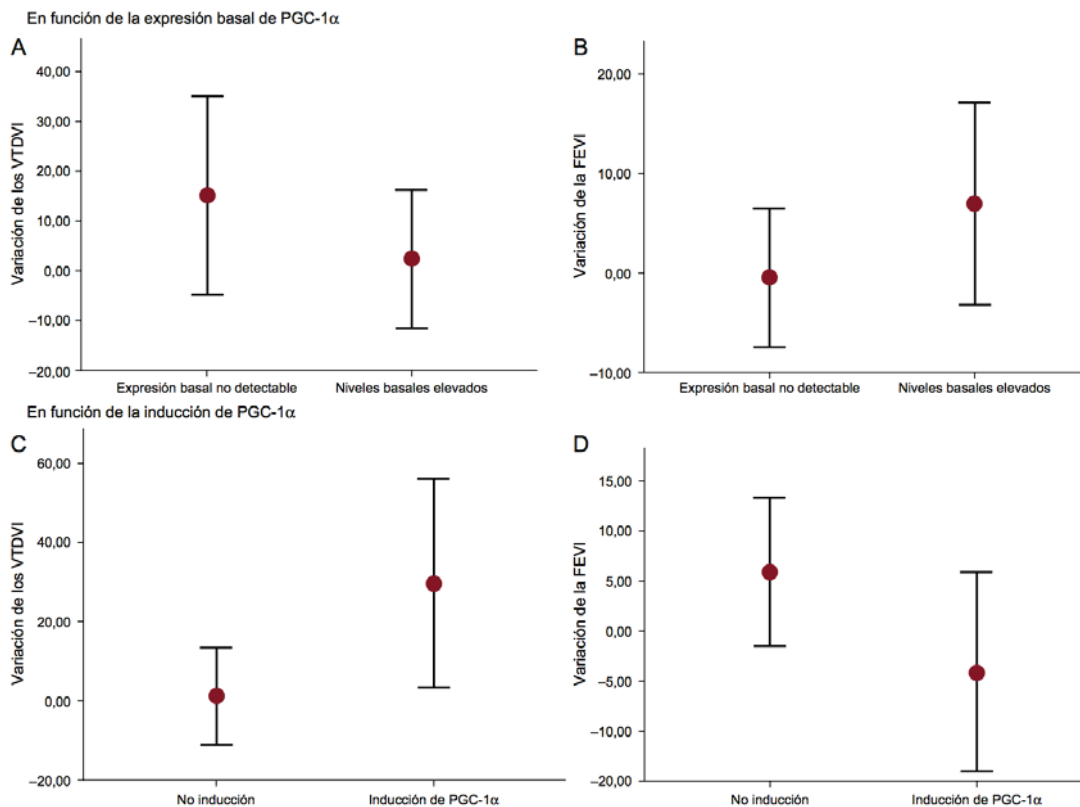


Figura 20. Variación de los volúmenes ventriculares y la función sistólica a los 6 meses. (A-B) Variación según la expresión basal de PGC-1 α . (C-D) Variación según la inducción de PGC-1 α tras SCACEST

5.2.2. Inducción de PGC-1 α tras UECEEST

Con objeto de estudiar la repercusión funcional de la inducción de PGC-1 α tras SCAEST, la muestra se dividió en dos grupos en función de su presencia o ausencia, teniendo en cuenta el nivel de expresión de PGC-1 α en las muestras sanguíneas al ingreso y a las 72 h. De esta manera, observamos que se detectó inducción de PGC-1 α más frecuentemente en el contexto de infartos extensos (área necrótica y edema estimado por RMC: RTG 20.99 vs 16.91%, $p=0.37$ y edema miocárdico 28.91 vs 19.59%, $p=0.051$ respectivamente) y con mayor pico enzimático (valor máximo de TnI 96.29 vs 71.23 ng/dL, $p=0.38$ y CK-MB 292.50 vs 160.39 ng/dL, $p=0.20$), aunque sin alcanzar la significación estadística. Asimismo, la inducción de PGC-1 α se correlacionó positivamente con los niveles de colesterol total y LDLc, sin hallarse otras diferencias significativas en el análisis de factores de riesgo cardiovascular y características del infarto entre los grupos (Tabla 4).

Evaluando los efectos a largo plazo de la inducción de PGC-1 α durante la fase aguda del infarto, comparamos nuevamente el índice de MS a los 6 meses entre los dos grupos, y aunque se halló una tendencia hacia un mayor índice de MS en el grupo de inducción de PGC-1 α (porcentaje de MS a los 6 meses: 43.1 ± 9.9 vs 27.5 ± 3.5 %, $p=0.071$) (Figura 21), ésta fue consecuencia de la mayor extensión del área de edema en fase aguda en estos pacientes. Por este motivo, se evaluó el área necrótica y el MS a largo plazo mediante un análisis por muestras pareadas y se comprobó una mejoría comparable en ambos grupos (Tabla 5).

Sin embargo, al comparar en estos grupos la evolución del volumen ventricular izquierdo a los 6 meses del infarto, se evidenció mayor RV en el grupo de inducción de PGC-1 α (variación porcentual del VTDVI: 29.7 ± 11.2 vs 1.2 ± 5.8 %, $p=0.04$), así como

un deterioro no significativo de la función global sistólica (variación porcentual de la FEVI: -4.1 ± 4.2 vs 5.9 ± 3.6 %, $p=0.085$) (Figura 20).

Características de la muestra	Grupo Inducción PGC-1 α (n=8)	Grupo No Inducción PGC-1 α (n=23)	p valor
Edad (años)	57.2 (\pm 10.6)	60.1 (\pm 13.9)	0.552
Sexo masculino, n (%)	5 (62.5)	20 (91.3)	0.059
Diabetes, n (%)	1 (12.5)	5 (21.7)	0.555
Hipertensión arterial, n (%)	3 (37.5)	10 (43.2)	0.782
Dislipemia, n (%)	4 (50.0)	9 (39.1)	0.624
Tabaquismo, n (%)	4 (50.0)	11 (47.8)	0.922
Índice masa corporal (kg/m ²)	27.34 (\pm 2.9)	26.81 (\pm 3.2)	0.673
Características infarto			
Tiempo isquemia (minutos)	283 (\pm 192.2)	202 (\pm 154.3)	0.213
Pico troponina I (ng/mL)	96.29 (\pm 70.6)	71.23 (\pm 54.8)	0.383
Pico CK-MB (ng/mL)	292.50 (\pm 265.4)	160.39 (\pm 109.3)	0.209
ICP primaria, n (%)	3 (37.5)	14 (60.9)	
ICP de rescate, n (%)	5 (62.5)	9 (39.1)	
Bioquímica sanguínea			
Hemoglobina (mg/dL)	14.0 (\pm 2.0)	14.4 (\pm 2.0)	0.635
Creatinina (mg/dL)	0.94 (\pm 0.9)	0.88 (\pm 0.9)	0.606
Colesterol total (mg/dL)	203.1 (\pm 23.4)	163.6 (\pm 40.5)	0.003
LDLc (mg/dL)	134.2 (\pm 24.0)	102.3 (\pm 33.1)	0.010
HDLc (mg/dL)	41.0 (\pm 7.9)	40.0 (\pm 12.7)	0.807
Glucemia ayunas (mg/dL)	126.4 (\pm 53.7)	119.4 (\pm 37.4)	0.743
Hb1Ac (%)	6.0 (\pm 2.2)	6.0 (\pm 1.3)	0.939
Proteína C reactiva (mg/dL)	0.66 (\pm 1.16)	0.73 (\pm 0.92)	0.879
Ecocardiografía y RMC			
FEVI por ecocardiografía (%)	51.8 (\pm 8.6)	49.2 (\pm 9.3)	0.471
RTG por RMC (%)	20.9 (\pm 7.9)	16.9 (\pm 11.8)	0.375
Edema por RMC (%)	28.9 (\pm 10.0)	19.6 (\pm 12.3)	0.051
Miocardio salvado (%)	26.8 (\pm 13.5)	17.4 (\pm 17.0)	0.135
OMV en RMC, n (%)	4 (50)	11 (47.8)	0.922

Tabla 4. Características de la muestra según inducción de PGC-1 α tras el infarto: factores de riesgo cardiovascular, características del infarto y bioquímica general. Significación estadística: $p < 0.05$. FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo. OMV: obstrucción microvascular

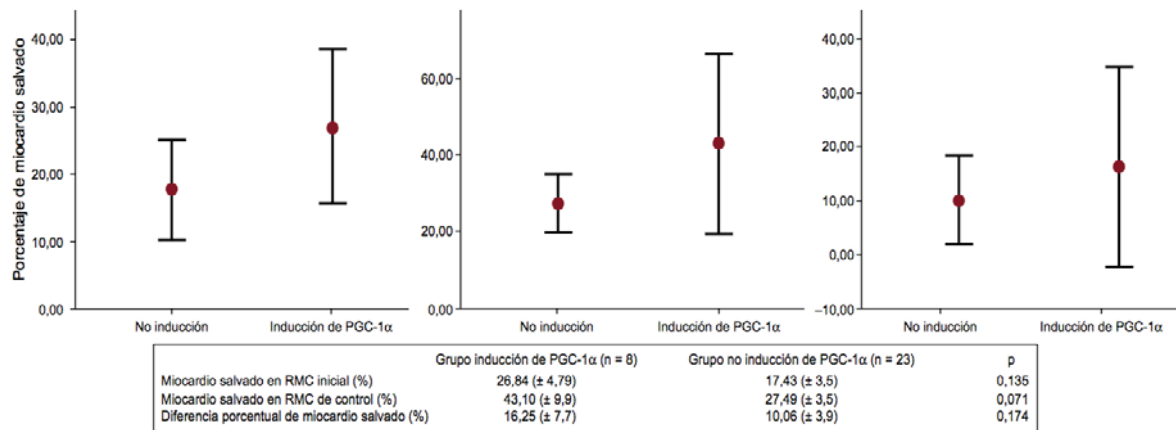


Figura 21. Miocardio salvado según la inducción de PGC-1α tras IAMEST: comparativa en estudio inicial, en el control a los 6 meses, y variación porcentual entre ambos estudios.

	Grupos muestrales (n=31)	RMC inicial	RMC 6 meses	p valor
Área de necrosis (%)	Inducción PGC (n=8)	20.98 (±7.9)	16.56 (±9.9)	0.009
	No inducción (n=23)	16.92 (±11.8)	14.70 (±10.9)	0.001
Miocardio salvado (%)	Inducción PGC (n=8)	26.70 (±13.5)	44.35 (±26.3)	0.095
	No inducción (n=23)	18.25 (±18.7)	27.76 (±17.7)	0.035

Tabla 5. Área de necrosis y miocardio salvado: muestras pareadas en función de la inducción de PGC-1α en fase aguda del infarto. Comparación de porcentajes mediante test t-Student para muestras pareadas. Datos expresados en porcentajes. Significación estadística: p < 0.05. *Área de necrosis estimada por RTG (realce tardío de gadolinio). Miocardio salvado estimado por diferencia entre área de edema en fase aguda y área de necrosis. RMC: resonancia magnética cardíaca.*

5.2.3. Respuesta inmune y PGC-1 α

Con el fin de evaluar si la inducción de PGC-1 α forma parte de la respuesta inflamatoria desencadenada tras el SCACEST, se monitorizaron los valores absolutos y relativos de leucocitos, linfocitos y monocitos en el momento del ingreso y a las 72 h. Se corroboró la existencia de leucocitosis ligera en el momento del ingreso en ambos grupos con normalización de las cifras a las 72 h, como parte de la respuesta inmune aguda inespecífica producida por el SCACEST. De forma significativa, el grupo de pacientes con inducción de PGC-1 α presentó al ingreso cifras menores en el recuento absoluto y relativo tanto de linfocitos como de monocitos. Sin embargo, en el control analítico a las 72 h pudo observarse un mayor incremento porcentual en sus cifras (Tabla 6).

5.2.4. Actividad molecular de PGC-1 α

Con el objetivo de monitorizar la actividad de PGC-1 α a nivel molecular y comprobar si la inducción tras SCACEST conlleva un incremento en su control transcripcional, se determinó el grado de expresión en forma de ARN de distintas dianas génicas de PGC-1 α : cyt c, SOD y GPx. Se encontró un incremento en los niveles de cyt cy GPx a las 72 h en el grupo de inducción de PGC-1 α (13.6 vs 1.07 y 425.6 vs 3.08 respectivamente; p=0.001 y p=0.046), siendo no significativo en el caso de SOD (Figura 22).

Asimismo, para confirmar la significación funcional de estos hallazgos, se monitorizaron los niveles proteicos de la PGC-1 α y se observó una correlación positiva con los niveles de ARN (Incremento relativo de la expresión proteica a las 72 h estimado por Zeptosens: 6.34 \pm 2.6 para el grupo con inducción de PGC-1 α vs. 1.7 \pm 0.8 para el grupo sin inducción, p=0.04).

Leucocitos – subtipos celulares	Inducción PGC-1 α (n=8)	No inducción (n=23)	p valor
Leucocitos totales 0 h (x1000/mL)	10787 (\pm 1336)	11830 (\pm 558)	0.497
Leucocitos totales 72 h (x1000/mL)	7150 (\pm 657)	8256 (\pm 443)	0.185
Linfocitos 0 h (x1000/mL)	1437 (\pm 244)	2443 (\pm 1370)	0.013
Linfocitos 72 h (x1000/mL)	1800 (\pm 162)	2126 (\pm 129)	0.135
Monocitos 0 h (x1000/mL)	475 (\pm 61)	823 (\pm 44)	<0.001
Monocitos 72 h (x1000/mL)	612 (\pm 74)	856 (\pm 63)	0.023
Linfocitos 0 h (%)	15.15 (\pm 3.1)	21.35 (\pm 2.3)	0.132
Linfocitos 72 h (%)	25.47 (\pm 2.3)	26.33 (\pm 1.4)	0.756
Variación porcentual linfocitos (%)	46.86 (\pm 25.7)	7.11 (\pm 11.2)	0.187
Monocitos 0 h (%)	4.60 (\pm 0.6)	7.38 (\pm 0.4)	0.002
Monocitos 72 h (%)	8.32 (\pm 0.8)	10.23 (\pm 0.3)	0.050
Variación porcentual monocitos (%)	38.27 (\pm 18.8)	7.77 (\pm 7.8)	0.168

Tabla 6. Subtipos celulares de leucocitos según inducción de PGC-1 α tras IAMEST: muestra sanguínea al ingreso y a las 72 horas

5.2.5. Sobreexpresión de ANT-1 mediada por PGC-1 α

ANT-1 regula la apoptosis celular miocárdica en situaciones de IR con elevado estrés mitocondrial y su expresión se induce en parte a través de PGC-1 α . Al correlacionar los niveles de expresión de PGC-1 α y ANT-1 tras SCACEST, encontramos que 7 de los 8 pacientes con inducción de PGC-1 α tras el infarto inducían a su vez ANT-1.

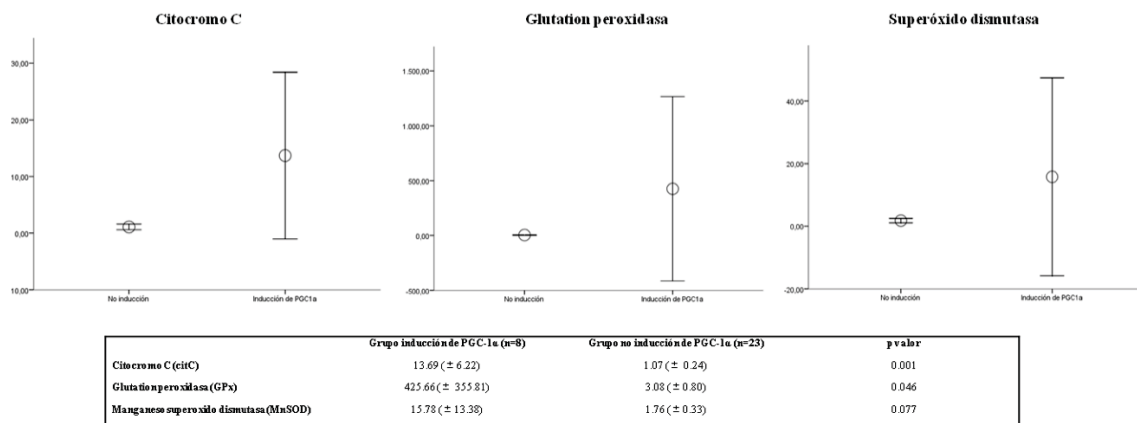


Figura 22. Expresión relativa de RNA de difentes dianas de PGC-1alpha: citocromo C, glutacion peroxidasa y superóxido dismutasa.

5.2.6. Inducción de PGC-1α, obstrucción microvascular y remodelado ventricular

Dado que los pacientes con inducción de PGC-1α presentaron mayores VTDVI en el control a los 6 meses y la OMV es un factor pronóstico emergente de RV, decidimos comprobar la capacidad predictiva del análisis de PGC-1α tras IAMEST tomando como referencia la presencia de OMV en el estudio inicial de RMC. De esta manera, encontramos que 7 de los 8 pacientes (87.5%) con inducción de PGC-1α tras IAMEST presentaban criterios de RV en la evolución, en comparación a 8 de los 15 pacientes (53.3%) con OMV en la CMR inicial.

En el análisis conjunto de OMV e inducción de PGC-1α tras infarto encontramos, por un lado, que la asociación de ambos factores se correlacionó de forma exacta con la presencia de RV en el estudio de control. En sentido opuesto, la ausencia de OMV e inducción de PGC-1α fue más frecuente en pacientes con infartos menos extensos, observando una mejoría significativa de la FEVI a los 6 meses y una tendencia en la preservación del VTDVI (Tabla 7).

VARIABLES	Inducción de PGC-1 y/o OMV en RMC (n=19)	Ausencia de inducción de PGC y OMV	P
Edad (años)	58.2 (±2.7)	61.2 (±4.3)	0.88
Tiempo isquemia (minutos)	220 (159-288)	209 (164-254)	0.54
Pico troponina I (ng/mL)	97.55 (84-110)	46.26 (33-59)	0.011
RTG inicial por RMC (%)	22.47 (±1.9)	10.81 (±3.2)	0.006
Edema RMC en estudio inicial (%)	27.27 (±2.2)	13.64 (±3.3)	0.003
RTG 6 meses por RMC (%)	18.88 (±2.3)	9.32 (±2.54)	0.010
FEVI inicial por RMC (%)	50.1 (±2.1)	49.1 (±2.9)	0.13
FEVI 6 meses por RMC (%)	49.1 (±2.1)	57.0 (±3.2)	0.054
Variación porcentual FEVI (%)	-2.9 (±3.5)	13.1 (±3.7)	0.004
VTDVI inicial por RMC (mL/m ²)	92.3 (±6.2)	91.0 (±11.3)	0.49
VTDVI 6 meses por RMC (mL/m ²)	102.0 (±7.7)	81.0 (±6.2)	0.043
Variación porcentual VTDVI (%)	15.3 (±7.1)	-2.2 (±8.4)	0.12

Tabla 7. Características de la muestra según la inducción PGC-1 α tras IAMEST y la presencia de OMV en el estudio de RMC inicial: valoración por RMC de la FEVI, VTDVI y tamaño del infarto (estimado por valores máximos de TnI y área de necrosis según RTG). Significación estadística: p <0.05. FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo. OMV: obstrucción microvascular RMC: resonancia magnética cardíaca. RTG: realce tardío de gadolinio. TnI: troponina I.

5.3. Tercera fase: Análisis de la correlación en la expresión de PGC-1 α en sangre periférica y miocardio

5.2.1. Características basales de los pacientes

Las características generales de este estudio en pacientes sometidos a cirugía cardíaca se presenta en la Tabla 8. Los pacientes se dividieron en dos grupos en función de la expresión basal ARN de PGC-1 α en sangre periférica. Ambos grupos fueron comparables en factores de riesgo cardiovascular, tratamiento, parámetros analíticos y ecocardiográficos, y clase funcional NYHA, con una tendencia hacia mayor prevalencia de diabetes en el grupo de pacientes con menor expresión basal de PGC-1 α .

Resultados

	Todos (n=35)	Expresión basal PGC-1α elevada (n=11)	Expresión basal PGC-1α no detectable (n=24)	p
Edad (años)	69,8 \pm 11,9	63,3 \pm 15,7	72,6 \pm 8,8	0,10
Sexo masculino, n(%)	19 (54)	7 (64)	12 (50)	0,22
Factores de riesgo, n(%)				
Hipertensión	29 (83)	9 (82)	20 (83)	0,91
Diabetes	9 (26)	1 (9)	8 (33)	0,13
Dislipemia	22 (63)	6 (55)	16 (67)	0,50
Tabaquismo	18 (51)	7 (64)	11 (46)	0,34
Tratamiento, n(%)				
IECA/ARA-II	23 (66)	7 (64)	16 (67)	0,52
Diureticos	24 (69)	6 (55)	18 (75)	0,24
Betabloqueantes	14 (40)	7 (64)	7 (29)	0,07
Estatinas	20 (57)	6 (55)	14 (58)	0,84
Metformina	6 (17)	1 (9)	5 (21)	0,14
Antidiabéticos	3 (9)	1 (9)	2 (9)	0,92
Insulina	4 (12)	0 (0)	4 (18)	0,14
Laboratorio				
Hemoglobina (g/dL)	13,1 \pm 1,1	13,4 \pm 1,2	12,9 \pm 1,1	0,15
Creatinina (mg/dL)	0,8 \pm 0,2	0,9 \pm 0,2	0,8 \pm 0,3	0,62
HbA1c (%)	6,2 \pm 0,6	6,0 \pm 0,9	6,6 \pm 0,5	0,36
Ecocardiografía				
LVEF (%)	60,4 \pm 10,3	59,4 \pm 14,2	60,9 \pm 8,2	0,72
VTDVI (mm)	48,8 \pm 9,4	51,6 \pm 10,9	47,5 \pm 8,5	0,20
TAPSE (mm)	22,7 \pm 6,0	24,0 \pm 4,7	22,1 \pm 6,6	0,40
sPAP (mmHg)	39,1 \pm 9,9	35,5 \pm 8,2	40,8 \pm 10,3	0,11
Historia cardiopatía				
Cardiopatía isquémica, n(%)	8 (23)	5 (45)	3 (13)	0,03
Nº de vasos con estenosis	0,2 \pm 0,6	0,4 \pm 0,9	0,2 \pm 0,5	0,41
Clase funcional NYHA	2,7 \pm 0,5	2,6 \pm 0,5	2,7 \pm 0,5	0,87

Tabla 8. Características basales de los pacientes en función de la expresión basal de PGC-1 α en sangre periférica.

Al analizar los resultados de la coronariografía preoperatoria, se halló una mayor prevalencia de enfermedad coronaria en los pacientes con mayor expresión constitutiva de PGC-1 α . Sin embargo, si comparamos las variables de la cirugía cardiaca que pueden verse influidas por la presencia de coronariopatía, como puede ser el tiempo de isquemia o el valor máximo de biomarcadores de daño miocárdico tras la cirugía (pico de troponina), no se observaron diferencias significativas (Tabla 9).

	Todos (n=35)	Pacientes con expresión periférica de PGC-1α elevada (n=11)	Pacientes con expresión periférica de PGC-1α no detectable (n=24)	P
<i>Gradientes ecocardiograficos prequirúrgicos (mmHg)</i>				
Gradiente aórtico pico	81.3 \pm 24.0	77.0 \pm 31.6	82.9 \pm 21.6	0.61
Gradiente aórtico medio	44.6 \pm 16.5	41.6 \pm 21.3	45.8 \pm 14.8	0.57
<i>Circulación extracorpórea</i>				
Tiempo de isquemia (min)	104.5 \pm 35.9	111.7 \pm 41.2	100.9 \pm 33.6	0.47
<i>Injertos coronarios</i>				
Pacientes con cirugía coronaria concomitante	5 (14)	3 (27)	2 (8)	0.65
Injertos coronarios totales	9	5	4	0.83
<i>Biomarcadores de daño miocárdico</i>				
Troponina I máxima (ng/mL)	1.4 \pm 2.6	1.7 \pm 2.7	1.2 \pm 2.6	0.59

Tabla 9. Variables de la cirugía cardiaca en función de la expresión de PGC-1 α en sangre periférica

5.2.2. Correlación en la expresión de PGC-1 α en células mononucleares aisladas de sangre periférica y en miocardio

Cuando se realizó un gráfico de dispersión de puntos utilizando el grado de expresión en los dos grupos de muestras, encontramos una gran variabilidad en los valores de expresión, tal y como cabía esperar según estudios clínicos previos (Figura 23). En base a esto, y con el fin de establecer si la expresión de PGC-1 α en sangre y las biopsias en miocardio guardaban, de hecho, una correlación clínica, se construyó una tabla cruzada con ambas expresiones utilizando un punto de corte en el nivel de expresión de PGC-1 α de 2 veces el valor mínimo detectado en la población, tal y como se describe anteriormente. Con esto, se observó una buena correlación entre ambas expresiones con un índice kappa de 0,66 ($p < 0,001$), con 8 de los 11 pacientes con expresión elevada tanto a nivel periférico como a nivel miocárdico.

5.2.3. Genes diana y genes reguladores de PGC-1 α

Con el objetivo de evaluar si la expresión periférica de PGC-1 α se correlacionaba con sus dianas, se determinó la expresión de SOD tanto en sangre periférica como en muestras de miocardio. Se observó un incremento ligero de la expresión de SOD en pacientes con expresión periférica elevada de PGC-1 α , aunque en el caso del tejido miocárdico la relación no fue estadísticamente significativa (ratio de expresión: 2.01 ± 3.21 vs. 1.03 ± 0.03 , $p = 0.14$) (Figure 24).

Al analizar si los reguladores post-trascipcionales que han mostrado incrementar la actividad de PGC-1 α presentaban una expresión diferenciada en ambos grupos, se determinó la expresión de ARNm de AMPK y SIRT-1. Observamos que en pacientes con mayor expresión basal de PGC-1 α , la expresión de SIRT-1 se encontraba incrementada tanto en sangre como en miocardio (x-fold: 4.43 ± 5.22 vs. 1.09 ± 0.14 ,

p=0.044 en sangre periférica; y 2.16 ± 3.29 vs. 1.03 ± 0.03 , p=0.096 en biopsias de miocardio) (Figure 24). No se hallaron diferencias significativas en la expresión de AMPK entre los grupos.

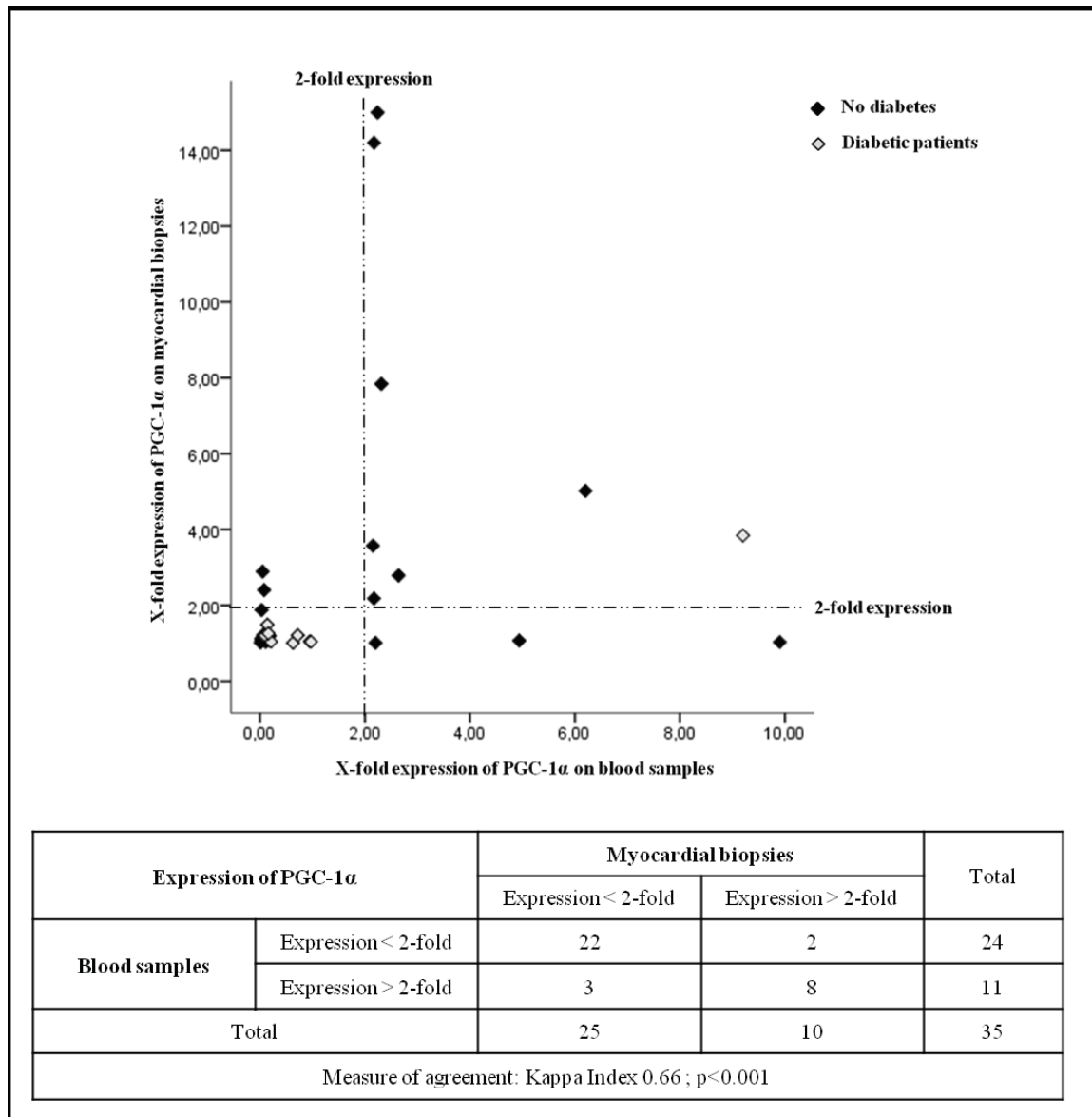


Figura 23. Correlación en la expresión de ARNm de PGC-1α en leucocitos aislados de sangre periférica y miocardio. Los pacientes se dividieron en función del punto de corte de 2-fold en sangre periférica. Se utilizó el índice Kappa para evaluar el grado de correlación entre las muestras.

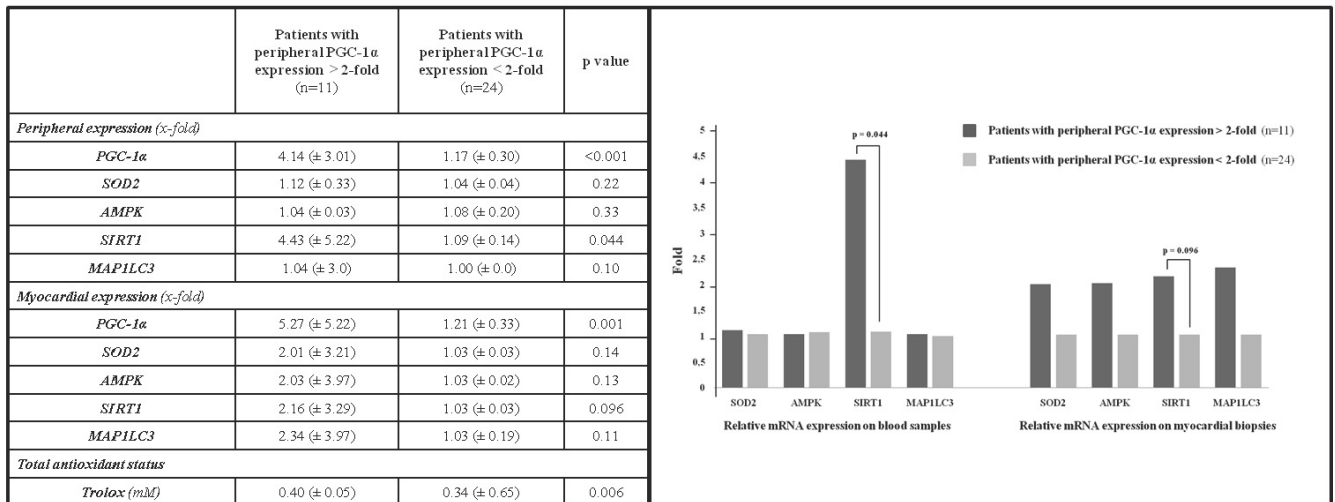


Figura 24. Expresión relativa de ARNm de los genes diana de PGC-1 α y el estado antioxidante total, en función de la expresión basal de PGC-1 α en sangre periférica. La expresión de ARNm se representa en función del x-fold sobre la expresión mínima detectada entre los pacientes. *SOD2*: superoxide dismutase 2. *AMPK*: AMP-activated protein kinasa. *SIRT-1*: silent information regulator 2 homolog 1. *MAP1LC3*: microtubule-associated protein-1 light chain-3. *Trolox*: 6-hidroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid

5.2.4. Autofagia y estado antioxidante total

Como marcador de autofagia, analizamos la expresión de microtubule-associated protein-1 light chain-3 (*MAP1LC3*) en ambos grupos, implicado en la elongación de la membrana de autofagosomas. Encontramos que los niveles de RNA de *MAP1LC3* eran superiores en el grupo de pacientes con expresión elevada de PGC-1 α , aunque las diferencias no fueron significativas (ratio de expresión entre grupos: 2.34 \pm 3.97 vs. 1.03 \pm 0.19, p=0.11) (Figura 24).

Al determinar el estado antioxidante total de los pacientes en ambos grupos, como marcador indirecto de su condición proinflamatoria, se halló una mayor concentración de Trolox en los pacientes con mayor expresión basal de PGC-1 α (Trolox 0.40 \pm 0.05 vs. 0.34 \pm 0.65, p=0.006), sugiriendo por tanto mayor nivel de metabolismo oxidativo, mayor ratio de consumo de oxígeno y menor estrés oxidativo sistémico.

5.2.5. Respuesta inmune

Con el objeto de caracterizar la respuesta inmune desencadenada por la cirugía cardíaca, se monitorizaron tras la intervención los valores absolutos y relativos de leucocitos, las cifras de proteína C reactiva, y los valores de lactato en sangre. Encontramos que los pacientes con mayor expresión basal de PGC-1 α en sangre tenían valores absolutos de leucocitos más elevados previos a la cirugía (0.68 ± 0.16 vs. 0.55 ± 0.11 , $p=0.01$), con una tendencia hacia mayor recuento de neutrófilos, sin otras diferencias significativas (Tabla 10 - apartado A). En relación al lactato, que se incrementa con la activación de la vía glucolítica, encontramos que los pacientes con mayor expresión de PGC-1 α mostraron niveles más bajos a las 8 horas de la cirugía, sugiriendo mayor dependencia en el metabolismo aerobio en estos pacientes. A las 24 horas las diferencias fueron similares, aunque no significativas. Finalmente, en relación al estudio de la proteína C reactiva, como marcador inflamatorio inespecífico, observamos menores cifras de la proteína en estos pacientes (0.21 ± 0.11 vs. 0.50 ± 0.42 , $p=0.01$), sugiriendo un perfil inflamatorio más favorable con la mayor expresión basal de PGC-1 α .

Para valorar de una forma más individualizada la respuesta a la cirugía, analizamos los cambios porcentuales en ambos grupos, y se halló un mayor incremento porcentual del valor absoluto de neutrófilos a las 48 horas en los pacientes con menor expresión de PGC-1 α , sin otras diferencias significativas (Tabla 10 - apartado B).

	PGC-1 α > 2-fold (n=11)	PGC-1 α < 2-fold (n=24)	p
A			
<i>Leucocitos</i>			
<i>Recuentos absolutos ($\cdot 10^9/L$)</i>			
<i>Neutrófilos 0h</i>	7.41 (\pm 2.30)	5.51 (\pm 2.78)	0.06
<i>Neutrófilos 48h</i>	14.34 (\pm 3.96)	13.45 (\pm 4.14)	0.55
<i>Linfocitos 0h</i>	1.94 (\pm 0.66)	1.78 (\pm 0.67)	0.52
<i>Linfocitos 48h</i>	1.01 (\pm 0.53)	0.81 (\pm 0.44)	0.26
<i>Monocitos 0h</i>	0.68 (\pm 0.16)	0.55 (\pm 0.11)	0.01
<i>Monocitos 48h</i>	1.09 (\pm 0.53)	0.94 (\pm 0.33)	0.33
<i>Recuentos porcentuales (%)</i>			
<i>Neutrófilos 0h</i>	67.1 (\pm 9.5)	65.7 (\pm 10.7)	0.71
<i>Neutrófilos 48h</i>	85.7 (\pm 5.4)	88.1 (\pm 3.1)	0.10
<i>Linfocitos 0h</i>	22.5 (\pm 8.3)	23.7 (\pm 9.6)	0.72
<i>Linfocitos 48h</i>	6.9 (\pm 4.4)	5.4 (\pm 2.2)	0.19
<i>Monocitos 0h</i>	7.5 (\pm 1.3)	7.1 (\pm 1.9)	0.53
<i>Monocitos 48h</i>	6.7 (\pm 3.0)	6.3 (\pm 1.7)	0.61
<i>Lactato (mmol/L)</i>			
<i>8h tras cirugía</i>	1.45 (\pm 0.91)	2.81 (\pm 1.53)	0.002
<i>24h tras cirugía</i>	2.11 (\pm 0.92)	2.74 (\pm 1.11)	0.09
<i>48h tras cirugía</i>	2.02 (\pm 1.12)	1.92 (\pm 0.86)	0.80
<i>Proteína C reactiva (mg/dL)</i>			
<i>Antes de la cirugía</i>	0.21 (\pm 0.11)	0.50 (\pm 0.42)	0.037
<i>24h tras cirugía</i>	9.06 (\pm 4.93)	7.59 (\pm 3.36)	0.31
<i>48h tras cirugía</i>	1.24 (\pm 4.17)	1.41 (\pm 6.11)	0.39
B			
<i>Leucocitos</i>			
<i>Cambios porcentuales (%)</i>			
<i>Neutrófilos 48h-0h/0h</i>	104.3 (\pm 63.3)	167.7 (\pm 93.0)	0.026
<i>Linfocitos 48h-0h/0h</i>	-41.9 (\pm 35.7)	-38.8 (\pm 85.8)	0.88
<i>Monocitos 48h-0h/0h</i>	65.1 (\pm 78.6)	78.5 (\pm 82.5)	0.65

Tabla 10. Respuesta inmune desencadenada por la cirugía, según el valor basal periférico de la PGC-1 α

5.2.6. Expresión de PGC-1 α en trastornos metabólicos

Como se muestra en figura 23, sólo uno de los nueve pacientes diabéticos de la muestra mostraba unos niveles de expresión basal de PGC-1 α elevados tanto en sangre periférica como en tejido miocárdico. Si consideramos el punto de corte de hemoglobina glicada $>6.5\%$ para el diagnóstico de diabetes, según las recomendaciones de las guías actuales⁸⁸, encontramos una distribución en el mismo sentido (Tabla 11). Esta regulación a la baja de la transcripción de PGC-1 α observada en pacientes con diabetes, asumiendo tanto los individuos con diagnóstico establecido de enfermedad como aquellos con hemoglobina glicada elevada (diagnóstico hospitalario), se correlacionó con menor número de transcritos de SIRT-1 y SOD, aunque éste último de forma no significativa (Figura 24). Los grupos fueron, por otro lado, comparables en el estado antioxidante total y el marcador de autofagia.

		PGC-1 α basal en sangre periférica			PGC-1 α basal en miocardio		
		> 2-Fold	< 2-Fold	p	> 2-Fold	< 2-Fold	p
Diagnóstico previo de diabetes	Sí	1	8	0.12	1	8	0.19
	No	10	16		9	17	
Diagnóstico previo de diabetes y/o hemoglobina glicada $\geq 6.5\%$	Sí	2	12	0.07	1	13	0.02
	No	9	12		9	12	

Tabla 11. Expresión basal de PGC-1 α según la presencia de trastornos del metabolismo glucídico

6.- Discusión

6.- Discusión

6.1. *Primera fase: Evaluación de los niveles de ARNm de PGC-1 α como biomarcador en pacientes con infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST*

La recuperación de la capacidad oxidativa en los miocardiocitos es crucial durante la fase de reperfusión tras un infarto agudo de miocardio. PGC-1 α es un regulador maestro del metabolismo celular oxidativo, con fuerte expresión en tejidos de actividad metabólica elevada como el miocárdico. Sin embargo, a pesar de la evidencia científica en estudios animales donde se ha demostrado el potencial papel cardioprotector de la expresión elevada de este factor de transcripción, no se había caracterizado hasta el momento la posible implicación funcional de PGC-1 α en la regulación de las diferentes rutas metabólicas tras un evento coronario agudo.

Los resultados del presente estudio sugieren que la monitorización de los niveles plasmáticos de PGC-1 α tras un SCACEST podría utilizarse como un interesante marcador de respuesta miocárdica durante la fase de recuperación tras el infarto.

Esta hipótesis se basa en el hecho que los pacientes con mayor nivel de expresión basal de la molécula y ausencia de inducción tras el evento, presentan menor necrosis miocárdica en la evolución, mientras los infartos más extensos se relacionan con pacientes que presentaban niveles pobres de expresión transcripcional al ingreso e intensa inducción de PGC-1 α a las 72 horas.

Es importante señalar que la inducción del cofactor se sigue de aumento proporcional en la expresión de las dianas génicas *cyt c* y *SOD*, tanto en expresión de ARN como en

síntesis proteica, lo que sirve como indicador de actividad de la molécula. El incremento de SOD en situaciones de isquemia-reperfusión es un hecho que reporta efectos protectores en el tejido donde se produce, como la evidencia en investigación básica ha demostrado. Por tanto, los datos de esta fase del estudio sugieren que la inducción de PGC-1 α podría tener un carácter cardioprotector, en tanto estimula la expresión de enzimas de detoxificación mitocondrial en condiciones de máximo estrés oxidativo celular, y por tanto, permitirían confirmar el alcance del coactivador en su función regulatoria transcripcional.

Otro concepto importante se deriva de la conclusión según la cual podemos medir los niveles de PGC-1 α de manera fiable mediante PCR a partir de muestras de sangre periférica, y estas mediciones son un buen indicador de la actividad de la molécula. Ningún estudio hasta el momento se había aproximado a la posibilidad de determinar en muestras de sangre periférica los niveles de PGC-1 α en pacientes con diagnóstico de infarto. Por ello, inicialmente, en base al conocimiento de la activación inmunológica que se produce tras un SCACEST, fue necesario evaluar si podía estimarse la expresión de la molécula en linfocitos murinos, tanto en estado basal como tras estimulación con IgM. Estos resultados apoyaron el aislamiento de la población linfocitaria durante el procesamiento de las muestras humanas para monitorizar la expresión de PGC-1 α , y permitieron, por tanto y de forma adicional, apoyar la hipótesis que la inducción de PGC-1 α en los linfocitos es parte de la activación inmune que sigue a un infarto de miocardio.

En relación a esta respuesta inmune, es sabido que tras un infarto de miocardio aumenta de manera considerable el recuento leucocitario en las primeras horas, producto de una activación inflamatoria en cascada, y se comprobó en nuestra muestra como, efectivamente, los resultados eran congruentes con la evidencia previa, y los

pacientes al ingreso presentaban en su mayoría leucocitosis significativa, con disminución progresiva en las cifras globales a las 72 horas siguientes. Sin embargo, no había diferencias significativas en la fórmula leucocitaria entre los dos grupos analizados en el estudio, lo que sugiere que la inducción de PGC-1 α es una respuesta específica de los linfocitos, independiente del cambio en el número de leucocitos.

Otro aspecto interesante de los resultados proviene de la observación que la inducción de PGC-1 α tiende a ser más frecuente y destacada en los pacientes con metabolismo glucídico alterado y aquellos con niveles más elevados de proteína C reactiva al ingreso, aunque las diferencias no alcanzan poder estadístico. Recientemente se ha relacionado el incremento plasmático de proteína C reactiva con un peor pronóstico en pacientes con infarto de miocardio sometidos a estrategia de reperfusión, mostrándose como un potente factor de riesgo en la estratificación de esta población⁸⁹. A pesar de la necesidad de más estudios, nuestro trabajo es coherente con la evidencia previa, y los resultados la apoyan en el sentido que los pacientes con infartos más extensos presentaban niveles más elevados de proteína C reactiva a su llegada a urgencias. En relación al metabolismo de la glucosa, los resultados son aparentemente contradictorios. Por un lado, estudios previos han demostrado aumento de los niveles de RNA de PGC-1 α en el hígado de pacientes diabéticos⁹⁰, sin embargo, en general, los resultados en pacientes diabéticos son consistentes a la hora de determinar una pérdida de actividad de la molécula⁹¹. Esta paradoja podría estar relacionada con el hecho demostrado que los pacientes diabéticos tienen generalmente una activación crónica basal del sistema inmune. Así, en nuestra muestra, los pacientes con alteración de la glucosa en ayunas, presentaron niveles basales de PGC-1 α reducidos e infartos más extensos, a pesar de la intensa inducción de la molécula.

Podemos explicar esto cotejando nuestros datos con la línea de la evidencia, donde está ampliamente aceptado que los estados de disfunción metabólica como la diabetes o la dislipemia suponen una depresión crónica de los niveles de expresión de PGC-1 α , y a pesar de la intensa inducción de la molécula que se produce en estos pacientes en situaciones de estrés oxidativo agudo, esta respuesta sería insuficiente debido a la disfunción mitocondrial generalizada que padecen. La definición molecular de esta situación, a través de pruebas que permiten la monitorización de los niveles de PGC-1 α durante la evolución del infarto, podría utilizarse en el futuro como un factor de riesgo añadido en la recuperación clínica de este tipo de pacientes y fue la base para definir la segunda fase del proyecto.

Los resultados de esta primera fase del estudio, en resumen, sugieren que probablemente la actividad de PGC-1 α sea relevante a la hora de limitar el daño miocárdico tras un SCACEST, y que, por tanto, la monitorización de los niveles de expresión plasmáticos durante la evolución del evento podría resultar útil como marcador molecular de recuperación cardíaca, en cuanto se relaciona de forma significativa con la extensión del infarto.

Sin embargo, el estudio presentó una serie de limitaciones importantes. En primer lugar, no se podía asegurar que las variaciones en los niveles de expresión de PGC-1 α analizadas en linfocitos periféricos, reflejaran de forma fiable cambios en la expresión de la molécula y sus dianas génicas en el tejido miocárdico. Además, a pesar que la evidencia previa en experimentación básica sugiere que la inducción de la molécula desempeña un papel en la protección miocárdica, no es posible establecer una relación de causalidad entre la inducción de PGC-1 α y su papel cardioprotector a partir de la observación de dicha asociación. Otra limitación del trabajo fue la heterogeneidad de

los pacientes, pues se incluyeron infartos de diversa localización y diferentes técnicas de reperfusión.

La dirección futura del proyecto se encaminó a subsanar estas restricciones. Se diseñó un nuevo proyecto con pacientes atendidos por infarto agudo de miocardio, pero todos de localización anterior y con un tiempo corto de evolución, para homogeneizar en lo posible la muestra. Para evaluar el papel protector de la molécula, se correlacionaron los niveles plasmáticos de PGC-1 α tras SCACEST con la cantidad de miocardio salvado por la reperfusión a partir de estudios de resonancia cardiaca. Para ello, son necesarios dos estudios de cardiorresonancia: un primer estudio en la fase aguda del evento clínico, identificando el área de edema miocárdico, que engloba tejido viable y no viable; y un segundo estudio a los seis meses en el cual se determine el área de RTG, correspondiente a tejido necrótico no viable. La cantidad de miocardio salvado por la reperfusión se estima a partir de la diferencia entre ambas áreas. Por tanto, el objetivo principal de la segunda fase del proyecto fue evaluar si la inducción de PGC-1 α tras SCACEST desempeña una función protectora en la recuperación del miocardio.

6.2. Segunda fase: PGC-1 predice miocardio salvado y remodelado ventricular tras infarto agudo de miocardio

Tal y como ha quedado reflejado, el objetivo principal de esta fase del proyecto fue evaluar el potencial papel de PGC-1 α en la recuperación del miocardio tras un síndrome coronario agudo, en base a su función como factor transcripcional maestro regulador de la expresión génica mitocondrial y nuclear en el tejido cardiaco.

Sabiendo que la disfunción endotelial promovida por radicales libres de oxígeno es una característica precoz de las enfermedades cardiovasculares, el interés clínico de PGC-1 α radica en su papel central de detoxificación intracelular en situaciones como la isquemia miocárdica.

Cabe señalar que si bien la inducción de PGC-1 α se ha mostrado beneficiosa en la adaptación del tejido neuronal y el músculo esquelético a situaciones de isquemia y ejercicio intenso respectivamente, su papel en la respuesta al estrés en el corazón adulto es hasta el momento controvertido. En modelos animales, por un lado se han observado efectos cardiotóxicos con la inducción de PGC-1 α , y por otro, disfunción cardíaca tras su delección transgénica. De la misma manera, estudios clínicos han descrito resultados contradictorios sobre el grado de expresión de PGC-1 α en miocardiocitos disfuncionantes^{92,93}. Centrados en esta aparente paradoja, otros trabajos han sugerido que la sobreexpresión atemperada y transitoria de PGC-1 α podría tener efectos beneficiosos en condiciones de estrés⁹⁴. De esta forma, la supervivencia celular frente al daño por IR dependería del grado de activación inicial del sistema de defensa mitocondrial, de su nivel de respuesta frente a la injuria oxidativa y del mantenimiento de la misma tras el estímulo.

En nuestro trabajo se monitorizó la expresión de PGC-1 α en pacientes con SCACEST sometidos a estrategia de reperfusión, y por tanto, con lesión por IR en tejido cardíaco. Encontramos, en primer lugar, que el grado de activación basal del sistema era importante en la extensión de la necrosis miocárdica, de forma que aquellos pacientes con expresión constitutiva de PGC-1 α detectable en la primera muestra sanguínea presentaron mayor índice de MS en el estudio de control a los 6 meses. Además, se observó una tendencia hacia menor RV y mayor grado de recuperación de la función sistólica. La ausencia de expresión basal de PGC-1 α se encontró más frecuentemente en

pacientes diabéticos, aunque de forma no significativa por el reducido tamaño muestral. Estos resultados refuerzan la evidencia que sugiere que la integridad del sistema regulado por PGC-1 α es esencial para afrontar el daño agudo por IR, y podrían explicar en parte la peor evolución de los pacientes con trastornos del metabolismo glucídico, en base a la pérdida de actividad de PGC-1 α descrita tradicionalmente en pacientes con diabetes⁹⁵. En este sentido, el ensayo AleCardio evaluó recientemente el efecto de aleglitazar, como agonista dual de los receptores PPAR, en la reducción de eventos cardiovasculares tras síndrome coronario agudo en pacientes diabéticos. Sin embargo, el ensayo se interrumpió de forma prematura por recomendación del comité de seguridad debido a la falta de eficacia y al incremento de los objetivos de seguridad en un análisis intermedio no planificado⁹⁶.

Al analizar la implicación pronóstica de la inducción de PGC-1 α en pacientes con IAMEST, observamos su correlación con el desarrollo de mayor RV, siendo los grupos muestrales comparables en tiempo de isquemia, estrategia de reperfusión, arteria responsable del evento y área de necrosis inicial estimada por RMC. Este incremento del VTDVI en el control a los 6 meses se acompañó de un deterioro no significativo de la función sistólica. La inducción de PGC-1 α se siguió asimismo de un aumento significativo en la expresión de sus dianas génicas citC y GPx. Estos datos apoyarían la hipótesis que sugiere que la inducción excesiva tanto de PGC-1 α , como del sistema mitocondrial frente a estrés oxidativo que regula, tendría efectos deletéreos sobre la supervivencia celular frente a situaciones de IR. El mecanismo fisiopatológico responsable podría explicarse en parte por la inducción de ANT mediada por PGC-1 α en respuesta a la lesión por IR, que incrementa la apoptosis celular de forma dosis-dependiente en diversos tejidos, incluido el cardíaco⁹⁷.

Recientemente, se ha demostrado cómo la activación coordinada de ANT-1 y PGC-1 α en modelos murinos de isquemia disminuye la tolerancia celular al estrés⁴⁹. Ante la evidencia de disfunción contráctil tras la inducción de PGC-1 α en situaciones de IR, se ha sugerido la participación conjunta de ANT-1 en el desarrollo de este fenotipo adverso, aunque esta situación no ha sido testada clínicamente en pacientes. En nuestro estudio, al comparar los grupos según la inducción de PGC-1 α tras SCACEST, se observó mayor inducción de ANT-1 en los pacientes con inducción de PGC-1 α . Por tanto, estos resultados apoyarían esta hipótesis por primera vez en un escenario clínico de lesión por IR.

Por otro lado, en base a la correlación observada entre la inducción de PGC-1 α y el desarrollo de RV, se comparó su capacidad pronóstica tomando como referencia la presencia de OMV en la RMC, pues ha demostrado ser un excelente factor pronóstico de RV^{98,99}. En nuestro estudio, la capacidad predictiva de la inducción de PGC-1 α tras SCACEST fue superior a la existencia de OMV, y el hallazgo conjunto de ambas variables se correlacionó de forma exacta con la aparición de RV en todos los pacientes. Además, y en sentido opuesto, la ausencia de OMV e inducción de PGC-1 α se relacionó con una mejor evolución tanto en la preservación del VTDVI como en la mejora de la FEVI. Aún con las limitaciones del reducido número de pacientes, estos datos sugieren el valor pronóstico de la inducción de PGC-1 α en la recuperación miocárdica tras SCACEST.

En resumen, la evidencia hasta el momento en investigación básica demuestra la participación de PGC-1 α en la regulación del sistema de protección celular frente a daño por IR, con resultados inciertos sobre su papel en tejido cardíaco. Nuestro trabajo monitorizó en un escenario clínico la expresión sistémica de PGC-1 α tras SCACEST con el objeto de definir un perfil de activación cardioprotector. Así, mientras la

expresión constitutiva de PGC-1 α se asoció a mayor MS, su inducción inmediata tras SCACEST se correlacionó con mayor RV en la evolución post-infarto. Este efecto perjudicial en la recuperación cardiaca podría explicarse en parte por la inducción de ANT-1 mediada por PGC-1 α .

Estos datos en conjunto sugieren que la integridad del sistema de protección mitocondrial regulado por PGC-1 α es esencial para una adecuada respuesta al daño por IR, mientras su activación excesiva y mantenida en el tiempo tras el evento isquémico tendría efectos deletéreos sobre la recuperación cardiaca. Sin embargo, las implicaciones pronósticas de estos hallazgos escapan al ámbito de nuestro estudio.

Esta fase del proyecto presentó como principales limitaciones el reducido tamaño muestral y el carácter eminentemente básico de la investigación. Así, aunque el diseño traslacional de la misma permite establecer hipótesis de trabajo en base a las conclusiones, conlleva inherentemente la necesidad de estudios clínicos futuros que permitan confirmar los hallazgos y definir el papel de la determinación de PGC-1 α en la práctica clínica.

6.3. Tercera fase: Correlación en la expresión de PGC-1 en sangre periférica y tejido miocárdico

En la última fase del proyecto se demostró por primera vez una buena correlación en los niveles de expresión de PGC-1 α en células mononucleares de sangre periférica y tejido miocárdico. Las conclusiones del trabajo sugieren que la estimación no invasiva del nivel de expresión de PGC-1 α mediante muestras sanguíneas podría ser un método fiable y reproducible para determinar el grado de expresión sistémico y miocárdico, y

permitiría, en su caso, la monitorización de los niveles de expresión en diferentes contextos clínicos.

Los resultados obtenidos en las fases previas del estudio^{100,101}, llevadas a cabo en el escenario clínico del infarto agudo de miocardio, mostraron que la estimación periférica de la expresión de PGC-1 α era un método práctico y los pacientes podían ser clasificados en dos subgrupos en base a los niveles de ARNm de PGC-1 α . Esto es, pacientes con niveles detectables de transcritos en sangre, y pacientes con expresión constitutiva indetectable mediante este protocolo de análisis. El primer estudio, además, correlacionó positivamente la extensión de la necrosis miocárdica con la inducción en la expresión de PGC-1 α tras el síndrome coronario agudo. El segundo estudio, por su parte, confirmó estos hallazgos y además caracterizó dos perfiles de expresión claramente diferenciados: por una parte, pacientes con expresión basal de PGC-1 α baja e inducción de la misma tras el evento, que presentaban infartos más extensos y mayor remodelado ventricular en la evolución; y por otro lado, pacientes con buena expresión constitutiva de PGC-1 α e incrementos de expresión más atemperados tras el síndrome coronario agudo, característicamente con menor necrosis miocárdica. Con objeto de validar estos resultados mediante el análisis directo del tejido miocárdico que nos permitiera correlacionar de manera directa la expresión central y periférica de PGC-1 α , se llevó a cabo esta tercera fase del estudio en pacientes sometidos a cirugía cardíaca.

Dado que la expresión de PGC-1 α presenta una gran dispersión interindividual en sus valores en estudios clínicos, a diferencia de los modelos animales donde es factible el control de ciertas variables confusoras, se determinó dividir a los pacientes de forma categórica, utilizando como punto de corte el grado de expresión superior a 2 pliegues (2-fold) sobre el mínimo valor de expresión detectado en los pacientes, con el fin de considerar expresión de PGC-1 α detectada en muestras sanguíneas como clínicamente

significativamente o no. Este método de análisis de la expresión de ARNm de PGC-1 α facilita la clasificación de los pacientes y de forma sencilla permite evaluar la significación clínica de los resultados. Hasta donde conocemos, todos los estudios previos han utilizado biopsias tisulares para determinar la expresión de PGC-1 α en forma de ARNm, tanto en tejido miocárdico¹⁰² como en músculo¹⁰³⁻¹⁰⁴. Nuestro protocolo permite una aproximación no invasiva del nivel de activación sistémica de PGC-1 α y sus genes diana, sin utilizar técnicas excesivamente sofisticadas o cruentas.

El mayor grado de expresión constitutiva de PGC-1 α se ha relacionado con la regulación al alza de la biogénesis mitocondrial y las defensas enzimáticas antioxidantes, y mayor uso de la vía de fosforilación oxidativa, especialmente en órganos con alta tasa metabólica como el cerebro, el músculo, el hígado o el corazón. Así, por ejemplo, PGC-1 α desempeña un rol fundamental en la regulación de SOD, enzima clave del sistema de protección frente a estrés oxidativo, en modelos animales de sobrecarga cardíaca¹⁰⁵. Además, se asume que la expresión de reguladores post-transcripciones que incrementan la actividad de PGC-1 α se verá aumentada en estas situaciones. En nuestro estudio, tanto los transcritos de SOD como de SIRT-1 tendieron a elevarse en pacientes con mayor expresión de PGC-1 α , aunque las diferencias no fueron significativas. Sin embargo, en conjunto, los resultados sugieren una activación coordinada del sistema regulado por PGC-1 α en situaciones de estrés oxidativo.

Relacionado con esto, cuando analizamos la relación potencial entre la expresión de ARNm de PGC-1 α y los mecanismo de autofagia celular y el estado redox del individuo, dado que estos procesos se han relacionado con algunos trastornos metabólicos como la diabetes^{106,107}, encontramos un regulación al alza de MAP1LC3 como marcador de autofagia en el grupo de pacientes con mayor expresión de PGC-1 α ,

y una mayor capacidad antioxidante estimada indirectamente por la concentración de Trolox. Todo esto refuerza la hipótesis que sugiere un mayor balance redox en estos pacientes. En este sentido, algunos estudios se han centrado en la relación entre la homeostasis redox regulada por PGC-1 α y su efecto cardioprotector, mostrando que la inducción de PGC-1 α puede reducir el tamaño del infarto y preservar la función ventricular izquierda en modelos animales de isquemia miocárdica. Por lo tanto, el uso clínico de la monitorización de los niveles de PGC-1 α en este contexto tendría probablemente su utilidad clínica.

Por otro lado, en relación al análisis de la respuesta inmune, es bien conocida la correlación del metabolismo con el sistema inmunitario, y cómo la expresión aberrante de PGC-1 α puede generar un estado persistente de inflamación sistémica y un riesgo más elevado de algunas enfermedades crónicas¹⁰⁸. Nuestros resultados indican que los pacientes con mayor expresión de PGC-1 α presentaban un mejor perfil inmune, con menores niveles de proteína C reactiva basal y tras cirugía, y menor producción de lactato tras la misma. Además, la respuesta inmune inespecífica tras la intervención representada por el incremento relativo de neutrófilos, fue más atemperada en estos pacientes. Estos hallazgos podrían ayudar a afianzar la evidencia creciente que establece una relación estrecha entre la disregulación metabólica y ciertos estados proinflamatorios.

A este respecto, algunos hallazgos recientes destacan el nexo de unión entre los procesos inflamatorios y las alteraciones metabólicas en la insuficiencia cardiaca de pacientes diabéticos¹⁰⁹. De forma destacable, la activación de PGC-1 α podría prevenir las alteraciones metabólicas ocurridas en el contexto de la miocardiopatía diabética, mediante la inhibición de procesos inflamatorios mediados por el factor NF- κ B. Nuestros resultados iniciales ya sugerían que los pacientes diabéticos mostraban valores

bajos de ARNm de PGC-1 α en sangre periférica, al compararlo con pacientes sin trastornos metabólicos. En esta última fase del proyecto, se demuestra como la amplia mayoría de pacientes diabéticos (tanto aquellos con diagnóstico previo como los que presentaban hemoglobina glicada durante el ingreso >6.5%) tenían valores de ARNm de PGC-1 α bajos. Esta regulación a la baja de PGC-1 α se asoció con una tendencia hacia menor expresión de las diferentes dianas génicas analizadas, y además, con una menor capacidad antioxidante.

Este último estudio comparte algunas limitaciones con las etapas previas, entre las que cabe enumerar el escaso tamaño muestral, el carácter unicéntrico del análisis, y las muestras únicas analizadas, tanto de sangre periférica como las resultantes de las biopsias cardíacas. Sin embargo, aunque algunos resultados no alcanzaron la significación estadística debido a estas limitaciones, son consistentes con nuestros resultados previos y la evidencia.

7.- Conclusiones

7.- Conclusiones

PGC-1 α es un coactivador transcripcional con un papel determinante en la regulación de los genes de protección mitocondrial frente a estrés oxidativo, y participa de manera fundamental en los procesos moleculares inherentes al fenómeno de isquemia-reperusión que ocurre en el contexto del síndrome coronario agudo.

Las principales conclusiones de la *primera fase del proyecto* son:

- Utilizando un modelo animal pudimos estimar la expresión de PGC-1 α y sus dianas génicas en poblaciones celulares de timocitos y esplenocitos, así como su inducción tras estimulación específica.
- En pacientes con SCACEST es posible estimar los niveles de ARNm de PGC-1 α a partir de muestras sanguíneas, así como monitorizar su expresión en la evolución del evento.
- La inducción de la molécula tras el infarto se relaciona con áreas de necrosis más extensas, mayor disfunción ventricular izquierda independientemente de la localización del infarto, y mayor movilización de biomarcadores de daño miocárdico.
- La inducción de PGC-1 α , que es más frecuente en pacientes diabéticos y con niveles de proteína C reactiva más elevados al ingreso, se sigue de un incremento proporcional en la expresión de dianas de protección celular frente a isquemia.

Las principales conclusiones de la *segunda fase del proyecto* son:

- La expresión sistémica de PGC-1 α puede monitorizarse en pacientes con SCACEST.
- Mientras el incremento constitutivo de la actividad del sistema regulado por PGC-1 α se correlaciona con mayor miocardio salvado, la inducción excesiva y persistente de la molécula tras el evento coronario se asocia a mayor remodelado ventricular en la evolución del infarto a largo plazo.
- Este efecto deletéreo en la recuperación cardíaca podría estar relacionado con la inducción de ANT-1 mediada por PGC-1 α , que promueve la apoptosis celular en la lesión por isquemia-reperfusión.

Las conclusiones de la *tercera fase del proyecto* son:

- En este estudio realizado en pacientes sometidos a cirugía valvular cardíaca, la expresión de ARNm de PGC-1 α en sangre periférico mostró una buena correlación con la expresión en biopsias de tejido miocárdico.
- La presencia de una mayor expresión sistémica de PGC-1 α se asoció con mayor expresión periférica de SIRT-1 y una mayor concentración Trolox, como indicador del estado antioxidante global en estos pacientes.
- De forma contraria, niveles de expresión bajos de PGC-1 α se correlacionaron con un mayor perfil inflamatorio en los pacientes, y esta condición fue más frecuente en pacientes con trastornos metabólicos.

Financiación del proyecto

Financiación del proyecto

El trabajo ha sido financiado a través de la concesión de varias becas y proyectos de investigación:

- Ministerio español de Ciencia e Innovación, mediante proyectos SAF 2009-07599 y CSD 2007-00020. Investigadora Principal: María Monsalve
- Fundación proCNIC, del Centro de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III de Madrid. Investigadora del CNIC: María Monsalve
- Ministerio de Economía y Competitividad, mediante proyecto SAF2012-37693. Investigadora Principal: María Monsalve
- Proyecto S2010/BMD-2361 de la Comunidad de Madrid. Investigadora Principal: María Monsalve
- Becas de investigación intramural de la Fundación para la investigación del Hospital General de Valencia, convocatorias 2008 y 2010. Investigador Principal: Óscar Fabregat Andrés
- Beca de investigación básica de la Sociedad Española de Cardiología y la Fundación Española del Corazón, convocatorias 2010 y 2014. Investigadores Principales: Francisco Ridocci Soriano, Óscar Fabregat Andrés
- Programa I3 de intensificación investigadora 2010 y 2012 del Instituto de Salud Carlos III y la Generalitat Valenciana. Investigador Principal: Francisco Ridocci Soriano

Bibliografía

Bibliografía

1. Jemal A, Ward E, Hao Y, Thun M. Trends in the leading causes of death in the United States, 1970-2002. *JAMA*. 2005 Sep 14; 294(10):1255-9
2. Graham I, Atar D, Borch-Johnsen K, Boysen G, Burell G, Cifkova R, et al. Guías de práctica clínica sobre prevención de la enfermedad cardiovascular: versión resumida. *Rev Esp Cardiol*. 2008; 61(1):e1-e49
3. Foot DK, Lewis RP, Pearson TA, Beller GA. Demographics and cardiology. 1950-2050. *J Am Coll Cardiol*. 2000; 35 (5 Suppl B):B66-80
4. Leal J, Luengo-Fernández R, Gray A, Petersen S, Rayner M. Economic burden of cardiovascular diseases in the enlarged European Union. *Eur Heart J*. 2006; 27:1610-9
5. Moreu-Burgos J, Macaya-Miguel C. Fisiopatología del miocardio isquémico. Importancia de la frecuencia cardíaca. *Rev Esp Cardiol*. 2007;7(Supl D):19-25
6. Vilariño J, Esper R, Badimón JJ. Fisiopatología de los síndromes coronarios agudos. Tres paradigmas para un nuevo dogma. *Rev Esp Cardiol*. 2004;4 (Supl G):13-24
7. Behrendt D, Ganz P. Endotelial function. From vascular biology to clinical applications. *Am J Cardiol*. 2002;90:140-8
8. Khazaei M, Moeien-Afshari F, Laher I. Vascular endothelial function in health and diseases. *Pathophysiology*. 2008;15:49-67
9. Glass, C. K., and Witztum, J. L. Atherosclerosis: the road ahead. *Cell*. 2001;104, 503-516
10. Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X. L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*. 2000;404, 787-790
11. Betarbet, R., Sherer, T. B., Di Monte, D. A., and Greenamyre, J. T. Mechanistic approaches to Parkinson's disease pathogenesis. *Brain Pathol* 2002;12, 499-510
12. Aliev, G., Smith, M. A., de la Torre, J. C., and Perry, G. Mitochondria as a primary target for vascular hypoperfusion and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Mitochondrion* 2004;4, 649-663
13. Milakovic, T., and Johnson, G. V. Mitochondrial respiration and ATP production are significantly impaired in striatal cells expressing mutant huntingtin. *J Biol Chem* 2005;280, 30773-30782
14. Liang, L. P., Ho, Y. S., and Patel, M. Mitochondrial superoxide production in kainate-induced hippocampal damage. *Neuroscience* 2000;101, 563-570
15. Ungvari, Z., Gupte, S. A., Recchia, F. A., Batkai, S., and Pacher, P. Role of oxidative-nitrosative stress and downstream pathways in various forms of cardiomyopathy and heart failure. *Curr Vasc Pharmacol* 2005;3, 221-229
16. Brownlee, M. A radical explanation for glucose-induced beta cell dysfunction. *J Clin Invest* 2003;112, 1788-1790
17. Jassem, W., and Heaton, N. D. The role of mitochondria in ischemia / reperfusion injury in organ transplantation. *Kidney Int* 2004;66, 514-517
18. Modica-Napolitano, J. S., and Singh, K. K. Mitochondrial dysfunction in cancer. *Mitochondrion* 2004;4, 755-762
19. Huang, H., and Manton, K. G. The role of oxidative damage in mitochondria during aging: a review. *Front Biosci* 2004; 9, 1100-1117
20. Valle, I., Alvarez-Barrientos A, Arza, E., Lamas, S, Monsalve, M. PGC-1 alpha regulates the mitochondrial antioxidant defence system in vascular endothelial cells. *Cardiovascular Res*. 2005;66:562-573
21. Puigserver, P. Tissue-specific regulation of metabolic pathways through the transcriptional coactivator PGC1-alpha. *Int J Obes (Lond)* 2005;29:Suppl 1:S5-9

22. Benton CR, Wright DC, Bonen A. PGC-1 α –mediated regulation of gene expression and metabolism: implications for nutrition and exercise prescriptions. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2008;33:843-62.
23. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1 α . *Cardiovascular Res*. 2008;79(2):208-17
24. Duncan JG, Finck B. The PPAR α - PGC-1 α Axis Controls Cardiac Energy Metabolism in Healthy and Diseased Myocardium. *PPAR Research*. doi:10.1155/253817. 2008
25. Sano M, Schneider MD. Energizer: PGC-1 α keeps the heart going. *Cell Metabolism*. 2005;1: 216-18
26. Arany Z, Novikov M, Chin S, Ma Y, Rosenzweig A, Spiegelman, B. Transverse aortic constriction leads to accelerated heart failure in mice lacking PPAR-gamma coactivator 1-alpha. *PNAS*. 2006;103(26)10086-91
27. Finck B. The PPAR regulatory system in cardiac physiology and disease. Review. *Cardiovascular Res*. 2007;73:269-277.
28. Chiueh, C. C., Andoh, T., and Chock, P. B. Induction of thioredoxin and mitochondrial survival proteins mediates preconditioning-induced cardioprotection and neuroprotection. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1042:403-418.
29. Hida, A., Kawakami, A., T, M., Yamosaki, S., Nakashima, K., Tanaka, F., Izumi, Y., et al. Nitric oxide acts on the mitochondria and protects human endothelial cells from apoptosis. *J Lab Clin Med* 2004;144(3), 148-155
30. Borniquel S, Valle I, Cadenas S, Lamas S, Monsalve M. Nitric oxide regulates mitochondrial oxidative stress protection via the transcriptional coactivator PGC-1 α . *The FASEB Journal*. 2006: 1889-91
31. Arany et al. Transcriptional coactivator PGC-1 α controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. *Cell Metabolism*. 2005;(1) 259-271
32. Ingwall, JS (2002). Energetic basis for heart failure. In *Heart Failure: A companion to Braunwald's Heart Disease*. D. Mann, ed.
33. Faerber G, Barreto-Perreia F, Schoepe M, Gilsbach R, Schrepper A, Schwarzer M, et al. Induction of heart failure by minimally invasive aortic constriction in mice: Reduced peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator levels and mitochondrial dysfunction. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2001;(141): 492-500
34. Hu P, Zhang D, Swenson L, Chakrabarti G, Abel ED, Litwin SE. Minimally invasive aortic banding in mice: effects of altered cardiomyocyte insulin signalling during pressure overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285:H1261-9
35. Rui C, Fengxia L, Shigeto M, Qian L, Junji M, Jun-ichi Y, et al. The effects of PPAR α agonist on myocardial damage in obese diabetic mice with heart failure. *Int Heart Journal*. 2010;51:3:199-206
36. Honda T et al. Pioglitazone, a peroxisome proliferators-activated receptor-gamma agonist, attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in mice with metabolic disorders. *J Moll Cell Cardiol*. 2008. 44(5):915-26
37. Shiomi T, Tsutsui H, Hayashidani S, Suematsu N, Ikeuchi M et al. Pioglitazone, a PPAR gamma agonist, attenuates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction. *Circulation*. 2002;106:3126-32
38. Tian-Li Yue et al. In vivo Myocardial Protection From Ischemia-Reperfusion Injury by the Peroxisome Proliferator-Activator receptor-gamma agonist Rosiglitazone. *Circulation*. 2001. 104:2588-2594
39. Wayman N, Hattori Y, McDonald M, Mota-Filipe H, Cuzzocrea S et al. Ligands of the PPAR gamma and alpha reduce myocardial infarct size. *The FASEB Journal*. 2002; 16:1027-40
40. Sun CK, Chang LT, Sheu JJ, Wang CY, Youssef AA, Wu CJ et al. Losartan preserves integrity of cardiac gap junctions and PGC-1 α gene expression and prevents cellular apoptosis in remote area of left ventricular myocardium following acute myocardial infarction. *Int Heart J*. 2007;48:533-42

41. Ruiz-Meana M, García-Dorado D. Fisiopatología del daño por isquemia-reperusión: nuevas oportunidades terapéuticas en el infarto agudo de miocardio. *Medicina cardiovascular traslacional (II)*. *Rev Esp Cardiol*. 2009;62(2):199-209
42. García-Dorado D, Thérroux P, Duran JM, Solares J, Alonso J, Sanz E, et al. Selective inhibition of the contractile apparatus. A new approach to modification of infarct size, infarct composition, and geometry during coronary artery occlusion and reperfusion. *Circulation*. 1992;85:1160-74
43. Siegmund B, Zude R, Piper HM. Recovery of anoxic-reoxygenated cardiomyocytes from severe calcium overload. *Am J Physiol*. 1992;263:H1262-9
44. Inserte J, García-Dorado D, Hernando V, Soler-Soler J. Calpain-mediated impairment of Na/K/ATPase activity during early reperfusion contributes to cell death after myocardial ischemia. *Circ Res*. 2005;97:465-73
45. García-Dorado D, Inserte J, Ruiz-Meana M, González MA, Solares J, Juliá M, et al. Gap junction uncoupler heptanol prevents cell-to-cell progression of hypercontracture and limits necrosis during myocardial reperfusion. *Circulation*. 1997;96:3579-86
46. Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, et al. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death. *Nature*. 2005;434:658-62
47. Honda HM, Korge P, Weiss JN. Mitochondria and ischemia-reperfusion injury. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1047:248-58
48. West MB, Rokosh G, Obal D, Velayutham M, Yu-Ting X, Hill B, Keith R, et al. Cardiac myocyte-specific expression of inducible nitric oxide synthase protects against ischemia-reperfusion injury by preventing mitochondrial permeability transition. *Circulation*. 2008; 44:1970-78
49. Lynn EG, Stevens MV, Wong RP, Carabenciov D, Jacobson J, Murphy E, et al. Transient upregulation of PGC-1 α diminishes cardiac ischemia tolerance via upregulation of ANT1. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;49(4):693-8
50. Dirksen MT, Laarman GJ, Simoons ML, Duncker DJ. Reperfusion injury in humans: a review of clinical trials on reperfusion injury inhibitory strategies. *Cardiovascular Res*. 2007;74:343-55
51. Theroux P, Chaitman BR, Danchin N, Erhardt L, Meinertz T, Schroeder JS, et al. Inhibition of the sodium-hydrogen exchanger with cariporide to prevent myocardial infarction in high-risk ischemic situations. Main results of the GUARDIAN trial. *Circulation*. 2000;102:3032-8
52. Zeymer U, Suryapranata H, Monassier JP, Opolski G, Davies J, Rasmanis G, et al. The sodium/hydrogen exchange inhibitor eniporide as an adjunct to early reperfusion therapy for acute myocardial infarction. Results of the evaluation of the safety and cardioprotective effects of eniporide in acute myocardial infarction (ESCAMI) trial. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38:1644-5
53. The EXPEDITION study investigators. Effects of sodium/hydrogen exchange inhibition by cariporide on death and nonfatal myocardial infarction in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. *Circulation*. 2003;108:3M
54. Flaherty JT, Pitt B, Gruber JW, Heuser RR, Rothbaum DA, Burwell LR, et al. Recombinant human superoxide dismutase fails to improve recovery of ventricular function in patients undergoing coronary angioplasty for acute myocardial infarction. *Circulation*. 1994;89:1982-91
55. Piot C, Croisille P, Staat P, Thibault H, Rioufol G, Mewton N, et al. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2008;359:473-81
56. Staat P, Rioufol G, Piot C, Cottin Y, Cung TT, L'Huillier I, et al. Postconditioning the human heart. *Circulation*. 2005;112:2143-8
57. Laskey WK. Brief repetitive balloon occlusions enhance reperfusion during percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction: a pilot study. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2005;65:361-7

58. Ma X, Zhang X, Li C, Luo M. Effect of postconditioning on coronary blood flow velocity and endothelial function and LV recovery after myocardial infarction. *J Interv Cardiol.* 2006;19:367-75
59. Bodí V, Ruiz-Nodar JM, Feliu E, Miñana G, Nunez J, Husser O, et al. Effect of postconditioning on microvascular obstruction in reperfused myocardial infarction. Results of a randomised study in patients and of an experimental model in swine. *Int J Cardiol.* 2014;175(1):138-46
60. Prasad A, Stone GW, Colmes D, Gersh B. Reperfusion injury, microvascular dysfunction and cardioprotection: the “dark side” or reperfusion. *Circulation.* 2009;120:2105-12
61. Gibbons RJ, Christian TF, Hopfenspirger M, Hodge DO, Bailey KR. Myocardium at risk and infarct size after thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: implications for the design of randomized trials of acute intervention. *J Am Coll Cardiol.* 1994;24:616-24
62. Zadelaar S, Kleemann L, Verschuren J, de Vries WdW, van der Hoorn H, Princen HM, Kooistra T. Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:1706-24
63. Plump A. S., Smith J. D., Hayek T., Aalto-Setälä K., Walsh A., Verstuyft J. G., Rubin E. M., Breslow J. L. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell.* 1992; 71; 343—353
64. Dong F, Li Q, Sreejayan N, Nunn JM, Ren J. Metallothionein prevents high-fat diet induced cardiac contractile dysfunction: role of peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1alpha and mitochondrial biogenesis. *Diabetes.* 2007. 56;9:2201-12
65. Duncan JG, Fong JL, Medeiros DM, Finck BN, Nelly DP. Insulin-resistant heart exhibits a mitochondrial biogenic response driven by the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha/PGC-1alpha gene regulatory pathway. *Circulation.* 2007. 115;7:909-17
66. Shan K, Constantine G, Sivananthan M, Flamm S. Role of cardiac magnetic resonance imaging in the assessment of myocardial viability. *Circulation.* 2004;109:1328-34
67. Klocke FJ. Cardiac resonance measurements of area at risk and infarct size in ischemic syndromes. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55:2489-90
68. Marholdt H, Wagner A, Holly TA, et al. Reproducibility of chronic infarct size measurement by contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation.* 2002;106:2322-27
69. Al Saadi N, Nagel E, Gross M, et al. Noninvasive detection of myocardial ischemia from perfusion reserve based on cardiovascular magnetic resonance. *Circulation.* 2000;101:1379-83
70. Baer FM, Theissen P, Schneider CA, et al. Dobutamine magnetic resonance imaging predicts contractile recovery of chronically dysfunctional myocardium after successful revascularization. *J Am Coll Cardiol.* 1998;31:1040-48
71. Raman SV, Simonetti OP, Winner M, Dickerson J, Mazzaferri E, Ambrosio G. Cardiac magnetic resonance with edema imaging identifies myocardium at risk and predicts worse outcome in patients with non ST-segment elevation acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55:2480-88
72. Monmeneu JV, Bodí V, Sanchis J, López-Lereu M, Mainar L, Nuñez J, et al. Valoración del edema tras un infarto agudo de miocardio con elevación del ST mediante resonancia magnética cardíaca. *Rev Esp Cardiol.* 2009;62(8):858-66
73. García-Dorado D, Oliveras J, Gili J, Sanz E, Pérez-Villa F, Barrabés J, et al. Analysis of myocardial oedema by magnetic resonance imaging early after coronary artery occlusion with or without reperfusion. *Cardiovasc Res.* 1993;27:1462-9
74. Friedrich MG, Abdel-Aty H, Taylor A, Schulz-Menger J, Messroghli D, Dietz R. The salvaged area at risk in reperfused acute myocardial infarction as visualized by cardiovascular magnetic resonance. *J Am Coll Cardiol.* 2008;51:1581-7

75. Eitel I, Desch S, Fuernau G, Hildebrand L, Gutberlet M, Schuler G, Thiele H. Prognostic significance and determinants of myocardial salvage assessed by cardiovascular magnetic resonance in acute reperfused myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55:2470-9
76. Ugucioni G, D'souza D, Hood DA. Regulation of PPAR γ coactivator-1 α function and expression in muscle: effect of exercise. *PPAR Res*. 2010;937123
77. Van der Werf (coordinador) et al. Guías de Práctica Clínica de la Sociedad Europea de Cardiología (ESC). Manejo del infarto agudo de miocardio en pacientes con elevación persistente del segmento ST. *Rev Esp Cardiol*. 2009;62(3):e1-e47
78. Arós F, Alegría E, Boraita A. Pruebas de esfuerzo en cardiología. Sección de Cardiopatía Isquémica y Unidades Coronarias y Grupo de Trabajo de Cardiología del Deporte de la SEC. 1º ed. Barcelona: Sanofi-Synthélabo, SA;2000. p. 1-17
79. Rijncke RD, Ascoop CA, Talmon JL. Clinical significance of upsloping ST segments in exercise electrocardiography. *Circulation*. 1980;61:671-8
80. San Román JA, Candell-Riera J, Arnold R, Sanchez PL, Aguadé-Bruix S, Bermejo J, et al. Análisis cuantitativo de la función ventricular izquierda como herramienta para la investigación clínica. Fundamentos y metodología. *Rev Clin Esp*. 2009;62:535-51
81. Monmeneu JV, Bodi V, Lopez-Lereu MP, Sanchis J, Nuñez J, Chaustre F, et al. Análisis mediante resonancia magnética cardíaca del miocardio salvado tras infarto. Predictores e influencia en el remodelado adverso. *Rev Esp Cardiol*. 2012;65:634-41
82. Bolognese L, Neskovic A, Parodi G, Cerisano G, Buonamici P, Santoro GM, et al. Left ventricular remodeling after primary coronary angioplasty: patterns of left ventricular dilation and long-term prognostic implications. *Circulation*. 2002;106:2351-7
83. Mannaerts HF, Van der Heide JA, Kamp O, Stoel MG, Twisk J, Visser CA. Early identification of left ventricular remodelling after myocardial infarction, assessed by transthoracic 3D echocardiography. *Eur Heart J*. 2004;25:680-7
84. Ortolani P, Marzocchi A, Marrozzini C, Palmerini T, Sala F, Taglieri N, et al. Predictive value of high sensitivity C-reactive protein in patients with ST elevation myocardial infarction treated with percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J*. 2008;29:1241-9
85. Soyal S, Krempler F, Oberkofler H, Patsch W. PGC1 α : a potent transcriptional cofactor involved in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2006;49:1477-88
86. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, et al. PGC1 α responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet*. 2003;34:267-73
87. García C, Feve B, Ferre P, Halimi S, Baizri H, Bordier L et al. Diabetes and inflammation: fundamental aspects and clinical implications. *Diabetes Metab*. 2007;36:327-338
88. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2014. *Diabetes Care* 2014;37:S14-80
89. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, et al. (2003) PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* 34: 267–273
90. García C, Feve B, Ferre P, Halimi S, Baizri H, et al. Diabetes and inflammation: fundamental aspects and clinical implications. *Diabetes Metab* 36: 327–338.
91. Capasso M, Bhamrah MK, Henley T, Boyd RS, Langlais C, et al. HVCN1 modulates BCR signal strength via regulation of BCR-dependent generation of reactive oxygen species. *Nat Immunol* 11: 265–272.
92. Karamanlidis G, Nascimben L, Couper GS, Shekar PS, Del Monte F, Tian R. Defective DNA replication impairs mitochondrial biogenesis in human failing hearts. *Circ Res* 2010;106:1541–8.
93. Sebastiani M, Giordano C, Nediani C, Travaglini C, Borch E, Zani M. Induction of mitochondrial biogenesis is a maladaptive mechanism in mitochondrial cardiomyopathies. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50:1362–9

94. Rowe GC, Jiang A, Arany Z. PGC-1 coactivators in cardiac development and disease. *Circ Res* 2010;107:825–38
95. MoothaVK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, et al. PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* 2003;34:267–73
96. Lincoff AM, Tardif JC, Schwartz GG, Nicholls SJ, Ryden L, Neal B, et al. Effect of aleglitazar on cardiovascular outcomes after acute coronary syndrome in patients with type 2 diabetes mellitus: the AleCardio randomized clinical trial. *JAMA* 2014;311:1515–25
97. Bauer MK, Schubert A, Rocks O, Grimm S. Adenine nucleotide translocase-1, a component of the permeability transition pore, can dominantly induce apo- ptois. *J Cell Biol* 1999;147:1493–502.
98. Merlos P, Lopez-Lereu MP, Monmeneu JV, Sanchis J, Nuñez J, Bonanad C, et al. Valor pronostico a largo plazo del analisis completo de los indices de resonancia magnetica cardiaca tras un infarto de miocardio con elevacion del segmento ST. *Rev Esp Cardiol* 2013;66:613–22
99. Wu E, Lee DC. Evaluacion del riesgo tras infarto de miocardio con elevacion del segmento ST. *Rev Esp Cardiol* 2013;66:603–5
100. Fabregat-Andres O, Tierrez A, Mata M, Estornell-Erill J, Ridocci-Soriano F, Monsalve M. Induction of PGC-1 α expression can be detected in blood samples of patients with ST-segment elevation acute myocardial infarction. *Plos One* 2011;6(11):e2691
101. Fabregat-Andrés Ó, Ridocci-Soriano F, Estornell-Erill J, Corbí-Pascual M, Valle-Muñoz A, Berenguer-Jofresa A, et al. Blood PGC-1 α concentration predicts myocardial salvage and ventricular remodeling after ST-segment elevation acute myocardial infarction. *Rev Esp Cardiol* 2015;68(5):408-16
102. Karamanlidis G, Bautista-Hernandez V, Fynn-Thompson F, Del Nido P, Tian R. Impaired mitochondrial biogenesis precedes heart failure in right ventricular hypertrophy in congenital heart disease. *Circ Heart Fail* 2011; 4: 707-13.
103. Hernandez-Alvarez MI, Thabit H, Burns N, Shah S, Brema I, Hatunic M, et al. Subjects with early-onset type 2 diabetes show defective activation of the skeletal muscle PGC-1alpha/Mitofusin-2 regulatory pathway in response to physical activity. *Diabetes Care* 2010; 33: 645-51.
104. Wang L, Mascher H, Psilander N, Blomstrand E, Sahlin K. Resistance exercise enhances the molecular signaling of mitochondrial biogenesis induced by endurance exercise in human skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985)* 2011; 111: 1335-44
105. Lu Z, Xu X, Hu S, Fassett J, Zhu G, Tao Y, et al. PGC-1 alpha regulates expression of myocardial mitochondrial antioxidants and myocardial oxidative stress after chronic systolic overload. *Antioxid Redox Signal* 2010; 13: 1011-22.
106. Cannavino J, Brocca L, Sandri M, Bottinelli R, Pellegrino MA. PGC- 1 α over-expression prevents metabolic alterations and soleus muscle atrophy in hindlimb unloaded mice. *J Physiol* 2014; 592: 4575-89.
107. Ferraro E, Giammarioli AM, Chiandotto S, Spoletini I, Rosano G. Exercise-induced skeletal muscle remodeling and metabolic adaptation: redox signaling and role of autophagy. *Antioxid Redox Signal* 2014; 21: 154-7
108. Handschin C. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha in muscle links metabolism to inflammation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2009; 36: 1139-43
109. Palomer X, Salvadó L, Barroso E, Vazquez-Carrera M. An overview of the crosstalk between inflammatory processes and metabolic dysregulation during diabetic cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 2013; 168: 3160-72

Anexo:

Artículos Científicos

Induction of PGC-1 α Expression Can Be Detected in Blood Samples of Patients with ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction

Óscar Fabregat-Andrés¹, Alberto Tierrez², Manuel Mata³, Jordi Estornell-Erill⁴, Francisco Ridocci-Soriano¹, María Monsalve^{2,5*}

1 Servicio de Cardiología, Consorcio Hospital General Universitario de Valencia, Valencia, Spain, **2** Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III, Madrid, Spain, **3** Fundación Hospital General de Valencia, Valencia, Spain, **4** Unidad de TAC y RMN, Eresa, Consorcio Hospital General Universitario de Valencia, Valencia, Spain, **5** Instituto de Investigaciones Biológicas Alberto Sols (CSIC), Madrid, Spain

Abstract

Following acute myocardial infarction (MI), cardiomyocyte survival depends on its mitochondrial oxidative capacity. Cell death is normally followed by activation of the immune system. Peroxisome proliferator activated receptor γ -coactivator 1 α (PGC-1 α) is a transcriptional coactivator and a master regulator of cardiac oxidative metabolism. PGC-1 α is induced by hypoxia and facilitates the recovery of the contractile capacity of the cardiac muscle following an artery ligation procedure. We hypothesized that PGC-1 α activity could serve as a good molecular marker of cardiac recovery after a coronary event. The objective of the present study was to monitor the levels of PGC-1 α following an ST-segment elevation acute myocardial infarction (STEMI) episode in blood samples of the affected patients. Analysis of blood mononuclear cells from human patients following an STEMI showed that PGC-1 α expression was increased and the level of induction correlated with the infarct size. Infarct size was determined by LGE-CMR (late gadolinium enhancement on cardiac magnetic resonance), used to estimate the percentage of necrotic area. Cardiac markers, maximum creatine kinase (CK-MB) and Troponin I (TnI) levels, left ventricular ejection function (LVEF) and regional wall motion abnormalities (RWMA) as determined by echocardiography were also used to monitor cardiac injury. We also found that PGC-1 α is present and active in mouse lymphocytes where its expression is induced upon activation and can be detected in the nuclear fraction of blood samples. These results support the notion that induction of PGC-1 α expression can be part of the recovery response to an STEMI and could serve as a prognosis factor of cardiac recovery.

Citation: Fabregat-Andrés Ó, Tierrez A, Mata M, Estornell-Erill J, Ridocci-Soriano F, et al. (2011) Induction of PGC-1 α Expression Can Be Detected in Blood Samples of Patients with ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction. PLoS ONE 6(11): e26913. doi:10.1371/journal.pone.0026913

Editor: Consuelo Borras, University of Valencia, Spain

Received: June 28, 2011; **Accepted:** October 6, 2011; **Published:** November 7, 2011

Copyright: © 2011 Fabregat-Andrés et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (<http://www.micinn.es/>) (grants SAF2009-07599 and CSD 2007-00020 to M.M.); a Juan de la Cierva postdoctoral contract to A.T.; two Intramural grants ("Beca de investigación Intramural"), years 2008 and 2010, from the Fundación Investigación CHGUV (<http://chguv.san.gva.es/Inicio/Paginas/default.aspx>); and a "Beca para Proyecto de Investigación Básica en Cardiología, 2010" grant from the Spanish Cardiology Society (<http://www.secardiologia.es/>). The Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC) (<http://www.cnic.es/es/index.php>) is supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation and the Pro-CNIC Foundation. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: mpmonsalve@iib.uam.es

Introduction

Acute myocardial infarction (MI) is the leading cause of death of patients with cardiovascular disease [1,2]. Left ventricular (LV) dilatation and pump failure following MI are the main causes for poor clinical outcomes. Clinical studies have consistently demonstrated that development of congestive heart failure typically depends on infarct and LV ischemic size areas. MI ischemic process initiates a cascade of progressive structural and geometric changes in the left ventricle, a process commonly referred to as remodeling. The molecular and cellular changes associated with ventricular remodeling affect both the necrotic zone and the non-infarcted segments of the ventricle and manifest clinically as chamber dilation, ventricular remodeling with increased sphericity of the ventricle and worsened cardiac function, greatly limiting patients living conditions [3,4].

MI recovery thus depends on two clearly distinct but related factors. The first one is the capacity of cardiomyocytes to survive

the ischemia-reperfusion (IR) injury, and the second one is the intrinsic regenerative capacity of the damaged tissue, that depend both on the patient genetics but also on its life-style and clinical history. Importantly, not only cardiomyocytes but several other cell types have been proposed to play a role in the repair/regeneration process and impact, both positively and negatively, the final outcome [5]. For example, early activation of the inflammatory system protects from ventricular remodeling although its sustained activation favors it. Evidence suggests that T cells play a significant role in controlling the post-infarct inflammatory response [6]. Their behavior is likely to depend to a large extent on the capacity of the damaged tissue of recovering its oxidative capacity. Low oxygen tension activates critical transcription factors like HIF (*Hypoxia Induced Factor*) that facilitates cell survival by shifting the cellular metabolism from oxidative to glycolytic [7]. If this metabolic shift were not reversed during the "recovery-regenerative" phase the result would be increased cardiac overload and failure [8]. The crucial regulatory factors/

pathways that mediate this metabolic shift are still only partially elucidated [9].

Peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator -1 α (PGC-1 α) is a transcriptional coactivator and a master regulator of genes involved in oxidative metabolism and mitochondrial biogenesis [10] that plays a key role in the metabolic control in the cardiac muscle [11] and participates in cardiomyocyte differentiation [12]. Importantly PGC-1 α knock out mice develop ventricular dysfunction and are prone to cardiac failure following transverse aortic constriction [13]. Accordingly, PGC-1 α levels are reduced in the heart following MI by coronary artery ligation in rats [14] while treatment with angiotensin II receptor blockers (ARB) and PPAR agonists (pioglitazone and rosiglitazone), preserve both ventricular function and PGC-1 α levels, and have been demonstrated to attenuate myocardial ischemia-reperfusion injury [15,16,17]. Another study using rats demonstrated that the gene expression of PGC-1 α was also down-regulated in the heart in congestive heart failure [18].

All these results support the notion that while severe hypoxia activates HIF [19] and down-regulates PGC-1 α levels in the cardiomyocyte, PGC-1 α induction is likely to be crucial during the regenerative phase to facilitate the recovery of the cardiac muscle oxidative capacity [20]. Therefore, monitorization of the patient's capacity to induce PGC-1 α expression post-infarction would be of potential use to pre-evaluate its later recovery, however that monitorization could only be feasible if PGC-1 α induction post-infarction could be detected in the nuclear fraction of blood samples. In this respect PGC-1 α has been previously reported to be present in circulating neutrophils and lymphocytes [21].

In summary, from what we know so far from PGC-1 α biology we think that the capacity of a tissue to induce PGC-1 α after an hypoxic event, such as a MI, could predict the regenerative capacity of the tissue. In the particular case of the human heart following a MI, that predictive value is both particularly relevant and hard to assess directly, because we cannot take biopsies of the infarcted heart in order to measure PGC-1 α levels. Hence, the potential use of PGC-1 α as a predictor of a patient's recovery capacity would have no translational use unless we showed first that we could detect PGC-1 α induction in circulating immune cells of infarcted patients.

Therefore, we decided to test if PGC-1 α could be detected in human blood mononuclear cells and if its expression was induced following lymphocyte activation post-infarction.

Our results show that PGC-1 α is present and active in both B and T lymphocytes, and its expression is activated upon lymphocyte activation. More importantly, PGC-1 α induction can be detected in blood mononuclear cells from MI patients, 72 hours (h) post-infarction, with PGC-1 α induction correlating well with the size of the hypoxic area.

Materials and Methods

Humans

This is a cohort study of 38 patients with confirmed ST-segment elevation myocardial infarction (STEMI) that were subjected to a reperfusion strategy and discharged alive from Coronary Care Unit of the "Consorcio Hospital General Universitario de Valencia" (CHGUV), Spain. The patients were admitted in the period from March-2009 through March-2010. The diagnosis of STEMI was based on the definition of the European Society of Cardiology (ESC) Guidelines [22,23], by the presence of clinically appropriate symptoms (ischemic characteristic chest pain and/or autonomic nervous system activation), increased blood levels of biomarkers troponin I (TnI) and creatin-kinase MB (CK-MB) and

persistent ST-segment elevation on the electrocardiogram (ECG). Reperfusion therapy included mechanical and pharmacological procedures, such as fibrinolytic treatment, primary percutaneous coronary intervention (PCI) and rescue PCI after failed pharmacological reperfusion. For exclusion criteria see Supp. Info. Blood samples were drawn on admission to the hospital and 72 h later. Total mRNA and protein were isolated from the blood mononuclear fraction.

Infarct size was estimated from the determination of the necrotic area by late gadolinium enhancement (LGE) in cardiac magnetic resonance (CMR) studies. Maximum CK-MB and TnI plasma levels, left ventricular ejection function (LVEF) and regional wall motion abnormalities (RWMA) were also used as markers of cardiac injury.

Patient exclusion criteria

Were excluded patients with previous history of coronary artery disease, in order to avoid bias measuring myocardial necrosis images obtained by CMR. We also excluded patients with chest pain latency longer than 150 minutes, to avoid miss interpretation of the results obtained from blood samples at the time of hospital admission. Moreover, patients resuscitated, those that suffered a second infarction in the first 72 h post admission, or having their highest CK value on admission, were also not included in the study. The presence of left bundle branch block or atrial fibrillation of ECG at admission was also an exclusion criteria.

Clinical data collected included: clinical history including, cardiovascular risk factors and ambulatory treatment, relevant biochemical values, including fasting glucose (mean of three independent values), hemoglobin and hematocrit at admission, leucocytes at admission and 72 h later (including total leucocytes, lymphocytes, monocytes and their relative percentages), CRP at admission, creatinine at admission and the glomerular filtration rate estimated by MDRD equation, lipid profile (including total cholesterol, LDLc, HDLc and triglycerides), glycosylated hemoglobin (Hb1Ac), and the plasma curve of cardiac biomarkers (peak values were used for the analysis), reperfusion procedure used (pharmacological strategy with tenecteplase or mechanical process as primary or rescue PCI), echocardiographic data, performed on the first 72 h, with all the M-mode parameters and two dimensional analysis, including LVEF and RWMA, hemodynamic data, including LVEF by ventriculography and coronary arteries affected by the coronarography (considering significant stenosis those with more than 75% of the vessel lumen of epicardial coronary arteries or more than 50% of the main left artery, and CMR data, including the regular determinations of both ventricles, their EF and myocardial mass, the necrotic mass estimated by late gadolinium enhancement (LGE), and the presence of microvascular obstruction).

Cardiac Magnetic Resonance (CMR) studies

CMR was performed with a 1.5 T unit (Magnetom Sonata, Siemens, Erlangen, Germany). Functional images of long-axis and short axis were obtained using ECG-gated SSFP (*Steady State Free Precession*) sequences (8 mm slice thickness with 2-mm gap between short-axis slices). Edema detection was carried out using short-axis black-blood, T2-weighted (short time inversion recovery) in the same views as the cine sequences using a HASTE (*Half-Fourier Acquisition Single-shot Turbo spin Echo*) multisection sequence (RT, 2 R-R intervals; ET, 33 ms; IT, 170 ms; slice thickness, 8 mm; inter-slice interval, 2 mm; flip angle, 160°; matrix, 256×151; bandwidth, 781 Hz/pixel) and a segmented TSE (*Turbo Spin-Echo*) sequence (RT, 2 R-R intervals; ET, 100 ms; IT, 170 ms; slice thickness, 8 mm; interval, 2 mm; flip angle, 180°; matrix,

256 \times 146; bandwidth, 235 Hz/pixel) in case of poor quality with HASTE sequence. Late-gadolinium images were acquired after intravenous injection (0.15 ml/kg) of dimeglumine gadobenate 0.5 M. Non breath-holding ECG-gated single-shot IR-SSFP short-axis in the same views as the cine sequences were performed 1–2 min after contrast administration with fixed long TI (600 ms) to discriminate normal myocardium, infarcted myocardium and microvascular obstruction (MVO). Ten minutes after contrast administration, the same short-axis slices were repeated adjusting the IT to null normal myocardium using non breath-holding single-shot IR-SFP sequences and finally breath-holding 2D and 3D turbo-FLASH (*Fast Low Angle Shot*) sequences. A standard 17-segmented cardiac-model was used for short-used for short-axis slice segmentation and assessing areas of edema and late-gadolinium images. Perfusion defects were assessed visually as persistent deficit during the first-pass contrast. Areas of high T2 signal intensity were identified by visual inspection. Finding of a low-signal-intensity area surrounded by a high-signal-intensity area in these images was considered to indicate an area of MVO. Areas with LGE were also identified by visual inspection, where MVO was defined as an area without signal located within an area of LGE. Transmurality was considered when the area of affected myocardium was >50%. Both edema and LGE were evaluated by manual tracing of these areas, and given values are expressed as percentage of total myocardium mass, as calculated by tracing endocardium and epicardium contours in a dedicated work-station (Argus, Siemens, Erlangen, Germany).

Mice

C57BL6 PGC-1 α ^{-/-} mice were originally provided by Dr. Bruce Spiegelman (DFCI, USA) and following embryonic transfer a colony was established within the SPF area of the CNIC animal facility. Male C57BL6 PGC-1 α ^{+/+} and PGC-1 α ^{-/-} of 6–8 weeks of age were used.

Preparation of splenocytes and thymocytes from mice

Spleen and thymus were removed aseptically. Single-cell suspensions were obtained by mechanically disrupting the organs with a syringe plunger in cold PBS supplemented with 2 mM EDTA and 0.1% FBS. Red blood cells were removed incubating the cells in ACK lysis buffer for 5 min at 4°C. Splenocytes and thymocytes were washed in cell culture medium (RPMI 1640 supplemented with 10% FBS, 10 mM HEPES, 2 mM L-Glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 1% non essential aminoacids, 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin) and filtered through a 70 μ m nylon cell strainer. Cells were adjusted to a final concentration of 10⁶ cells/ml. Spleen cells were stimulated for 3, 6 and 24 hours with anti-IgM F(ab')₂ fragment (1 μ g/ml; Jackson immunoresearch).

Preparation of mononuclear cells from human peripheral blood

4 mL of human peripheral blood collected in K3EDTA Vacutainers (BD) were used to isolate mononuclear cells by Ficoll density gradient centrifugation using Ficoll-PaqueTM (Miltenyi Biotec) and following the manufacturer's instructions. Isolated cells were analyzed using Cytospin and Fast Panoptic Staining (Panreac). Only those preparations containing \geq 90% of mononuclear cells were used for the analysis.

Molecular Biology Analysis

Total RNA was isolated using TrizolTM (Invitrogen) and following the manufacturer's instructions. The quality of the

RNA was evaluated in a Bioanalyzer and quantitated in a Nanodrop. The RNA used had a ratio of the absorbance at 260 and 280 \geq 1.8 and a RNA integrity number (RIN) \geq 8. Relative mRNA expression levels of PGC-1 α , cytochrome c (Cyt c) and Mn superoxide dismutase (MnSOD) were determined by quantitative PCR of retro transcribed cDNA (qRT-PCR) with specific primers as previously described [24]. Whole cell extracts were used to analyze protein levels. PGC-1 α , Cyt c and MnSOD protein levels in mouse splenocytes were determined by western blot using specific antibodies. The Zeptosens reverse array platform was used to quantify Cyt c protein levels in human samples.

Mitochondria

Mitochondrial mass was estimated using MitoTracker Green labeling. In short, 2.5 \times 10⁵ splenocytes were incubated in 96-well U- bottom plates with 0.1 μ M MitoTracker Green (Invitrogen) in PBS for 30 min at 37°C, washed twice with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min at 4°C. A FACSCantoTM II cytometer (Becton Dickinson) was used to measure fluorescence intensity of \geq 20,000 events per sample. Data was analyzed using the FACSDiva software (Becton Dickinson).

Ethics

The human experimental protocols were approved by the Institutional Ethical Committee of the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) and the CHGUV (Permit number PI 10/09). All patients signed a written informed consent form. The animal experimental protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the CNIC (Permit number PA 13/09), and all efforts were made to minimize suffering. All procedures conformed to the Declaration of Helsinki and the NIH guidelines for animal care and use (NIH publication No. 85-23).

Statistics

Statistical analyses were performed using SPSS for Windows, release 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Levene's test for equality of variances and t-test for equality of means were used. All *p*-values refer to two-tailed tests of significance; *p*, 0.05 was considered significant.

Results

To determine if PGC-1 α levels are induced during lymphocyte activation we used a mouse model. First, we evaluated if PGC-1 α mRNA could be detected in total splenocyte, thymocytes and lymph nodes from mice. We found that although PGC-1 α mRNA was detectable in both preparations PGC-1 α levels were about 15 fold higher in splenocytes than in thymocytes and lymph nodes (Fig. 1A). Next, we tested whether PGC-1 α protein could be detected in mouse splenocytes. A protein band of the predicted molecular weight could be detected by western blot with a specific antibody (Fig. 1B). In order to assess if this band was in fact PGC-1 α , a preparation of total splenocytes from PGC-1 α ^{-/-} mice was used as negative control. We confirmed that the band was missing from PGC-1 α ^{-/-} splenocytes and therefore we concluded that PGC-1 α is present in mouse splenocytes (Fig. 1B).

To evaluate if the detected PGC-1 α protein was playing an active role in the metabolic control of the splenocytes, we tested by western blot the expression levels of well characterized molecular targets of PGC-1 α . Cyt c, that is part of the mitochondrial electron transport chain [10], and the detoxification enzyme MnSOD [24] and both were also found to be reduced in the total nuclear fraction of blood samples from PGC-1 α ^{-/-} mice, suggesting that PGC-1 α is not only present, but is active in splenocytes (Fig. 1B).

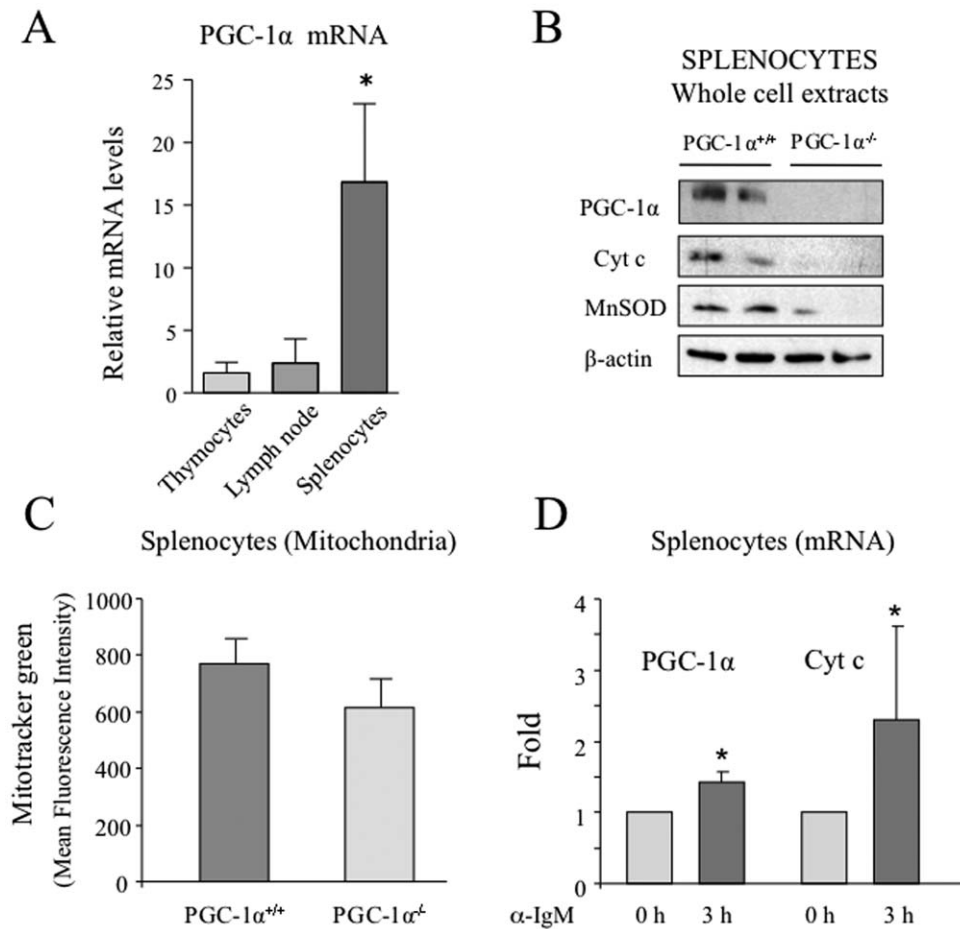


Figure 1. PGC-1 α mRNA is induced in mouse splenocytes following stimulation with α IgM. A) PGC-1 α is present in mouse splenocytes and thymocytes. Relative PGC-1 α mRNA levels mouse splenocytes and thymocytes. B) Whole cell extracts of total splenocytes isolated from PGC-1 $\alpha^{+/+}$ and PGC-1 $\alpha^{-/-}$ mice analyzed by western blot with specific antibodies against PGC-1 α , Cyt c, MnSOD and β -actin as loading control. C) Total splenocytes isolated from PGC-1 $\alpha^{+/+}$ and PGC-1 $\alpha^{-/-}$ mice were labeled with MitoTracker Green and analyzed by flow cytometry. D) Total splenocytes isolated from C57BL6 mice were stimulated with α IgM for 3 h. Total RNA was extracted and PGC-1 α and Cyt c mRNA levels were analyzed by qRT-PCR. Data are means \pm SD. (*) $p < 0.05$. doi:10.1371/journal.pone.0026913.g001

We further analyzed the mitochondrial content of murine splenocytes from PGC-1 $\alpha^{+/+}$ and PGC-1 $\alpha^{-/-}$ mice. The cells were labeled with MitoTracker Green, a non-membrane potential-dependent fluorescent marker, and analyzed by flow cytometry. The results show that PGC-1 $\alpha^{-/-}$ splenocytes have an average 20% less mitochondrial content than the PGC-1 $\alpha^{+/+}$ splenocytes, indicating that the absence of PGC-1 α has a net impact on the number of mitochondria in splenocytes (Fig. 1C).

Finally, we tested if PGC-1 α levels were modified upon lymphocyte activation. First we examined the change in total PGC-1 α levels upon stimulation of total splenocytes with specific stimuli for B lymphocytes (α -IgM). Splenocytes stimulated with α -IgM showed an increase in both PGC-1 α and Cyt c mRNA levels 3 h post stimulation, (Fig. 1D). We concluded that PGC-1 α expression is induced upon B cell stimulation. These results support the notion that PGC-1 α is present and active in lymphocytes and its levels and activity are induced following lymphocyte stimulation.

In order to evaluate if we could detect the induction of PGC-1 α expression following STEMI, we isolated total mRNA from blood mononuclear cells, isolated immediately upon admission and 72 h later. PGC-1 α levels were monitored by qRT-PCR. We found that the samples segregated in two groups, those that induced PGC-1 α

and those that did not ($\leq 1 / > 1$). The induction group was further subdivided in those that induced PGC-1 α up to 10 fold (1–10), and those that induced it more (≥ 10) (Fig. 2A). To monitor PGC-1 α activity we also determined the induction of the PGC-1 α target genes Cyt c and MnSOD. We found that following STEMI not only PGC-1 α but also Cyt c and MnSOD mRNA levels were increased (Fig. 2B–C), suggesting that not only PGC-1 α mRNA levels are higher, but also its transcriptional activity is elevated following STEMI. This notion is further supported by the observation that the induction of both Cyt c and MnSOD is significantly higher in those patients that induced PGC-1 α expression more than 10 fold. To confirm the significance of this observation Cyt c protein levels were directly monitored in whole cell extracts from blood mononuclear cells, and were found to be significantly elevated following STEMI only in the group of patients that induced PGC-1 α expression more than 10 fold (Fig. 2D).

Importantly, we noted that the induction of PGC-1 α after STEMI inversely correlated with the mRNA levels of both PGC-1 α and Cyt c at the time of admission (Fig. 3), suggesting that reduced basal PGC-1 α activity, would result in stronger inductions following STEMI.

PGC-1 α mRNA 72 h/0 h	PGC-1 α 0 h	PGC-1 α 72 h	<i>p</i>
≤ 1	1x (sd 1.16x)	0.45x (sd 0.52x)	n.s.
1-10	0.083x (sd 0.17x)	0.79x (sd 1.15x)	n.s.
≥ 10	$\leq 0.0032x$ (sd nd)	16.57x (sd 42.84x)	7.9e-6
PGC-1 α mRNA 72 h/0 h	Cyt c 0 h	Cyt c 72 h	<i>p</i>
≤ 1	1x (sd 2.82x)	2.20x (sd 1.70x)	n.s.
1-10	0.54x (sd 0.53x)	1.64x (sd 1.52x)	n.s.
≥ 10	0.13x (sd 0.23x)	4.50x (sd 2.00x)	0.0050
PGC-1 α mRNA 72 h/0 h	MnSOD 0 h	MnSOD 72 h	<i>p</i>
≤ 1	1x (sd 1.59x)	6.46x (sd 25.45x)	n.s.
1-10	1.4x (sd 1.72x)	6.23x (sd 6.30x)	n.s.
≥ 10	0.73x (sd 0.98x)	32.88x (sd 22.51x)	0.017

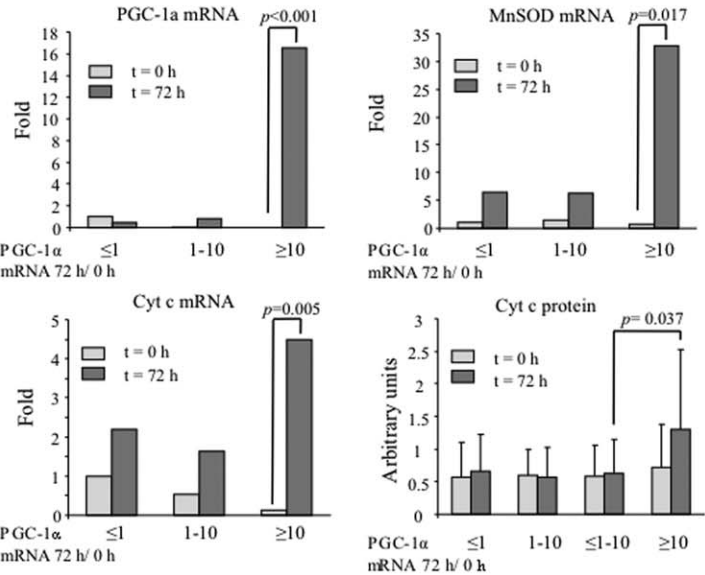


Figure 2. PGC-1 α induction after STEMI correlates with Cyt c and MnSOD induction. A) PGC-1 α mRNA levels, B) MnSOD mRNA levels, C) Cyt c mRNA levels, D) Cyt c protein levels, in the blood mononuclear fraction of 37 STEMI patients right after hospital admission (t=0) and 72 h later (t=72 h). Samples were grouped according to the induction rate of PGC-1 α mRNA levels after STEMI (PGC-1 α mRNA 72 h/PGC-1 α mRNA 0 h) in three groups, those that did not induce PGC-1 α (≤ 1), those that induced PGC-1 α up to 10-fold (1-10) and those that induced PGC-1 α more than 10-fold (≥ 10). Data are means \pm SD. n.s.=non statistically significant. Significance: $p < 0.05$. doi:10.1371/journal.pone.0026913.g002

PGC-1 α mRNA 72 h/0 h	≤ 1	1-10	<i>p</i>	≤ 1	≥ 10	<i>p</i>
PGC-1 α 0 h	100 %	8.29 %	0.023	100 %	0.32 %	0.95e-8
Cyt c 0 h	100 %	54.45 %	0.6	100 %	13.09 %	0.3

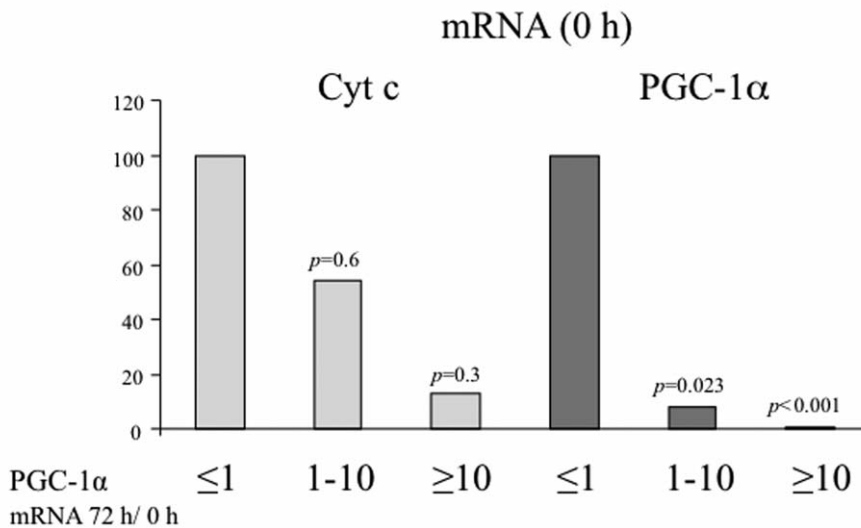


Figure 3. PGC-1 α induction after STEMI negative correlates with PGC-1 α basal levels. The graph shows average Cyt C and PGC-1 α mRNA levels at the time of hospital admission in the three groups of PGC-1 α induction. doi:10.1371/journal.pone.0026913.g003

To evaluate the functional significance of PGC-1 α induction, expression of PGC-1 α was compared with: blood levels of biomarkers (maximum values of TnI and CK-MB), echocardiographic parameters (LVEF and RWMA), and infarct size estimated by LGE in the CMR study. We found that induction of PGC-1 α expression 72 h after STEMI correlates with bigger infarcted areas (% of necrotic area: 24.91 vs 10.9%) (Fig. 4A) and with higher enzymatic peak (TnI 119.87 vs 63.01 ng/ml and CKMB 474.08 vs 170.73 ng/mL) (Fig. 4B), suggesting that induction of PGC-1 α expression is part of the cellular response to a STEMI.

PGC-1 α induction tends to be more frequent in patients with altered glucose metabolism and correlates with higher C-reactive

protein (CRP) levels, although the differences do not reach statistical significance (Fig. 4D and Fig. 5).

Importantly, we also found that induction of PGC-1 α expression 72 h after STEMI correlates with more ventricular dysfunction, with reduced LVEF, 53.96 vs 47.41% (Fig. 6A), and increased RWMA (1.43 vs 1.79). Remarkably, left ventricular dysfunction is more frequent in patients with a strong PGC-1 α induction, independently of the localization of the necrotic area and despite the bigger size of the anterior infarctions (Fig. 6C). This important observation may relate both to a stronger immune response, and to a lower systemic level of PGC-1 α .

Infarct size	PGC-1 α 72 h/0 h \leq 1	PGC-1 α 72 h/0 h \geq 1	<i>p</i>
% LGE	10.9 (sd 10.88)	24.91 (sd 21.85)	0.012

Parameter	PGC-1 α 72h/0 h \leq 1	PGC-1 α 72h/0 h $>$ 1	<i>p</i>
TnI _{max} (ng/mL)	63.01 (sd 54.95)	119.87 (sd 79.31)	0.039
CKMB _{max} (ng/mL)	170.73 (sd 116.82)	474.08 (sd 728.73)	0.043
CRP (mg/dL)	0.64 (sd 0.64)	0.98 (sd 0.98)	0.126

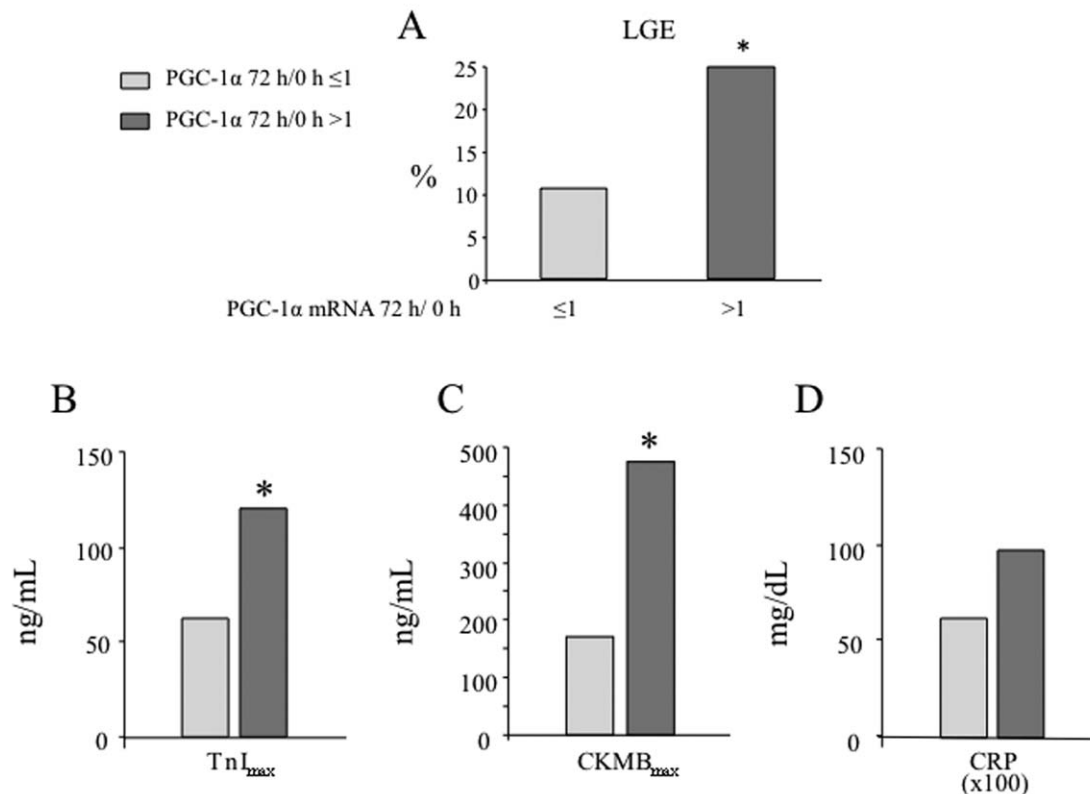


Figure 4. Patients that induce PGC-1 α after STEMI have bigger necrotic areas. **A)** Necrotic areas as estimated by late gadolinium enhancement (LGE). The infarct sizes, of the cohort of STEMI patients under survey, was determined by LGE on cardiac RMN (CMR). The estimated mean infarct size for patients that induced PGC-1 α levels (PGC-1 α 72 h/0 h \geq 1) is compared to that of patients that did not induce PGC-1 α (PGC-1 α 72 h/0 h \leq 1) after STEMI. **B–D)** PGC-1 α induction positively correlates with cardiac necrosis as estimated by TnI_{max} (B), CKMB_{max} (C), and CRP plasma levels (D). TnI_{max}, CKMB_{max}, and CRP levels of the cohort of STEMI patients under survey. The estimated mean for patients that induced PGC-1 α levels (PGC-1 α 72 h/0 h \geq 1) is compared to that of patients that did not induce PGC-1 α (PGC-1 α 72 h/0 h \leq 1) after STEMI. Data are means \pm SD. (*) $p < 0.05$.

doi:10.1371/journal.pone.0026913.g004

Parameter	PGC-1 α 72h/0 h \leq 1	PGC-1 α 72h/0 h $>$ 1	<i>p</i>
Glucose (mg/dL)	105.26 (sd 16.83)	120.83 (sd 27.6)	0.091

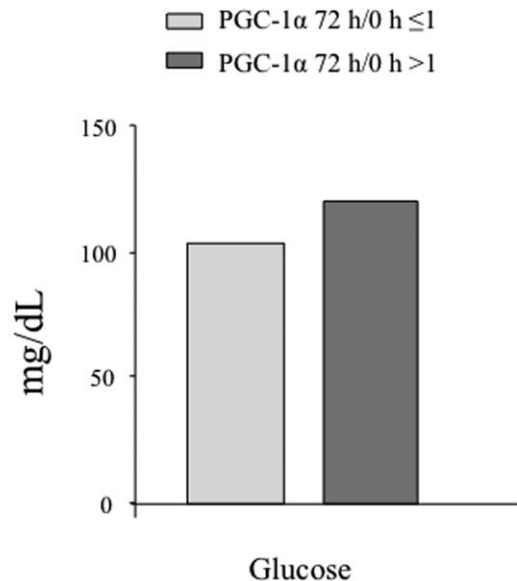


Figure 5. PGC-1 α induction correlates with higher plasma glucose levels in the cohort of STEMI patients under survey. The estimated mean for patients that induced PGC-1 α levels (PGC-1 α 72 h/0 h \geq 1) is compared to that of patients that did not induce PGC-1 α (PGC-1 α 72 h/0 h \leq 1) after STEMI. Data are means \pm SD. (*) $p < 0.05$. doi:10.1371/journal.pone.0026913.g005

In order to evaluate if the observed induction of PGC-1 α monitored gross differences in the immune response after STEMI, the total and relative blood count of total leukocytes, lymphocytes and monocytes were monitored at $t = 0$ h and $t = 72$ h. As previously noted a relative lymphocyte count tends to be reduced after 72 h while the monocyte count tends to be increased. No major differences were observed between the group of patients that induced PGC-1 α and the group that did not, indicating that the observed increase in PGC-1 α is likely a specific induction of its expression and not just a reflection of changes in the number of leukocytes following STEMI (Fig. 7).

Discussion

This study suggests that the monitorization of PGC-1 α mRNA levels has potential interest as a novel marker for the recovery after STEMI, since high $t = 0$ PGC-1 α levels and absence of PGC-1 α induction 3 days following STEMI, strongly correlate with reduced cardiac injury. Furthermore, our data show that PGC-1 α mRNA levels can be readily detected in blood mononuclear cell samples and are a good indicator of its activity.

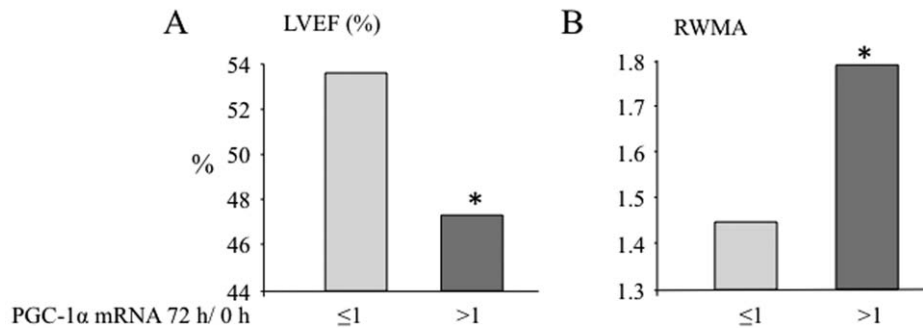
Recovery of the cardiomyocyte oxidative capacity is crucial during the reperfusion phase after STEMI. PGC-1 α is a master regulator of cellular oxidative metabolism. Since PGC-1 α has been found in lymphocytes, and induction of the immune system is also a key factor in the STEMI recovery phase, we decided to evaluate if PGC-1 α induction could be detected in human patients after STEMI. We found a good correlation between its post-hypoxic expression and the size of the infarcted area.

38 patients were prospectively selected with STEMI diagnostic that underwent a re-perfusion procedure. Blood samples were obtained right after their arrival to the hospital and 72 h later, being processed for RNA isolation. PGC-1 α mRNA levels were analyzed by qRT-PCR. Expression of PGC-1 α in blood mononuclear cells was compared with the severity of the cardiac injury estimated by: enzymatic peak, LVEF and necrotic area determined by LGE-CMR. We found that induction of PGC-1 α in blood mononuclear cells positively correlates with higher levels of myocardium damage, a more severe left ventricular dysfunction, a higher RWMA score, and larger necrotic areas. This observation showed that PGC-1 α induction can be detected in human blood mononuclear cells as part of the response to an STEMI, and suggested that PGC-1 α is induced in the immune system (Table 1 and 2).

Interestingly, PGC-1 α induction tends to be more frequent in patients with altered glucose metabolism and higher C-reactive protein (CRP) levels. CRP is generally acknowledged as an important predictor of vascular death and has been shown to allow reliable risk stratification of STEMI patients [25]. Elevated PGC-1 α mRNA levels have been previously reported in the liver of diabetic patients [26]. However, metabolic data in diabetic patients is generally consistent with a loss of PGC-1 α activity [27]. This apparent paradox may be related to the well-established observation that diabetic patients have a chronic basal activation of the immune system [28].

Although there were no major differences in the immune response between the groups, some significant differences were observed. The induction group had significantly more lympho-

Ecography	PGC-1 α 72h/0 h ≤ 1	PGC-1 α 72h/0 h > 1	<i>p</i>
LVEF (%)	53.96 (sd 8.37)	47.41 (sd 7.59)	0.025
RWMA	1.43 (sd 0.42)	1.79 (sd 0.27)	0.013



AMI localization	Inferior-posterior (n=21)	Antero-lateral (n=17)	<i>p</i>
LVEF (%)	52.6 (sd 6.9)	49.00 (sd 8.9)	0.182
% LGE	8.35 (sd 1.54)	24.94 (sd 4.9)	0.002

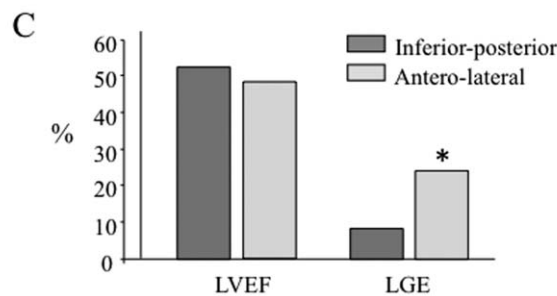


Figure 6. PGC-1 α induction positively correlates with cardiac ventricular dysfunction. **A)** LVEF and **B)** RWMA, were determined by ecocardiography. The estimated mean for patients that induced PGC-1 α levels (PGC-1 α 72 h/0 h ≥ 1) is compared to that of patients that did not induce PGC-1 α (PGC-1 α 72 h/0 h ≤ 1) after STEMI. **C)** Antero-lateral infarcts are associated to larger necrotic areas than inferior-posterior infarcts as determine by LGE on CRM. The graph shows mean LVEF and necrotic area (LGE) of patients with antero-lateral or inferior-posterior infarcts. Data are means \pm SD. (*) $p < 0.05$. doi:10.1371/journal.pone.0026913.g006

cytes at the time of hospitalization, and the increase in monocyte count at $t = 72$ h was significantly more pronounced in the induction group. Although the significance of these differences requires further evaluation, it is likely that they may just be the correlate of a more severe cardiac damage.

Neutrophils, lymphocytes and monocytes are part of this response with neutrophil's count peak 12 h post-infarction, lymphocytes and monocytes 48 h post-infarction. PGC-1 α has been previously found in human lymphocytes. To directly test if PGC-1 α is induced in stimulated leukocytes we measured PGC-1 α levels in murine splenocytes and we found that PGC-1 α levels were induced following B-cell receptor (BCR) stimulation. These results support the notion that induction of PGC-1 α in lymphocytes could be part of the immune activation that follows an STEMI. A possible role of PGC-1 α in lymphocyte activation is supported by different observations. For example, oxygen consumption is increased in B lymphocytes following IgM activation [29], and mitochondrial activity is associated with T cell activation [30,31,32].

It should be noted that no changes in PGC-1 α levels can be detected in murine splenocytes at times shorter than 3 h

post-stimulation. Since patients with a latency time of over 150 min were excluded from the study, we believe that the values detected in human blood mononuclear cells at the time of the patient admission are a close correlate of the normal the basal levels for the patient. Nevertheless, this remains an estimate that cannot unfortunately be fixed, since it was not possible to get blood samples of the patients before the STEMI.

Overall, we interpret these results as an indication that PGC-1 α expression is induced as part of the immune responsiveness following myocardial infarction in humans, and furthermore, they possibly suggest that low basal PGC-1 α levels negatively correlate with cardiac damage. Following myocardial infarction an inflammatory cascade is activated and circulating total white blood cell counts increase dramatically. Larger infarct sizes and adverse outcomes correlate with white blood cell count in STEMI.

Results obtained with animal models and *in vitro* cell assays have shown that reduced blood flow and reduced oxygen tension induce PGC-1 α , and conversely PGC-1 α is necessary to induce angiogenesis and recover the tissue capacity to access and use oxygen, as well as to maintain muscle contraction capacity, while

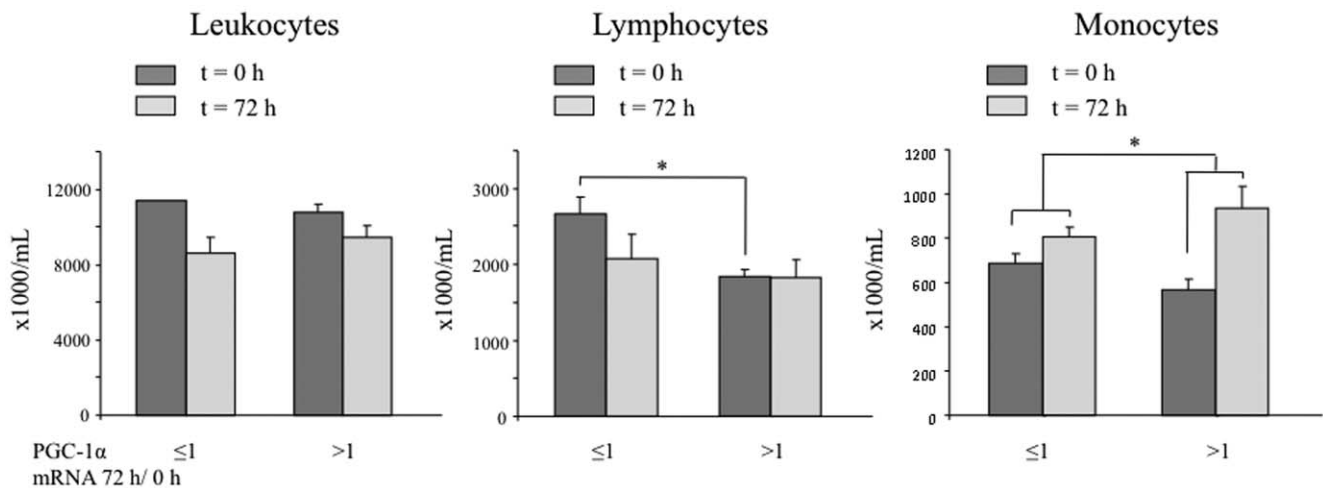


Figure 7. STEMI patients that induce PGC-1 α do not show gross differences in the number of leukocytes. Total number of leukocytes, lymphocytes, and monocytes in blood samples of patients at the time of hospitalization (t=0) and 72 h later. The estimated mean for patients that induced PGC-1 α levels (PGC-1 α 72 h/0 h ≥ 1) is compared to that of patients that did not induce PGC-1 α (PGC-1 α 72 h/0 h ≤ 1) after STEMI. Data are means \pm SD. (*) $p < 0.05$.

doi:10.1371/journal.pone.0026913.g007

Table 1. Demographic data, Biochemistry and CMR Characteristics of the Patients with and without PGC-1 α Induction.

	PGC-1 α mRNA 72 h/0 h > 1 (n=12)	PGC-1 α mRNA 72 h/0 h ≤ 1 (n=26)	p value
Base line characteristics			
Age (years)	61.08 (sd 3.03)	60.88 (sd 2.33)	0.959
Males sex (%)	10 (83.3%)	22 (84.6%)	0.924
Diabetes (%)	5 (41.7%)	8 (30.8%)	0.541
Hypertension (%)	9 (75%)	18 (69.2%)	0.722
Hypercholesterolemia (%)	6 (50%)	14 (53.8%)	0.834
Current smoker (%)	6 (50%)	15 (57.7%)	0.674
Coronary event			
Mean time to reperfusion (minutes)	189 (137–242)	184 (160–208)	0.942
Median troponin I peak value (ng/mL)	119.87 (97–143)	63.01 (52–74)	0.039
Median creatine kinase MB peak value (ng/mL)	474.08 (264–684)	170.73 (148–193)	0.043
Elective ACTP (%)	3 (25%)	10 (38%)	0.417
Rescue ACTP (%)	7 (58.4%)	4 (16%)	0.006
Reperfusion by thrombolysis (%)	2 (16.6%)	12 (46%)	0.084
Anterior infarction (%)	8 (66.6%)	9 (34.6%)	0.075
Biochemistry (plasma)			
Creatinine (mg/dL)	1.03 (0.95–1.11)	1.01 (0.97–1.05)	0.811
Haemoglobine (mg/dL)	13.10 (12.6–13.6)	13.86 (13.4–14.3)	0.249
Cholesterol (mg/dL)	177.08 (165–189)	180.92 (170–191)	0.812
LDLc (mg/dL)	116.50 (107–126)	122.19 (115–130)	0.642
HDLc (mg/dL)	38.58 (37–40)	36.23 (35–38)	0.269
Glucose (mg/dL)	120.83 (113–128)	105.26 (102–109)	0.091
CRP (mg/dL)	0.98 (0.71–1.25)	0.64 (0.57–0.71)	0.126
Ecocardiography and magnetic resonance			
Ejection fraction by echocardiography (%)	47.41 (sd 2.2)	53.96 (sd 1.6)	0.025
Score regional wall motion abnormalities	1.79 (sd 0.1)	1.43 (sd 0.1)	0.013
Left ventricle ejection fraction $< 35\%$ (%)	16.6 (sd 11.2)	3.8 (sd 0.4)	0.136
Late gadolinium enhancement by CMR (%)	24.91 (sd 6.3)	10.90 (sd 2.1)	0.012

Data are means \pm SD. n.s = non statistically significant. Significance: $p < 0.05$.

doi:10.1371/journal.pone.0026913.t001

Table 2. White Blood Cell Subtypes of Patients with and without PGC-1 α Induction.

White blood cell subtypes	PGC-1 α mRNA 72 h/0 h \leq 1 (n=26)	PGC-1 α mRNA 72 h/0 h $>$ 1 (n=12)	p value
Leukocytes 0 h (\times 1000/mL)	11426 (sd 820)	10775 (sd 826)	n.s.
Leukocytes 72 h (\times 1000/mL)	8584 (sd 413)	9408 (sd 683)	n.s.
(leuko. 72 h –leuco. 0 h)/leuko. 0 h (%)	–34.3	–19.8	n.s.
Lymphocytes 0 h (\times 1000/mL)	2665 (sd 227)	1850 (sd 327)	0.04
Lymphocytes 72 h (\times 1000/mL)	2076 (sd 92)	1825 (sd 245)	n.s.
(lym. 72 h –lym. 0 h)/lym. 0 h (%)	–29.1	–5.1	n.s.
Monocytes 0 h (\times 1000/mL)	684 (sd 44)	566 (sd 41)	n.s.
Monocytes 72 h (\times 1000/mL)	807(sd 48)	933 (sd 97)	n.s.
(mono. 72 h –mono.0 h)/mono. 0 h (%)	10.9	32.1	0.05
Lymphocytes 0 h (%)	24.5 (sd 1.7)	18 (sd 3.2)	n.s.
Lymphocytes 72 h (%)	24.9 (SD +/- 1.33)	19.7 (SD +/- 2.3)	0.04
Monocytes 0 h (%)	6.2 (SD +/- 0.3)	6.1 (SD +/- 0.6)	n.s.
Monocytes 72 h (%)	9.3 (SD +/- 0.3)	9.9 (SD +/- 0.5)	n.s.

Data are means \pm SD. n.s.=non statistically significant. Significance: $p < 0.05$. doi:10.1371/journal.pone.0026913.t002

its absence leads to heart failure. These results, although highly informative lack so far a human correlate, mainly due to the obvious need and impossibility to take human heart samples. Our results now open a new window of possibilities since the observation that PGC-1 α induction can be observed in the mononuclear cells of blood samples makes now feasible to test if PGC-1 α has in fact a prognostic value for cardiac recovery.

It is widely accepted that metabolic dysfunctions, where PGC-1 α levels are reduced, are an important risk factor for cardiovascular disease. Our results suggest that PGC-1 α activity is also likely to be relevant in the limitation of cardiac damage

following an STEMI, and that its monitorization is feasible and likely to be a relevant prognosis factor both for cardiovascular disease and for the extent of cardiac damage following STEMI.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: M. Monsalve. Performed the experiments: OFA AT JE-E M. Mata FR-S. Analyzed the data: M. Monsalve OFA AT JE-E M. Mata FR-S. Wrote the paper: M. Monsalve OFA AT M. Mata JE-E FR-S.

References

- Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, Carnethon M, Dai S, et al. Heart disease and stroke statistics—2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 121: e46–e215.
- Yasuda S, Shimokawa H (2009) Acute myocardial infarction: the enduring challenge for cardiac protection and survival. *Circ J* 73: 2000–2008.
- White HD, Chew DP (2008) Acute myocardial infarction. *Lancet* 372: 570–584.
- Rohini A, Agrawal N, Koyani CN, Singh R Molecular targets and regulators of cardiac hypertrophy. *Pharmacol Res* 61: 269–280.
- Rubart M, Field LJ (2006) Cardiac regeneration: repopulating the heart. *Annu Rev Physiol* 68: 29–49.
- Bodi V, Sanchis J, Nunez J, Mainar L, Minana G, et al. (2008) Uncontrolled immune response in acute myocardial infarction: unraveling the thread. *Am Heart J* 156: 1065–1073.
- Weidemann A, Johnson RS (2008) Biology of HIF-1 α . *Cell Death Differ* 15: 621–627.
- Lehman JJ, Kelly DP (2002) Transcriptional activation of energy metabolic switches in the developing and hypertrophied heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29: 339–345.
- Shohet RV, Garcia JA (2007) Keeping the engine primed: HIF factors as key regulators of cardiac metabolism and angiogenesis during ischemia. *J Mol Med* 85: 1309–1315.
- Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, et al. (1999) Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98: 115–124.
- Huss JM, Kelly DP (2004) Nuclear receptor signaling and cardiac energetics. *Circ Res* 95: 568–578.
- Ding L, Liang X, Zhu D, Lou Y (2007) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha is involved in cardiomyocyte differentiation of murine embryonic stem cells in vitro. *Cell Biol Int* 31: 1002–1009.
- Arany Z, Novikov M, Chin S, Ma Y, Rosenzweig A, et al. (2006) Transverse aortic constriction leads to accelerated heart failure in mice lacking PPAR-gamma coactivator 1 α . *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 10086–10091.
- Sun CK, Chang LT, Sheu JJ, Wang CY, Youssef AA, et al. (2007) Losartan preserves integrity of cardiac gap junctions and PGC-1 α gene expression and prevents cellular apoptosis in remote area of left ventricular myocardium following acute myocardial infarction. *Int Heart J* 48: 533–546.
- Honda T, Kaikita K, Tsujita K, Hayasaki T, Matsukawa M, et al. (2008) Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in mice with metabolic disorders. *J Mol Cell Cardiol* 44: 915–926.
- Shiomi T, Tsutsui H, Hayashidani S, Suematsu N, Ikeuchi M, et al. (2002) Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, attenuates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction. *Circulation* 106: 3126–3132.
- Yue TL TL, Chen J, Bao W, Narayanan PK, Bril A, et al. (2001) In vivo myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone. *Circulation* 104: 2588–2594.
- Garnier A, Fortin D, Delomenie C, Momken I, Veksler V, et al. (2003) Depressed mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in rat failing cardiac and skeletal muscles. *J Physiol* 551: 491–501.
- Krishnan J, Suter M, Windak R, Krebs T, Felley A, et al. (2009) Activation of a HIF1 α -PPAR γ axis underlies the integration of glycolytic and lipid anabolic pathways in pathologic cardiac hypertrophy. *Cell Metab* 9: 512–524.
- Rimbaud S, Garnier A, Ventura-Clapier R (2009) Mitochondrial biogenesis in cardiac pathophysiology. *Pharmacol Rep* 61: 131–138.
- Ferrer MD, Tauler P, Sureda A, Tur JA, Pons A (2009) Antioxidant regulatory mechanisms in neutrophils and lymphocytes after intense exercise. *J Sports Sci* 27: 49–58.
- Swedberg K, Cleland J, Dargie H, Drexler H, Follath F, et al. (2005) [Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure: executive summary (update 2005)]. *Rev Esp Cardiol* 58: 1062–1092.
- Van de Werf F, Bax J, Betriu A, Blomstrom-Lundqvist C, Crea F, et al. (2009) ESC guidelines on management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation. *Rev Esp Cardiol* 62: 293, e291–247.
- Valle I, Alvarez-Barrientos A, Arza E, Lamas S, Monsalve M (2005) PGC-1 α regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res* 66: 562–573.

25. Ortolani P, Marzocchi A, Marrozzini C, Palmerini T, Saia F, et al. (2008) Predictive value of high sensitivity C-reactive protein in patients with ST-elevation myocardial infarction treated with percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J* 29: 1241–1249.
26. Soyat S, Krempler F, Oberkofler H, Patsch W (2006) PGC-1 α : a potent transcriptional cofactor involved in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetologia* 49: 1477–1488.
27. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, et al. (2003) PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* 34: 267–273.
28. Garcia C, Feve B, Ferre P, Halimi S, Baizri H, et al. Diabetes and inflammation: fundamental aspects and clinical implications. *Diabetes Metab* 36: 327–338.
29. Capasso M, Bhamrah MK, Henley T, Boyd RS, Langlais C, et al. HVCN1 modulates BCR signal strength via regulation of BCR-dependent generation of reactive oxygen species. *Nat Immunol* 11: 265–272.
30. Schwindling C, Quintana A, Krause E, Hoth M Mitochondria positioning controls local calcium influx in T cells. *J Immunol* 184: 184–190.
31. Kaminski MM, Sauer SW, Klemke CD, Suss D, Okun JG, et al. Mitochondrial reactive oxygen species control T cell activation by regulating IL-2 and IL-4 expression: mechanism of ciprofloxacin-mediated immunosuppression. *J Immunol* 184: 4827–4841.
32. Ryan JA, Brunelle JK, Letai A Heightened mitochondrial priming is the basis for apoptotic hypersensitivity of CD4+ CD8+ thymocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 12895–12900.

Artículo original

Los niveles en sangre de PGC-1 α predice miocardio salvado y remodelado ventricular tras infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST



Óscar Fabregat-Andrés^{a,b,*}, Francisco Ridocci-Soriano^{a,c}, Jordi Estornell-Erill^d, Miguel Corbí-Pascual^e, Alfonso Valle-Muñoz^f, Alberto Berenguer-Jofresa^a, José A. Barrabés^{g,h}, Manuel Mataⁱ y María Monsalve^j

^a Servicio de Cardiología, Consorcio Hospital General Universitario de Valencia, Valencia, España

^b Fundación de Investigación, Hospital General de Valencia, Valencia, España

^c Departamento de Medicina, Universitat de València, Valencia, España

^d Unidad de Imagen Cardíaca, ERESA, Hospital General Universitario de Valencia, Valencia, España

^e Departamento de Cardiología, Complejo Hospitalario de Albacete, Albacete, España

^f Departamento de Cardiología, Hospital Marina Salud, Denia, Alicante, España

^g Departamento de Cardiología, Hospital Universitario Vall d'Hebron, Barcelona, España

^h Departamento de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España

ⁱ Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universitat de València, Valencia, España

^j Departamento de Metabolismo y Señalización Celular, Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (CSIC-UAM), Madrid, España

Historia del artículo:

Recibido el 28 de febrero de 2014

Aceptado el 7 de mayo de 2014

On-line el 5 de noviembre de 2014

Palabras clave:

PGC-1 α

Infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST

Remodelado ventricular

Metabolismo oxidativo

Estrés oxidativo

RESUMEN

Introducción y objetivos: El coactivador 1 α del receptor activado gamma del proliferador de peroxisoma (PGC-1 α) es un regulador metabólico que se induce durante la isquemia y previene el remodelado cardíaco en modelos animales. Su actividad puede estimarse en pacientes con infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST. Nuestro objetivo es evaluar el valor predictivo de los niveles en sangre de PGC-1 α en la extensión del área necrótica y el remodelado ventricular tras infarto.

Métodos: Estudio prospectivo de 31 pacientes con primer infarto de miocardio de localización anterior y reperfusión exitosa. Se determinó la expresión de PGC-1 α en sangre periférica al ingreso y a las 72 h, evaluando su correlación con el daño miocárdico y el volumen ventricular y la función sistólica a los 6 meses. El edema y la necrosis miocárdica se estimaron mediante resonancia magnética cardíaca durante la primera semana. A los 6 meses, una resonancia de control evaluó tamaño del infarto y remodelado ventricular, definido como el incremento > 10% del volumen telediastólico del ventrículo izquierdo. Se definió miocardio salvado como la diferencia entre las áreas de edema y de necrosis.

Resultados: Se observó más miocardio salvado en los pacientes con expresión de PGC-1 α detectable al ingreso (el 18,3% \pm 5,3% frente al 4,5% \pm 3,9%; $p = 0,04$). La inducción de PGC-1 α a las 72 h se correlacionó con mayor remodelado ventricular (variación del volumen telediastólico del ventrículo izquierdo a los 6 meses, el 29,7% \pm 11,2% frente al 1,2% \pm 5,8%; $p = 0,04$).

Conclusiones: El grado de expresión basal de PGC-1 α y una respuesta atenuada del sistema tras infarto agudo de miocardio se asocian con más miocardio salvado y predicen menos remodelado ventricular.

© 2014 Sociedad Española de Cardiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Blood PGC-1 α Concentration Predicts Myocardial Salvage and Ventricular Remodeling After ST-segment Elevation Acute Myocardial Infarction

ABSTRACT

Introduction and objectives: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α (PGC-1 α) is a metabolic regulator induced during ischemia that prevents cardiac remodeling in animal models. The activity of PGC-1 α can be estimated in patients with ST-segment elevation acute myocardial infarction. The aim of the present study was to evaluate the value of PGC-1 α in blood in predicting the extent of necrosis and ventricular remodeling after infarction.

Methods: In this prospective study of 31 patients with a first myocardial infarction in an anterior location and successful reperfusion, PGC-1 α expression in peripheral blood on admission and at 72 hours was correlated with myocardial injury, ventricular volume, and systolic function at 6 months. Edema and myocardial necrosis were estimated using cardiac magnetic resonance imaging during the first week. At 6 months, infarct size and ventricular remodeling, defined as an increase > 10% of the left

Keywords:

PGC-1 α

ST-segment elevation acute myocardial infarction

Ventricular remodeling

Oxidative metabolism

Oxidative stress

* Autor para correspondencia: Servicio de Cardiología, Consorcio Hospital General Universitario de Valencia, Avda. Tres Cruces 2, 46014 Valencia, España. Correo electrónico: osfabregat@gmail.com (Ó. Fabregat-Andrés).

ventricular end-diastolic volume, was evaluated by follow-up magnetic resonance imaging. Myocardial salvage was defined as the difference between the edema and necrosis areas.

Results: Greater myocardial salvage was seen in patients with detectable PGC-1 α levels at admission (mean [standard deviation (SD)], 18.3% [5.3%] vs 4.5% [3.9%]; $P = .04$). Induction of PGC-1 α at 72 hours correlated with greater ventricular remodeling (change in left ventricular end-diastolic volume at 6 months, 29.7% [11.2%] vs 1.2% [5.8%]; $P = .04$).

Conclusions: Baseline PGC-1 α expression and an attenuated systemic response after acute myocardial infarction are associated with greater myocardial salvage and predict less ventricular remodeling.

Full English text available from: www.revespcardiol.org/en

© 2014 Sociedad Española de Cardiología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Abreviaturas

IAMCEST: infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST
 IR: isquemia-reperfusión
 MS: miocardio salvado
 OMV: obstrucción microvascular
 PGC-1 α : coactivador 1 α del receptor activado gamma del proliferador de peroxisoma
 RV: remodelado ventricular

INTRODUCCIÓN

El infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST (IAMCEST) es una de las principales causas de muerte por enfermedad cardiovascular¹. En los últimos años, el progreso en estrategias de reperfusión que reducen el tiempo de isquemia ha permitido una mejora en la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes con IAMCEST. A pesar de ello, actualmente muchos pacientes todavía sufren necrosis miocárdicas extensas que condicionan su evolución clínica². Numerosos estudios han demostrado que parte de la muerte celular miocárdica que ocurre en este contexto se precipita durante la fase de restauración del flujo coronario, en un fenómeno conocido como lesión por reperfusión³.

La investigación en terapias de cardioprotección contra el daño por isquemia-reperfusión (IR) supone, por lo tanto, la oportunidad de reducir el grado de necrosis celular y, en consecuencia, mejorar el pronóstico de estos pacientes. Sin embargo, actualmente muchos aspectos de la lesión por IR permanecen inciertos⁴⁻⁶. Diversos estudios han evaluado el efecto de mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo, como el uso de antioxidantes⁷ o la regulación de enzimas mitocondriales⁸, en modelos de infarto de miocardio. No obstante, la existencia de un mecanismo coordinado que regule el sistema de protección mitocondrial en tejidos celulares con altas tasas metabólicas como el cardíaco está por dilucidar.

El coactivador 1 α del receptor activado gamma del proliferador de peroxisoma (PGC-1 α) es un coactivador transcripcional que actúa como regulador maestro de los genes implicados en el metabolismo oxidativo y la biogénesis mitocondrial y tiene un papel fundamental en el control metabólico del músculo cardíaco y la diferenciación madurativa de los miocardiocitos⁹.

En modelos animales de isquemia cardíaca, se ha observado la reducción en la expresión miocárdica de PGC-1 α tras ligadura de la arteria coronaria¹⁰ y que el uso de fármacos agonistas de los receptores activados del proliferador peroxisómico (PPAR)¹¹, que mantienen su expresión, es capaz de reducir el tamaño del infarto y la apoptosis celular miocárdica y preservar en mayor grado la función ventricular.

La homeostasis mitocondrial es clave en la tolerancia miocárdica a situaciones de isquemia y estrés oxidativo. Por un lado, se ha

demostrado que la delección genética de PGC-1 α causa incapacidad del miocardio para adaptarse a estímulos de sobrecarga¹² y, por el contrario, la sobreexpresión de PGC-1 α ocasiona un aumento desmesurado del número de mitocondrias que altera la estructura sarcomérica de los miocardiocitos y produce disfunción contráctil¹³. Por lo tanto, la inducción de PGC-1 α como respuesta al daño celular por estrés oxidativo debe ser transitoria y proporcionada¹⁴.

Según esta evidencia, la monitorización de la concentración de PGC-1 α tras un IAMCEST puede ser útil en la evaluación de la recuperación miocárdica, de manera que el análisis tanto de los valores basales de la molécula como de su inducción posthipóxica permitiría estimar la tolerancia de las células cardíacas a la isquemia.

Nuestro grupo ha descrito recientemente la posibilidad de detectar inducción de PGC-1 α en pacientes con IAMCEST por su grado de expresión en linfocitos procedentes de muestras de sangre periférica¹⁵. Los pacientes con mayor inducción de PGC-1 α tuvieron en la evolución infartos más extensos y más frecuencia de disfunción ventricular izquierda. Esta respuesta deletérea podría explicarse en parte por la sobreexpresión de *adenine nucleotide translocase 1* (ANT-1) mediada por PGC-1 α , componente del complejo de transición de permeabilidad mitocondrial (mtPTP) que regula la apoptosis celular miocárdica en situaciones de isquemia¹⁶.

Con la finalidad de caracterizar el grado de expresión de PGC-1 α en respuesta al estrés oxidativo miocárdico desencadenado por IR, nos planteamos como objetivo evaluar si los valores basales de la molécula y su inducción tras el IAMCEST se relacionaban con la extensión de la necrosis, el área miocárdica en riesgo y la función ventricular, con objeto de definir un perfil de activación cardioprotector.

MÉTODOS

Muestra

Se incluyó prospectivamente a 31 pacientes atendidos en nuestro centro hospitalario con diagnóstico de IAMCEST de localización anterior y sometidos a estrategia de reperfusión en el periodo comprendido entre junio de 2009 y mayo de 2011. Los criterios de inclusión fueron: primer episodio de IAMCEST, localización anterior del infarto con lesión causal en segmento proximal o medio de la arteria coronaria descendente anterior y terapia de reperfusión mediante angioplastia primaria o de rescate. Siguiendo las guías de práctica clínica de la Sociedad Europea de Cardiología¹⁷, se estableció el diagnóstico de IAMCEST en los pacientes con síntomas isquémicos, elevación persistente del segmento ST en el electrocardiograma y elevación típica de biomarcadores de necrosis miocárdica. Inicialmente los pacientes fueron informados verbalmente de su participación en el estudio, y luego firmaron el correspondiente consentimiento informado, aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del hospital.

Los criterios de exclusión y los datos recogidos durante el estudio se detallan en el [material suplementario](#).

Estudios de resonancia cardiaca

Se realizaron dos estudios de resonancia magnética cardiaca durante el seguimiento. Una primera exploración entre el tercer y el quinto día tras el infarto, con el fin de evaluar el porcentaje de miocardio salvado (MS), definido por la diferencia entre el edema miocárdico en fase aguda del infarto y la necrosis cardiaca estimada por el área de realce tardío de gadolinio, y un estudio de control a los 6 meses para evaluar la cicatriz ya establecida. Asimismo, el análisis comparativo entre el área de edema miocárdico en la exploración inicial y el área de necrosis a los

6 meses permitió estimar el MS en la evolución a largo plazo ([figura 1](#)).

La metodología de las exploraciones de resonancia magnética cardiaca se detalla en el [material suplementario](#).

Preparación de las muestras de sangre periférica y análisis de biología molecular

Se obtuvieron 6 ml de sangre periférica mediante tubos Vacutainer™ con EDTA al ingreso y a las 72 h. Se aislaron células mononucleares por centrifugación en gradiente de densidad mediante técnica de Ficoll-Hypaque (Ficoll-Paque™, Miltenyi Biotec). Se determinó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa de ADNc retrotranscrito (qRT-PCR)

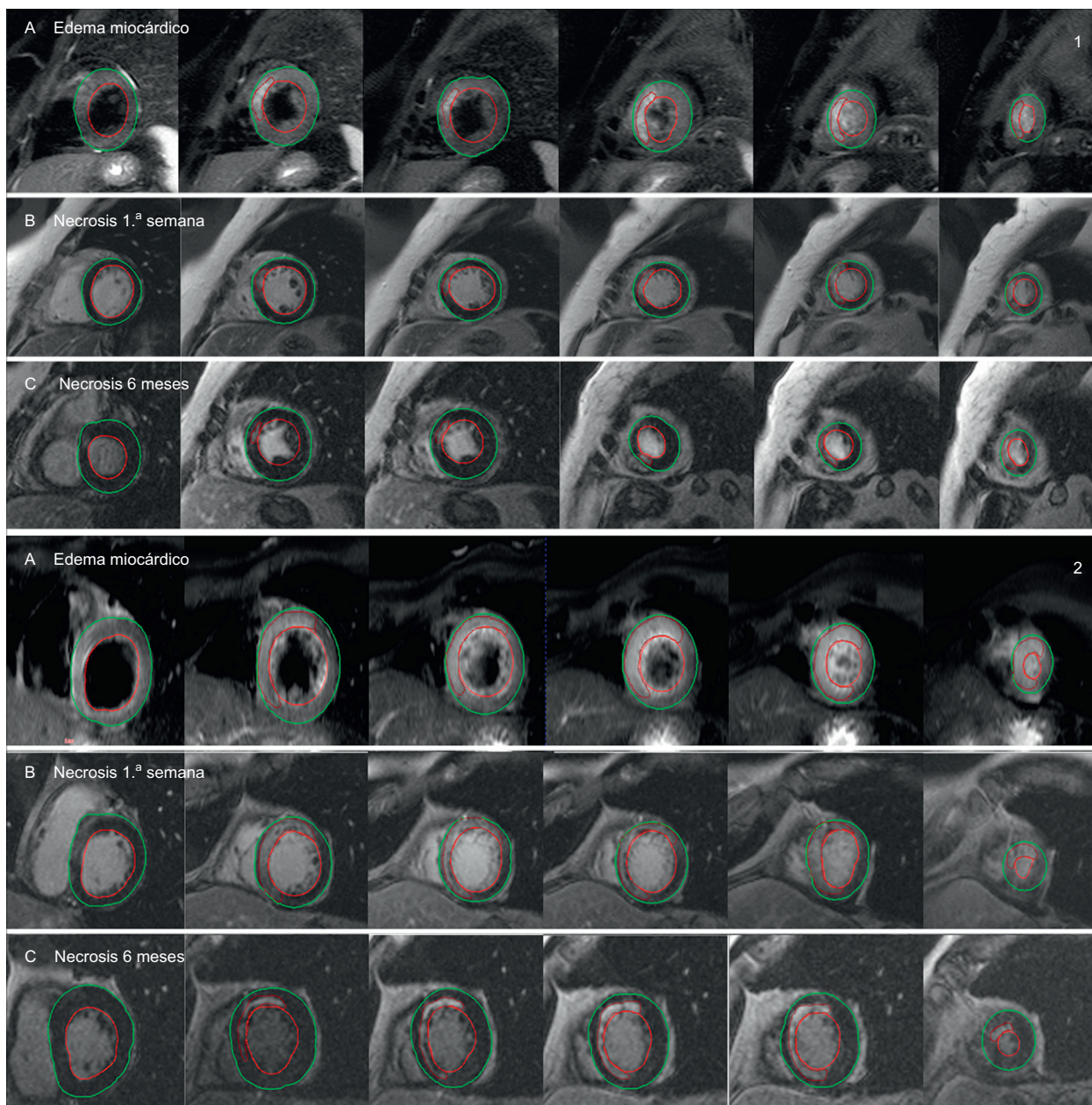


Figura 1. Comparación de estudios de resonancia magnética cardiaca entre dos pacientes paradigmáticos según la inducción de PGC-1 α tras infarto de miocardio (1: paciente con inducción; 2: paciente sin inducción): área en riesgo estimada por edema miocárdico en secuencias T2-weighted Short Tau Inversion Recovery (T2-STIR) (A), y área de necrosis estimada por realce tardío de gadolinio durante la primera semana (B) y a los 6 meses (C). Las áreas de necrosis y edema (líneas de color granate) se calcularon con respecto a la masa miocárdica total, trazando manualmente los contornos epicárdico (línea verde) y endocárdico (línea roja). Esta figura se muestra a todo color solo en la versión electrónica del artículo.

la expresión relativa de ARN de PGC-1 α y sus dianas génicas citocromo C, manganeso superóxido dismutasa (MnSOD), glutatión peroxidasa (GPx) y ANT-1, utilizando sondas específicas¹⁸.

Los detalles de la extracción de ARN y el análisis de proteínas se detallan en el [material suplementario](#).

Para el análisis de resultados, se dividió la muestra en dos grupos: por un lado, según la expresión basal de PGC-1 α al ingreso, si esta era detectable en sangre periférica en la primera determinación o no, y por otro lado, en función de la inducción de PGC-1 α tras el infarto, teniendo en cuenta los valores de expresión de ARN en las muestras al ingreso y a las 72 h. Se definió inducción de PGC-1 α como el incremento > 2 veces de la expresión determinada por qRT-PCR en la segunda muestra.

En el análisis de ANT-1, se definió igualmente inducción como el incremento > 2 veces en la determinación seriada a las 72 h.

Análisis estadístico

Mediante el test de Kolmogorov-Smirnov, se comprobó la normalidad en la distribución de las variables cuantitativas. Todas las variables continuas y normales se expresaron como media \pm desviación estándar, y las variables categóricas, como número (porcentaje). La comparación de las variables continuas entre los grupos se realizó mediante el test de la t de Student para muestras independientes y el test de Mann-Whitney para variables con

distribución no normal, y las variables no continuas se compararon mediante el test de la χ^2 y la prueba exacta de Fisher cuando fue apropiado. Se estudió el porcentaje de MS en cada uno de los grupos definidos, así como el remodelado ventricular (RV), y se compararon las medias también mediante prueba de la t de Student para muestras independientes. El análisis de las variaciones en el tamaño de la necrosis y el MS a largo plazo en cada paciente se realizó mediante el test de la t de Student para muestras apareadas. Se representó en diagramas de barras de error el cambio porcentual en los diferentes subgrupos. El análisis estadístico se realizó mediante el programa SPSS para Windows versión 17.0 (SPSS Inc.; Chicago, Illinois, Estados Unidos). Se consideraron significativos los valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Expresión basal de PGC-1 α

Al dividir la muestra en función de la expresión basal de PGC-1 α en la muestra sanguínea al ingreso, establecimos dos grupos claramente diferenciados: pacientes con expresión constitutiva y pacientes sin expresión basal detectable. Así, encontramos que la ausencia de detección periférica de PGC-1 α en el momento inicial tendía a ser más frecuente en pacientes diabéticos y se correlacionaba positivamente con valores más elevados de proteína C reactiva, aunque sin alcanzar significación estadística.

Tabla 1

Características de la muestra según grado de expresión basal de PGC-1 α : factores de riesgo cardiovascular, características del infarto y bioquímica general

Características de la muestra	Valor basal de PGC-1 α elevado (n=16)	Ausencia de detección basal de PGC-1 α (n=15)	p
<i>Características de los pacientes</i>			
Edad (años)	61,1 \pm 13,6	57,5 \pm 12,5	0,452
Varones	12 (75)	13 (86,6)	0,172
Diabetes mellitus	2 (12,5)	4 (26,6)	0,335
Hipertensión arterial	6 (37,5)	7 (46,6)	0,620
Dislipemia	7 (43,7)	6 (40)	0,839
Tabaquismo	10 (62,5)	5 (33,3)	0,111
Índice de masa corporal	26,15 \pm 2,4	27,79 \pm 3,7	0,158
<i>Características del infarto</i>			
Tiempo de isquemia (min)	214 \pm 32	242 \pm 51	0,482
Pico de troponina I (ng/ml)	63,4 \pm 52,7	92,9 \pm 63,3	0,172
Pico de CK-MB (ng/ml)	145,9 \pm 79,1	246,0 \pm 221,6	0,116
Angioplastia primaria	10 (62,5)	7 (46,7)	
Angioplastia de rescate	6 (37,5)	8 (53,3)	
<i>Bioquímica sanguínea</i>			
Hemoglobina (mg/dl)	14,0 \pm 2,3	14,6 \pm 1,7	0,380
Creatinina (mg/dl)	0,86 \pm 0,20	0,94 \pm 0,27	0,402
Colesterol total (mg/dl)	169,2 \pm 46,3	178,8 \pm 34,1	0,510
cLDL (mg/dl)	109,5 \pm 39,1	111,7 \pm 28,3	0,862
cHDL (mg/dl)	42,5 \pm 12,5	38,3 \pm 10,5	0,368
Glucemia en ayunas (mg/dl)	113,5 \pm 33,4	129,5 \pm 48,3	0,298
HbA _{1c} (%)	5,92 \pm 1,5	6,21 \pm 1,7	0,609
Proteína C reactiva (mg/dl)	0,50 \pm 0,29	0,94 \pm 1,34	0,207
<i>Ecocardiografía y RMC inicial</i>			
FEVI por ecocardiografía (%)	48,7 \pm 9,3	51,1 \pm 9,0	0,464
RTG por RMC (%)	16,9 \pm 11,3	19,0 \pm 10,8	0,609
Edema por RMC (%)	20,7 \pm 11,9	23,3 \pm 13,0	0,576
Miocardio salvado en RMC (%)	21,0 \pm 18,9	18,6 \pm 14,0	0,693
OMV en RMC	7 (43,7)	8 (53,3)	0,624

cHDL: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad; CK-MB: fracción MB de la creatinina; cLDL: colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad; FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo; HbA_{1c}: glucohemoglobina; OMV: obstrucción microvascular; RMC: resonancia magnética cardiaca; RTG: realce tardío de gadolinio. Significación estadística, $p < 0,05$. Los valores indican n (%) o media \pm desviación estándar.

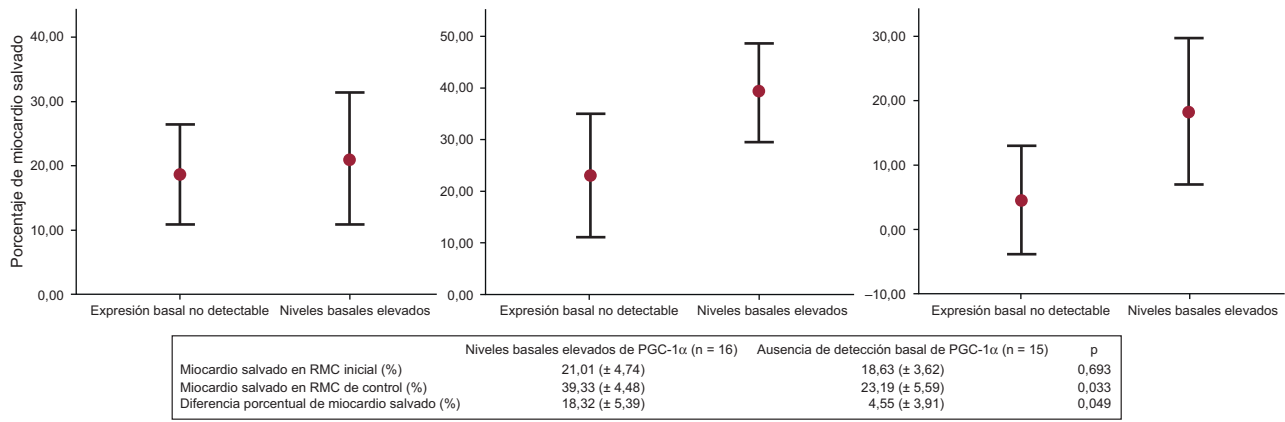


Figura 2. Miocardio salvado según la expresión basal de PGC-1α: comparación de estudio inicial, el control a los 6 meses y la variación porcentual entre ambos estudios. RMC: resonancia magnética cardíaca.

El análisis de factores de riesgo cardiovascular y características del infarto no halló diferencias entre los grupos (tabla 1).

Con el fin de evaluar qué implicación tenía la activación basal de PGC-1α en la recuperación del miocardio tras el infarto, decidimos comparar el MS a largo plazo entre los dos grupos. De esta forma, se observó que, si bien no se hallaron diferencias en MS al comparar los grupos en la exploración inicial, los pacientes con grado de expresión de PGC-1α elevado al ingreso presentaron mayor índice de MS en el estudio de control (porcentaje de MS a los 6 meses, el 39,3% ± 4,5% frente al 23,2% ± 5,6%; p = 0,033) (figura 2).

Además, en el estudio del volumen ventricular, se observó una tendencia hacia mayor RV en el grupo de pacientes sin expresión basal de PGC-1α detectable (variación porcentual del volumen telediastólico del ventrículo izquierdo, el 15,2% ± 9,2% frente al 2,3% ± 6,5%; p = 0,26) (figura 3 A), mientras que en los pacientes con mayor actividad basal de PGC-1α mejoró la función sistólica a los 6 meses, aunque las diferencias no fueron significativas (variación porcentual de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo, el 6,9% ± 4,7% frente al -0,5% ± 3,2%; p = 0,20) (figura 3 B).

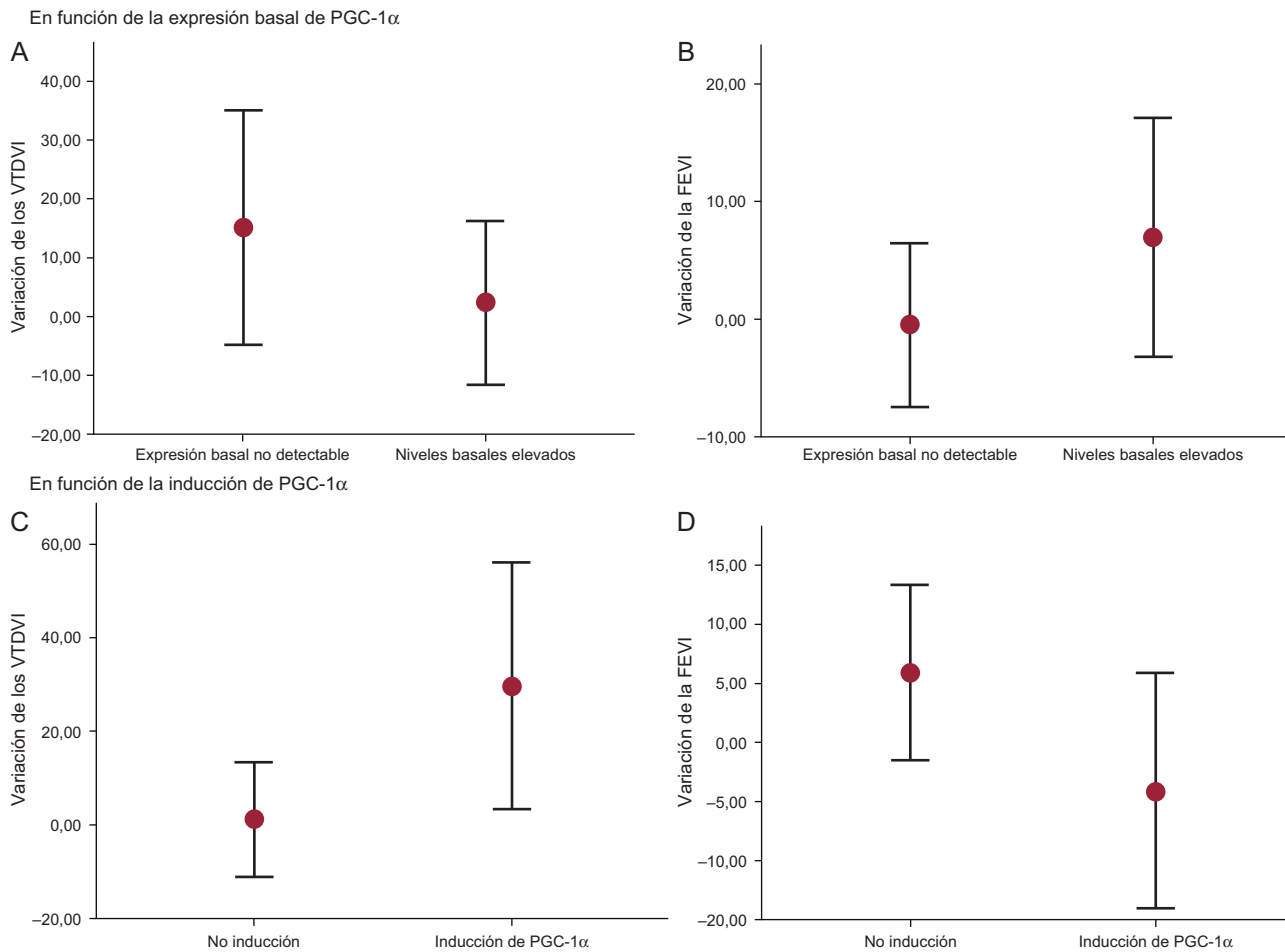


Figura 3. Variación de los volúmenes ventriculares y la función sistólica a los 6 meses (A y B). Variación según la expresión basal de PGC-1α (C y D). Variación según la inducción de PGC-1α tras infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST. FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo; VTDVI: volumen telediastólico del ventrículo izquierdo.

Tabla 2Características de la muestra según inducción de PGC-1 α tras el infarto: factores de riesgo cardiovascular, características del infarto y bioquímica general

Características de la muestra	Grupo con inducción de PGC-1 α (n=8)	Grupo sin inducción de PGC-1 α (n=23)	p
Edad (años)	57,2 \pm 10,6	60,1 \pm 13,9	0,552
Varones	5 (62,5)	20 (91,3)	0,059
Diabetes mellitus	1 (12,5)	5 (21,7)	0,555
Hipertensión arterial	3 (37,5)	10 (43,2)	0,782
Dislipemia	4 (50,0)	9 (39,1)	0,624
Tabaquismo	4 (50,0)	11 (47,8)	0,922
Índice de masa corporal	27,3 \pm 2,9	26,8 \pm 3,2	0,673
Características del infarto			
Tiempo de isquemia (min)	283 \pm 192	202 \pm 154	0,213
Pico de troponina I (ng/ml)	96,3 \pm 70,6	71,2 \pm 54,8	0,383
Pico de CK-MB (ng/ml)	292,5 \pm 265,4	160,4 \pm 109,3	0,209
Angioplastia primaria	3 (37,5)	14 (60,9)	
Angioplastia de rescate	5 (62,5)	9 (39,1)	
Bioquímica sanguínea			
Hemoglobina (g/dl)	14,0 \pm 2,0	14,4 \pm 2,0	0,635
Creatinina (mg/dl)	0,94 \pm 0,9	0,88 \pm 0,9	0,606
Colesterol total (mg/dl)	203,1 \pm 23,4	163,6 \pm 40,5	0,003
cLDL (mg/dl)	134,2 \pm 24,0	102,3 \pm 33,1	0,010
cHDL (mg/dl)	41,0 \pm 7,9	40,0 \pm 12,7	0,807
Glucemia ayunas (mg/dl)	126,4 \pm 53,7	119,4 \pm 37,4	0,743
HbA _{1c} (%)	6,0 \pm 2,2	6,0 \pm 1,3	0,939
Proteína C reactiva (mg/dl)	0,66 \pm 1,16	0,73 \pm 0,92	0,879
Ecocardiografía y RMC			
FEVI por ecocardiografía (%)	51,8 \pm 8,6	49,2 \pm 9,3	0,471
RTG por RMC (%)	20,9 \pm 7,9	16,9 \pm 11,8	0,375
Edema por RMC (%)	28,9 \pm 10,0	19,6 \pm 12,3	0,051
Miocardio salvado (%)	26,8 \pm 13,5	17,4 \pm 17,0	0,135
OMV en RMC	4 (50)	11 (48)	0,922

cHDL: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad; CK-MB: fracción MB de la creatinincinasa; cLDL: colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad; FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo; HbA_{1c}: glucosilhemoglobina; OMV: obstrucción microvascular; RMC: resonancia magnética cardiaca; RTG: realce tardío de gadolinio. Significación estadística, $p < 0,05$. Los valores indican n (%) o media \pm desviación estándar.

Inducción de PGC-1 α tras infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST

Con objeto de estudiar la repercusión funcional de la inducción de PGC-1 α tras IAMCEST, la muestra se dividió en dos grupos en función de su presencia o ausencia, teniendo en cuenta el grado de expresión de PGC-1 α en las muestras sanguíneas al ingreso y a las 72 h. De esta manera, observamos que se detectó inducción de PGC-1 α más frecuentemente en el contexto de infartos extensos (área necrótica y edema estimado por resonancia magnética cardiaca; realce tardío de gadolinio, el 20,99 frente al 16,91%; $p = 0,37$; edema miocárdico, el 28,91 frente al 19,59%; $p = 0,051$) y con mayor pico enzimático (valor máximo de troponina I, 96,3 frente a 71,2 ng/dl; $p = 0,38$; CK-MB, 292,5 frente a 160,4 ng/dl; $p = 0,20$), aunque sin alcanzar la significación estadística. Asimismo, la inducción de PGC-1 α se correlacionó positivamente con los valores de colesterol total y colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad, pero no se hallaron otras diferencias significativas entre los grupos en el análisis de factores de riesgo cardiovascular y las características del infarto (tabla 2).

Evaluando los efectos a largo plazo de la inducción de PGC-1 α durante la fase aguda del infarto, comparamos nuevamente el índice de MS a los 6 meses entre los dos grupos, y aunque se halló tendencia a mayor índice de MS en el grupo de inducción de PGC-1 α (porcentaje de MS a los 6 meses, el 43,1% \pm 9,9% frente al 27,5% \pm 3,5%; $p = 0,071$) (figura 4), esta era consecuencia de la mayor extensión del área de edema en fase aguda en estos pacientes. Por este

motivo, se evaluó el área necrótica y el MS a largo plazo mediante un análisis por muestras apareadas, y se comprobó una mejora comparable en ambos grupos (tabla 3).

Sin embargo, al comparar en estos grupos la evolución del volumen ventricular izquierdo a los 6 meses del infarto, se evidenció mayor RV en el grupo de inducción de PGC-1 α (variación porcentual del volumen telediastólico del ventrículo izquierdo, el 29,7% \pm 11,2% frente al 1,2% \pm 5,8%; $p = 0,045$) (figura 3 C) y un deterioro no significativo de la función sistólica general (variación porcentual de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo, el -4,1% \pm 4,2% frente al 5,9% \pm 3,6%; $p = 0,085$) (figura 3 D).

Respuesta inmune y PGC-1 α

Véase el [material suplementario](#) y la [tabla del material suplementario](#).

Actividad molecular de PGC-1 α

Véase el [material suplementario](#) y la [figura del material suplementario](#).

Inducción de ANT-1 mediada por PGC-1 α

La ANT-1 regula la apoptosis celular miocárdica en situaciones de IR con elevado estrés mitocondrial, y su expresión se induce en parte a través de PGC-1 α . Al correlacionar los grados de expresión

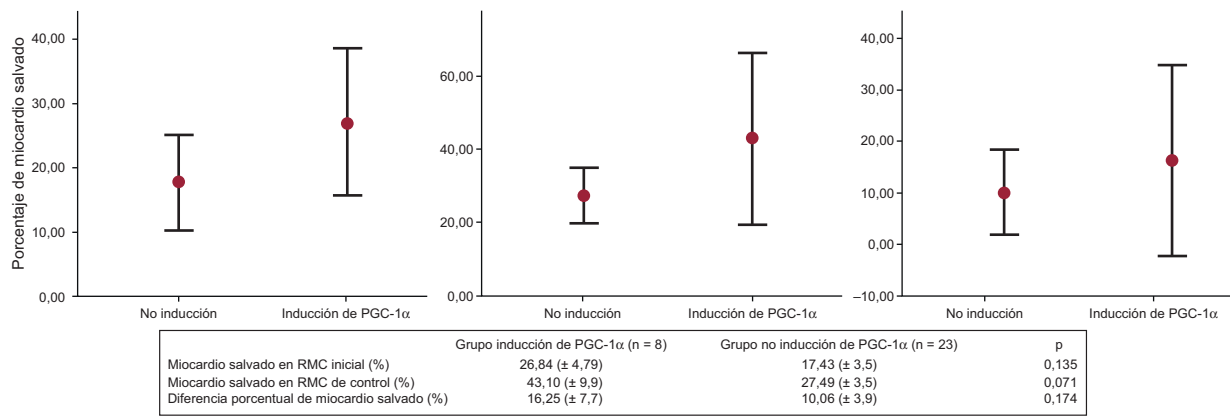


Figura 4. Miocardio salvado según la inducción de PGC-1α tras infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST: comparación del estudio inicial, el control a los 6 meses y la variación porcentual entre ambos estudios. RMC: resonancia magnética cardiaca.

de PGC-1α y ANT-1 tras IAMCEST, encontramos que 7 de los 8 pacientes con inducción de PGC-1α tras el infarto inducían a su vez ANT-1 (tabla 4 A).

Inducción de PGC-1α, obstrucción microvascular y remodelado ventricular

Dado que los pacientes con inducción de PGC-1α presentaron mayor volumen telediastólico del ventrículo izquierdo en el control a los 6 meses y la obstrucción microvascular (OMV) es un factor pronóstico emergente de RV, decidimos comprobar la capacidad predictiva del análisis de PGC-1α tras IAMCEST tomando como referencia la presencia de OMV en el estudio inicial de resonancia magnética cardiaca. De esta manera, encontramos que 7 de los 8 pacientes (87,5%) con inducción de PGC-1α tras IAMCEST presentaban criterios de RV en la evolución (tabla 4 B), en comparación con los 8 de los 15 pacientes (53,3%) con OMV en la resonancia cardiaca inicial (tabla 4 C).

En el análisis conjunto de OMV e inducción de PGC-1α tras infarto, encontramos, por un lado, que la asociación de ambos factores se correlacionó con exactitud con la presencia de RV en el estudio de control (tabla 4 D). En sentido opuesto, la ausencia de OMV e inducción de PGC-1α fue más frecuente en pacientes con infartos menos extensos, y se observó una mejora significativa de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo a los 6 meses y tendencia a la preservación del volumen telediastólico del ventrículo izquierdo (tabla 5).

DISCUSIÓN

El PGC-1α es un factor transcripcional maestro que regula la expresión génica mitocondrial y nuclear en el tejido cardiaco. Además de su participación en el metabolismo energético, PGC-1α activa la biogénesis mitocondrial y coordina el programa de defensa celular contra el estrés oxidativo¹⁹.

Tabla 3

Área de necrosis y miocardio salvado: muestras apareadas en función de la inducción de PGC-1α en fase aguda del infarto. Comparación de porcentajes mediante test de la t de Student para muestras apareadas

	Grupos muestrales (n = 31)	RMC inicial	RMC 6 meses	p
Área de necrosis (%)	Inducción de PGC-1α (n = 8)	20,98 ± 7,9	16,56 ± 9,9	0,009
	Sin inducción (n = 23)	16,92 ± 11,8	14,70 ± 10,9	0,001
Miocardio salvado (%)	Inducción de PGC-1α (n = 8)	26,70 ± 13,5	44,35 ± 26,3	0,095
	Sin inducción (n = 23)	18,25 ± 18,7	27,76 ± 17,7	0,035

RMC: resonancia magnética cardiaca; RTG: realce tardío de gadolinio.

Datos expresados en porcentajes. Significación estadística, p < 0,05. Área de necrosis estimada por RTG. Miocardio salvado estimado por diferencia entre área de edema en fase aguda y área de necrosis.

Sabiendo que la disfunción endotelial promovida por radicales libres de oxígeno es una característica precoz de las enfermedades cardiovasculares, el interés clínico de PGC-1α radica en su papel central de desintoxicación intracelular en situaciones como la isquemia miocárdica.

Cabe señalar que, si bien la inducción de PGC-1α se ha mostrado beneficiosa en la adaptación del tejido neuronal y el músculo esquelético a situaciones de isquemia y ejercicio intenso respectivamente, su papel en la respuesta al estrés en el corazón adulto es hasta el momento controvertido. En modelos animales, por un lado, se han observado efectos cardiotoxicos con la inducción de PGC-1α y, por otro, disfunción cardiaca tras su delección transgénica. De la misma manera, estudios clínicos han descrito resultados contradictorios sobre el grado de expresión de PGC-1α en miocardiocitos disfuncionantes^{20,21}. Centrados en esta aparente paradoja, otros trabajos han señalado que la sobreexpresión atenuada y transitoria de PGC-1α podría tener efectos beneficiosos en condiciones de estrés²². De esta forma, la supervivencia celular frente al daño por IR dependería del grado de activación inicial del sistema de defensa mitocondrial, su grado de respuesta al daño por oxidación y el mantenimiento de la respuesta tras el estímulo.

En nuestro trabajo se monitorizó la expresión de PGC-1α en pacientes con IAMCEST sometidos a estrategia de reperfusión y, por lo tanto, con lesión por IR en tejido cardiaco. Encontramos, en primer lugar, que el grado de activación basal del sistema era importante en la extensión de la necrosis miocárdica, de forma que los pacientes con expresión constitutiva de PGC-1α detectable en la primera muestra sanguínea presentaron mayor índice de MS en el estudio de control a los 6 meses. Además, se observó tendencia a menor RV y mayor grado de recuperación de la función sistólica. La ausencia de expresión basal de PGC-1α se encontró más frecuentemente en pacientes diabéticos, aunque de manera no significativa por el reducido tamaño muestral. Estos resultados refuerzan la evidencia de que la integridad del sistema regulado por PGC-1α es esencial para afrontar el daño agudo por IR, y podrían explicar en parte la peor

Tabla 4Inducción de ANT-1 y remodelado ventricular en función de la inducción de PGC-1 α y la presencia de obstrucción microvascular

		Muestra total (n=29)*	Inducción de PGC-1 α (n=8)	Sin inducción de PGC-1 α (n=21)
A	Inducción de ANT-1	Inducción ANT-1 > 2 veces (n=15)	7	8
		Inducción ANT-1 < 2 veces (n=14)	1	13
		Muestra total (n=31)	Inducción de PGC-1 α (n=8)	Sin inducción de PGC-1 α (n=23)
B	Remodelado ventricular	Incremento de VTDVI > 10% (n=15)	7	8
		Incremento VTDVI < 10% (n=16)	1	15
		Muestra total (n=31)	OMV (n=15)	Sin OMV (n=16)
C	Remodelado ventricular	Incremento de VTDVI > 10% (n=15)	8	7
		Incremento de VTDVI < 10% (n=16)	7	9
		Muestra total (n=31)	Inducción de PGC-1 α + OMV (n=4)	Sin asociación conjunta (n=27)
D	Remodelado ventricular	Incremento de VTDVI > 10% (n=15)	4	11
		Incremento de VTDVI < 10% (n=16)	0	16

ANT-1: adenine nucleotide translocase 1; OMV: obstrucción microvascular; VTDVI: volumen telediastólico del ventrículo izquierdo.

* Muestra total en análisis de ANT-1: 29 pacientes, 2 pérdidas por material genético insuficiente.

Los valores expresan número de pacientes.

evolución de los pacientes con trastornos del metabolismo glucídico, con base en la pérdida de actividad de PGC-1 α descrita tradicionalmente en pacientes con diabetes mellitus²³. En este sentido, el ensayo AleCardio ha evaluado recientemente el efecto de aleglitazar, como agonista dual de los PPAR, en la reducción de eventos cardiovasculares tras síndrome coronario agudo en pacientes diabéticos. Sin embargo, el ensayo se interrumpió prematuramente por recomendación del comité de seguridad debido a la falta de eficacia y el incremento de los objetivos de seguridad en un análisis intermedio no planificado²⁴.

Al analizar la implicación pronóstica de la inducción de PGC-1 α en pacientes con IAMCEST, observamos su correlación con el desarrollo de mayor RV, mientras que los grupos muestrales son comparables en tiempo de isquemia, estrategia de reperfusión, arteria causal del evento y área de necrosis inicial estimada por resonancia magnética cardíaca. Este incremento del volumen telediastólico del ventrículo izquierdo en el control a los 6 meses se acompañó de un deterioro no significativo de la función sistólica. La inducción de PGC-1 α se siguió asimismo de un aumento significativo en la expresión de sus dianas génicas citocromo C y GPx. Estos datos respaldarían la hipótesis de que la inducción excesiva, tanto de PGC-1 α como del sistema mitocondrial contra el estrés oxidativo que regula, tendría efectos deletéreos en la supervivencia celular en situaciones de IR. El mecanismo fisiopatológico causal podría explicarse en parte por la inducción

de ANT-1 mediada por PGC-1 α en respuesta a la lesión por IR, que incrementa la apoptosis celular de manera dependiente de la dosis en diversos tejidos, incluido el cardíaco²⁵.

Recientemente se ha demostrado que la activación coordinada de ANT-1 y PGC-1 α en modelos murinos de isquemia disminuye la tolerancia celular al estrés¹⁶. Ante la evidencia de disfunción contráctil tras la inducción de PGC-1 α en situaciones de IR¹⁴, se ha propuesto que ANT-1 participa conjuntamente en el desarrollo de este fenotipo adverso, aunque esta situación no se ha probado clínicamente en pacientes. En nuestro estudio, al comparar los grupos según la inducción de PGC-1 α tras IAMCEST, se observó mayor inducción de ANT-1 en los pacientes con inducción de PGC-1 α . Por lo tanto, estos resultados respaldarían esta hipótesis por primera vez en un escenario clínico de lesión por IR.

Por otro lado, por la correlación observada entre la inducción de PGC-1 α y el desarrollo de RV, se comparó su capacidad pronóstica tomando como referencia la presencia de OMV en la resonancia magnética cardíaca, pues se ha demostrado que es un excelente factor pronóstico de RV^{26,27}. En nuestro estudio, la capacidad predictiva de la inducción de PGC-1 α tras IAMCEST fue superior a la existencia de OMV, y el hallazgo conjunto de ambas variables se correlacionó exactamente con la aparición de RV en todos los pacientes. Además, y en sentido opuesto, la ausencia de OMV e inducción de PGC-1 α se relacionó con mejor evolución tanto en la preservación del volumen telediastólico del ventrículo izquierdo

Tabla 5Características de la muestra según la inducción de PGC-1 α tras IAMCEST y la presencia de OMV en el estudio de CRM inicial: valoración por CRM de FEVI, VTDVI y tamaño del infarto (estimado por valores máximos de Tnl y área de necrosis según RTG)

	Inducción de PGC-1 α y/o OMV en CRM (n=19)	Ausencia de inducción de PGC-1 α y OMV (n=12)	p
Edad (años)	58,2 \pm 2,7	61,2 \pm 4,3	0,88
Tiempo de isquemia (min)	220 (159-288)	209 (164-254)	0,54
Pico de troponina I (ng/ml)	97,55 (84-110)	46,26 (33-59)	0,011
RTG inicial por RMC (%)	22,47 \pm 1,9	10,81 \pm 3,2	0,006
Edema por RMC en estudio inicial (%)	27,27 \pm 2,2	13,64 \pm 3,3	0,003
RTG por RMC (%) a los 6 meses	18,88 \pm 2,3	9,32 \pm 2,54	0,010
FEVI inicial por RMC (%)	50,1 \pm 2,1	49,1 \pm 2,9	0,13
FEVI por RMC (%) a los 6 meses	49,1 \pm 2,1	57,0 \pm 3,2	0,054
Variación porcentual de la FEVI (%)	-2,9 \pm 3,5	13,1 \pm 3,7	0,004
VTDVI inicial por RMC (ml/m ²)	92,3 \pm 6,2	91,0 \pm 11,3	0,49
VTDVI a los 6 meses por RMC (ml/m ²)	102,0 \pm 7,7	81,0 \pm 6,2	0,043
Variación porcentual del VTDVI (%)	15,3 \pm 7,1	-2,2 \pm 8,4	0,12

FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo; IAMCEST: infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST; OMV: obstrucción microvascular; RMC: resonancia magnética cardíaca; RTG: realce tardío de gadolinio; Tnl: troponina I; VTDVI: volumen telediastólico del ventrículo izquierdo.

Significación estadística, p < 0,05. Los valores expresan media \pm desviación estándar o media (intervalo).

como en la mejora de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo. Aun con las limitaciones del reducido número de pacientes, estos datos indican el valor pronóstico de la inducción de PGC-1 α en la recuperación miocárdica tras IAMCEST.

En resumen, hasta el momento la evidencia en investigación básica demuestra la participación de PGC-1 α en la regulación del sistema de protección celular contra el daño por IR, con resultados inciertos sobre su papel en tejido cardíaco. Nuestro trabajo monitorizó en un escenario clínico la expresión sistémica de PGC-1 α tras IAMCEST con el objeto de definir un perfil de activación cardioprotector. Así, mientras la expresión constitutiva de PGC-1 α se asoció a mayor MS, su inducción inmediata tras IAMCEST se correlacionó con mayor RV en la evolución postinfarto. Este efecto perjudicial en la recuperación cardíaca podría explicarse en parte por la inducción de ANT-1 mediada por PGC-1 α .

Estos datos en conjunto indican que la integridad del sistema de protección mitocondrial regulado por PGC-1 α es esencial para una adecuada respuesta al daño por IR, mientras su activación excesiva y persistente tras el evento isquémico tendría efectos deletéreos en la recuperación cardíaca. Sin embargo, las implicaciones pronósticas de estos hallazgos escapan al ámbito de nuestro estudio.

Limitaciones del estudio

Las principales limitaciones son el reducido tamaño muestral y el carácter eminentemente básico de la investigación. Así, aunque su diseño traslacional permite establecer hipótesis de trabajo con base en las conclusiones, conlleva la necesidad inherente de estudios clínicos futuros que permitan confirmar los hallazgos y definir el papel de la determinación de PGC-1 α en la práctica clínica.

CONCLUSIONES

La expresión sistémica de PGC-1 α puede monitorizarse en pacientes con IAMCEST. Mientras el incremento constitutivo de actividad del sistema regulado por PGC-1 α se correlacionó con mayor MS, la inducción excesiva y persistente de PGC-1 α tras IAMCEST se asoció a mayor RV. Este efecto deletéreo en la recuperación cardíaca podría estar relacionado con la inducción de ANT-1 mediada por PGC-1 α , que promueve la apoptosis celular en la lesión por IR.

FINANCIACIÓN

Este trabajo ha sido financiado por la Sociedad Española de Cardiología, a través de Beca para Proyectos de Investigación Básica en Cardiología, convocatoria 2010; el programa I3 de intensificación investigadora 2010 y 2012 del Instituto de Salud Carlos III y la Generalitat Valenciana; Fundación para la Investigación del Hospital General Universitario de Valencia, a través de Becas de Investigación Intramural, convocatorias 2008 y 2010; Ministerio de Ciencia e Innovación español, mediante proyectos SAF 2009-07599 y CSD 2007-00020; SAF2012-37693 del MINECO (Ministerio de Economía y Competitividad), y S2010/BMD-2361 de la Comunidad de Madrid.

CONFLICTO DE INTERESES

Ninguno.

MATERIAL SUPLEMENTARIO



Se puede consultar material suplementario a este artículo en su versión electrónica disponible en [doi:10.1016/j.recesp.2014.05.020](https://doi.org/10.1016/j.recesp.2014.05.020).

BIBLIOGRAFÍA

- Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, Carnethon M, Dai S, De Simone G, et al. Heart disease and stroke statistics – 2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2010;121:e46–215.
- Ruiz-Meana M, García-Dorado D. Fisiopatología del daño por isquemia-reperusión: nuevas oportunidades terapéuticas en el infarto agudo de miocardio. *Medicina cardiovascular traslacional (II)*. *Rev Esp Cardiol*. 2009;62:199–209.
- Prasad A, Stone GW, Colmes D, Gersh B. Reperfusion injury, microvascular dysfunction and cardioprotection: the “dark side” or reperfusion. *Circulation*. 2009;120:2105–12.
- García-Dorado D, Ruiz-Meana M, Piper HM. Lethal reperfusion injury in acute myocardial infarction: facts and unresolved issues. *Cardiovascular Res*. 2009;83:165–8.
- Cuellas-Ramón C, Pérez de Prado A, Pérez-Martínez C, Diego-Nieto A, Gonzalo-Orden JM, Fernández-Vázquez F. Investigación traslacional en isquemia, infarto de miocardio y reperusión. *Rev Esp Cardiol Supl*. 2013;13(E):57–63.
- García-Dorado D, Rodríguez-Sinovas A, Ruiz-Meana M, Inseste J. Protección contra el daño miocárdico por isquemia-reperusión en la práctica clínica. *Rev Esp Cardiol*. 2014;67:394–404.
- Horwitz LD, Fennessey PV, Shikes RH, Kong Y. Marked reduction in myocardial infarct size due to prolonged infusion of an antioxidant during reperfusion. *Circulation*. 1994;89:1792–801.
- Woo YJ, Zhang JC, Vijayarathay C, Zwacka RM, Englehardt JF, Gardner TJ, et al. Recombinant adenovirus-mediated cardiac gene transfer of superoxide dismutase and catalase attenuates postischemic contractile dysfunction. *Circulation*. 1998;98:11255–60.
- Ding L, Liang X, Zhu D, Lou Y. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha is involved in cardiomyocyte differentiation of murine embryonic stem cells in vitro. *Cell Biol Int*. 2007;31:1002–9.
- Sun CK, Chang LT, Sheu JJ, Wang CY, Youssef AA, Wu CJ, et al. Losartan preserves integrity of cardiac gap junctions and PGC-1 α gene expression and prevents cellular apoptosis in remote area of left ventricular myocardium following acute myocardial infarction. *Int Heart J*. 2007;48:533–45.
- Honda T, Kaikita K, Tsujita K, Hayashi T, Matsukawa M, Fuchigami S, et al. Pioglitazone, a peroxisome proliferators-activated receptor-gamma agonist, attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in mice with metabolic disorders. *J Moll Cell Cardiol*. 2008;44:915–26.
- Lehman JJ, Barger PM, Kovacs A, Saffitz JE, Medeiros DM, Kelly DP. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J Clin Invest*. 2000;106:847–56.
- Schwartz DR, Sack MN. Targeting the mitochondria to augment myocardial protection. *Curr Opin Pharmacol*. 2008;8:160–5.
- St-Pierre J, Lin J, Krauss S, Tarr PT, Yang R, Newgard CB, et al. Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivators 1 alpha and 1 beta in muscle cells. *J Biol Chem*. 2003;278:26597–603.
- Fabregat-Andrés O, Tierrez A, Mata M, Estornell-Erill J, Ridocci-Soriano F, Monsalve M. Induction of PGC-1 α expression can be detected in blood samples of patients with ST-segment elevation acute myocardial infarction. *PLoS One*. 2011;6:e26913.
- Lynn EG, Stevens MV, Wong RP, Carabenciov D, Jacobson J, Murphy E, et al. Transient upregulation of PGC-1 α diminishes cardiac ischemia tolerance via upregulation of ANT1. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;49:693–8.
- Van de Werf F, Bax J, Betriu A, Blomstrom-Lundqvist C, Crea F, Falk V, et al. Guías de Práctica Clínica de la Sociedad Europea de Cardiología (ESC). Manejo del infarto agudo de miocardio en pacientes con elevación persistente del segmento ST. Grupo de Trabajo de la Sociedad Europea de Cardiología (ESC) sobre el manejo del infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST. *Rev Esp Cardiol*. 2009;62:293.e1–47.
- Valle I, Alvarez-Barrientos A, Arza E, Lamas S, Monsalve M. PGC-1 alpha regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res*. 2005;66:562–73.
- Lu Z, Xu X, Hu X, Fassetz J, Zhu G, Tao Y, et al. PGC-1 alpha regulates expression of myocardial mitochondrial antioxidants and myocardial oxidative stress after chronic systolic overload. *Antioxid Redox Signal*. 2010;13:1011–22.
- Karamanlidis G, Nascimben L, Couper GS, Shekar PS, Del Monte F, Tian R. Defective DNA replication impairs mitochondrial biogenesis in human failing hearts. *Circ Res*. 2010;106:1541–8.
- Sebastiani M, Giordano C, Nediani C, Travaglini C, Borchetti E, Zani M. Induction of mitochondrial biogenesis is a maladaptive mechanism in mitochondrial cardiomyopathies. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50:1362–9.
- Rowe GC, Jiang A, Arany Z. PGC-1 coactivators in cardiac development and disease. *Circ Res*. 2010;107:825–38.
- Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, et al. PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet*. 2003;34:267–73.
- Lincoff AM, Tardif JC, Schwartz GG, Nicholls SJ, Ryden L, Neal B, et al. Effect of alemtazar on cardiovascular outcomes after acute coronary syndrome in patients with type 2 diabetes mellitus: the AleCardio randomized clinical trial. *JAMA*. 2014;311:1515–25.
- Bauer MK, Schubert A, Rocks O, Grimm S. Adenine nucleotide translocase-1, a component of the permeability transition pore, can dominantly induce apoptosis. *J Cell Biol*. 1999;147:1493–502.
- Merlos P, López-Lereu MP, Monmeneu JV, Sanchis J, Núñez J, Bonanad C, et al. Valor pronóstico a largo plazo del análisis completo de los índices de resonancia magnética cardíaca tras un infarto de miocardio con elevación del segmento ST. *Rev Esp Cardiol*. 2013;66:613–22.
- Wu E, Lee DC. Evaluación del riesgo tras infarto de miocardio con elevación del segmento ST. *Rev Esp Cardiol*. 2013;66:603–5.

mRNA PGC-1 α levels in blood samples reliably correlates with its myocardial expression: study in patients undergoing cardiac surgery

Oscar Fabregat-Andres, Federico Paredes, María Monsalve, Javier Milara, Francisco Ridocci-Soriano, Sonia Gonzalez-Hervas, Armando Mena, Lorenzo Facila, Fernando Hornero, Salvador Morell, Juan Martinez-Leon, Julio Cortijo*

Cardiovascular Institute and *Research Foundation, General University Hospital from Valencia-Spain

ABSTRACT

Objective: Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α) is a transcriptional coactivator that has been proposed to play a protective role in mouse models of cardiac ischemia and heart failure, suggesting that PGC-1 α could be relevant as a prognostic marker. Our previous studies showed that the estimation of peripheral mRNA PGC-1 α expression was feasible and that its induction correlated with the extent of myocardial necrosis and left ventricular remodeling in patients with myocardial infarction. In this study, we sought to determine if the myocardial and peripheral expressions of PGC-1 α are well correlated and to analyze the variability of PGC-1 α expression depending on the prevalence of some metabolic disorders.

Methods: This was a cohort of 35 consecutive stable heart failure patients with severe aortic stenosis who underwent an elective aortic valve replacement surgery. mRNA PGC-1 α expression was simultaneously determined from myocardial biopsy specimens and blood samples obtained during surgery by quantitative PCR, and a correlation between samples was made using the Kappa index. Patients were divided into two groups according to the detection of baseline expression levels of PGC-1 α in blood samples, and comparisons between both groups were made by chi-square test or unpaired Student's t-test as appropriate.

Results: Based on myocardial biopsies, we found that mRNA PGC-1 α expression in blood samples showed a statistically significant correlation with myocardial expression (Kappa index 0.66, $p < 0.001$). The presence of higher systemic PGC-1 α expression was associated with a greater expression of some target genes such as silent information regulator 2 homolog-1 (x -fold expression in blood samples: 4.43 ± 5.22 vs. 1.09 ± 0.14 , $p = 0.044$) and better antioxidant status in these patients (concentration of Trolox: 0.40 ± 0.05 vs. 0.34 ± 0.65 , $p = 0.006$).

Conclusions: Most patients with higher peripheral expression also had increased myocardial expression, so we conclude that the non-invasive estimation of mRNA PGC-1 α expression from blood samples provides a good approach of the constitutive status of the mitochondrial protection system regulated by PGC-1 α and that this could be used as prognostic indicator in cardiovascular disease. (*Anatol J Cardiol* 2016; 16: 000-00)

Key words: peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α , mRNA expression, cardiac surgery, prognosis marker

Introduction

Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α) is a transcriptional coactivator and master regulator of genes involved in oxidative metabolism and mitochondrial biogenesis that controls cellular responses to metabolic demands inducing genes that coordinately increase the oxidative capacity of the cell, including mitochondrial biogenesis and energy metabolism genes (1). Enhanced oxidative phosphorylation is normally associated with increased mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production, and this negative effect is amply compensated by PGC-1 α induction of antioxidant systems, resulting in a net reduction of cellular ROS levels when PGC-1 α is active (2). Thereby, PGC-1 α has been shown to play a

fundamental role in metabolic control as well as in the terminal differentiation of high-energy metabolism tissues including the myocardium (3, 4).

Constitutive PGC-1 α expression levels are likely to reflect the general metabolic status of patients, with high levels presumably associated with a higher level of oxidative metabolism, high oxygen consumption rates, and reduced general oxidative stress, while low basal PGC-1 α levels are expected to be associated with enhanced reliance on glycolytic metabolism, low oxygen consumption, and elevated ROS levels. This last condition tended to be more frequent in diabetic patients, as previously reported (5). Importantly, low PGC-1 α levels may also be the cause of the high levels of ROS and poor tolerance to ischemic injury generally associated with those patients (6, 7).

Address for correspondence: Óscar Fabregat-Andrés MD, Research Foundation and Cardiology Department, General University Hospital from Valencia, Avenida Tres Cruces, 2. 46014, Valencia-Spain
Phone: +0034 96197 2000 Fax: +0034 96197 2161 E-mail: osfabregat@gmail.com

Accepted Date: 30.09.2015 **Available Online Date:** 26.11.2015

©Copyright 2016 by Turkish Society of Cardiology - Available online at www.anatoljcardiol.com
DOI:10.5152/AnatolJCardiol.2015.6466



In this regard, PGC-1 α has been proposed to play a protective role in mouse models of cardiac ischemia and heart failure (8, 9), so it is suggested that PGC-1 α levels are relevant as prognostic marker in patients with cardiovascular disease. Because the direct analysis of PGC-1 α expression in the heart is not possible in clinical practice, we previously performed testing in acute myocardial infarction patients to determine whether PGC-1 α activity in peripheral blood samples could be analyzed, and we found that the estimation of peripheral PGC-1 α expression was feasible (10) and that its induction correlated with the extent of myocardial necrosis and left ventricular remodeling in ST-segment elevation myocardial infarction patients (11).

Nonetheless, if PGC-1 α expression in blood samples is correlated to myocardial expression has not been previously evaluated, it would be imperative to provide value to these previous clinical studies. Therefore, in this study, we simultaneously analyzed the expression of PGC-1 α in myocardial biopsies and peripheral blood in patients undergoing cardiac surgery and correlated it with the expression of superoxide dismutase 2 (SOD2), a target gene within the mitochondrial system of oxidative stress protection. The myocardial and peripheral mRNA expressions of both AMP-activated protein kinase (AMPK) and silent information regulator 2 homolog 1 (SIRT-1) were also analyzed as key regulators of PGC-1 α activity. AMPK and SIRT-1 are two metabolic sensors that could directly affect PGC-1 α activity through post-transcriptional modifications (12). Thus, phosphorylation by AMPK results in an increase in PGC-1 α protein levels as a consequence of increased protein stability, and deacetylation via SIRT-1 keeps PGC-1 α in an active state. Taken together, these players constitute an energy-sensing axis that controls metabolic homeostasis, and the abnormal function of this network could be essential in the pathophysiology of type 2 diabetes and other metabolic disorders (13).

In addition, total antioxidant status and autophagy markers were analyzed as indicators of comorbidity and advanced disease. Autophagy is the process for degrading and recycling long-lived proteins and cytoplasmic organelles through the lysosome, which plays an important role in cardiac remodeling, aging, and inflammation to maintain cellular homeostasis in the heart. In this regard, some stressors such as hypoxia could induce autophagy that protects against ischemia-reperfusion injury (14, 15); it is suggested that autophagy plays a key role in mediating the regression of cardiac hypertrophy during mechanical unloading (16, 17).

Therefore, the aim of the study was to determine if the myocardial and peripheral expressions of PGC-1 α and its target genes are well correlated and to analyze the variability of PGC-1 α expression depending on the pro-inflammatory status of patients and prevalence of some metabolic diseases such as diabetes.

Methods

Study population

This is a cohort of 35 consecutive patients electively referred to our Department of Cardiac Surgery (Cardiovascular Institute

from General University Hospital, Valencia, Spain) to undergo aortic valve replacement surgery between June and December 2014. Inclusion criteria were as follows: severe aortic valve disease indicating replacement surgery, with or without concomitant coronary heart disease; no episodes of acute decompensated heart failure or acute coronary syndrome in the previous 3 months; and age of >18 years with a capacity to sign the informed consent form. Were selected stable patients with aortic valve disease to homogenize both the study population with respect to clinical and surgical characteristics as the protocol to obtain the cardiac biopsies?

Clinical and biochemical data

Clinical data collected included medical history with cardiovascular risk factors and medications and baseline biochemical values such as glucose, hemoglobin, and creatinine levels. The parameters analyzed to characterize immune response were as follows: leukocyte count prior to surgery and 48 h later (including total neutrophil, lymphocyte, and monocyte counts and their relative percentages); baseline, 24 h, and 48 h C-reactive protein (CRP) levels; and baseline, 8 h, 24 h, and 48 h lactate levels. As indirect marker of myocardial necrosis was used the maximum value of troponin I during admission.

Echocardiography

Transthoracic echocardiogram was performed in all patients as local protocol. Left ventricular ejection fraction, left ventricular end-diastolic and end-systolic diameters, tricuspid annular plane systolic excursion, and systolic pulmonary artery pressure through a tricuspid regurgitate jet were measured before surgery.

Variable of cardiac surgery

All patients underwent aortic valve replacement through medial sternotomy. Those patients with concomitant coronary artery disease underwent coronary bypass surgery in the same intervention. The total time of extracorporeal circulation and time of myocardial ischemia were recorded, as well as the number of coronary artery bypass grafts, where appropriate.

Acquisition of myocardial biopsies

Endomyocardial biopsies were obtained during aortic valve replacement. Briefly, after on-pump cannulation and aortic cross-clamping, the heart was arrested using a cold cardioplegia solution. Endoventricular access was performed through a 10–15-mm oblique aortotomy above the sinotubular junction, and endomyocardial specimens were excised from the left ventricular basal septum using a cold scalpel No. 11.

Preparation of mononuclear cells from blood samples

Immediately before starting extracorporeal circulation, 6–8 mL of peripheral blood collected in EDTA vacutainers (BD) were used to isolate mononuclear cells by Ficoll density gradient cen-

trifugation using Ficoll-Paque™ (Miltenyi Biotec, Surrey, United Kingdom), following the manufacturer's instructions. Isolated cells were analyzed using Cytospin and Fast Panoptic Staining (Panreac, Barcelona, Spain). Only preparations containing $\geq 90\%$ mononuclear cells were used for the analysis.

Real-time quantitative PCR

Total RNA was isolated using Trizol™ (Invitrogen), following the manufacturer's instructions. The quality of RNA was evaluated in a bioanalyzer and quantitated in a nanodrop. RNA used had a ratio of absorbance at 260 nm and 280 nm of ≥ 1.8 and an RNA integrity number of ≥ 8 . Relative mRNA expression levels of PGC-1 α , SOD2, AMPK, and SIRT-1 were determined by quantitative PCR of retrotranscribed cDNA with specific primers as previously described (18), both for peripheral blood samples and cardiac biopsies. Results were expressed as x-fold expression over the minimum value detected among all patients.

Antioxidant assay kit

The total antioxidant status of the patients was estimated using a Trolox™ Equivalent Antioxidant Capacity assay (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in plasma samples based on the scavenging of the 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical (ABTS•), a soluble chromogen that is converted into a colorless product when it reacts with the ferryl myoglobin radical (a product from the reaction between met-myoglobin and hydrogen peroxide). The concentration of Trolox, a water-soluble vitamin E analog, was used in analyses as the antioxidant control.

Ethics

The experimental protocol was approved by the Local Ethical Committees: Research Foundation and Cardiovascular Institute from University General Hospital of Valencia. All patients signed a written informed consent form, and all procedures conformed to the Declaration of Helsinki.

Statistics

Categorical values were expressed as absolute numbers and percentages and continuous variables as mean \pm standard deviation. The Kolmogorov–Smirnov test was used to test the normality of the distribution. Patients were divided in two groups according to the detection of baseline expression levels of PGC-1 α in blood samples, assuming a two-fold expression over the minimum value detected as the cut-off value. Comparisons between both groups were made by the chi-square test or unpaired Student's t-test as appropriate. The correlation between peripheral and cardiac samples was made using the Kappa index. All p-values refer to two-tailed tests of significance and p-values of <0.05 were considered to be significant. Statistical analyses were performed using SPSS for Windows, release 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

Results

Baseline patient characteristics

The general characteristics of the patients are presented in Table 1. The patients were divided in two groups according to the detection of the baseline expression levels of PGC-1 α in blood samples. Both groups were comparable with respect to cardiovascular risk factors, medication, laboratory and echocardiographic parameters, and heart failure functional class, with a trend toward a higher prevalence of diabetic patients in the group with a lower baseline expression of PGC-1 α .

Table 1. Baseline patient characteristics according to the expression of PGC-1 α in blood samples

	All patients (n=35)	Patients with peripheral PGC-1 α expression >2 -fold (n=11)	Patients with peripheral PGC-1 α expression <2 -fold (n=24)	P
Age, years	69.8 \pm 11.9	63.3 \pm 15.7	72.6 \pm 8.8	0.10
Male, n (%)	19 (54)	7 (64)	12 (50)	0.22
Cardiovascular risk factors, n (%)				
Hypertension	29 (83)	9 (82)	20 (83)	0.91
Diabetes	9 (26)	1 (9)	8 (33)	0.13
Dyslipidemia	22 (63)	6 (55)	16 (67)	0.50
Smoking history	18 (51)	7 (64)	11 (46)	0.34
Medication, n (%)				
ACEI or ARB	23 (66)	7 (64)	16 (67)	0.52
Diuretics	24 (69)	6 (55)	18 (75)	0.24
Beta-blockers	14 (40)	7 (64)	7 (29)	0.07
Estatins	20 (57)	6 (55)	14 (58)	0.84
Metformin	6 (17)	1 (9)	5 (21)	0.14
ODM	3 (9)	1 (9)	2 (9)	0.92
Insulin	4 (12)	0 (0)	4 (18)	0.14
Laboratory				
Hemoglobin, g/dL	13.1 \pm 1.1	13.4 \pm 1.2	12.9 \pm 1.1	0.15
Creatinine, mg/dL	0.8 \pm 0.2	0.9 \pm 0.2	0.8 \pm 0.3	0.62
Hb1Ac (%)	6.2 \pm 0.6	6.0 \pm 0.9	6.6 \pm 0.5	0.36
Echocardiography				
LVEF (%)	60.4 \pm 10.3	59.4 \pm 14.2	60.9 \pm 8.2	0.72
LVEDD, mm	48.8 \pm 9.4	51.6 \pm 10.9	47.5 \pm 8.5	0.20
LVESD, mm	30.7 \pm 9.0	33.9 \pm 10.5	29.1 \pm 8.0	0.23
TAPSE, mm	22.7 \pm 6.0	24.0 \pm 4.7	22.1 \pm 6.6	0.40
sPAP, mm Hg	39.1 \pm 9.9	35.5 \pm 8.2	40.8 \pm 10.3	0.11
Coronarography				
CAD, n (%)	8 (23)	5 (45)	3 (13)	0.03
VSS	0.2 \pm 0.6	0.4 \pm 0.9	0.2 \pm 0.5	0.41
History of heart failure				
NYHA functional class	2.7 \pm 0.5	2.6 \pm 0.5	2.7 \pm 0.5	0.87

ACEI - angiotensin-converting enzyme inhibitor; ARB - angiotensin II receptor blocker; CAD - coronary artery disease; LVEF - left ventricular ejection fraction; LVEDD - left ventricular end-diastolic diameter; LVESD - left ventricular end-diastolic end-systolic diameter; ODM - other oral an diabetic medication; sPAP - systolic pulmonary artery pressure; TAPSE - tricuspid annular plane systolic excursion; VSS - No of vessels with significant stenosis. Comparisons between both groups were made by chi-square and unpaired Student's t-tests. Quantitative data expressed as mean \pm standard deviation. Significant if p <0.05

When coronarography results were analyzed, a significantly higher prevalence of coronary artery disease was found in patients with a higher constitutive expression of PGC-1 α . Nonetheless, if we compare cardiac surgery variables, such as time of ischemia or peak of troponin monitored after surgery, depending on this condition, no significant differences were detected (Table 2).

Correlation between mononuclear cell and myocardial expressions

When a scatter plot with both variables was generated, we found a large dispersion of values, consistent with the variability of PGC-1 α expression in clinical studies (Fig. 1). Therefore, to establish if peripheral and myocardial expressions of PGC-1 α were indeed correlated, a cross table with both expressions was constructed classifying patients according to the cut-off value of 2-fold expression level, as described previously. With this, we observed a good correlation between both expressions with a kappa index of 0.66 ($p < 0.001$); 8 of the 11 patients with higher peripheral expression also had increased myocardial expression.

PGC-1 α target genes and regulators

To evaluate if peripheral PGC-1 α expression correlated with the expression of target genes, SOD2 expression was determined both in blood samples and myocardial biopsy specimens. We found that SOD2 mRNA levels were slightly increased in patients with higher peripheral PGC-1 α expression, although this was only in myocardial biopsy specimens, and differences were not statistically significant (x -fold: 2.01 ± 3.21 vs. 1.03 ± 0.03 , $p = 0.14$) (Fig. 2).

To assess if post-transcriptional regulators that have been shown to increase the activity of PGC-1 α were differently expressed in both groups according to peripheral PGC-1 α expression, we determined AMPK and SIRT-1 mRNA levels both in blood samples and myocardial biopsy specimens. We found that in patients with a higher peripheral PGC-1 α expression, SIRT-1 mRNA expression was increased both in blood samples and myocardial biopsy specimens, although only in the first reached significance (x -fold: 4.43 ± 5.22 vs. 1.09 ± 0.14 , $p = 0.044$ in blood samples; and 2.16 ± 3.29 vs. 1.03 ± 0.03 , $p = 0.096$ in myocardial biopsy specimens) (Fig. 2). No differences were found in AMPK expression.

Autophagy and total antioxidant status

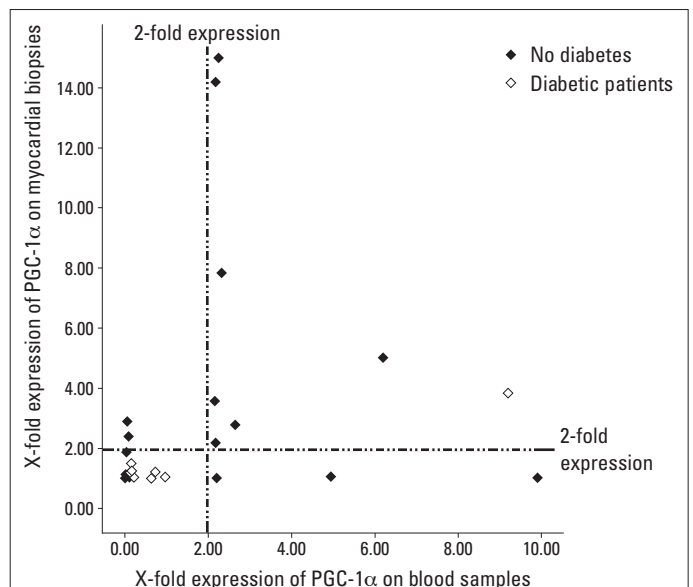
As a marker of autophagy, we analyzed the expression of microtubule-associated protein-1 light chain-3 (MAP1LC3), which is involved in the elongation of the membrane of autophagosomes, in both groups. We found that the expression of MAP1LC3 transcripts was mildly increased in the myocardial biopsy specimens of patients with a higher peripheral PGC-1 α expression, although differences were not significant (x -fold: 2.34 ± 3.97 vs. 1.03 ± 0.19 , $p = 0.11$) (Fig. 2).

When we determine the total antioxidant status as an indirect marker of pro-inflammatory condition of the patients in both groups, we observed that those with a greater peripheral PGC-1 α expression had a higher concentration of Trolox (0.40 ± 0.05 vs. 0.34 ± 0.65 ,

Table 2. Cardiac surgery variables according to the expression of PGC-1 α in blood samples

	All patients (n=35)	Patients with peripheral PGC-1 α expression >2-fold (n=11)	Patients with peripheral PGC-1 α expression <2-fold (n=24)	P
Echocardiographic presurgical gradients, mm Hg				
Peak aortic gradient	81.3 \pm 24.0	77.0 \pm 31.6	82.9 \pm 21.6	0.61
Mean aortic gradient	44.6 \pm 16.5	41.6 \pm 21.3	45.8 \pm 14.8	0.57
Extracorporeal circulation				
Ischemia times, min	104.5 \pm 35.9	111.7 \pm 41.2	100.9 \pm 33.6	0.47
Coronary artery bypass grafting				
Concomitant BS	5 (14)	3 (27)	2 (8)	0.65
Total coronary bypass	9	5	4	0.83
Myocardial necrosis related to surgery				
Peak of troponin, ng/mL	1.4 \pm 2.6	1.7 \pm 2.7	1.2 \pm 2.6	0.59

Comparisons between both groups were made by chi-square and unpaired Student's t-tests. Quantitative data expressed as mean \pm standard deviation. Significant if $p < 0.05$. BS - bypass surgery



Expression of PGC-1 α		Myocardial biopsies		Total
		Expression <2-fold	Expression >2-fold	
Blood samples	Expression <2-fold	22	2	24
	Expression >2-fold	3	8	11
Total		25	10	35

Measure of agreement: Kappa Index 0.66; $P < 0.001$

Figure 1. Comparative mRNA expression of PGC-1 α in blood samples and myocardial biopsy specimens

Patients were divided according to the cut-off value of 2-fold PGC-1 α expression in blood samples (i.e., patients with a significant higher expression: >2-fold expression and patients without detectable PGC-1 α expression: <2-fold expression). Kappa index was used as measure of agreement between both determinations

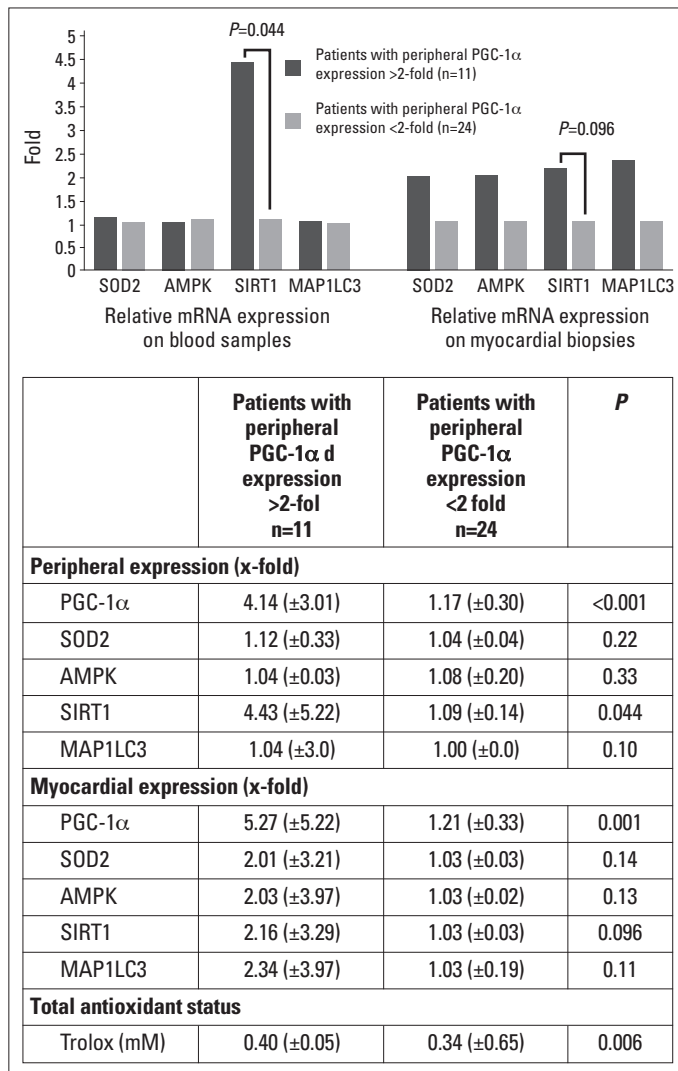


Figure 2. Relative mRNA expression of target genes and total antioxidant status according to PGC-1α expression in blood samples.

mRNA expression is represented as x-fold expression over the minimum expression detected among all patients. SOD2-superoxide dismutase 2. AMPK-AMP-activated protein kinase. SIRT1-silent information regulator 2 homolog 1. MAP1LC3-microtubule-associated protein-1 light chain-3. Trolox: 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid

p=0.006), suggesting higher oxidative metabolism levels, high oxygen consumption rates, and reduced general oxidative stress.

Immune response

To characterize the immune response triggered by surgery, absolute and relative leukocyte counts and CRP and lactate levels were monitored after cardiac intervention (Table 3A). We found that patients with a greater baseline PGC-1α expression in blood samples had a higher absolute monocyte count before surgery (0.68±0.16 vs. 0.55±0.11, p=0.01) and a trend toward a high absolute neutrophil count, without other significant differences in absolute and relative leukocyte counts. With respect to lactate levels, which are increased with anaerobic glycolysis, we found that patients with a higher expression of PGC-1α showed lower levels at 8 h after surgery, suggesting more reliance on oxidative metabolism.

Table 3. Immune response triggered by cardiac surgery: leukocyte counts and C-reactive protein and lactate levels according to peripheral PGC-1α expression

	Patients with peripheral PGC-1α expression >2 fold (n=11)	Patients with peripheral PGC-1α expression <2 fold (n=24)	P
A			
Leukocytes			
Absolute counts (·10⁹/L)			
Neutrophils at baseline	7.41 (±2.30)	5.51 (±2.78)	0.06
Neutrophils 48 h	14.34 (±3.96)	13.45 (±4.14)	0.55
Lymphocytes at baseline	1.94 (±0.66)	1.78 (±0.67)	0.52
Lymphocytes 48 h	1.01 (±0.53)	0.81 (±0.44)	0.26
Monocytes at baseline	0.68 (±0.16)	0.55 (±0.11)	0.01
Monocytes 48 h	1.09 (±0.53)	0.94 (±0.33)	0.33
Relative counts, (%)			
Neutrophils at baseline	67.1 (±9.5)	65.7 (±10.7)	0.71
Neutrophils 48 h	85.7 (±5.4)	88.1 (±3.1)	0.10
Lymphocytes at baseline	22.5 (±8.3)	23.7 (±9.6)	0.72
Lymphocytes 48 h	6.9 (±4.4)	5.4 (±2.2)	0.19
Monocytes at baseline	7.5 (±1.3)	7.1 (±1.9)	0.53
Monocytes 48 h	6.7 (±3.0)	6.3 (±1.7)	0.61
Lactate, mmol/L			
8 h after surgery	1.45 (±0.91)	2.81 (±1.53)	0.002
24 h after surgery	2.11 (±0.92)	2.74 (±1.11)	0.09
48 h after surgery	2.02 (±1.12)	1.92 (±0.86)	0.80
C-reactive protein, mg/dL			
Before surgery	0.21 (±0.11)	0.50 (±0.42)	0.037
24 h after surgery	9.06 (±4.93)	7.59 (±3.36)	0.31
48 h after surgery	1.24 (±4.17)	1.41 (±6.11)	0.39
B			
Leukocytes			
Percentage changes (%)			
Neutrophil 48 h – 0 h/0 h	104.3 (±63.3)	167.7 (±93.0)	0.026
Lymphocyte 48 h – 0 h/0 h	-41.9 (±35.7)	-38.8 (±85.8)	0.88
Monocyte 48 h – 0 h/0 h	65.1 (±78.6)	78.5 (±82.5)	0.65
Comparisons between both groups were made by unpaired Student's t-test. Quantitative data expressed as mean±standard deviation. Percentage changes indicate the percentage difference between the value at baseline and the value at 48 h. Significant if p<0.05			

We found similar differences at 24 h, although these were not significant. Finally, regarding CRP levels, an inflammatory unspecific marker, we observed that patients with a high PGC-1α expression had significant lower levels before surgery (0.21±0.11 vs. 0.50±0.42, p=0.01), suggesting a less inflammatory burden in these patients.

To better compare the individual response to surgery, we analyzed percentage changes between the groups and found that patients with a lower PGC-1α expression showed a greater percentage increase in the absolute neutrophil count at 48 h, with no other significant differences (Table 3B).

Table 4. PGC-1 α expression in blood samples and myocardial biopsy specimens according to the presence of metabolic disorders

	PGC-1 α expression in blood samples			PGC-1 α expression in cardiac samples		
	>2-fold	<2-fold	<i>P</i>	>2-fold	<2-fold	<i>P</i>
Prior diagnosis of diabetes						
Yes	1	8	0.12	1	8	0.19
No	10	16		9	17	
Prior diagnosis of diabetes and/or glycated hemoglobin of $\geq 6.5\%$						
Yes	2	12	0.07	1	13	0.02
No	9	12		9	12	
Comparisons between groups were made by the chi-square test. Significant if $p < 0.05$						

PGC-1 α expression in metabolic disorders

As shown in Figure 1, only 1 of the 9 diabetic patients in our population showed elevated expression of PGC-1 α both in blood samples and myocardial biopsy specimens. When we also considered those patients with glycated hemoglobin of $\geq 6.5\%$, which is cut-off value recommended for diagnosing diabetes according current guidelines (19), we found similar significant distributions (Table 4). This downregulation in PGC-1 α mRNA expression observed in patients with metabolic disorders, assuming both with previous diagnosis of diabetes and those with glycated hemoglobin of $\geq 6.5\%$, correlated with lower transcripts of SIRT-1 and SOD2, although the latter was not significant (Fig. 3). No significant differences were reached in the total antioxidant status and autophagy markers.

Discussion

This study shows that PGC-1 α mRNA levels in blood samples are well correlated with myocardial expression for the first time and could thus be reliable to estimate the constitutive expression of PGC-1 α and monitor changes in different clinical settings.

Our previous studies (10, 11) performed in acute myocardial infarction patients showed that the peripheral estimation of PGC-1 α expression was feasible and that patients could be classified in two alternative ways based on PGC-1 α levels: those with significant detectable levels of PGC-1 α mRNA and those without detectable constitutive expression. The first study showed that infarct size positively correlated with the induction of PGC-1 α expression after acute coronary syndrome. The second study supported those notions and found that both low basal PGC-1 α levels and induction correlated with larger necrotic areas after myocardial infarction. To validate these results, we conducted the present study in cardiac surgery patients and suggested a good correlation between both expression levels.

Because the expression of PGC-1 α considerably varies in clinical studies, unlike experimental studies where the control of certain variables is ensured, we divided patients into two groups according to the detectable expression, establishing a cut-off value of 2-fold expression over the minimum detected value among patients.

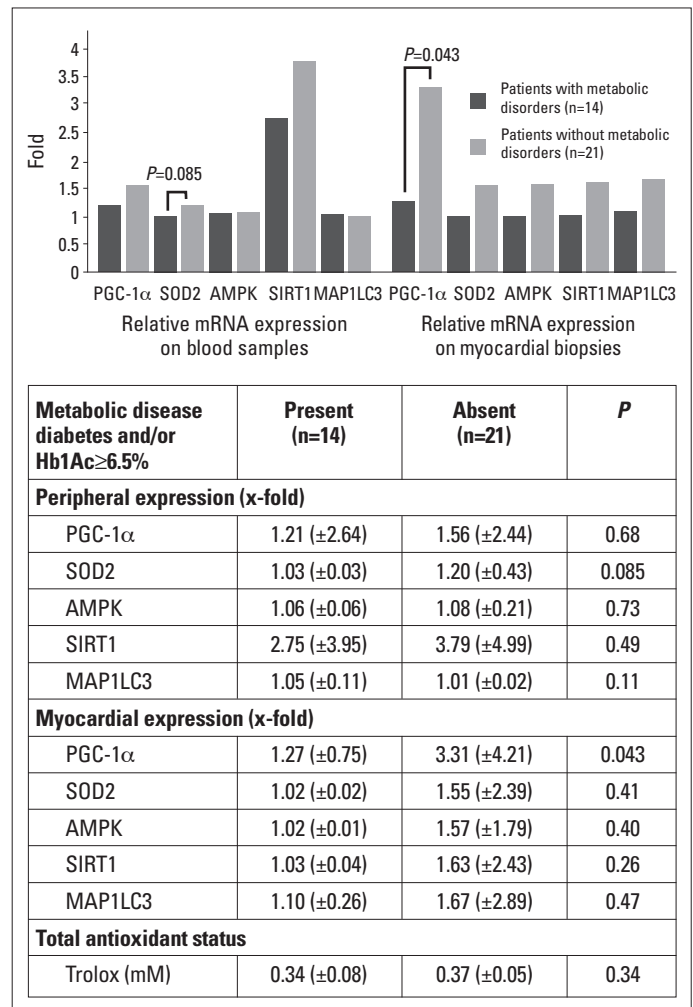


Figure 3. Relative mRNA expression of target genes and total antioxidant status according to the prevalence of metabolic disorders.

Were considered both known diabetic patients as those with Hb1Ac of $\geq 6.5\%$. mRNA expression is represented as x-fold expression over the minimum expression detected among all patients. SOD2 - superoxide dismutase 2. AMPK-AMP-activated protein kinase. SIRT-1 - silent information regulator 2 homolog 1. MAP1LC3 - microtubule-associated protein-1 light chain-3. Trolox- 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid

This method of analysis of PGC-1 α mRNA expression facilitates the classification of patients and easily allows the assessment of the clinical significance of results. To our knowledge, all previous clinical studies used biopsy specimens to determine PGC-1 α mRNA expression both with myocardial (20) and skeletal muscle biopsy specimens (21, 22), the most commonly used. Our protocol estimating peripheral PGC-1 α expression could provide a rough overview of the systemic activation of this coactivator and its target genes without using invasive or overly sophisticated techniques.

The constitutive higher expression of PGC-1 α has been shown to be related to the upregulation of mitochondrial biogenesis and antioxidant defenses and an increased reliance on oxidative phosphorylation, especially in organs with a high metabolic rate (i.e., brain, muscle, liver, and heart). For example, PGC-1 α plays a key role in regulating the expression of mitochondrial antioxidants such as SOD2 in protecting the heart against

myocardial oxidative stress (23). Furthermore, it is assumed that post-transcriptional regulators that enhance PGC-1 α activity would be upregulated under this condition. In our study, both SOD2 and SIRT-1 transcripts tended to be increased in patients with a higher PGC-1 α expression, although differences were not significant in all comparisons. Nonetheless, these results together suggest a coordinated activation of the mitochondrial protection system regulated by PGC-1 α .

In this regard, when we analyzed the potential link of PGC-1 α mRNA expression with autophagy mechanisms and redox status, because these processes have been suggested to be related in some metabolic stress models (24, 25), we found that the upregulation of MAP1LC3 as a marker of autophagy was slight and not significant in the group of patients with a higher PGC-1 α expression. However, the estimated antioxidant capacity by indirectly Trolox concentration was significantly increased, reinforcing the hypothesis of a better redox balance in these patients. In this respect, several studies have focused on redox homeostasis regulated by PGC-1 α and cardioprotection, showing that the induction of PGC-1 α expression could reduce mitochondrial damage (Flameng mitochondrial function score: 0.44 ± 0.13 in the group with higher expression of PGC-1 α vs. 1.70 ± 0.03 in the control group) and prevent cellular apoptosis in the remote area of the left ventricular myocardium (Connexin 43 expression: 1.03 ± 0.29 in the group with a higher expression of PGC-1 α vs. 0.53 ± 0.14 in the control group) in acute myocardial infarction models (26, 27). Therefore, the clinical use of our protocol to monitor PGC-1 α expression may be useful in this context.

With regard to immune response analysis, the close relationship between metabolism and immunity and how the aberrant expression of PGC-1 α could be linked to persistent systemic inflammation and a higher risk for some chronic diseases are well known (28). Our results indicate a better immune profile in patients with a higher PGC-1 α expression with less baseline CRP levels before surgery and less lactate production at 8 h. Furthermore, acute unspecific response represented by neutrophil relative change was more tempered in these patients. These findings contribute to provide more evidence in recent years pointing to a potential link between low-grade inflammation in the heart and metabolic dysregulation.

In this respect, novel insights highlight the crosstalk between inflammatory processes and metabolic alterations in the failing heart in diabetic patients (29). Notably, PGC-1 α activation might prevent metabolic disturbances occurring during diabetic cardiomyopathy, while inhibiting inflammatory processes in the heart, in particular, modulating nuclear factor- κ B. Our previous results already indicated that diabetic patients show low PGC-1 α mRNA levels in blood samples, compared with those without metabolic disorders. In this study, we proved that the vast majority of known diabetic patients showed lower PGC-1 α expression both in blood samples and myocardial biopsy specimens, which was also observed in patients still not diagnosed with metabolic disease but with Hb1Ac of $\geq 6.5\%$ determined during admission.

This downregulation of PGC-1 α expression was associated by a trend to the lower expression of different gene targets analyzed and the antioxidant status of patients.

Study limitations

There are some limitations such as the small sample size of patients, single-center experience, and unique blood samples and myocardial biopsy specimens for each patient. Nonetheless, although some results did not reach statistical significance, they are consistent with those found in our previous studies.

Conclusions

In this study performed in patients undergoing cardiac surgery, mRNA PGC-1 α expression in blood samples showed a good correlation with the expression in myocardial biopsy specimens. The presence of a higher systemic PGC-1 α expression was associated with higher peripheral SIRT-1 levels and Trolox concentration, suggesting a better antioxidant status in these patients. Conversely, lower PGC-1 α levels were related to a significant inflammation profile, and this condition was more frequent in patients with metabolic disorders.

Conflict of interest: None declared.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Authorship contributions: Concept- Concept- O.F.A., F.P., M.M., J.C.; Design- O.F.A., F.P., M.M., J.M., F.R.S., J.C.; Supervision- F.R.S., L.F., S.M., J.M.L., J.C.; Funding- J.C., J.M., O.F.A.; Materials- J.C., J.M., O.F.A.; Data collection &/or processing – J.C., S.G.H.; Analysis and/or interpretation – J.C., S.G.H.; Literature search- O.F.A., L.F., F.H., S.M., J.M.L., J.C.; Writing – O.F.A., L.F., F.H., J.C., J.M.; Critical review- F.R.S., S.M., J.M.L., J.C., L.F.

Acknowledgements: Grant from Sociedad Valenciana de Cardiología, 2013 to Óscar Fabregat-Andrés.

References

1. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1 α . *Cardiovasc Res* 2008; 79: 208-17.
2. Valle I, Alvarez-Barrientos A, Arza E, Lamas S, Monsalve M. PGC-1 α regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res* 2005; 66: 562-73.
3. Ding L, Liang X, Zhu D, Lou Y. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha is involved in cardiomyocyte differentiation of murine embryonic stem cells in vitro. *Cell Biol Int* 2007; 31: 1002-9.
4. Duncan JG, Finck BN. The PPAR α -PGC-1 α axis controls cardiac energy metabolism in healthy and diseased myocardium. *PPAR Res* 2008; 2008: 253817.
5. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, et al. PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* 2003; 34: 267-73.

6. Bournat JC, Brown CW. Mitochondrial dysfunction in obesity. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2010; 17: 446-52.
7. Shimizu I, Minamino T, Toko H, Okada S, Ikeda H, Yasuda N, et al. Excessive cardiac insulin signaling exacerbates systolic dysfunction induced by pressure overload in rodents. *J Clin Invest* 2010; 120: 1506-14.
8. Arany Z, Novikov M, Chin S, Ma Y, Rosenzweig A, Spiegelman BM. Transverse aortic constriction leads to accelerated heart failure in mice lacking PPAR-gamma coactivator 1alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 10086-91.
9. Sun CK, Chang LT, Sheu JJ, Wang CY, Youssef AA, Wu CJ, et al. Losartan preserves integrity of cardiac gap junctions and PGC-1 alpha gene expression and prevents cellular apoptosis in remote area of left ventricular myocardium following acute myocardial infarction. *Int Heart J* 2007; 48: 533-46.
10. Fabregat-Andres O, Tierrez A, Mata M, Estornell-Erill J, Ridocci-Soriano F, Monsalve M. Induction of PGC-1alpha expression can be detected in blood samples of patients with ST-segment elevation acute myocardial infarction. *PLoS One* 2011; 6: e26913.
11. Fabregat-Andrés O, Ridocci-Soriano F, Estornell-Erill J, Corbi-Pascual M, Valle-Muñoz A, Berenguer-Jofresa A, et al. Blood PGC-1 α concentration predicts myocardial salvage and ventricular remodeling after ST-segment elevation acute myocardial infarction. *Rev Esp Cardiol* 2015; 68: 408-16.
12. Ugucioni G, D'souza D, Hood DA. Regulation of PPAR γ coactivator-1 α function and expression in muscle: effect of exercise. *PPAR Res* 2010 Aug 19. Epub ahead of print.
13. Cantó C, Auwerx J. PGC-1alpha, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr Opin Lipidol* 2009; 20: 98-105.
14. Hamacher-Brady A, Brady NR, Gottlieb RA. Enhancing macroautophagy protects against ischemia/reperfusion injury in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 2006; 281: 29776-87.
15. Wang Y, Shen J, Xiong X, Xu Y, Zhang H, Huang C, et al. Remote ischemic preconditioning protects against liver ischemia-reperfusion injury via heme oxygenase-1-induced autophagy. *PLoS One* 2014; 9: e98834.
16. Kassiotis C, Ballal K, Wellnitz K, Vela D, Gong M, Salazar R, et al. Markers of autophagy are downregulated in failing human heart after mechanical unloading. *Circulation* 2009; 120: S191-7.
17. Hariharan N, Ikeda Y, Hong C, Alcendor RR, Usui S, Gao S, et al. Autophagy plays an essential role in mediating regression of hypertrophy during unloading of the heart. *PLoS One* 2013; 8: e51632.
18. Valle I, Alvarez-Barrientos A, Arza E, Lamas S, Monsalve M. PGC-1alpha regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res* 2005; 66: 562-73.
19. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2014. *Diabetes Care* 2014; 37: S14-80.
20. Karamanlidis G, Bautista-Hernandez V, Fynn-Thompson F, Del Nido P, Tian R. Impaired mitochondrial biogenesis precedes heart failure in right ventricular hypertrophy in congenital heart disease. *Circ Heart Fail* 2011; 4: 707-13.
21. Hernandez-Alvarez MI, Thabit H, Burns N, Shah S, Brema I, Hatunic M, et al. Subjects with early-onset type 2 diabetes show defective activation of the skeletal muscle PGC-1alpha/Mitofusin-2 regulatory pathway in response to physical activity. *Diabetes Care* 2010; 33: 645-51.
22. Wang L, Mascher H, Psilander N, Blomstrand E, Sahlin K. Resistance exercise enhances the molecular signaling of mitochondrial biogenesis induced by endurance exercise in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985) 2011; 111: 1335-44.
23. Lu Z, Xu X, Hu S, Fassett J, Zhu G, Tao Y, et al. PGC-1 alpha regulates expression of myocardial mitochondrial antioxidants and myocardial oxidative stress after chronic systolic overload. *Antioxid Redox Signal* 2010; 13: 1011-22.
24. Cannavino J, Brocca L, Sandri M, Bottinelli R, Pellegrino MA. PGC-1 α over-expression prevents metabolic alterations and soleus muscle atrophy in hindlimb unloaded mice. *J Physiol* 2014; 592: 4575-89.
25. Ferraro E, Giammarioli AM, Chiandotto S, Spoletini I, Rosano G. Exercise-induced skeletal muscle remodeling and metabolic adaptation: redox signaling and role of autophagy. *Antioxid Redox Signal* 2014; 21: 154-76.
26. Sun CK, Chang LT, Sheu JJ, Wang CY, Youssef AA, Wu CJ, et al. Losartan preserves integrity of cardiac gap junctions and PGC-1 alpha gene expression and prevents cellular apoptosis in remote area of left ventricular myocardium following acute myocardial infarction. *Int Heart J* 2007; 48: 533-46.
27. Han JS, Wang HS, Yan DM, Wang ZW, Han HG, Zhu HY, et al. Myocardial ischaemic and diazoxide preconditioning both increase PGC-1alpha and reduce mitochondrial damage. *Acta Cardiol* 2010; 65: 639-44.
28. Handschin C. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha in muscle links metabolism to inflammation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2009; 36: 1139-43.
29. Palomer X, Salvadó L, Barroso E, Vazquez-Carrera M. An overview of the crosstalk between inflammatory processes and metabolic dysregulation during diabetic cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 2013; 168: 3160-72.