



VNIVERSITAT  
D VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Medicina

Programa de doctorado: 3139 Medicina

---

**Estudio de los mecanismos básicos y el diagnóstico  
del daño microvascular tras un infarto agudo de  
miocardio. Exploración de nuevas oportunidades  
terapéuticas**

---

**Tesis Doctoral presentada por:**

César Ríos Navarro

**Dirigida por:**

Dr. Vicente Bodí Peris

Dra. Amparo Ruiz Saurí

Valencia 2022





**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**

**FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGIA**

**DEPARTAMENT DE MEDICINA**

**Dr. Vicente Bodí Peris**, Catedrático de la Universitat de València y Jefe de la Sección de Hospitalización de la Sala de Cardiología del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

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

**CERTIFICAN:**

Que la presente Tesis Doctoral titulada “Estudio de los mecanismos básicos y el diagnóstico del daño microvascular tras un infarto agudo de miocardio. Exploración de nuevas oportunidades terapéuticas”, presentada por el Licenciado en Biotecnología **César Ríos Navarro**, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València.

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

Para que así conste a los efectos oportunos, se expide la presente certificación en Valencia, a 8 de febrero de 2022.

Dr. Vicente Bodí Peris

Dra. Amparo Ruiz Saurí



*“Si tú no trabajas por tus sueños,  
alguien te contratará para que trabajes por los suyos”*

*Steve Jobs*



## **Agradecimientos**

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores la posibilidad que me han dado para realizar esta tesis y ayudarme a crecer como investigador y, más importante, como persona. A Vicente por confiar en mí desde el principio aun sin conocerme y seguir haciéndolo a día de hoy, por enseñarme a ser riguroso, meticoloso y cuidar los pequeños detalles. A Amparo porque sin su apoyo incondicional, sus sabios consejos y sus acertadas palabras de ánimo el camino hasta aquí hubiera sido más complicado y, personalmente, por ser un ejemplo de que con esfuerzo y constancia se puede conseguir lo que te propongas.

A mis compañeros de laboratorio. A Arantxa porque después de los buenos años que pasamos en la universidad volvimos a encontrarnos para trabajar juntos y dejaste el listón muy alto cuando me diste el relevo. A Elena y Nerea por todos estos años llenos de anécdotas y esperas. A María por su entusiasmo, los ánimos mutuos y hacerme creer que explico bien las inmunos.

Gracias Jose, conocido por algunos como JaccMan, por todos estos años trabajando codo a codo, por haber soportado mis temazos, por los sitios de aparcamiento que me has quitado por las mañanas, pero sobretodo por ser un gran apoyo y un amigo.

A las mejores vecinas de laboratorio por haber hecho más ameno y divertido el día a día y por las sesiones de terapia mutuas. A Ana y Eva porque es un placer trabajar con ellas y por todas las anécdotas que hemos pasado hasta formar el exclusivo Equipo IAM. A todos los investigadores con los que he podido trabajar en estos años y de los cuales he podido aprender y formarme; en especial a Laura por haberme enseñado el mundo de la angiogénesis.

Gracias a mis amigos. A Jessica por estar presente en gran parte de mis recuerdos desde la infancia. A Concha porque la amistad no entiende de espacio y tiempo. A Marina por haber reavivado mi interés hacia la medicina y por haberme animado a luchar por mis metas. A Dulce por haber compartido desde el principio esta etapa juntos y estar siempre disponible para aconsejarme y animarme. A los gabis por las noches de juegos, bailecitos y pelis de miedo con oca y fragu.

Finalmente, gracias a mi familia. A mis padres, por los valores que me habéis transmitido, por haberme animado a seguir mi camino y enseñarme que, aunque aparezcan adversidades, con perseverancia y trabajo puedes conseguir lo que te propongas. A Iván, porque aunque le gustaría que le diera más arrechuchones, no tengo dudas de que siempre va a estar a mi lado apoyándome para que consiga mis sueños. A mis abuelos, por haberme hecho sentir especial desde pequeño y espero que ahora estéis orgullosos de vuestro nieto mayor.

Agradecer a todas las personas que me han ayudado a llegar hasta aquí y a los que han tenido una palabra o un gesto de ánimo en el momento indicado. Con estas líneas, que los que me conocen un poco es la parte de la tesis que más me ha costado escribir, se cierra una etapa y da comienzo una cargada de nuevos objetivos e ilusiones.

Muchas gracias a todos

# ÍNDICE





---

|                         |        |
|-------------------------|--------|
| <b>ABREVIATURAS</b>     | XVII   |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b> | XXI    |
| <b>LISTA DE TABLAS</b>  | XXVII  |
| <b>ABSTRACT</b>         | XXXI   |
| <b>RESUMEN</b>          | XXXVII |

|   |    |
|---|----|
| <b>I.- INTRODUCCIÓN</b>   | 3  |
| <b>1. El infarto agudo de miocardio</b>                                 | 3  |
| 1.1. Fisiopatología   | 3  |
| 1.2. Tratamiento de revascularización en el IAMEST                      | 4  |
| 1.3. Daño por reperfusión   | 6  |
| <b>2. Daño microvascular tras un IAM</b>                                | 8  |
| 2.1. Implicaciones estructurales y pronósticas de la OMV                | 9  |
| <b>3. Fisiopatología del daño microvascular</b>                         | 12 |
| 3.1. Estructura de la circulación coronaria                             | 12 |
| 3.2. Daño por isquemia-reperfusión sobre la microcirculación            | 14 |
| 3.3. Daño en la macrocirculación en la cardiopatía isquémica            | 17 |
| <b>4. Diagnóstico del daño microvascular tras un IAM</b>                | 18 |
| 4.1. Índices invasivos  | 18 |
| 4.2. Índices no invasivos   | 19 |
| 4.2.1. Técnicas de imagen cardíaca: ecocardiografía y RMC               | 19 |
| 4.2.2. Índices universales y características basales                    | 20 |
| 4.2.3. Biomarcadores  | 21 |
| 4.3. <i>Epithelial cell adhesion molecule</i>                           | 23 |
| 4.3.1. Estructura y función en situaciones fisiológicas                 | 23 |
| 4.3.2. Implicaciones de EpCAM en situaciones patológicas                | 23 |
| 4.3.3. Participación de EpCAM en enfermedades cardiovasculares          | 24 |
| <b>5. Oportunidades terapéuticas para reparar el daño microvascular</b> | 27 |

|  |           |
|--|-----------|
| 5.1. Dinámica del daño microvascular   | 27        |
| 5.2. Angiogénesis como mecanismo reparador del daño microvascular  | 30        |
| 5.3. Papel de la isoforma anti-angiogénica VEGF-A <sub>165b</sub>  | 32        |
| <b>6. Contribución original del autor</b>  | <b>34</b> |
| <br>   |           |
| <b>II.- HIPÓTESIS</b>  | <b>37</b> |
| <br>   |           |
| <b>III.- OBJETIVOS</b>   | <b>41</b> |
| <br>   |           |
| <b>IV.-RESUMEN DE MANUSCRITOS</b>  | <b>45</b> |
| <b>1. Ischemia-reperfusion injury to coronary arteries: Comprehensive microscopic study after reperfused myocardial infarction. (Ríos-Navarro et al. Ann Anat. 2021;238:151785)</b>        | <b>45</b> |
| <b>2. EpCAM and microvascular obstruction in patients with STEMI: a cardiac magnetic resonance study. (Ríos-Navarro et al. Rev Esp Cardiol. 2021;S1885-5857(21)00135-3)</b>                | <b>51</b> |
| <b>3. Role of antiangiogenic VEGF-A<sub>165b</sub> in angiogenesis and systolic function after reperfused myocardial infarction. (Ríos-Navarro et al. Rev Esp Cardiol. 2021;74:131-39)</b> | <b>56</b> |
| <br>   |           |
| <b>V.- DISCUSIÓN</b>   | <b>67</b> |
| <b>1. Efecto del daño por isquemia-reperfusión sobre la pared de la arteria epicárdica</b>   | <b>67</b> |
| 1.1. Alteraciones en la estructura de las arterias epicárdicas en la cardiopatía isquémica   | 68        |
| 1.1.1. Daño sobre la capa íntima   | 70        |
| 1.1.2. Daño sobre la capa media  | 71        |
| 1.1.3. Daño sobre la capa adventicia   | 72        |
| <b>2. Diagnóstico del daño microvascular: Exploración de un nuevo biomarcador</b>  | <b>75</b> |

---

|   |            |
|---|------------|
| 2.1. Biomarcadores para detectar el daño microvascular  | 75         |
| 2.1.1. EpCAM y daño microvascular post-IAMEST   | 76         |
| <b>3. Implicación de la angiogénesis en la reparación del daño microvascular tras un IAMEST</b> | <b>80</b>  |
| 3.1. Participación de la isoforma VEGF-A <sub>165b</sub> en pacientes con IAMEST                | 80         |
| 3.2. Papel de la isoforma VEGF-A <sub>165b</sub> en modelos murinos de IAM                      | 82         |
| 3.2.1. Optimización de los modelos experimentales murinos de IAM                                | 82         |
| 3.2.2. Participación del VEGF-A <sub>165b</sub> en modelos murinos de IAM                       | 83         |
| 3.2.3. Efecto del bloqueo de VEGF-A <sub>165b</sub> en modelos murinos de IAM                   | 84         |
| <b>VI.- CONCLUSIONS</b>   | <b>89</b>  |
| <b>VII.- CONCLUSIONES</b>   | <b>93</b>  |
| <b>VIII.- BIBLIOGRAFÍA</b>  | <b>97</b>  |
| <b>IX.- ANEXOS</b>  | <b>119</b> |
| <b>Anexo I:</b> Ríos-Navarro et al. Ann Anat. 2021;238:151785                                   | 119        |
| <b>Anexo II:</b> Ríos-Navarro et al. Rev Esp Cardiol. 2021;S1885-5857(21)00135-3                | 131        |
| <b>Anexo III:</b> Ríos-Navarro et al. Rev Esp Cardiol. 2021;74:131-39                           | 149        |
| <b>Anexo IV:</b> Otras publicaciones y premios derivados del desarrollo de la tesis             | 171        |
| <b>Anexo V:</b> Fuentes de financiación   | 185        |
| <b>Anexo VI:</b> Comités de ética   | 189        |



# **ABREVIATURAS**



**ADA:** arteria descendente anterior.

**EpCAM:** *epithelial cell adhesion molecule*.

**FEVI:** fracción de eyección del ventrículo izquierdo.

**IAM:** infarto agudo de miocardio.

**IAMEST:** infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST.

**IC95%:** intervalo de confianza del 95%.

**OMV:** obstrucción microvascular.

**OR:** odd ratio.

**RMC:** resonancia magnética cardiaca.

**VEGF:** *vascular endothelial growth factor*.





# **LISTA DE FIGURAS**



**Figura 1.** Etiología del síndrome coronario agudo.

**Figura 2.** Coronariografía de un paciente con una arteria ocluida y reperfundida después de practicar una angioplastia coronaria trasluminal percutánea.

**Figura 3.** Implicaciones estructurales y clínicas de la OMV en pacientes con IAM con elevación del segmento ST.

**Figura 4.** Mecanismos que participan en el daño microvascular.

**Figura 5.** Estructura microscópica de las arterias epicárdicas.

**Figura 6.** Efectos del daño por isquemia-reperfusión sobre las células endoteliales.

**Figura 7.** Técnicas de imagen cardíaca para detectar el daño microvascular.

**Figura 8.** Asociación entre los niveles circulantes de diferentes subtipos leucocitarios con la extensión de la OMV evaluada por RMC en fase aguda (1 semana post-infarto).

**Figura 9.** Expresión de la molécula *epithelial cell adhesion molecule* en células del músculo cardíaco.

**Figura 10.** Dinámica del daño microvascular en pacientes y en un modelo experimental.

**Figura 11.** Dinámica del daño microvascular y los niveles circulantes de HIF-1A en el proceso de isquemia-reperfusión después de un IAM.

**Figura 12.** Principales factores pro-angiogénicos y anti-angiogénicos implicados en la formación de nuevos vasos en condiciones normales y patológicas.

**Figura 13.** Implicación de la isoforma VEGF-A<sub>165b</sub> en pacientes tras un IAMEST.

**Figura 14.** Esquema de las diferentes muestras aisladas de la arteria responsable del infarto.

**Figura 15.** Cambios dinámicos en la estructura microscópica de la pared de la zona distal de la ADA a diferentes tiempos del proceso de isquemia-reperfusión.

**Figura 16.** Cambios dinámicos en los *vasa vasorum* en la zona distal de la ADA a diferentes tiempos del proceso de isquemia-reperfusión.

**Figura 17.** Infiltración de leucocitos en la ADA a diferentes tiempos del proceso de isquemia-reperfusión.

**Figura 18.** Relación de los niveles de EpCAM con respecto a la extensión de la OMV evaluada por RMC a la semana del evento cardiovascular.

**Figura 19.** Asociación entre los niveles séricos EpCAM a las 24 horas de la reperfusión con el tamaño del infarto y la hemorragia intramiocárdica a la semana del infarto así como con la FEVI y el IVTSVI a los 6 meses del evento cardiovascular.

**Figura 20.** Esquema de los grupos experimentales, el tratamiento y los estudios realizados a los animales incluidos en este estudio.

**Figura 21.** Los niveles séricos y miocárdicos de VEGF-A<sub>165b</sub> aumentan en modelos experimentales de IAM.

**Figura 22.** Efecto del bloqueo de la isoforma VEGF-A<sub>165b</sub> sobre el tamaño de infarto y la función sistólica evaluada por ecocardiografía en modelos murinos de IAM.

**Figura 23.** Efecto de la neutralización de la isoforma VEGF-A<sub>165b</sub> sobre la densidad microvascular.

**Figura 24.** Representación de los cambios histológicos que ocurren en la pared de la arteria coronaria responsable del infarto a lo largo del proceso de isquemia y posterior reperfusión.

**Figura 25.** Tras un IAMEST, niveles elevados de EpCAM se asocian con una menor extensión de OMV probablemente por una mayor integridad de las células de la monocapa endotelial y por la activación de la angiogénesis.

**Figura 26.** Efecto de la revascularización coronaria y la administración de terapias co-adyuvantes sobre el tamaño de infarto, el remodelado ventricular y la densidad microvascular.



# **LISTA DE TABLAS**





**Tabla 1.** Mecanismos fisiopatológicos relacionados con el daño por reperfusión.

**Tabla 2.** Índices de RMC evaluados tras una semana y seis meses del infarto agudo de miocardio en los pacientes con EpCAM por encima y por debajo de la mediana.



# **ABSTRACT**



Myocardial infarction (MI) is one of the main causes of morbidity and mortality in western societies. Although great advances have been made in the treatment of coronary reperfusion by percutaneous revascularization, 30 to 50% of patients suffer significant damage in the microcirculation known as microvascular obstruction (MVO). This phenomenon is considered to play a pivotal role in the development of adverse remodeling and occurrence of major adverse cardiac events after MI.

Therefore, the main objective of the present PhD Thesis is to advance in the understanding of the basic mechanisms and the diagnosis of microvascular injury after ST-segment elevation MI (STEMI) as well as to explore novel therapeutic opportunities.

In the first article, we evaluated the dynamic structural alterations in the wall of the epicardial arteries through the ischemia-reperfusion process. For this objective, we employed a controlled swine model of reperfused MI. Juvenile animals were divided into one control and four reperfused MI groups: 90-min ischemia without reperfusion, or followed by 1-minute, 1-week or 1-month reperfusion. Left anterior descending coronary artery (LAD, infarct-related artery) and control right coronary artery (non-infarct-related artery) were isolated. Taking the balloon inflation region as a reference, we isolated the proximal and distal LAD areas. In all samples, we performed histological, immunohistochemical, and electron microscopy techniques. Afterwards, samples were photographed and morphometrically analysed.

Although mild changes in tunica intima were observed during ischemia, an almost complete absence of endothelium, and abnormal breaks in the internal elastic layer were found post-revascularization. In tunica media, increased thickness was detected soon after coronary

reperfusion, whereas larger thickness, disorganized muscle cell distribution, and edema were found one week after reperfusion. This damage was more pronounced in distal than proximal LAD. In the tunica adventitia, *vasa vasorum* density decayed during ischemia in both regions, but was restored after one month. Leukocyte adhesion began after revascularization, developing into a massive presence one week after reperfusion. As a consequence, ischemia-reperfusion injury induced abnormalities in epicardial coronary artery wall started during ischemia and increased after reperfusion, becoming more pronounced in the region distal to balloon inflation.

In the second manuscript, we explored the association of circulating epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) with cardiac magnetic resonance (CMR)-derived MVO at acute phase, and also with systolic function within the first six months after STEMI. We prospectively included 106 patients with a first STEMI treated with percutaneous coronary intervention and serum levels of EpCAM were determined 24 hours post-reperfusion. All patients underwent CMR imaging 1 week and 6 months post-STEMI.

At 1-week CMR, EpCAM levels lower than median value (4.48 pg/ml) were related to extensive MVO, larger intramyocardial haemorrhage, and greater infarct size. At presentation, EpCAM values were significantly associated with the presence of MVO in univariate and multivariate logistic regression models. Although MVO tends to resolve at chronic phases, decreased EpCAM was associated with worse systolic function: depressed left ventricular ejection fraction (LVEF) and higher left ventricular end-systolic volume. Hence, circulating EpCAM values after reperfused STEMI were associated with CMR-derived MVO at acute phases and compromised systolic function at chronic phases.

In the third article, our first objective was to describe the role of the anti-angiogenic vascular endothelial growth factor (VEGF)-A<sub>165b</sub> isoform in two murine models of MI as well as to scrutinize the beneficial impact of its blockage *in vivo* in terms of microvessel density, infarct size, and systolic function. Two mice MI models were formed: 1) permanent coronary ligation (non-reperfused MI), and 2) transient 45-min coronary occlusion followed by reperfusion (reperfused MI). In both models, animals underwent echocardiography before euthanasia at day 21 after MI induction. In the two MI models, circulating and myocardial VEGF-A<sub>165b</sub> presence was increased 21 days after MI induction. Serum VEGF-A<sub>165b</sub> levels inversely correlated with systolic function evaluated by echocardiography. VEGF-A<sub>165b</sub> neutralization with anti-VEGF-A<sub>165b</sub> antibody increased capillary density, reduced infarct size, and enhanced left ventricular function in reperfed, but not in non-reperfused MI experiments.

As a second objective, we scrutinized the association between serum levels of VEGF-A<sub>165b</sub> with long-term systolic function and the occurrence of adverse events (defined as death, heart failure, or re-infarction) in a cohort of 104 STEMI patients. Elevated circulating VEGF-A<sub>165b</sub> levels correlated with lower CMR-derived LVEF at 6-months and with the occurrence of adverse events during follow-up. Therefore, in experimental and clinical studies, higher serum VEGF-A<sub>165b</sub> levels were related with worse systolic function. Its blockage enhanced neoangiogenesis, reduced infarct size, and increased systolic function in reperfed, but not in non-reperfused, murine MI models.





# RESUMEN



El infarto agudo de miocardio (IAM) constituye una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en las sociedades occidentales. A pesar de que se han hecho grandes avances en el tratamiento gracias a la reperfusión coronaria por métodos percutáneos, entre el 30-50% de los pacientes presentan un daño severo en la microcirculación conocido como obstrucción microvascular (OMV). Este fenómeno ejerce efectos negativos en cuanto a la estructura y pronóstico de los pacientes con IAM con elevación del segmento ST (IAMEST). Por ello, el principal objetivo de la presente Tesis Doctoral es avanzar en el entendimiento de los mecanismos y el diagnóstico del daño microvascular tras un IAMEST así como explorar nuevas oportunidades terapéuticas.

En el primer artículo, se evaluaron los cambios dinámicos en la estructura de la pared de las arterias epicárdicas debido al daño por isquemia-reperfusión. Para este objetivo, se empleó un modelo controlado porcino de IAM realizado de forma percutánea. Se utilizaron cerdos jóvenes que se agruparon en un grupo control y cuatro grupos de 90 minutos de isquemia: uno sin reperfusión y tres más seguidos de 1 minuto, 1 semana o 1 mes de reperfusión. Se aisló la arteria descendente anterior (ADA, arteria responsable del infarto) en su porción proximal y distal al punto de colocación del balón de angioplastia y la arteria coronaria derecha (arteria no responsable del infarto). En todas las muestras, se realizaron tinciones histológicas, de inmunohistoquímica y se prepararon para microscopía electrónica. A continuación, las muestras fueron fotografiadas y analizadas mediante técnicas morfométricas.

Aunque el daño en la túnica íntima comienza durante la isquemia, es durante la fase de reperfusión cuando se observa una ausencia casi completa de células CD31+ (marcador específico de células endoteliales) y roturas patológicas en la lámina elástica interna. En la

túnica media, se detectó un ligero aumento del grosor durante la isquemia, mientras que en las muestras aisladas tras la reperfusión observamos un aumento significativo del grosor de la capa media, una desorganización de las células musculares y la formación de edema entre las mismas. Este patrón se manifestó de forma más pronunciada en la porción distal de la ADA en comparación con la proximal. En la túnica adventicia, la densidad de los *vasa vasorum* disminuyó en el grupo sin reperfusión, se mantuvo reducida después de 1 minuto y 1 semana de reperfusión y se restableció después de 1 mes de reperfusión. Esta dinámica se observó en ambas regiones de la ADA. Tras la reperfusión, comenzó la adhesión de leucocitos a la túnica íntima de la ADA, principalmente en la región proximal al balón de angioplastia. Tras una semana de reperfusión, se detectó la presencia de células CD45+ (marcador específico de leucocitos) tanto en la túnica íntima como en la media. En consecuencia, el daño por isquemia-reperfusión indujo cambios en la estructura de la pared epicárdica durante la isquemia y éstos se incrementaron durante la reperfusión. Estas alteraciones fueron más acusadas en la zona distal al punto de colocación del balón de angioplastia.

En el segundo artículo, se exploró la relación entre los niveles circulantes de *epithelial cell adhesion molecule* (EpCAM) determinados 24 horas después de la angioplastia percutánea y la presencia de la OMV determinada mediante resonancia magnética cardíaca (RMC), así como con la función sistólica en los primeros 6 meses después del IAMEST. Se incluyó prospectivamente a 106 pacientes con un primer IAMEST tratados con angioplastia primaria. La concentración sérica de EpCAM se determinó 24 horas después de la reperfusión coronaria. Se sometió a todos los pacientes a un estudio de RMC a la semana y otro a los 6 meses del IAMEST.

Se evidenció que los pacientes que tenían valores más bajos de EpCAM presentaban una mayor extensión de la OMV y un mayor tamaño de infarto en los estudios de RMC realizados 1 semana después del evento cardiovascular. La concentración de EpCAM se asoció significativamente con la presencia de OMV tanto en el análisis univariable como en el multivariable tras ajustarse por las variables clínicas y angiográficas. A pesar de que la OMV tiende a resolverse espontáneamente en las fase crónica, unos valores más bajos de EpCAM se correlacionaron con una peor función sistólica: una fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) más deprimida y un volumen telesistólico del ventrículo izquierdo más bajo. En conclusión, los valores de EpCAM circulante tras un IAMEST reperfundido se relacionaron con la OMV determinada mediante RMC en las fases agudas y con un remodelado ventricular adverso a largo plazo.

En el tercero de los artículos, el primer objetivo fue describir el papel de la isoforma anti-angiogénica *vascular endothelial growth factor* (VEGF)-A<sub>165b</sub> en dos modelos murinos de IAM así como evaluar el impacto que tiene su bloqueo sobre la densidad microvascular, el tamaño de infarto y la función sistólica. Se realizaron dos modelos murinos de IAM: a) ligadura permanente de la arteria coronaria (IAM no reperfundido) y b) oclusión transitoria durante 45 minutos de la arteria coronaria seguida de reperfusión (IAM reperfundido); en ambos modelos, se realizó a los animales una ecocardiografía previa a la eutanasia el día 21 post-IAM. En los dos grupos experimentales de IAM, los niveles séricos y tisulares de VEGF-A<sub>165b</sub> habían aumentado a los 21 días de la inducción del IAM. Además, existía una correlación negativa entre los valores circulantes de VEGF-A<sub>165b</sub> y la función sistólica evaluada mediante ecocardiografía. El bloqueo *in vivo* de VEGF-A<sub>165b</sub> utilizando anticuerpos específicos se relacionó

con una mayor densidad microvascular, menor tamaño de infarto y mejor función sistólica en el modelo de IAM reperfundido, pero no en el modelo de IAM no reperfundido.

El segundo objetivo de este tercer manuscrito fue demostrar la relación entre los niveles de VEGF-A<sub>165</sub>b circulantes con la estructura cardíaca resultante, evaluada a los 6 meses mediante RMC, y con la aparición de episodios cardíacos adversos (muerte, re-infarto o insuficiencia cardíaca) durante el seguimiento en una cohorte prospectiva de 104 pacientes con IAMEST. Aquellos pacientes con unos niveles séricos elevados de VEGF-A<sub>165</sub>b presentaron una FEVI más deprimida al sexto mes del evento cardiovascular y una mayor tasa de eventos adversos. Con todo ello, podemos concluir que el VEGF-A<sub>165</sub>b estaba considerablemente elevado en modelos animales experimentales de IAM. Su neutralización *in vivo* fomentó la angiogénesis, redujo el tamaño del infarto y aumentó la función sistólica siempre que se permita la reperfusión. En pacientes con IAMEST, la mayor concentración de esta isoforma se correlacionó con peor función sistólica y con mayor incidencia de eventos adversos durante el seguimiento.

# **I.- INTRODUCCIÓN**



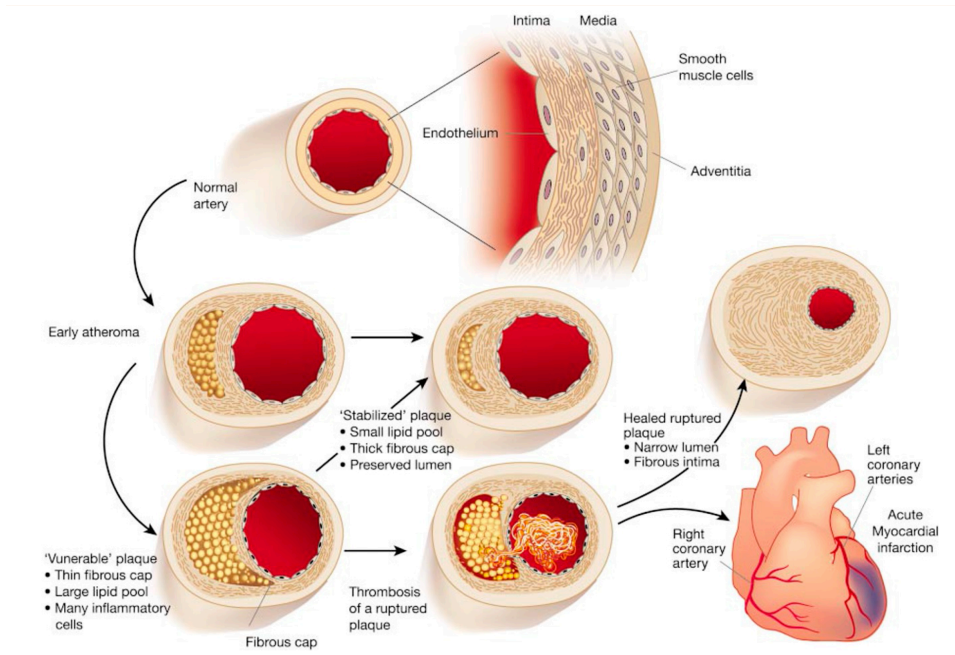


## **1. El infarto agudo de miocardio**

El infarto agudo de miocardio (IAM) constituye una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en nuestro entorno. Como consecuencia del aumento de la esperanza de vida, esta tendencia será más acusada en los próximos años. Es por ello que esta patología se encuentra entre las entidades que demandan una mayor atención en nuestro sistema sanitario (OMS. 2014).

### **1.1. Fisiopatología**

La aterosclerosis es un proceso inflamatorio crónico que afecta a las arterias de diferentes lechos vasculares y que se caracteriza por el engrosamiento de la capa íntima y media con pérdida de la elasticidad. Su lesión básica es la placa de ateroma compuesta fundamentalmente por lípidos, tejido fibroso y células inflamatorias, y pasa por diferentes estadios. Con el tiempo, estas lesiones maduran y se endurecen. Al crecer la placa, la luz de las arterias se reduce limitando la cantidad de sangre que llega al miocardio. Esta reducción del volumen de sangre implica un aporte insuficiente de nutrientes y oxígeno que puede producir isquemia (Hansson, et al. 2006) (Figura 1).



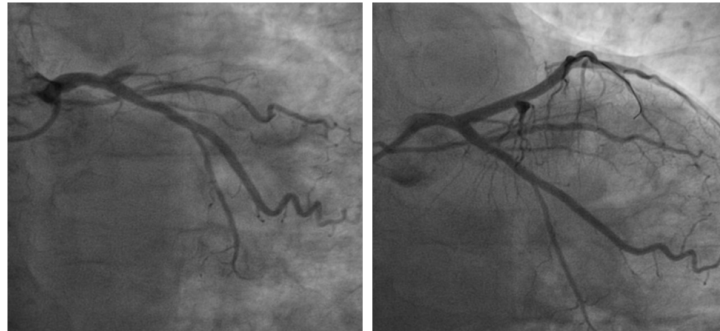
**Figura 1.** Etiología del síndrome coronario agudo (adaptada de Libby. 2002).

El IAM con elevación del segmento ST (IAMEST) se desencadena por un bloqueo de la perfusión coronaria debido a la formación de un trombo liberado en la rotura de una placa inestable de atheroma en la luz de las arterias coronarias. El cese de la perfusión provoca una situación de hipoxia y falta de nutrientes lo que conduce a una situación de isquemia que, si se prolonga en el tiempo, produce una necrosis irreversible del tejido cardíaco perfundido por esta arteria. Además, se pueden producir otros eventos adversos como la muerte súbita por arritmias malignas (Zeijlon et al. 2021).

### 1.2. Tratamiento de revascularización en el IAMEST

El IAMEST es un importante problema de salud pública en los países industrializados y está adquiriendo una creciente importancia en los países en vías de desarrollo (Boersma et al. 2003). La rápida restauración del flujo coronario anterógrado y la perfusión tisular, ya

sea mediante el uso de fármacos trombolíticos o mediante intervencionismo coronario percutáneo, son factores clave en la reducción de la mortalidad en el IAMEST (Ibáñez, et al. 2015; Niccoli, et al. 2016) (Figura 2). Diferentes trabajos han mostrado que el período comprendido entre el inicio de los síntomas y el restablecimiento del flujo coronario es un factor crucial en la evolución del paciente a corto y largo plazo (Berger et al. 1999; Cannon et al. 2000).



**Figura 2.** Coronariografía de un paciente con la arteria descendente anterior ocluida (izquierda) y reperfundida (derecha) después de practicar una angioplastia coronaria trasluminal percutánea.

Existe evidencia científica indiscutible de que la angioplastia primaria en pacientes con IAMEST es en la actualidad la técnica de elección, puesto que ha mostrado reducir la mortalidad y las tasas de re-infarto no fatal y accidente cerebrovascular en comparación con el tratamiento trombolítico (Keeley et al. 2003; Weaver et al. 1997; Widimsky et al. 2000). Gracias a los avances en el manejo de los pacientes con IAM y al desarrollo del “código infarto”, se ha conseguido reducir significativamente la mortalidad post-infarto en las últimas décadas. Sin embargo, la mejora de las tasas de mortalidad ha conllevado un aumento de la prevalencia de la enfermedad coronaria y de sus complicaciones como es la insuficiencia cardiaca (Dégano et al., 2013; Ferreira-González, 2014).

### **1.3. Daño por reperfusión**

Si bien la reperfusión limita el tamaño del infarto, mejora la función ventricular a largo plazo y reduce la mortalidad de los pacientes, al mismo tiempo inicia una serie de fenómenos moleculares y celulares, resumidos en la Tabla 1, que ejercen un efecto deletéreo sobre el miocardio (Hausenloy et al. 2013; Heusch. 2020; Ibáñez et al. 2015; Toldo et al. 2018) (Tabla 1). En este complejo fenómeno, conocido como daño por reperfusión, intervienen diferentes actores entre los que destacan los cardiomiocitos y la circulación coronaria así como leucocitos y plaquetas.

**Tabla 1.** Mecanismos celulares y moleculares relacionados con el daño por reperfusión.

|  |  |                               |  |
|--|--|-------------------------------|--|
| <b>Acumulación intracelular de iones</b>                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Sobrecarga de calcio intracelular.</li> <li>- Incremento del sodio intracelular.</li> <li>- Descenso del pH con normalización tras la reperfusión.</li> </ul> | <b>Apoptosis y autofagia</b>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Mediadores de la muerte celular por reperfusión.</li> </ul>   |
| <b>Disipación del potencial de membrana mitocondrial</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Poros de transición de la permeabilidad mitocondrial.</li> </ul>  | <b>Disfunción endotelial</b>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Citoquinas y quimioquinas.</li> <li>- Expresión de marcadores de adhesión celular.</li> <li>- Alteración de la vasodilatación.</li> </ul> |
| <b>Formación de radicales libres</b>                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Generación por la xantina oxidasa.</li> <li>- Infiltración de neutrófilos.</li> </ul>   | <b>Agregación plaquetaria</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Trombosis microvascular.</li> </ul>   |
| <b>Metabolismo del óxido nítrico</b>                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Pérdida de vasodilatación por el óxido nítrico.</li> <li>- Acumulación de peroxinitrito.</li> </ul>   | <b>Activación inmune</b>      | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Activación del complemento.</li> <li>- Acumulación de neutrófilos, macrófagos y linfocitos T.</li> </ul>                                  |

Debido a lo extenso y complejo que es este fenómeno, en la presente Tesis Doctoral, nos vamos a centrar en explorar el efecto que tiene el daño por reperfusión sobre la circulación coronaria.

## 2. Daño microvascular tras un IAM

En el IAM, la reperfusión temprana de la arteria ocluída es un paso clave para preservar la viabilidad del tejido miocárdico. Sin embargo, a pesar del restablecimiento del flujo coronario epicárdico, un número considerable de pacientes presentan una zona de hipoperfusión dentro de la región previamente isquémica (Konijnenberg et al. 2020; Ibáñez et al. 2019). Este fenómeno fue descrito por primera vez por Kloner y colaboradores en un modelo animal de 90 minutos de isquemia seguido de un periodo de reperfusión (Kloner et al. 1974).

Posteriormente este hecho también fue documentado en pacientes con IAMEST tratados con fármacos trombolíticos o angioplastia primaria. En concreto, en un 30-50% de pacientes se observa una zona de hipocaptación dentro de la zona de realce tardío de gadolinio en estudios de resonancia magnética cardíaca (RMC) (Bodí et al. 2017; Ibáñez et al. 2015). Este fenómeno aparece en los primeros minutos tras la reperfusión y se hace máximo alrededor de los 7 días post-IAM (Hervás et al. 2015; Ibáñez et al. 2019).

En la literatura científica se emplean diferentes términos para referirse a este hecho; por lo que recientemente se ha llegado a un consenso para definirlos (Konijnenberg et al. 2020):

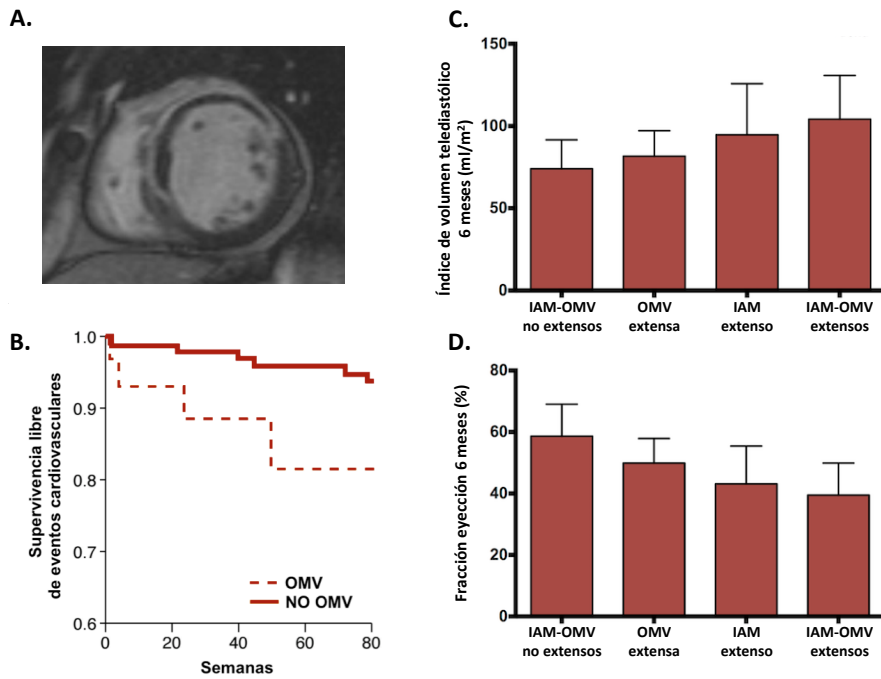
- *No-reflow*: se considera el retraso o la ausencia de flujo anterógrado en estudios de angiografía o la falta de marcadores de flujo coronario (como la tinción con tioflavina-S o la administración de microesferas) en estudios de microscopía.
- Obstrucción microvascular (OMV): se define en estudios de RMC como las zonas de hipocaptación de contraste en la zona central de realce tardío de gadolinio (Figura 3A).
- Daño microvascular: daño a nivel de la microcirculación cardíaca causado por la isquemia y posterior reperfusión temprana.

## 2.1. Implicaciones estructurales y pronósticas de la OMV

Actualmente, existe evidencia sólida de que en infartos con grandes áreas de miocardio en riesgo, el principal factor que va a marcar el daño estructural resultante y la supervivencia de los pacientes con IAMEST, junto con la extensión de la necrosis, es la magnitud de la OMV.

En este sentido, ya en la era de la reperfusión generalizada, se ha demostrado la alta prevalencia de la OMV así como sus efectos estructurales deletéreos en forma de infartos más extensos, mayor depresión de la función sistólica, menor recuperación contráctil, más remodelado adverso o existencia de trombos ventriculares (Bodí et al. 2017; Hamirani et al. 2014). La OMV ha demostrado ser un factor asociado de manera potente a todos estos hallazgos que a su vez implican un elevado riesgo de eventos tras un IAM (Bodí et al. 2009a; Brosh et al. 2007; de Waha et al. 2017; van Kranenburg et al. 2014).

La constatación del impacto negativo estructural de la OMV rápidamente se trasladó hacia un interés en explorar las implicaciones pronósticas. Tanto en registros prospectivos como en metanálisis de estudios que han utilizado la RMC, la presencia de OMV se ha revelado como un marcador pronóstico de eventos graves tras un IAM. En un reciente metanálisis el riesgo a 2 años de muerte, reinfarto o insuficiencia cardiaca fue del 24% en pacientes con OMV frente al 7% en aquellos sin OMV; la presencia de OMV se manifestó como el factor pronóstico más potente y multiplicó de manera independiente por 3,7 el riesgo de eventos (van Kranenburg et al. 2014) (Figura 3B).



**Figura 3.** Implicaciones estructurales y clínicas de la OMV en pacientes con IAM con elevación del segmento ST. (A) Imagen representativa de OMV obtenida mediante RMC con captación tardía de gadolinio. (B) Carácter pronóstico de la OMV en pacientes con IAM (adaptada de Bodí et al. 2009a). Tras un primer IAM, los pacientes que sufren infartos extensos, sin presencia de OMV, a la primera semana post-IAM presentan volúmenes telediastólicos (C) y valores de fracción de eyección (D) del ventrículo izquierdo (determinados ambos mediante RMC) al sexto mes del IAM menos comprometidos que los pacientes en los que co-existen infarto y OMV extensos (adaptada de Bodí et al. 2017).

IAM: infarto agudo de miocardio; OMV: obstrucción microvascular; RMC: resonancia magnética cardiaca.

Es esperanzador conocer que con la reperfusión precoz tras el IAM y un tratamiento médico óptimo la tendencia actual en la mayoría de los casos es hacia el remodelado inverso (beneficioso). Incluso en infartos extensos, si se evita la OMV, la tendencia es muy parecida. Sin embargo los casos en los que coexisten necrosis y OMV extensas

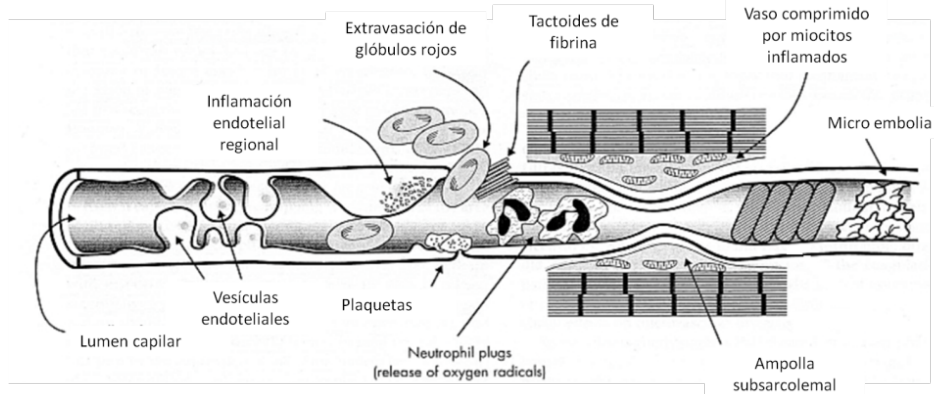


son los que sufren un daño estructural más grave y muestran una evolución clínica más sombría (Bodí et al. 2017) (Figura 3C y 3D). Por último, con el objetivo de poner en evidencia la importancia del daño microvascular en el escenario del IAMEST, resaltar que recientemente en el panel de expertos del *Journal of the American College of Cardiology* se ha sugerido que, después del tamaño de infarto, la OMV se debería considerar como un end-point clave a tener en cuenta en los ensayos clínicos y en los estudios experimentales (Ibáñez et al. 2019).

En consecuencia, la presente Tesis Doctoral se centra en comprender mejor la fisiopatología del daño microvascular, así como potenciales mecanismos diagnósticos y terapéuticos para su reparación.

### 3. Fisiopatología del daño microvascular tras un IAM

Varios mecanismos subyacentes actúan de forma simultánea y secuencial en la compleja y, aún no completamente entendida, fisiopatología del daño microvascular tras un IAM (Niccoli et al. 2009; Niccoli et al. 2016; Ríos-Navarro et al. 2019) (Figura 4).



**Figura 4.** Mecanismos que participan en el daño microvascular (adaptada de Best et al. 2012).

A pesar de que factores predisponentes del paciente como son la presencia de una gran zona de riesgo (anomalías extensas del electrocardiograma, insuficiencia cardíaca en el momento de la presentación) o una microcirculación previamente dañada (diabetes mellitus, reperfusión retardada) pueden condicionar la aparición de OMV en pacientes con IAMEST (Doherty et al. 2021; Husser et al. 2013; Niccoli et al. 2016; Tiller et al. 2019), la circulación coronaria desde las arterias epicárdicas hasta los microvasos y, en concreto, las células endoteliales juegan un papel clave en este fenómeno.

#### 3.1. Estructura de la circulación coronaria

En función de la morfología y función, la circulación cardíaca está compuesta por (i) macrocirculación coronaria, referida a vasos con

diámetro superior a 100  $\mu\text{m}$  (que incluirían las arterias epicárdicas) y (ii) microcirculación coronaria que, en su porción final, estará compuesta por pequeños capilares.

Según su estructura microscópica, las arterias coronarias epicárdicas se consideran arterias musculares, formadas por tres capas principales: túnica íntima, media y adventicia (Figura 5). Brevemente, la túnica íntima, la capa más interna en contacto con el flujo sanguíneo, está formada por una monocapa de células endoteliales y una delgada capa subendotelial (compuesta por tejido conjuntivo laxo). En la túnica media, las células musculares lisas, con algunas fibras de colágeno y elásticas, son responsables de la contractilidad y el tono muscular. Finalmente, la túnica adventicia, la más externa de las capas, está constituida por fibras de colágeno orientadas en todas las direcciones del espacio y una red de pequeños capilares y nervios, para proporcionar sangre e inervación a la pared de la arteria coronaria (Sabra et al. 2021; Sandow et al. 2009).



**Figura 5.** Estructura microscópica de las arterias epicárdicas (adaptada de Atlas Histología, Universidad de Zaragoza).

Por su parte, la microcirculación está formada por una extensa red de capilares que, estructuralmente, estarán compuestos por una monocapa continua de células endoteliales rodeadas en algunos puntos por pericitos. Las células endoteliales, a través de uniones estrechas y uniones tipo gap, forman una barrera semipermeable y metabólicamente activa que interacciona con otras células y factores humorales regulando el tono vascular, la permeabilidad, la angiogénesis, el tráfico leucocitario y la agregación plaquetaria (Sabra et al. 2021).

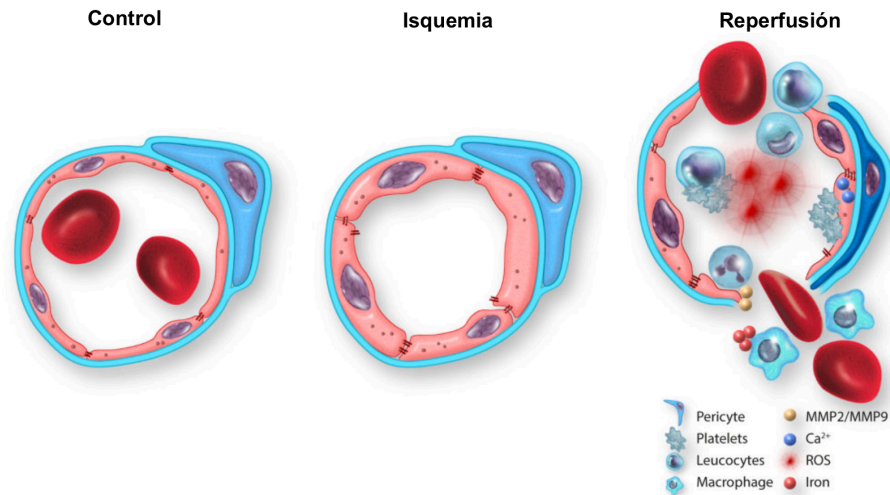
### **3.2. Daño por isquemia-reperfusión sobre la microcirculación**

Se han descrito diferentes efectos que ejerce el proceso de isquemia y posterior reperfusión sobre la microcirculación coronaria y que, en última instancia, acaba por comprometer el correcto aporte de sangre al miocardio.

Las células endoteliales en cultivo resisten periodos prolongados de isquemia (24-48 horas) sin una pérdida masiva de integridad celular (Baldea et al. 2018; Stempien-Otero et al. 1999). De hecho, células endoteliales sometidas a hipoxia tanto *in vitro* como *in vivo* responden activando mecanismos protectores contra la falta de oxígeno como son la reducción de los niveles de malondialdehído (marcador de estrés oxidativo), aumentando la presencia de superóxido dismutasa (enzima antioxidante) y la expresión del factor inducible por hipoxia-1A (regulador del metabolismo anaerobio) (Baldea et al. 2018; Ríos-Navarro et al. 2018). No obstante, a pesar de que la isquemia induce mínimas alteraciones en la estructura microscópica de los microvasos del tejido miocárdico (Hollander et al. 2016), estos cambios se exacerban tras la reperfusión.

En primer lugar, se ha demostrado una reducción significativa de la densidad microvascular en el tejido infartado que comienza poco después del inicio de la isquemia y se acentúa en el momento de la reperfusión (Ríos-Navarro et al. 2018). Asimismo, tras un IAM reperfundido, también acontecen cambios en la ultraestructura de las células endoteliales de la zona infartada. En concreto, se ha constatado una disminución de la densidad de la cromatina, cambios irreversibles en el núcleo, dismunición de vesículas intracitoplasmáticas y un menor número de uniones intercelulares (Ambrosio et al. 1989; Hollander et al. 2016). Otro hallazgo que se manifiesta tras la reperfusión es la formación de dilataciones (*blebs*) en la membrana de las células endoteliales que acaban protruyendo hacia la luz del capilar y, por ende, obstaculizando el correcto flujo sanguíneo (Hollander et al. 2016). Señalar también que en el escenario de un IAM, la falta de nutrientes y de oxígeno durante la isquemia pueden provocar un daño celular irreversible sobre las células endoteliales, pudiendo activar incluso vías apoptóticas *in vitro* (Forteza et al. 2014; Ríos-Navarro et al. En revisión).

Estas alteraciones van a repercutir negativamente en la integridad y correcta función de la monocapa endotelial, conllevando la extravasación de contenido hemático y de líquido plasmático (hemorragia y edema intramiocárdico, respectivamente), que, en última instancia, van a provocar la compresión externa de los capilares dificultando el aporte sanguíneo al miocardio infartado (Bergem et al. 2015; Hollander et al. 2016; Konijnenberg et al. 2020) (Figura 6).



**Figura 6.** Efectos del daño por isquemia-reperfusión sobre las células endoteliales (adaptada de Konijnenberg et al. 2020).

Por último, tras la reperusión, se va activar la cascada inflamatoria, clave para llegar a cabo la reparación del miocardio necrótico y formar una correcta cicatriz fibrótica. La liberación de señales proinflamatorias conduce a la activación del endotelio permitiendo así la adhesión y migración de leucocitos al tejido infartado (Prabhu et al. 2016). Sin embargo, cuando está fuera de control, este proceso puede provocar un daño miocárdico y microvascular innecesario. Los neutrófilos, a través de la agregación y formación de trampas extracelulares, participan de manera decisiva en el daño microvascular (Frangogiannis. 2017; Prabhu et al. 2016; Ríos-Navarro et al. 2021b). De hecho, estudios en cohortes extensas de pacientes con IAMEST demuestran que un recuento elevado de neutrófilos y monocitos a la llegada del paciente al hospital se asocia con una mayor extensión de OMV en fase aguda (de Dios et al. 2021; Dentali et al. 2018).

### **3.3. Daño en la macrocirculación en la cardiopatía isquémica**

En el contexto de la cardiopatía isquémica crónica, se ha estudiado en profundidad la formación de placas de ateroma sobre las arterias epicárdicas. A grandes rasgos, consiste en la acumulación crónica y progresiva de grasa, colesterol y células inflamatorias en el espacio subendotelial de las arterias coronarias (Libby et al. 2011; Libby et al. 2019). Con el tiempo, estas placas pueden crecer y endurecerse haciendo que se reduzca la luz de las arterias y limitando la cantidad de sangre que llega al miocardio.

En el campo de la cardiopatía isquémica aguda y concretamente tras un IAM, estudios experimentales y clínicos han puesto de manifiesto la aparición de estenosis de la arteria epicárdica provocada durante la intervención percutánea para revascularizar la arteria ocluida y la posterior implantación de un stent (Dashwood et al. 1999; Kim et al. 2019; Okamoto et al. 2011). En concreto, se ha visto que el daño por el sobreestiramiento que produce el balón de angioplastia durante la intervención percutánea induce el reclutamiento de leucocitos y la proliferación de miofibroblastos debido a la liberación de citocinas pro-inflamatorias y especies reactivas de oxígeno. En última instancia, esto provoca la aparición de reestenosis post-angioplastia.

Sin embargo, existen pocos estudios que evalúen únicamente el impacto sobre la pared de la arteria coronaria que ejerce el daño por isquemia-reperfusión. Por lo tanto, el primero de los objetivos de la presente Tesis Doctoral fue realizar una caracterización de los cambios dinámicos sobre la estructura microscópica de la pared de la arteria responsable del infarto (en su porción distal y proximal a la oclusión) así como de la arteria no responsable del infarto durante la isquemia y posterior perfusión.

#### 4. Diagnóstico del daño microvascular tras un IAM

##### 4.1. Índices invasivos

Al llegar el paciente a la sala de hemodinámica, hay diferentes índices angiográficos como la presencia de oclusión completa ("*Thrombolysis in Myocardial Infarction*" TIMI = 0) y la enfermedad de la arteria descendente anterior (ADA) proximal, que informan de predisposición al daño microvascular. Una vez realizado el tratamiento de reperfusión, la velocidad de relleno de la arteria responsable del infarto (índices TIMI y "*TIMI Frame Count*") y la captación de contraste por el miocardio (índices "*TIMI Myocardial Perfusion Grade*" y "*Myocardial Blush Grade*") han sido ampliamente utilizados en la valoración de la perfusión miocárdica tras la reperfusión del IAM, aunque son índices muy sujetos a variabilidad inter-observador (Niccoli et al. 2016; Ríos-Navarro et al. 2019; Taqueti et al. 2018).

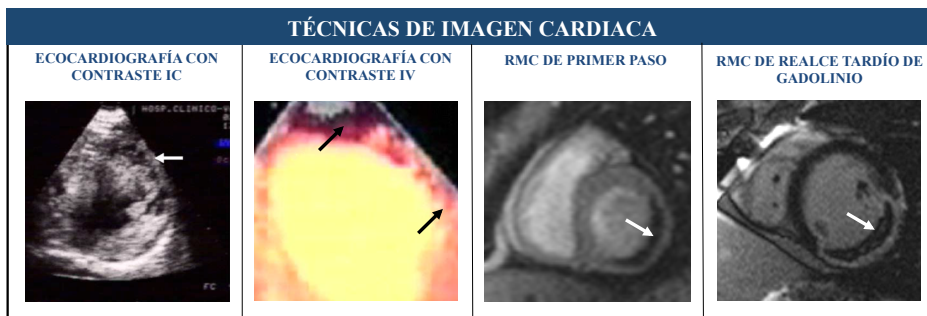
Más recientemente se han desarrollado aproximaciones de perfil más fisiológico basadas en el flujo (como la reserva de velocidad del flujo coronario, el tiempo de deceleración diastólico de la velocidad del flujo coronario o la presencia de inversión sistólica del flujo) o en la resistencia (como los índices de resistencia microvascular o de presión coronaria a flujo cero). La opinión generalizada es que se trata de índices muy prometedores para la valoración precoz de la presencia y magnitud del daño microvascular post-IAM, pero será preciso una validación mucho más amplia para llegar a esta conclusión (Niccoli et al. 2016; Ríos-Navarro et al. 2019; Taqueti et al. 2018).



## 4.2. Índices no invasivos

### 4.2.1. Técnicas de imagen cardiaca: ecocardiografía y RMC

El desarrollo de técnicas de imagen cardiaca, inicialmente mediante ecocardiografía transtorácica e inyección intracoronaria de contraste, supuso un gran avance en el diagnóstico de la perfusión miocárdica. Debido al carácter invasivo y a la baja disponibilidad de esta técnica, se comenzó a evaluar el daño en la microcirculación tras un IAMEST mediante ecocardiografía transtorácica con inyección intravenosa de contraste ecográfico (Allencherril et al. 2019; Konijnenberg et al. 2020; Niccoli et al. 2016) (Figura 7).



**Figura 7.** Técnicas de imagen cardiaca para detectar el daño microvascular (adaptada de Ríos-Navarro et al. 2019).

IC: intracardiaca. IV: intravenosa. RMC: resonancia magnética cardiaca.

En este contexto, la resonancia magnética cardiaca (RMC) se ha revelado como la técnica de imagen cardiaca no invasiva de referencia para el estudio de las consecuencias estructurales del infarto. Dada su elevada resolución espacial aporta una reproducibilidad y calidad de imagen superior al resto de técnicas. Permite de manera muy fiable con secuencias de cine la cuantificación de parámetros clásicos tales como la fracción de

eyección, los volúmenes ventriculares telediastólico y telesistólico, la masa ventricular o el estado del ventrículo derecho. Por otra parte mediante secuencias T1 y T2 con y sin contraste permite obtener información muy valiosa no sólo de cara al pronóstico y la toma de decisiones sino para entender mejor la fisiopatología en los pacientes con infarto en aspectos como la extensión del edema, la hemorragia, el miocardio infartado, el miocardio salvado, la fibrosis miocárdica así como la OMV.

Mediante la inyección intravenosa de gadolinio es posible estudiar con RMC el estado de la microcirculación. Si durante el primer paso de contraste (primer minuto tras la inyección) hay un retraso en la llegada de contraste a la zona del infarto, esto es indicativo de daño microvascular. Este índice ha sido criticado por su excesiva sensibilidad ya que aparece alterado en la mayoría de los pacientes. Tras unos 10 minutos de la inyección, el contraste queda retenido en la zona del infarto delimitando con exactitud la zona necrótica que aparece realzada. La falta de contraste (zona oscura) dentro de esta zona hiper-realzada es indicativo de la presencia de OMV (Allencherril et al. 2019; Bodí et al. 2017; Konijnenberg et al. 2020) (Figura 7).

#### **4.2.2. Índices universales y características basales**

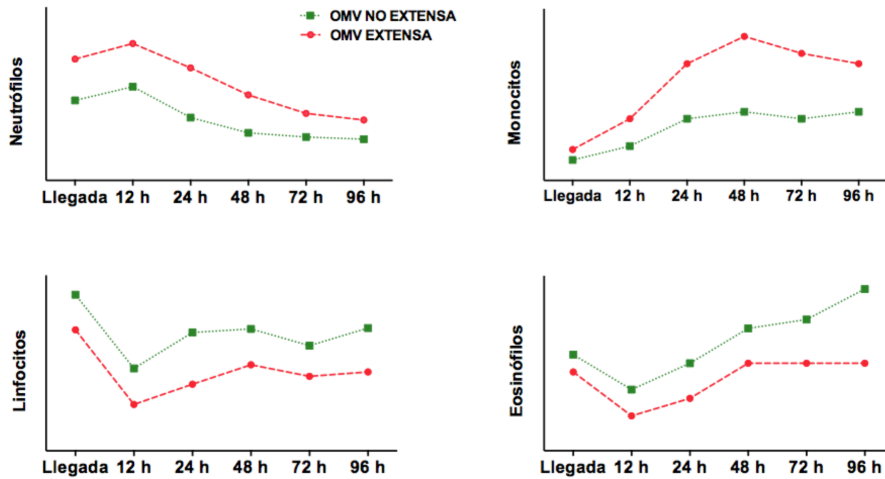
También existen herramientas de disponibilidad universal, como el electrocardiograma, que nos informan del resultado de las terapias de reperfusión a nivel microvascular. Si la oclusión coronaria epicárdica se ha resuelto, la presencia de elevación residual del segmento ST (incluso si ésta es mínima) en las derivaciones del infarto es un potente predictor de aparición de OMV (Stensjoen et al. 2020; Wong et al. 2013).

Además, ya en el momento de la llegada del paciente al hospital, determinadas características basales del paciente son de gran valor

para predecir el riesgo de producirse OMV. En este contexto, se ha descrito una escala que incluye 4 variables disponibles en el momento de la presentación (clase Killip >1, retraso en la reperfusión >3 horas, diabetes mellitus y sumatorio de ST en el electrocardiograma inicial >10 mm), la cual se asocia estrechamente al riesgo de desarrollar OMV (9% si ninguno estaba presente, 93% si 3 o más estaban presentes) (Husser et al. 2013).

#### **4.2.3. Biomarcadores**

Uno de los principales biomarcadores asociados con la posterior aparición de OMV es el recuento de leucocitos (así como sus diferentes subtipos) desde la llegada del paciente al hospital y durante las primeras horas tras la revascularización. En concreto, se ha descrito en cohortes extensas de pacientes con IAMEST la asociación entre un elevado recuento de leucocitos totales, neutrófilos y monocitos y la magnitud de la OMV. Por su parte, un menor recuento de eosinófilos y linfocitos también se correlaciona con una mayor extensión de la OMV (Bodí et al. 2009b; Husser et al. 2011; Ríos-Navarro et al. 2018) (Figura 8).



**Figura 8.** Asociación entre los niveles circulantes de diferentes subtipos leucocitarios con la extensión de la OMV evaluada por RMC en fase aguda (1 semana post-infarto) (datos obtenidos de la base de datos de nuestro grupo de investigación).

OMV: obstrucción microvascular. RMC: resonancia magnética cardiaca.

De la misma manera, se ha descrito la asociación de diferentes biomarcadores inespecíficos de daño celular implicados en procesos de necrosis e inflamación, con la extensión del daño microvascular. Entre ellos, los niveles circulantes en fases tempranas post-revascularización de biomarcadores clásicos como troponina ultrasensible, creatin quinasa o lactato deshidrogenasa se ha relacionado con la magnitud de la OMV en fase aguda en pacientes con IAMEST (Feistritzer et al. 2016; Stamboul et al. 2017; Younger et al. 2007). Sin embargo, estos tres biomarcadores no están estrechamente relacionados con la fisiopatología del IAMEST ya que se elevan en otras patologías cardiovasculares o con base inflamatoria. Es por ello, que en la presente Tesis Doctoral nos propusimos investigar el papel de un biomarcador que, además de ayudar al diagnóstico y predicción de la aparición del daño

microvascular, también pudiera estar involucrado en su fisiopatología para así avanzar en el conocimiento de este fenómeno.

### **4.3. Epithelial cell adhesion molecule**

#### **4.3.1. Estructura y función en situaciones fisiológicas**

*Epithelial cell adhesion molecule* (EpCAM) es una glicoproteína transmembrana tipo I conformada por 314 aminoácidos y de 39-42 kDa que se encuentra en la membrana basolateral de numerosas células epiteliales. Su estructura incluye un dominio extracelular y un dominio intracelular. Su principal función es mantener la cohesión intercelular de forma calcio independiente, aunque también se ha descrito su implicación en señalización celular, proliferación, diferenciación, formación y mantenimiento de la estructura de los órganos (Huang et al. 2018; Gaber et al. 2020). En base a los datos de *Human Protein Atlas*, EpCAM se encuentra expresado en gran proporción en el tracto gastrointestinal, glándula tiroides y riñón.

#### **4.3.2. Implicación de EpCAM en situaciones patológicas**

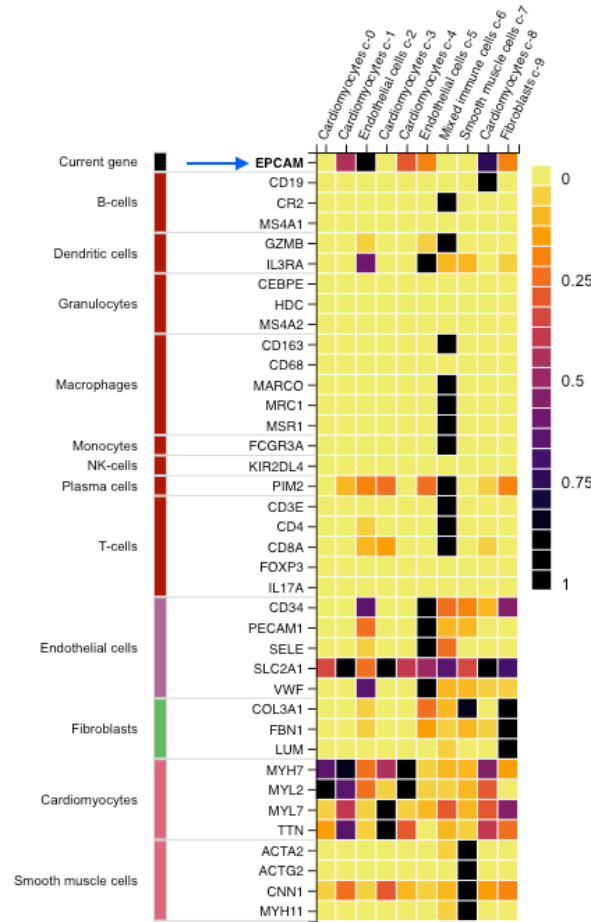
Se ha descrito la implicación de EpCAM en diferentes patologías en los últimos años, principalmente en el campo de la Oncología. La sobreexpresión de esta molécula se ha evidenciado en gran variedad de carcinomas epiteliales asociándose con la malignidad de la neoplasia y el pronóstico de los pacientes (Dai et al. 2017; Zhou et al. 2018; Zhu et al. 2021). Como ejemplo, indicar que en el cáncer colorrectal, uno de los de mayor incidencia en los países occidentales, se ha demostrado que EpCAM participa en un complejo proteico responsable de la progresión de la enfermedad así como en la capacidad de resistencia a la apoptosis que tienen las células cancerígenas (Kuhn et al. 2007). Además, EpCAM se ha convertido

en una prometedora diana terapéutica para la cual ya existen diferentes anticuerpos monoclonales en el mercado (adecatumumab o edrecolomab).

Por otro lado, EpCAM también se ha vinculado a la fisiopatología del síndrome de Lynch, una enfermedad genética de herencia autosómico dominante y penetrancia incompleta que predispone a la aparición de cáncer colorrectal. En el 80% de los pacientes, esta entidad está producida por la mutación de los genes MLH1 y MSH2, proteínas implicadas en la reparación de los daños que ocurren en la replicación del ADN. En este contexto, la mutación de EpCAM causa la inactivación del gen MSH2 y, en consecuencia, provoca una deficiente reparación de los errores que ocurren durante la división del material genético en la mitosis (Schnell et al. 2013). Por ende, tanto la sobreexpresión como la depleción de EpCAM puede estar involucrada en la formación tumoral.

#### **4.3.3. Participación de EpCAM en enfermedades cardiovasculares**

Hasta la fecha y en base a nuestro conocimiento, son escasos los estudios que investigan la implicación de EpCAM en patologías cardiovasculares. De acuerdo con *Human Protein Atlas*, aunque su expresión es mucho más reducida que en otros órganos, también se ha revelado su expresión en el músculo cardíaco y, concretamente, en las células endoteliales (Figura 9).



**Figura 9.** Expresión de la molécula *epithelial cell adhesion molecule* en células del músculo cardiaco (adaptada de *Human Protein Atlas*).

Se ha postulado que EpCAM está implicado en las uniones intercelulares y debido a que se expresa en las células endoteliales del tejido cardiaco, se podría hipotetizar que participa en el mantenimiento de la correcta adhesión de las células endoteliales. Por ello, en el escenario del daño por isquemia-reperfusión, cambios en su expresión podrían jugar un papel importante en el

mantenimiento de la integridad de la monocapa endotelial y, por consiguiente, en la extensión de la OMV.

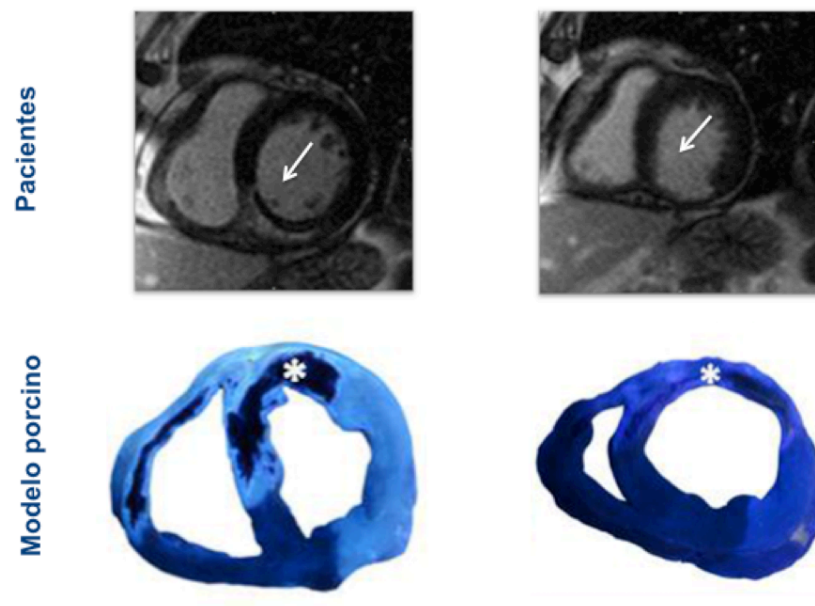
Por todo ello, el segundo de los objetivos de esta Tesis Doctoral se basó en explorar en pacientes con IAMEST la asociación entre los niveles circulantes de este biomarcador, en las primeras horas tras la revascularización, con la presencia de la OMV en fase aguda (1 semana después del evento cardiovascular). Asimismo, también nos propusimos explorar la relación entre los niveles de EpCAM circulante con la función sistólica en los primeros 6 meses después de un IAMEST.



## 5. Oportunidades terapéuticas para reparar el daño microvascular

### 5.1. Dinámica del daño microvascular

El daño microvascular es un proceso dinámico. Existen diferentes estudios experimentales y de imagen cardíaca que demuestran un rápido inicio de este fenómeno, el cual al mismo tiempo tiende a resolverse de forma espontánea en las semanas posteriores al IAM (Abanador-Kamper et al. 2016; Bodí et al. 2006; Bodí et al. 2017; Hervás et al. 2015; Orn et al. 2009) (Figura 10).

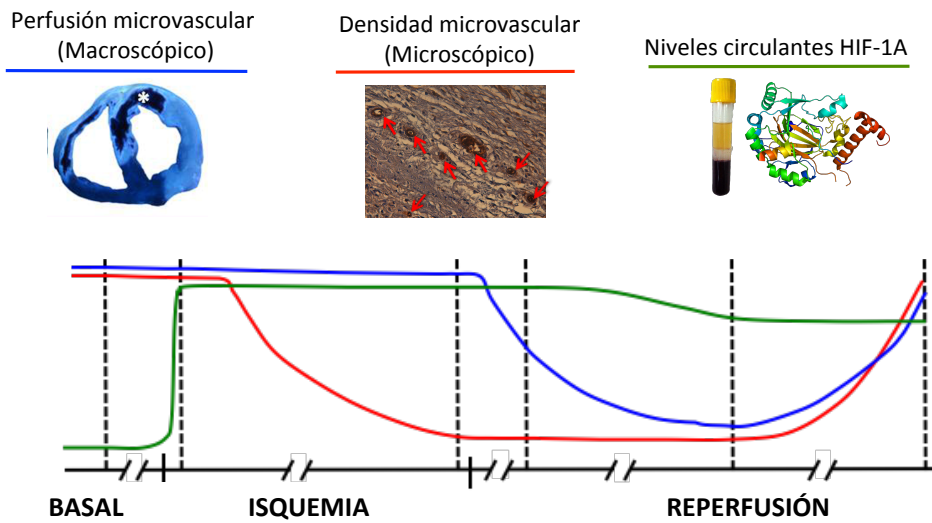


**Figura 10.** Dinámica del daño microvascular en pacientes y en un modelo experimental.

Por una parte, datos de nuestro grupo en una cohorte multicéntrica de más de 700 pacientes con IAMEST apuntan a que la OMV aparece en un 50% de los pacientes en el estudio de RMC realizado a la semana del evento cardiovascular, mientras que ésta se resuelve

completamente a los 6 meses en aproximadamente el 90% de ellos (Bodí et al. En revisión). Esta tendencia natural hacia la mejora de la perfusión microvascular durante las semanas y meses posteriores al IAMEST también se ha corroborado en pacientes con IAMEST mediante angiografía, ecocardiografía de contraste intracoronaria e intravenosa (Allencherril et al. 2019; Konijnenberg et al. 2020).

Por otro lado, en modelos experimentales de IAM reperfundido altamente controlados, se ha observado que, aunque la pérdida de densidad capilar comienza unos minutos después de la oclusión coronaria (durante la fase de isquemia), es inmediatamente tras la perfusión cuando se evidencia macroscópicamente la aparición de *no-reflow* gracias a la administración de tioflavina-S. La extensión del *no-reflow* alcanza un pico máximo a la semana. En fases avanzadas (un mes tras la revascularización), se ha constatado tanto una resolución prácticamente completa del *no-reflow* así como una recuperación de la densidad microvascular, determinado por técnicas inmunohistoquímicas en el tejido muscular cardíaco infartado (Gkontra et al. 2018; Hervás et al. 2015; Ríos-Navarro et al. 2018) (Figura 11).



**Figura 11.** Dinámica del daño microvascular y los niveles circulares de HIF-1A en el proceso de isquemia-reperfusión después de un IAM. En un IAM reperfundido, la reducción de la densidad microvascular (antes de la reperfusión) precede a la aparición de la obstrucción microvascular; ambos procesos siguen una recuperación paralela y se resuelven de forma prácticamente completa después de 1-mes de reperfusión. Al mismo tiempo, los niveles circulares de la molécula pro-angiogénica HIF-1A en el suero de seno coronario aumentan dramáticamente durante la isquemia, lo cual supone el inicio de un potente mecanismo compensatorio con el fin de recuperar la perfusión en el área infartada (adaptada de Ríos-Navarro et al 2018).

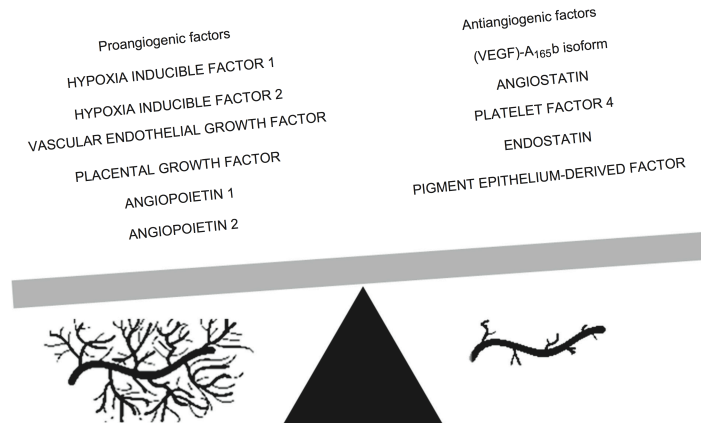
HIF-1A: factor inducible por hipoxia-1A. IAM: infarto agudo de miocardio.

La onda del daño microvascular presenta una progresión mucho más lenta en los vasos pequeños (que dura hasta varios días) que la necrosis en los cardiomiocitos. Esto ofrece una ventana de tiempo terapéutico potencialmente más larga para explorar posibles terapias co-adyuvantes para reparar el daño microvascular, en comparación con las escasas 4-6 horas que tenemos para salvar el miocardio (Davidson et al. 2019).

Además, a diferencia de la regeneración miocárdica ineficaz, el daño microvascular tiende a repararse en fases avanzadas de la enfermedad (Figura 11). Como se ha indicado anteriormente, tanto en modelos clínicos como experimentales (Abanador-Kamper et al. 2016; Bodí et al. 2006; Hervás et al. 2015; Orn et al. 2009), hay una tendencia natural a la recuperación del aporte sanguíneo en las áreas hipoperfundidas. Por todo ello, resulta de gran interés buscar terapias co-adyuvantes a la revascularización para promover la tendencia natural a la reparación del daño microvascular.

### **5.2. Angiogénesis como mecanismo reparador del daño microvascular**

La angiogénesis puede tener un papel central en la restauración de la microvasculatura a nivel cardiaco (Badimon et al. 2018; Li et al. 2022; Sabra et al. 2021). En el adulto, la red vascular está en estado quiescente. Por contra, ante determinados estímulos, tales como la falta de oxígeno que ocurre durante la oclusión de la arteria coronaria, el proceso de angiogénesis se puede activar. Se considera un proceso secuencial que comprende las siguientes etapas: la aparición del estímulo angiogénico, la degradación de la matriz extracelular y por último la migración y proliferación de las células endoteliales, que favorecerán la formación de nuevos capilares (Sabra et al. 2021). La activación de este proceso viene modulada por un equilibrio dinámico entre señales pro- y anti-angiogénicas (Cochain et al. 2013; Fracassi et al. 2017; Liu et al. 2015; Potente et al. 2011) (Figura 12).



**Figura 12.** Principales factores pro-angiogénicos y anti-angiogénicos implicados en la formación de nuevos vasos en condiciones normales y patológicas (adaptada de Fracassi et al. 2017).

De hecho, incluso durante la isquemia (cuando todavía el daño microvascular no se ha hecho evidente a nivel macroscópico), nuestro organismo activa rápidamente mecanismos pro-angiogénicos que contribuyen a la regeneración espontánea de la microvasculatura (como son la liberación del factor inducible por hipoxia-1A) (Jianqiang et al. 2015; Loo et al. 2008; Ríos-Navarro et al. 2018) (Figura 11).

Otro de los marcadores típicos encargados de regular la formación de nuevas estructuras vasculares tanto en condiciones fisiológicas como fisiopatológicas es el *vascular endothelial growth factor* (VEGF). Se ha demostrado que los niveles de este factor están aumentados en el miocardio isquémico así como en suero de pacientes con un IAMEST (Banai et al. 1994; Ferrara et al. 2003; Iribarren et al. 2011). Recientemente se ha sugerido que el VEGF podría inducir angiogénesis a través de la activación del eje especies reactivas de oxígeno-estrés en el retículo endoplasmático-autofagia en células endoteliales vasculares (Zou et al. 2019). Sin embargo, a pesar del incremento de los valores séricos de este factor pro-angiogénico en

una fase temprana tras un infarto, se ha observado que existe un retraso en la formación de nuevos vasos en el miocardio infartado.

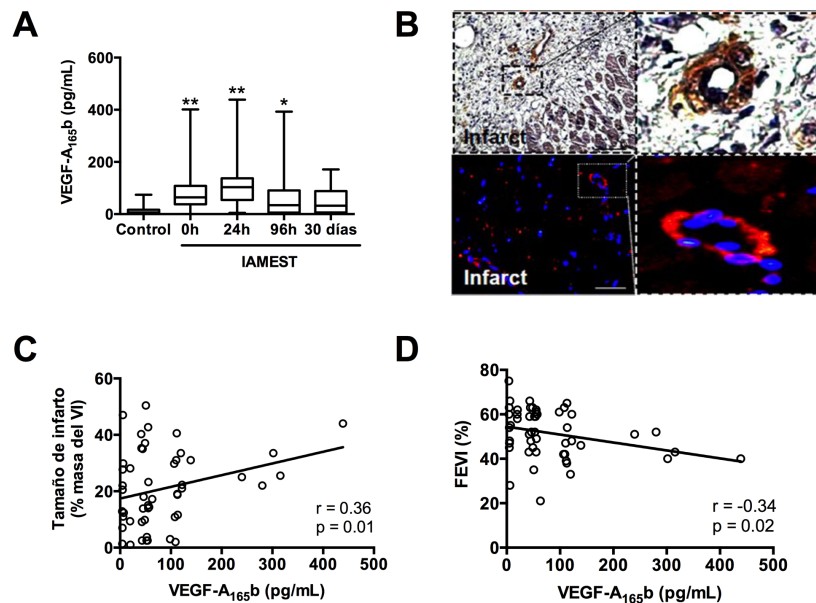
### **5.3. Papel de la isoforma anti-angiogénica VEGF-A<sub>165b</sub>**

El gen del VEGF se transcribe en múltiples isoformas de ARN mensajero que están reguladas por splicing alternativo. Cuando el ARN mensajero que se va a traducir contiene la porción proximal del exón 8, resulta en una forma pro-angiogénica de VEGF-A<sub>165a</sub>, sin embargo, cuando incluye la porción distal de este exón, se traducirá en una isoforma anti-angiogénica, VEGF-A<sub>165b</sub>. La isoforma anti-angiogénica tiene una estructura tridimensional que le permite tener una afinidad similar a la del VEGF-A<sub>165a</sub> por el receptor VEGFR-2 que VEGF-A<sub>165a</sub>. En cambio, no tiene la capacidad de activar a este receptor y en consecuencia impide la iniciación del proceso de angiogénesis (Kikuchi et al. 2019; Qiu et al 2009; Rannel et al. 2009; Tanabe et al. 2018).

En el ámbito clínico, el déficit de este factor se ha correlacionado con una mayor capacidad angiogénica en algunas patologías tales como el cáncer (Bunni et al. 2015; Karsten et al. 2020) y la retinopatía diabética (Ved et al. 2017). Concretamente en enfermedades cardiovasculares, un incremento de la isoforma VEGF-A<sub>165b</sub> se ha asociado con una menor vascularización en pacientes con enfermedad arterial periférica (Kikuchi et al. 2014) y esclerosis sistémica (Manetti et al. 2011).

En la cardiopatía isquémica y en particular en el IAM, un estudio retrospectivo preliminar de nuestro grupo llevado a cabo en una cohorte de 50 pacientes a los que se les extrajo sangre 24 horas tras un IAMEST se ha observado un incremento en los niveles circulantes de este factor anti-angiogénico (Hueso et al. 2017). Además, los niveles de este factor se correlacionaron positivamente con el tamaño

de infarto y la FEVI, ambos parámetros medidos por RMC en fase aguda (una semana del evento) (Figura 13).



**Figura 13.** Implicación de la isoforma VEGF-A<sub>165b</sub> en pacientes tras un IAMEST. La presencia de VEGF-A<sub>165b</sub> se encuentra aumentado en suero de pacientes con IAMEST (A) y en muestras de autopsias de pacientes con IAMEST de más de 6 meses de evolución (B). Asimismo niveles séricos elevados de VEGF-A<sub>165b</sub> se asociaron con un mayor tamaño de infarto (C) y una menor FEVI (D) (adaptada de Hueso et al. 2017).

IAMEST: infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST. FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo. VEGF: *vascular endothelial growth factor*. VI: ventrículo izquierdo.

Por último, también comprobamos que, en un ensayo funcional de diferenciación *in vitro* de células endoteliales arteriales coronarias a estructuras tubulares, el bloqueo de la isoforma VEGF-A<sub>165b</sub> mediante la administración de un anticuerpo neutralizante produce un aumento de la capacidad angiogénica del suero aislado de pacientes con IAMEST (Hueso et al. 2017).

Dado que estos resultados apuntan a que este factor podría tener un efecto anti-angiogénico y, por consiguiente, deletéreo para la recuperación de la vascularización post-IAM, el tercero de los objetivos de esta Tesis Doctoral fue caracterizar la implicación de esta isoforma en modelos experimentales murinos de IAM así como estudiar el potencial efecto beneficioso de su bloqueo *in vivo*. Igualmente, también se pretendió corroborar en una cohorte más extensa de pacientes con IAMEST, la relación entre los niveles séricos de esta novedosa isoforma con la función sistólica a largo plazo y con la aparición de eventos adversos.

#### **6. Contribución original del autor**

El autor de este trabajo ha llevado a cabo la adquisición y análisis de los datos estudiados. Las tres partes de esta Tesis, formada por un compendio de 3 artículos, han sido publicadas en revistas científicas internacionales indexadas dentro de *Journal of Citation Report*. El autor de este trabajo ha escrito todos los artículos y ha desempeñado las funciones necesarias como primer autor.



## **II.- HIPÓTESIS**



El daño por isquemia-reperfusión en un modelo porcino de IAM reperfundido provoca cambios en la estructura microscópica de la pared de la arteria coronaria responsable del infarto siendo éstos más acusados en la zona distal que proximal a la oclusión.

Los niveles séricos del biomarcador EpCAM determinados a las 24 horas de la reperfusión en pacientes con IAMEST se asocian con la aparición de la OMV evaluada por RMC en la fase aguda del evento cardiovascular así como con la función sistólica resultante en la fase crónica.

Los niveles séricos de la isoforma anti-angiogénica VEGF-A<sub>165b</sub> están asociados con la función sistólica en modelos experimentales murinos de IAM y en pacientes con IAMEST. Asimismo su bloqueo en un modelo murino de IAM reperfundido ejerce efectos beneficiosos en cuanto a la densidad capilar, el tamaño de infarto y la función sistólica.



### **III.- OBJETIVOS**



Mediante una aproximación multidisciplinar al daño microvascular tras un IAMEST que incluye a) modelo controlado porcino de IAM reperfundido, b) análisis clínicos en pacientes con IAMEST evaluados con RMC en fase aguda (una semana) y crónica (seis meses) del evento cardiovascular y c) modelos murinos de IAM reperfundido y no reperfundido, el objetivo principal de esta Tesis Doctoral es profundizar en el conocimiento de los mecanismos básicos y el diagnóstico del daño microvascular tras un IAMEST así como explorar nuevas oportunidades terapéuticas para su reparación.

Para ello se han determinado los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar la dinámica de los cambios histológicos en la pared de la arteria responsable del infarto a diferentes tiempos del proceso de isquemia-reperfusión en un modelo porcino.
2. Comparar los cambios histológicos en la pared de la arteria responsable del infarto entre la zona proximal y distal a la oclusión así como con la estructura de la pared de la arteria no responsable del infarto en un modelo porcino de isquemia-reperfusión.
3. Explorar la asociación entre los niveles circulantes de EpCAM medidos a las 24 horas de la revascularización en pacientes con IAMEST con la existencia de la OMV en fase aguda evaluada mediante RMC.
4. Determinar la relación entre los niveles circulantes de EpCAM medidos a las 24 horas de la revascularización en pacientes con IAMEST con la función sistólica resultante a los seis meses del evento cardiovascular.
5. Caracterizar la implicación de la isoforma anti-angiogénica VEGF-A<sub>165b</sub> y el potencial efecto de su bloqueo sobre la densidad

capilar, el tamaño de infarto y la función sistólica en dos modelos murinos de IAM (reperfundido y no reperfundido).

6. Examinar la asociación entre los niveles circulantes de VEGF-A<sub>165b</sub> determinados a las 24 horas de la revascularización en pacientes con IAMEST con la función sistólica a los seis meses del evento cardiovascular evaluada mediante RMC y con la aparición de eventos adversos durante el seguimiento.



## **IV.- RESUMEN DE MANUSCRITOS**



**1. Ischemia-reperfusion injury to coronary arteries: Comprehensive microscopic study after reperfused myocardial infarction (Anexo I)**

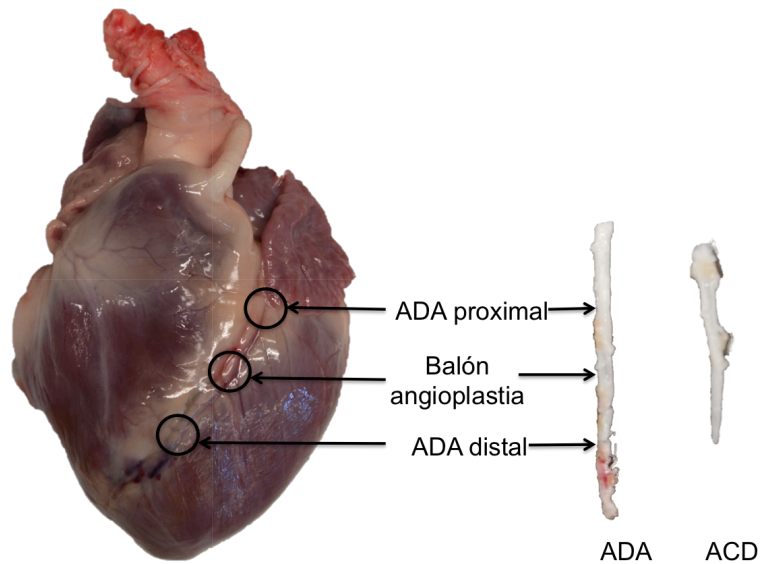
Ríos-Navarro C, Daghbouche-Rubio N, Gavara J, et al. Ischemia-reperfusion injury to coronary arteries: Comprehensive microscopic study after reperfused myocardial infarction. *Ann Anat.* 2021;238:151785.

**Antecedentes y objetivo:** Aunque la reperfusión coronaria es esencial para limitar el tamaño de infarto y aumentar la supervivencia de los pacientes con IAMEST, el rápido restablecimiento del flujo sanguíneo puede llevar asociados una serie de efectos dañinos conocidos como daño por isquemia-reperfusión.

El papel de la reperfusión sobre la microcirculación cardiaca ha sido ampliamente explorado. Sin embargo, existen pocos estudios que evalúen exclusivamente el efecto que ejerce el daño por isquemia-reperfusión sobre la pared de la arteria epicárdica a nivel microscópico. Por lo tanto, el objetivo de este primer trabajo fue caracterizar mediante microscopia óptica y electrónica los cambios dinámicos producidos en la pared de la arteria coronaria responsable del infarto (en su porción distal y proximal a la oclusión) y en una arteria no responsable del infarto.

**Métodos:** El IAM se indujo de forma percutánea en cerdos comunes hembras mediante la oclusión transitoria de la ADA (Hervás et al. 2015; Ríos-Navarro et al. 2018). Se realizó un grupo control y cuatro grupos de IAM. En estos últimos, después de la oclusión del segmento medio de la ADA durante 90 min mediante un balón de angioplastia, los experimentos fueron clasificados en los siguientes grupos: 1) sin reperfusión y 2) 1-min, 3) 1-semana y 4) 1-mes de reperfusión (n = 3 animales/grupo). El grupo control (n = 3) se llevó a

cabo siguiendo el mismo protocolo experimental que los grupos IAM, en cambio, el balón de angioplastia no fue hinchado y, por lo tanto, la isquemia y el infarto no fueron inducidos. Tras finalizar el protocolo experimental, se aisló la ADA (arteria responsable del infarto) en su porción proximal y distal al punto de colocación del balón de angioplastia así como la arteria coronaria derecha (arteria no responsable del infarto) (Figura 14).



**Figura 14.** Esquema de las diferentes muestras aisladas de la arteria responsable del infarto. Tomando como referencia la región en la cual el balón fue hinchado, se aislaron muestras en dos puntos diferentes de la ADA (arteria responsable del infarto): proximal y distal a la colocación del balón. Además, también se aisló una muestra de la ACD (no responsable del infarto), la cual se utilizó como control.

ACD: arteria coronaria derecha. ADA: arteria descendente anterior.

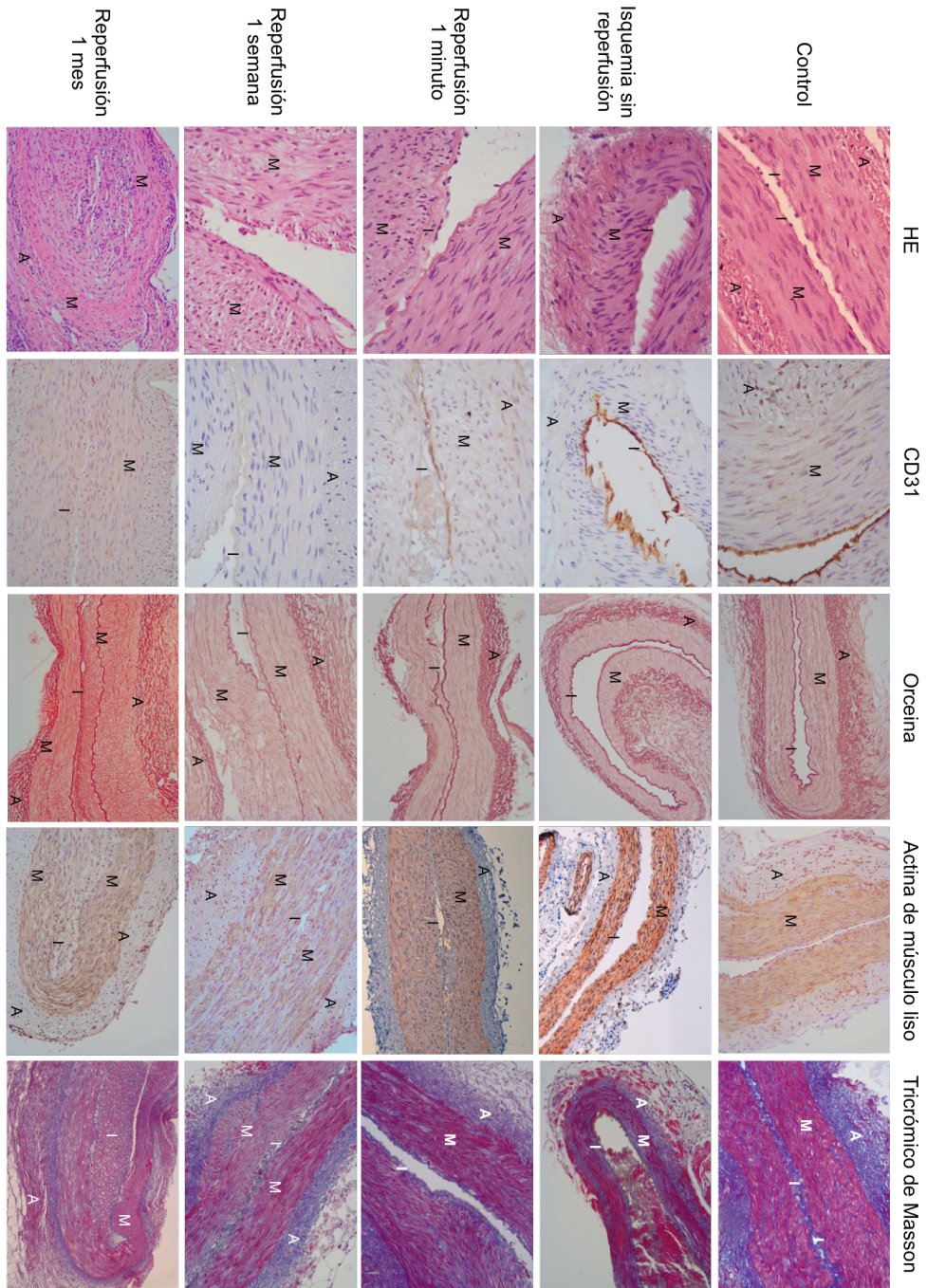
Para realizar el estudio con microscopía óptica, estas muestras se fijaron en formaldehído, se incluyeron en parafina y se realizaron cortes de 5  $\mu\text{m}$  y se montaron sobre portaobjetos. Posteriormente se tiñeron con hematoxilina-eosina para realizar la valoración histológica

general, con orceína para poner de manifiesto las fibras elásticas y con tricrómico de Masson para evaluar las fibras de colágeno. Además se realizaron técnicas inmunohistoquímicas usando anticuerpos anti-CD31 (marcadores específicos de células endoteliales), anti-actina de músculo liso, y anti-CD45 (marcador específico de leucocitos totales). A continuación se realizaron fotografías a diferentes aumentos y se analizaron por técnicas morfológicas utilizando el software Image-Pro Plus 7.0.

Para realizar el estudio con microscopía electrónica, las muestras se fijaron en glutaraldehído y posteriormente se procesaron para su visualización utilizando el microscopio electrónico de transmisión JEM-1010.

**Resultados:** Respecto a la túnica íntima, el daño en la monocapa endotelial comienza incluso antes de la reperfusión, durante la fase de isquemia. Este daño aumenta después de la reperfusión, observándose una ausencia de células CD31+ en la túnica íntima y un aumento del tamaño de las fenestras en la lámina elástica interna de los grupos de 1-minuto y 1-semana de reperfusión. En el grupo de 1-mes, se observa en dos de los tres casos un engrosamiento de la capa subintimal (Figura 15).

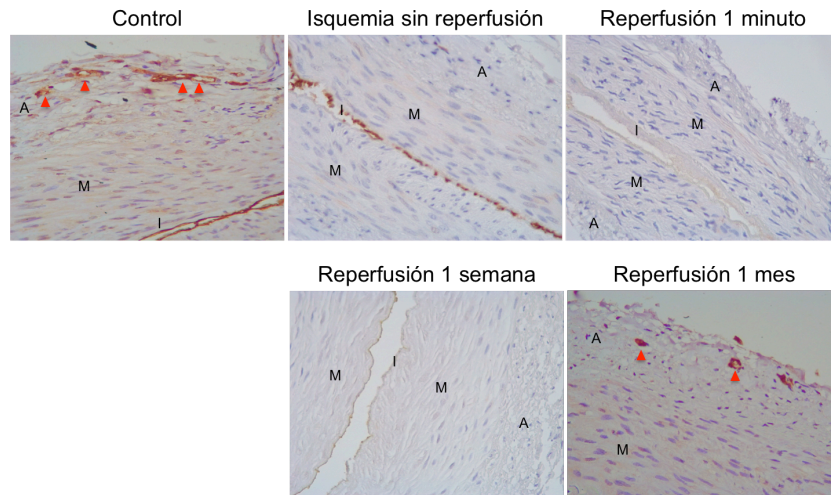
A pesar de que no se observó daño en la túnica media del grupo sin reperfusión, sí que se produjo un aumento de su grosor tras la reperfusión. En el grupo de 1 semana de reperfusión, se encontró un mayor engrosamiento de la capa media, una desorganización en la distribución de las células musculares lisas, así como la presencia de edema (Figura 15). El daño en la túnica íntima y media fue más acusado en la región distal al punto de colocación del balón de angioplastia en comparación con la región proximal.



**Figura 15.** Cambios dinámicos en la estructura microscópica de la pared de la zona distal de la arteria descendente anterior a diferentes tiempos del proceso de isquemia-reperfusion.

A: capa adventicia. HE: hematoxilina-eosina. I: capa íntima. M: capa media.

En la túnica adventicia, la densidad de los *vasa vasorum* (células CD31 positivas) disminuyó en el grupo sin reperfusión, se mantuvo reducida después de 1 minuto y 1 semana de reperfusión y se restableció después de 1 mes de reperfusión (Figura 16). Esta dinámica se observó en ambas regiones de la ADA.

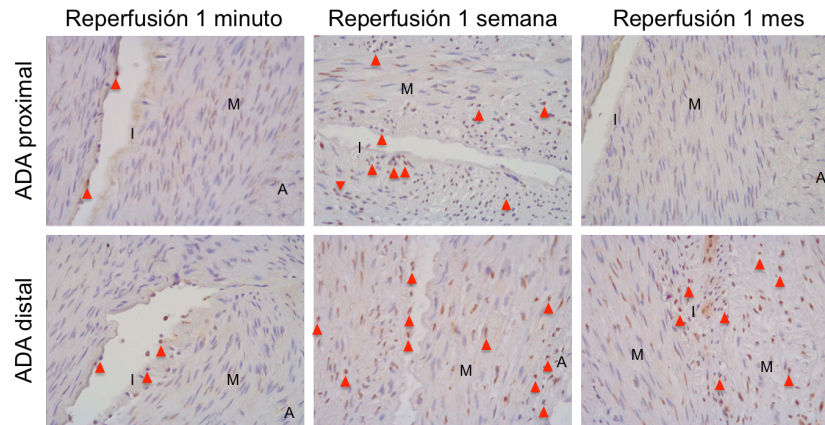


**Figura 16.** Cambios dinámicos en los *vasa vasorum* en la zona distal de la ADA a diferentes tiempos del proceso de isquemia-reperfusión. Se aislaron muestras de la porción distal de la ADA (arteria responsable del infarto) y se tiñeron con un anticuerpo anti-CD31 (marcador específico de células endoteliales). Los triángulos rojos indican los *vasa vasorum* presentes en la capa adventicia.

A: capa adventicia. ADA: arteria descendente anterior. I: capa íntima. M: capa media.

Tras la reperfusión, comenzó la adhesión de leucocitos (células CD45 positivas) a la túnica íntima de la ADA, principalmente en la región proximal al balón de angioplastia. En el grupo de 1 semana de reperfusión, se detectó la presencia de células CD45+ tanto en la túnica íntima como en la media (Figura 17).





**Figura 17.** Infiltración de leucocitos en la ADA a diferentes tiempos del proceso de isquemia-reperfusión. Se aislaron muestras de la porción distal y proximal al punto de oclusión de la ADA (arteria responsable del infarto) y se tiñeron con un anticuerpo anti-CD45 (marcador específico de leucocitos totales). Los triángulos rojos indican los leucocitos presentes en la pared de la arteria.

A: capa adventicia. ADA: arteria descendente anterior (arteria responsable del infarto).  
I: capa íntima. M: capa media.

En los cinco grupos experimentales, también se aisló la arteria coronaria derecha (no responsable del infarto) y su estructura microscópica era similar a la de una arteria control.

**Conclusión:** Tras un IAM, se observan cambios patológicos en la arteria responsable del infarto, siendo éstos más pronunciados en la región distal a la oclusión coronaria. Este daño comienza durante la isquemia y se incrementa después de la reperusión. El entendimiento de estos cambios dinámicos es importante para comprender con más detalle el daño microvascular en la fisiopatología del IAM.



## **2. EpCAM and microvascular obstruction in patients with STEMI: a cardiac magnetic resonance study (Anexo II)**

Ríos-Navarro C, Gavara J, Núñez J, et al. EpCAM and microvascular obstruction in patients with STEMI: a cardiac magnetic resonance study. Rev Esp Cardiol. 2021;S1885-5857(21)00135-3.

**Antecedentes y objetivo:** Los biomarcadores para predecir la presencia de la OMV son escasos, por lo que resulta de gran interés descubrir nuevas moléculas que nos ayuden no sólo a diagnósticar la aparición de OMV sino también a comprender mejor su fisiopatología. EpCAM se encuentra en la membrana basolateral de numerosas células epiteliales normales para mantener la cohesión entre ellas y preservar así su integridad. A pesar de su prometedor papel en Oncología, no se ha demostrado la participación de esta molécula en el ámbito cardiovascular. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue explorar en pacientes con IAMEST la relación entre los niveles de EpCAM circulante determinados a las 24 horas después de la angioplastia primaria y la aparición de la OMV cuantificada mediante RMC, así como con la función sistólica en los primeros seis meses después del IAMEST.

**Métodos:** Se incluyó prospectivamente a 106 pacientes con un primer IAMEST tratados con angioplastia primaria. La concentración sérica de EpCAM se determinó 24 horas tras la reperusión coronaria. Todos los pacientes incluidos en este estudio fueron sometidos a un estudio de RMC a la semana y otro a los seis meses del evento cardiovascular.

**Resultados:** La media de edad de la muestra fue de  $59 \pm 13$  años, y el 81 (76%) eran hombres. La localización anatómica del infarto fue anterior en 54 pacientes (51%), y en 20 pacientes (19%) la clase de Killip fue  $\geq$  II.

Con respecto a las variables de las imágenes obtenidas mediante RMC a la semana, los pacientes con una concentración de EpCAM por debajo de la mediana (4,48 pg/ml) presentaron mayores valores de OMV, tamaño del infarto y hemorragia intramiocárdica (Tabla 2).

**Tabla 2.** Índices de RMC evaluados tras una semana y seis meses del infarto agudo de miocardio en los pacientes con EpCAM por encima y por debajo de la mediana.

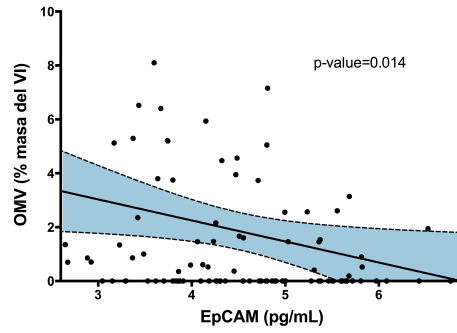
|  | EpCAM por debajo de la mediana (< 4,48 pg/ml) | EpCAM por encima de la mediana (> 4,48 pg/ml) | <i>p-value</i> |
|--|---|---|----------------|
| Número de pacientes                    | 53  | 53  |                |
| <b><u>RMC en la primera semana</u></b> |   |   |                |
| FEVI (%)                               | 51±12   | 55±11   | 0,087          |
| IVTSVI (ml/m <sup>2</sup> )            | 38±14   | 36±15   | 0,399          |
| Edema (% de masa del VI)               | 33±15   | 28±16   | 0,088          |
| OMV (% de masa del VI)                 | 0,7 [0-4,2]                                   | 0 [0-1,5]                                     | 0,021          |
| TI (% de masa del VI)                  | 24±15   | 17±12   | 0,019          |
| Hemorragia (n de segmentos)            | 0 [0-2]                                       | 0 [0-0,8]                                     | 0,010          |
| <b><u>RMC al sexto mes</u></b>         |   |   |                |
| FEVI (%)                               | 55±13   | 61±10   | 0,009          |
| IVTSVI (ml/m <sup>2</sup> )            | 36±20   | 30±13   | 0,043          |
| OMV (% de masa del VI)                 | 0 [0-0]                                       | 0 [0-0]                                       | 0,658          |
| TI (% de masa del VI)                  | 17±12   | 17±10   | 0,885          |

EpCAM: *epithelial cell adhesion molecule*. FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo. IVTSVI: índice del volumen telesistólico del ventrículo izquierdo. OMV: obstrucción microvascular. RMC: resonancia magnética cardíaca. TI: tamaño de infarto. VI: ventrículo izquierdo.

En un análisis univariante, la concentración de EpCAM [odds ratio (OR) = 0,58; intervalo de confianza del 95% (IC95%), 0,38-0,88;  $p = 0,011$ ], la clasificación del flujo TIMI previo a la angioplastia percutánea (OR = 0,73; IC95%, 0,52-1,00;  $p = 0,049$ ) y el número mínimo de eosinófilos (OR = 0,99; IC95%, 0,98-1,00;  $p = 0,040$ ) se relacionaron de forma significativa con la presencia de OMV. No obstante, cuando se incluyeron todas las variables clínicas iniciales en un modelo de regresión logística multivariante, sólo la concentración de EpCAM se relacionó de forma independiente con la OMV (OR = 0,55; IC95%, 0,35-0,87;  $p = 0,010$ ).

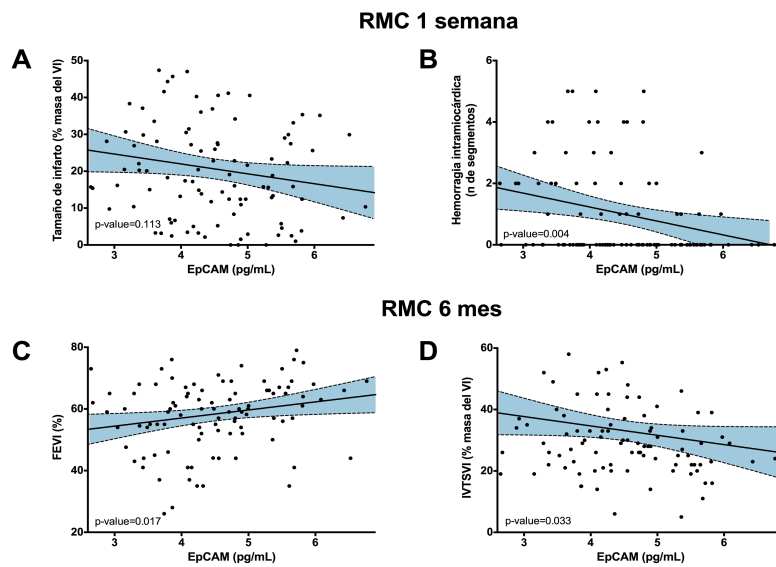
Con respecto a las variables obtenidas en los estudios de RMC realizados a los seis meses, los pacientes con una concentración de EpCAM por debajo de la mediana presentaban una menor FEVI y un mayor volumen telesistólico del ventrículo izquierdo (Tabla 2). La FEVI a los seis meses (OR = 1,05; IC95%, 1,01-1,09,  $p = 0,012$ ) y el índice de volumen telesistólico del ventrículo izquierdo a los 6 meses (OR = 0,97; IC95%, 0,95-0,99;  $p = 0,048$ ) se relacionaron de manera significativa con una concentración baja de EpCAM.

Tras el ajuste multivariante con todas las variables clínicas iniciales, la concentración sérica de EpCAM siguió relacionándose de forma inversa y significativa con la OMV (Figura 18), el tamaño del infarto (Figura 19A) y la hemorragia intramiocárdica (Figura 19B) analizados en estudios de RMC realizados una semana después del IAM. También se observó una relación positiva significativa entre la concentración sérica de EpCAM y la FEVI a los 6 meses (Figura 19C) y una relación negativa con el índice de volumen telesistólico del ventrículo izquierdo a los 6 meses (Figura 19D).



**Figura 18.** Relación de los niveles de EpCAM con respecto a la extensión de la OMV evaluada por RMC a la semana del evento cardiovascular.

EpCAM: *epithelial cell adhesion molecule*. OMV: obstrucción microvascular. VI: ventrículo izquierdo.



**Figura 19.** Asociación entre los niveles séricos EpCAM a las 24 horas de la reperusión con el tamaño del infarto (A) y la hemorragia intramiocárdica (B) a la semana del infarto así como con la FEVI (C) y el IVTSVI (D) a los 6 meses del infarto.

EpCAM: *epithelial cell adhesion molecule*. FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo. IVTSVI: índice de volumen telesistólico del ventrículo izquierdo. RMC: resonancia magnética cardiaca. VI: ventrículo izquierdo.

**Conclusión:** Los valores de EpCAM circulante tras un IAMEST reperfundido se relacionan con la presencia de la OMV cuantificada mediante RMC en las fase aguda así como con la remodelación ventricular adversa a largo plazo. A pesar de que los resultados son prometedores, se requiere estudios en cohortes más extensas de pacientes para confirmar el papel de EpCAM como biomarcador de la extensión de la OMV así como su potencial papel en la fisiopatología del daño microvascular.

### **3. Role of antiangiogenic VEGF-A<sub>165b</sub> in angiogenesis and systolic function after reperfused myocardial infarction (Anexo III)**

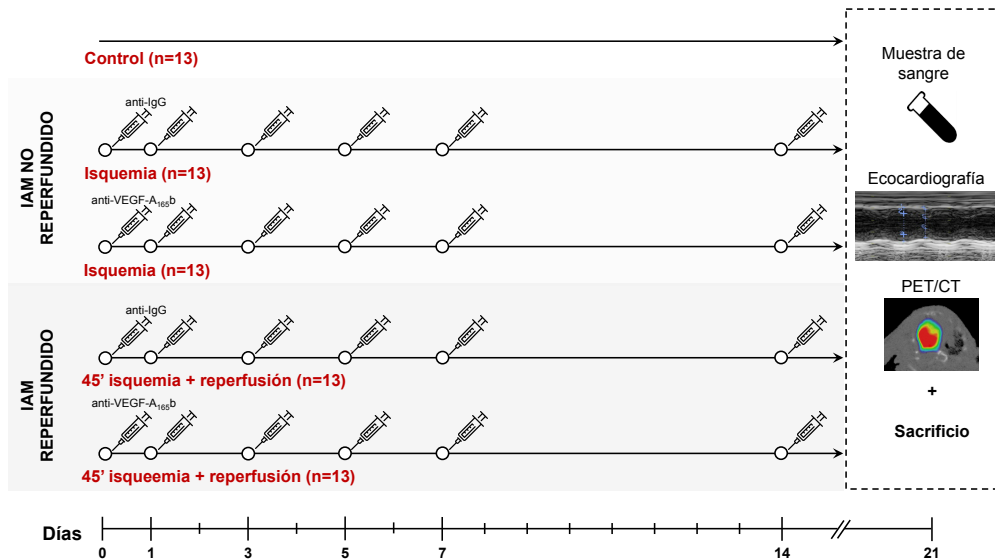
Ríos-Navarro C, Hueso L, Díaz A, et al. Role of antiangiogenic VEGF-A<sub>165b</sub> in angiogenesis and systolic function after reperfused myocardial infarction. Rev Esp Cardiol. 2021;74:131-39.

**Antecedentes y objetivo:** La angiogénesis está implicada en la recuperación de la microcirculación tras un IAM. Aunque el VEGF se considera uno de los factores pro-angiogénicos clásicos, recientemente se ha descrito una isoforma anti-angiogénica, la VEGF-A<sub>165b</sub>, en patologías como el cáncer y la retinopatía diabética. En un estudio previo del grupo, se demostró la implicación de esta isoforma en pacientes con IAMEST. En base a ello, el objetivo de este tercer trabajo fue investigar el papel que desempeña la isoforma VEGF-A<sub>165b</sub> y explorar su potencial como terapia complementaria a la reperfusión coronaria en modelos murinos de IAM reperfundido y no reperfundido. Adicionalmente, también se evaluó la relación entre la concentración sérica de VEGF-A<sub>165b</sub> en pacientes con IAMEST con la FEVI en fase crónica y con la aparición de eventos adversos.

**Métodos:** Para llevar a término los estudios experimentales, se indujo un IAM en ratones por ligadura de la arteria coronaria descendente anterior izquierda. Los ratones se separaron en 2 modelos de IAM: a) IAM no reperfundido (ligadura coronaria permanente, sin reperfusión); y b) IAM reperfundido (oclusión transitoria de 45 minutos de la arteria coronaria seguida de reperfusión). Además, también se incluyó un grupo control. A estos animales se les aplicó el mismo protocolo quirúrgico excepto por la oclusión de la arteria coronaria.

Los ratones se asignaron de manera aleatoria a los siguientes grupos de tratamiento: a) control; b) IAM no reperfundido tratado con

anticuerpo de isotipo anti-IgG; c) IAM no reperfundido tratado con anticuerpo bloqueador del VEGF-A<sub>165b</sub>; d) IAM reperfundido tratado con anticuerpo de isotipo anti-IgG, y e) IAM reperfundido tratado con anticuerpo bloqueador del VEGF-A<sub>165b</sub>. Cada grupo experimental constaba de 13 animales, por lo que el grupo de estudio definitivo estaba formado por 65 ratones (Figura 20).



**Figura 20.** Esquema de los grupos experimentales, el tratamiento y los estudios realizados a los animales incluidos en este estudio.

IAM: infarto agudo de miocardio. PET/TC: tomografía de emisión de positrones/tomografía computerizada. VEGF: *vascular endothelial growth factor*.

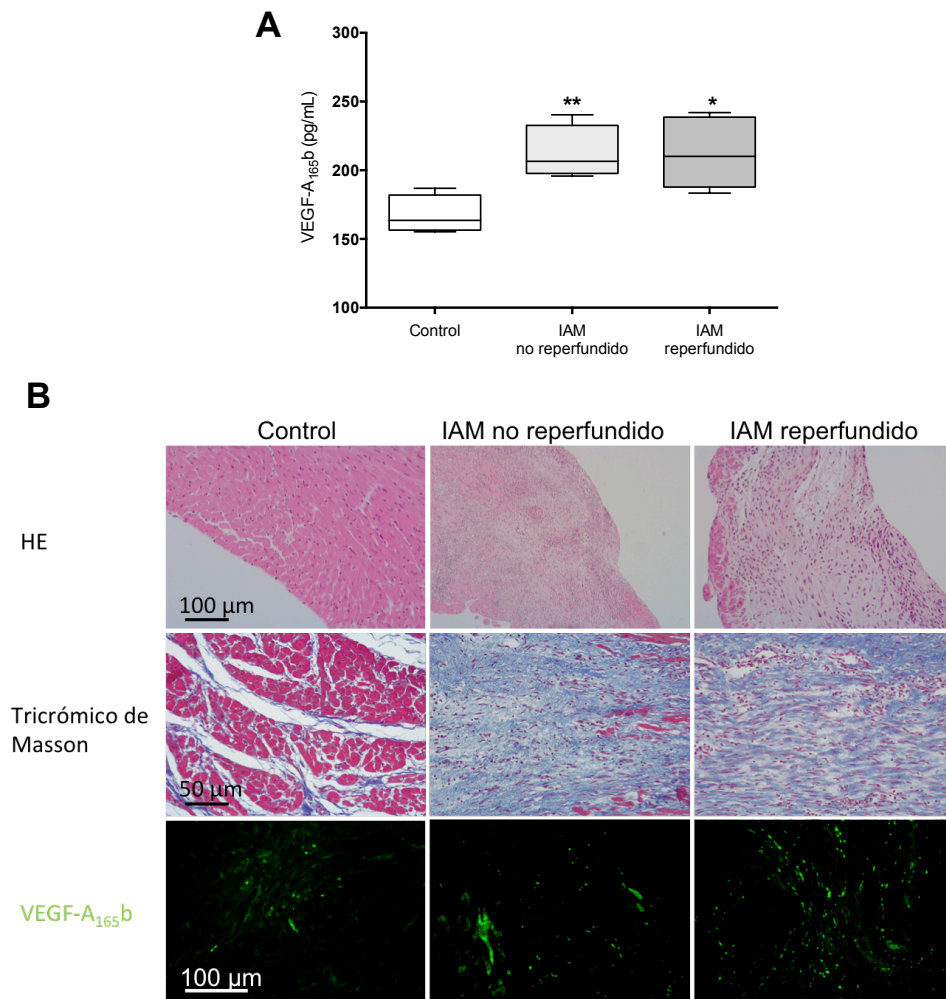
A los 21 días después de la inducción del IAM, se les realizó un estudio de tomografía por emisión de positrones/tomografía computerizada y una ecocardiografía transtorácica del ventrículo izquierdo con la finalidad de evaluar la función sistólica, se extrajo una muestra de sangre para la determinación de los niveles de VEGF-A<sub>165b</sub> en suero y se sacrificó a los animales (Figura 20). A continuación, se aisló el corazón y se incubó con una solución de

2,3,5-trifeniltetrazolio para cuantificar el tamaño del infarto. Asimismo se guardaron muestras del miocardio infartado para realizar estudios histológicos y de western blot.

Los estudios clínicos se realizaron en una cohorte de 104 pacientes con un primer IAMEST tratados con angioplastia primaria. La concentración sérica de VEGF-A<sub>165</sub> se determinó 24 horas tras la reperfusión coronaria. Todos los pacientes incluidos en este estudio fueron sometidos a un estudio de RMC a los seis meses del evento cardiovascular y se les realizó un registro de eventos adversos (definidos como muerte, insuficiencia cardíaca o reinfarto) durante el seguimiento.

**Resultados:** En ambos modelos experimentales, los niveles séricos de VEGF-A<sub>165b</sub> habían aumentado a los 21 días de la inducción del IAM (Figura 21A). Además, se obtuvo una correlación inversa entre la concentración sérica del VEGF-A<sub>165b</sub> y la FEVI y la fracción de acortamiento del ventrículo izquierdo (ambos parámetros determinados mediante ecocardiografía transtorácica).



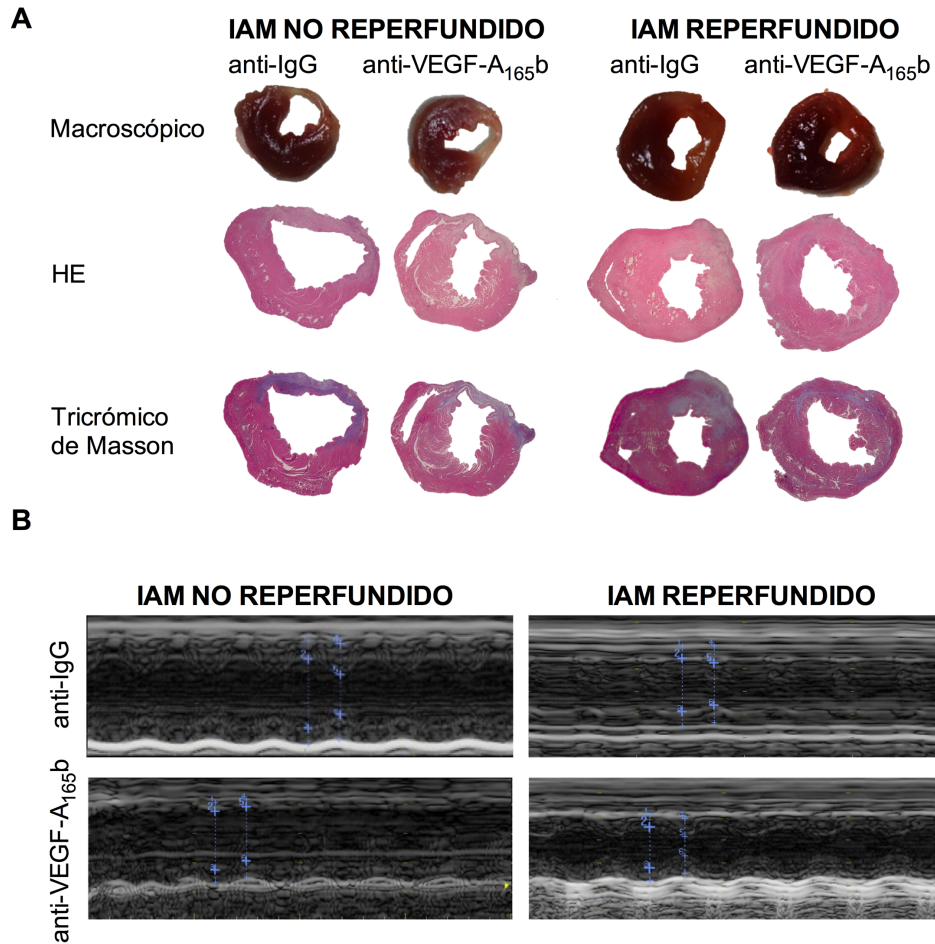


**Figura 21.** Los niveles séricos (A) y miocárdicos (B) de VEGF-A<sub>165b</sub> aumentan en modelos experimentales de IAM. Los datos continuos distribuidos normalmente se expresan como media  $\pm$  desviación estándar y se analizaron mediante análisis ANOVA de una vía seguido de la prueba de Bonferroni. \*p-valor<0,05, \*\*p-valor<0,01 vs. control.

HE: hematoxilina-eosina. IAM: infarto agudo de miocardio. VEGF: *vascular endothelial growth factor*.

Los estudios de inmunofluorescencia revelaron que, aunque se observó una expresión constitutiva débil del VEGF-A<sub>165b</sub> en el miocardio, la presencia de esta nueva isoforma era mayor en las áreas de infarto de ambos grupos de IAM (Figura 21B). Además, la inmunofluorescencia de doble marcado confirmó la expresión del VEGF-A<sub>165b</sub> en células CD31+ (marcador específico de células endoteliales).

Respecto al efecto terapéutico del bloqueo de la isoforma VEGF-A<sub>165b</sub> en ambos modelos experimentales, se observó que en el modelo de IAM reperfundido, el tratamiento con un anticuerpo específico anti-VEGF-A<sub>165b</sub> produjo una mejora de la FEVI y de la fracción de acortamiento del ventrículo izquierdo comparado con los animales tratados con anticuerpo anti-IgG. Por contra, a pesar del bloqueo del VEGF-A<sub>165b</sub>, no se observó ninguna diferencia en la función sistólica entre los dos grupos experimentales de IAM no reperfundido (Figura 22B).



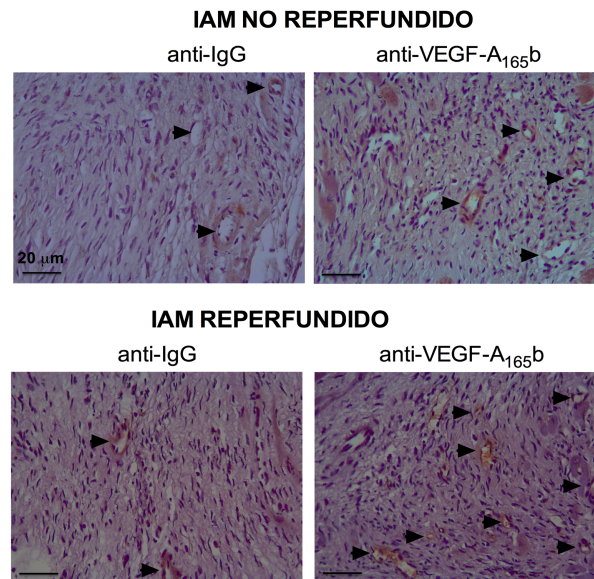
**Figura 22.** Efecto del bloqueo de la isoforma VEGF-A<sub>165b</sub> sobre el tamaño de infarto (A) y la función sistólica evaluada por ecocardiografía (B) en modelos murinos de IAM.

HE: hematoxilina-eosina. IAM: infarto agudo de miocardio. VEGF: *vascular endothelial growth factor*.

A continuación, se realizó el análisis macroscópico de los corazones aislados de los 4 grupos experimentales. El tratamiento con un anticuerpo específico anti-VEGF-A<sub>165b</sub> en el modelo de IAM reperfundido redujo el tamaño del infarto comparado con el tratamiento con anticuerpo anti-IgG, pero no se detectaron cambios

en el grosor de la pared infartada. En cambio, en el modelo de IAM no reperfundido, el bloqueo de la isoforma anti-angiogénica VEGF-A<sub>165b</sub> no tuvo ningún efecto en el tamaño del infarto ni en el grosor de la pared infartada (Figura 22A).

A continuación, se cuantificó la densidad microvascular en los cuatro grupos experimentales mediante inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo anti-CD31 (marcador específico de las células endoteliales). En los modelos de IAM reperfundido, la densidad de los capilares fue considerablemente mayor en los animales tratados con anticuerpo anti-VEGF-A<sub>165b</sub> comparado con anti-IgG. Contrariamente, el bloqueo del VEGF-A<sub>165b</sub> no produjo ningún cambio en la densidad de los capilares en los grupos a los que se aplicó el modelo de IAM no reperfundido (Figura 23).



**Figura 23.** Efecto de la neutralización de la isoforma VEGF-A<sub>165b</sub> sobre la densidad microvascular.

IAM: infarto agudo de miocardio. VEGF: *vascular endothelial growth factor*.

Por último, en la cohorte de pacientes, se dividió a los pacientes con IAMEST según si la FEVI estaba deprimida o preservada (Bodí et al. 2016; Gavara et al. 2018). Se detectó una menor concentración del VEGF-A<sub>165b</sub> circulante al cabo de 24 horas de la reperfusión coronaria en pacientes con un FEVI preservada en la RMC realizada a los 6 meses.

Durante el seguimiento (mediana: 186 semanas; intervalo [33-242] semanas), se produjeron 21 eventos cardiovasculares adversos (5 muertes cardíacas, 9 IAM no mortales, y 7 reingresos por insuficiencia cardíaca). Los pacientes con eventos cardiovasculares adversos mostraron mayor concentración sérica del VEGF-A<sub>165b</sub> comparado con los pacientes sin eventos. Además, la concentración del VEGF-A<sub>165b</sub> superior a 405 pg/ml (media) se relacionó estrechamente con un aumento de la probabilidad de aparición de evento adverso.

**Conclusiones:** Los niveles séricos y miocárdicos de VEGF-A<sub>165b</sub> se encuentran elevados en modelos murinos de IAM. En los estudios experimentales y clínicos, los valores séricos elevados de VEGF-A<sub>165b</sub> se asocian con una peor función sistólica. La neutralización del factor VEGF-A<sub>165b</sub> *in vivo* previene la reducción de la función sistólica, disminuye el tamaño de infarto y mejora la angiogénesis en el modelo de IAM reperfundido, pero no en el de IAM no reperfundido. En consecuencia, el bloqueo de la isoforma anti-angiogénica VEGF-A<sub>165b</sub> representa una potencial terapia co-adyuvante a la reperfusión coronaria.



## **V.- DISCUSIÓN**





El IAM constituye una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en nuestro entorno. Como consecuencia del aumento de la esperanza de vida, esta tendencia será más acusada en los próximos años (OMS, 2014).

El IAM se produce por una oclusión aguda de la arteria coronaria debido a la liberación de un trombo procedente de una placa de ateroma inestable. Sin duda, la terapia de elección es la reperfusión temprana de la arteria ocluida, idealmente mediante técnicas percutáneas. Este abordaje ha demostrado una reducción del tamaño de infarto, un menor remodelado ventricular adverso, una mejora en la función sistólica a largo plazo y, más importante aún, un menor número de eventos adversos a largo plazo (Ibáñez, et al. 2015; Niccoli, et al. 2016). Sin embargo, a pesar de que son innumerables los efectos beneficiosos que ejerce la rápida revascularización de la arteria ocluida, también tiene asociados una serie de efectos negativos conocidos como daño por reperfusión.

Tanto en modelos experimentales como en pacientes, uno de los hallazgos relacionados con la reperfusión es el daño a nivel de la microvasculatura (Hervás et al. 2015; Ibáñez et al. 2015; Konijnenberg et al. 2020). A pesar de una revascularización completa a nivel epicárdico, en un número considerable de pacientes se ha observado por técnicas de RMC la aparición de una zona de hipoperfusión dentro de la zona infartada (Bodí et al. 2017; Ibáñez et al. 2019). A este fenómeno se le conoce como OMV y se ha relacionado en cohortes extensas de pacientes con IAMEST con una dilatación del ventrículo izquierdo y con un peor pronóstico de los pacientes (Bodí et al. 2017; de Waha et al. 2017; Hamirani et al. 2014; van Kranenburg et al. 2014). En consecuencia, en esta Tesis Doctoral, nos hemos planteado profundizar en el mejor entendimiento de la fisiopatología y el diagnóstico de la disfunción de la

microvasculatura coronaria tras un IAM, así como potenciales mecanismos terapéuticos para su reparación.

## **1. Efecto del daño por isquemia-reperfusión sobre la pared de la arteria epicárdica**

El rápido reestablecimiento del flujo coronario al miocardio isquémico comporta una serie de efectos deletéreos, conocidos como daño por reperfusión, y en el que participan diversos mecanismos celulares y moleculares tales como las especies reactivas de oxígeno, la acumulación intracelular de iones, el sistema inmune o la apoptosis (Hausenloy et al. 2013; Heusch. 2020; Ibáñez et al. 2015; Toldo et al. 2018).

Uno de los fenómenos relacionados con el daño por reperfusión es la falta de una completa reperfusión a nivel miocárdico a pesar de la completa revascularización de la arteria epicárdica (Ibáñez et al. 2019; Konijnenberg et al. 2020; Ríos-Navarro et al. 2019). En su fisiopatología intervienen diferentes mecanismos de forma simultánea y secuencial, siendo uno de los actores principales la circulación coronaria. Por consiguiente, en este primer objetivo nos centramos en examinar el daño por reperfusión sobre las arterias epicárdicas.

### **1.1. Alteraciones en la estructura de las arterias epicárdicas en la cardiopatía isquémica**

Una de las causas principales del IAM es la liberación de un trombo procedente de una placa de ateroma inestable. Es por ello que, en el contexto clínico, la aterosclerosis presente en las arterias coronarias es un hallazgo frecuente en los pacientes post-IAM (Libby et al. 2019). Asimismo y como se ha comentado previamente, el tratamiento de elección tras un IAM es la reperfusión de la arteria

ocluida, idealmente mediante técnicas percutáneas, y la posterior colocación de un stent. En modelos porcinos, se ha postulado el impacto negativo que provocan las técnicas percutáneas sobre la estructura de la pared de la arteria coronaria (Dashwood et al. 1999; Kim et al. 2019; Okamoto et al. 2001). En concreto, se ha descrito la migración masiva de células inflamatorias (preferentemente neutrófilos y macrófagos) así como la proliferación de miofibroblastos por la liberación de especies reactivas de oxígeno y quimiocinas tales como la interleucina-8. Esta cascada de eventos acaba derivando en la re-endarterización de la zona en fases avanzadas (tras un mes del procedimiento percutáneo).

Dado que las alteraciones acaecidas en la pared de arteria epicárdica debido exclusivamente al proceso de isquemia y posterior reperfusión no han sido exploradas con tanta profundidad, este fue el primero de los objetivos de esta Tesis Doctoral. La aterosclerosis coronaria y el procedimiento percutáneo que empleamos para la inducción del infarto en nuestro modelo porcino pueden provocar cierto daño en la pared de la arteria (Dashwood et al. 1999; Kim et al. 2019; Libby et al. 2019; Okamoto et al. 2001), en consecuencia, se tuvieron las siguientes precauciones a la hora de aislar las muestras de este estudio: en primer lugar, se utilizaron animales jóvenes (3 meses de edad) sin signos angiográficos ni microscópicos de aterosclerosis y, en segundo lugar, para evitar el daño causado por el balón de angioplastia para inducción de la isquemia, se aislaron muestras a una distancia mínima de 3 mm por encima y por debajo de la colocación del balón de angioplastia.

### 1.1.1. Daño sobre la capa íntima

La capa íntima está compuesta por la monocapa endotelial, la capa subendotelial y la lámina elástica interna (Sabra et al. 2021). De acuerdo con nuestros resultados, se detectan ligeros cambios en la monocapa endotelial durante la isquemia; en cambio, inmediatamente tras la reperfusión (grupo de 90 minutos de isquemia seguido de 1 minuto de reperfusión) se observa, mediante técnicas inmunohistoquímicas y de microscopía electrónica, prácticamente una completa denudación de células endoteliales (Rios-Navarro et al. 2021a) (Figura 24). Esta situación se exacerba en fases más avanzadas (1 mes tras la inducción del infarto) ya que, al igual que se evidenció en otros estudios (Dashwood et al. 1999; Okamoto et al. 2001), se produce la formación de una neo-íntima constituida principalmente por células endoteliales, fibroblastos y fibrina. Estos cambios se observan únicamente en la ADA (arteria responsable del infarto) y son más pronunciados en la región distal al punto de oclusión.

Las alteraciones en la monocapa endotelial probablemente participarán en la activación de plaquetas (por exposición de las fibras de colágeno de la capa subendotelial) y leucocitos. De hecho, nuestros resultados evidencian la adhesión de células inflamatorias en la porción distal de la ADA instantes después de la reperfusión coronaria (Rios-Navarro et al. 2021a). En línea con estos resultados, la presencia de células inflamatorias se ha descrito previamente en arterias coronarias humanas aisladas de pacientes no reperfundidos que murieron 48 horas después del inicio de la angina inestable (Kohchi et al. 1985; Mauriello et al. 2005). Señalar también que la activación de plaquetas y leucocitos en la zona distal a la oclusión coronaria debido al daño a nivel de la monocapa endotelial puede

inducir la formación de trombos así como *neutrophil extracellular traps* que, en definitiva, van a conducir a la aparición de OMV y episodios de reinfarto post-revascularización (Bouleti et al. 2015; Ibáñez et al. 2015; Ríos-Navarro et al. 2021b).

Por último, también hemos demostrado cambios a nivel de la lámina elástica interna, implicada en funciones mecánicas y de transporte de agua, nutrientes y electrolitos (Sandow et al. 2009). La caída en densidad de poros de la lámina elástica interna empieza en el grupo de 90 minutos de isquemia, se hace máxima tras una semana de reperfusión y vuelve a niveles de la arteria aislada del grupo control en fases crónicas (un mes post-IAM) (Ríos-Navarro et al. 2021a). Inicialmente pensamos que la resolución de los daños a nivel de la lámina elástica interna se podría deber a la formación de nuevas fibras elásticas. En cambio, esta hipótesis fue descartada debido a que la formación de nuevas fibras elásticas requiere un proceso muy complejo, que incluye la expresión de proteínas precursoras (tropoelastina) y una extensa reticulación (Cocciolone et al. 2018). Finalmente, la hipótesis que creemos más plausible es que después de un mes de reperfusión, el edema presente en la capa media se redujo significativamente y, por ende, la distensión de las fenestras de la lámina elástica interna disminuyó en gran medida.

### **1.1.2. Daño sobre la capa media**

La túnica media, encargada de regular el flujo sanguíneo que llega al miocardio, está conformada por capas circunferencialmente alineadas de células musculares lisas, con fibras de colágeno y elásticas (Sabra et al. 2021). En base a nuestros resultados, el daño en la túnica media se inició poco después de la revascularización, como se refleja por el aumento en el grosor de la capa media en comparación con las arterias epicárdicas aisladas del grupo control (en el cual se realizó el

abordaje percutáneo pero no se hinchó el balón de angioplastia). No obstante, este daño alcanzó su punto máximo una semana después de la reperfusión coronaria, como demuestra la desorganización en la distribución de las células musculares y el edema intersticial detectado en la porción distal de la ADA (Rios-Navarro et al. 2021a) (Figura 24), en contraste con las leves alteraciones presentes en la porción proximal de la ADA.

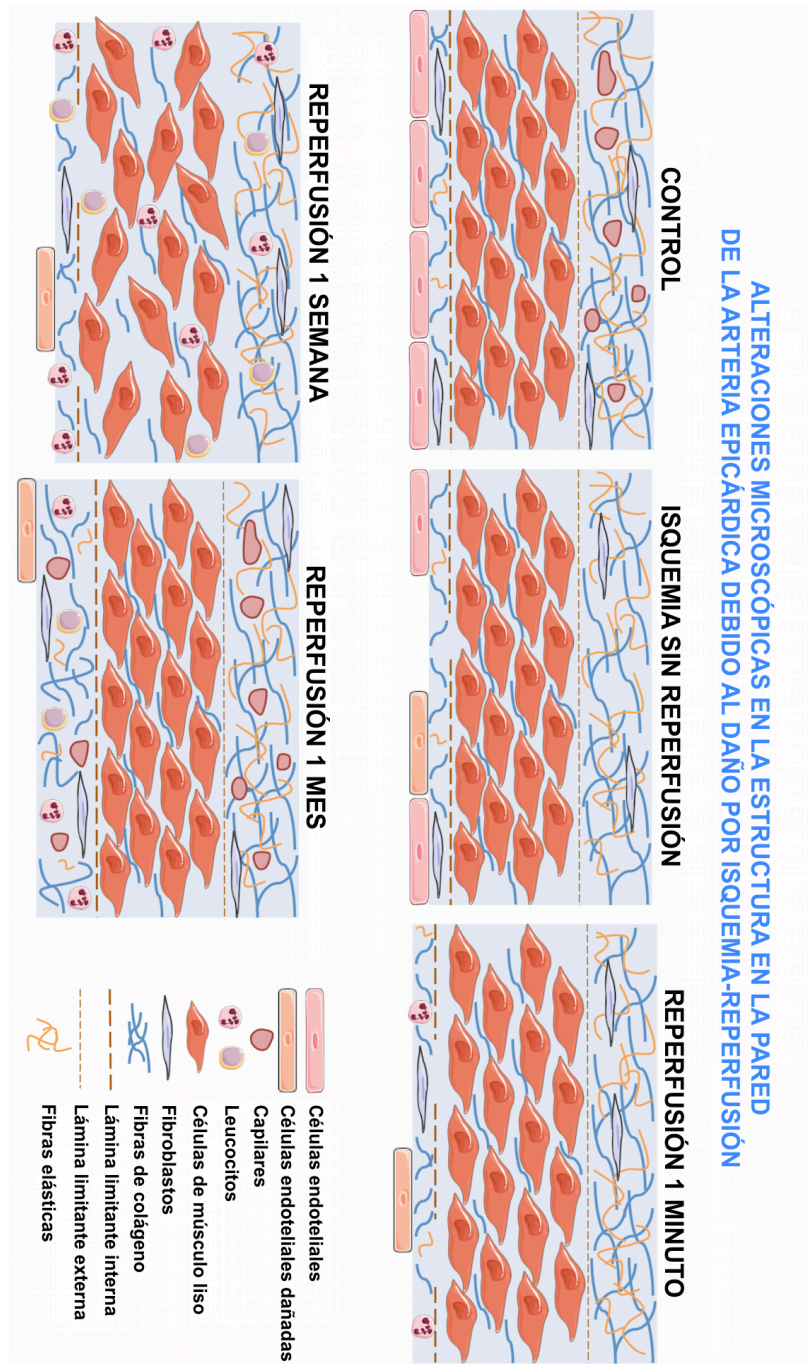
La aparición de un daño masivo a nivel de la monocapa endotelial tras la revascularización es paralela y puede ser el mecanismo subyacente al aumento de edema observado en la túnica media. Debido a que la túnica media participa en el control del tono vascular, su lesión a nivel microscópico puede provocar vasoespasmo y contractilidad muscular anormal. Ambos fenómenos también pueden participar en la aparición de zonas de hipoperfusión a pesar de la completa reperfusión a nivel epicárdico.

De hecho, en el laboratorio de hemodinámica, algunos pacientes post-IAMEST muestran un retraso en la progresión distal del contraste angiográfico. Esta entidad, conocida como fenómeno de flujo lento coronario, tradicionalmente se había asociado a enfermedad de los microvasos, anomalías endoteliales, aterosclerosis subclínica e inflamación (Alvarez et al., 2018; Wang et al. 2011). Sin embargo, nuestros resultados sugieren que el daño en la túnica media de la arteria responsable del infarto también podría participar en la etiopatogenia de este fenómeno.

### **1.1.3. Daño sobre la capa adventicia**

En la capa adventicia, encontramos una red de capilares, llamados *vasa vasorum*, encargados de vascularizar las células musculares localizadas en los dos tercios externos de la capa media (Xu et al.

2015; Sabra et al. 2021). En nuestros resultados, hallamos una severa disminución en el número de microvasos en la túnica adventicia en ambas regiones de la ADA (distal y proximal a la oclusión) en comparación con las arterias aisladas 90 minutos después de la oclusión. Esta reducción de los *vasa vasorum* persistió durante la primera semana y el número de *vasa vasorum* se recuperó a niveles de control un mes después de la reperfusión (Ríos-Navarro et al. 2021a) (Figura 24). Esta disminución de los *vasa vasorum* compromete severamente el suministro de nutrientes y oxígeno a las células musculares ubicadas en la túnica media, probablemente afectando su contractilidad. Al igual que en los *vasa vasorum*, la densidad de microvasos en el miocardio infartado también disminuyó después de una isquemia de 90 minutos y se restauró casi por completo un mes después de la revascularización coronaria (Ríos-Navarro et al., 2018). La recuperación tanto de *vasa vasorum* en la túnica adventicia como de la microvasculatura del miocardio en las fases crónicas posteriores al infarto de miocardio podría deberse al rápido aumento de los niveles circulantes de factores pro-angiogénicos (factor inducible por hipoxia-1A, VEGF y angiopoyetina-2) (Lee et al. 2000; Ríos-Navarro et al. 2018; Wu et al. 2009). Por tanto, la promoción de la angiogénesis podría ser una prometedora terapia co-adyuvante a la reperfusión coronaria para mejorar la densidad de microvasos no sólo a nivel del músculo cardíaco sino también en los *vasa vasorum* de las arterias epicárdicas.



**Figura 24.** Representación de los cambios histológicos que ocurren en la pared de la arteria coronaria responsable del infarto a lo largo del proceso de ischemia y posterior reperfusion.



## **2. Diagnóstico del daño microvascular: Exploración de un nuevo biomarcador**

A nivel clínico, técnicas invasivas en el laboratorio de hemodinámica así como técnicas de imagen cardíaca como la ecocardiografía y la RMC son claves para el diagnóstico del daño microvascular. En concreto, actualmente, la técnica más fiable para determinar la presencia y extensión de la OMV es la RMC con realce tardío de gadolinio. En estos estudios, la OMV se define como aquellas regiones con hipocaptación dentro del núcleo de un área infartada hiperrealzada (Allencherril et al. 2019; Bodí et al. 2017; Konijnenberg et al. 2020). Sin embargo, también existe otra batería de marcadores universales para predecir o diagnosticar la extensión de la OMV.

En cuanto a los parámetros puramente clínicos, el retraso en la reperfusión, la presencia de diabetes mellitus, la elevación residual del segmento ST en el electrocardiograma después de la revascularización y la clase Killip predicen la presencia de la OMV (Husser et al. 2013; Redfors et al. 2021; Rommel et al. 2014). Sin embargo, en esta Tesis Doctoral nos vamos a centrar en los biomarcadores disponibles para diagnosticar y predecir la OMV en pacientes con IAMEST.

### **2.1. Biomarcadores para detectar el daño microvascular**

Dentro de los posibles marcadores para predecir la aparición de OMV, los que más utilidad van a tener en la práctica asistencial son aquellos que se miden de forma rutinaria en los laboratorios clínicos. Por ejemplo, niveles elevados de neutrófilos y monocitos así como un bajo recuento de linfocitos y eosinófilos a la llegada al hospital se asocian con una mayor extensión de OMV en fase aguda (Husser et al. 2011; Ríos-Navarro et al. 2018). Valores pico elevados dentro de

los primeros días post-IAM de marcadores tales como la troponina ultrasensible, la creatin quinasa, la proteína C reactiva, la mieloperoxidasa o la lactato deshidrogenasa también se correlacionan significativamente con la OMV evaluada por RMC (Feistritzer et al. 2016; Stamboul et al. 2017; Younger et al. 2007). Sin embargo, estos índices son inespecíficos y no están relacionados directamente con la fisiopatología del daño microvascular. En consecuencia, nos propusimos investigar nuevas moléculas que ayudaran no sólo a entender la fisiopatología de este fenómeno sino también ser un biomarcador para su diagnóstico temprano.

Tras un IAM y con el objetivo de reparar el daño microvascular, se ha postulado la activación del proceso de angiogénesis (Badimon et al. 2018). Recientemente se ha evidenciado en una cohorte de 147 pacientes con IAMEST que los niveles circulantes de VEGF, molécula con actividad pro-angiogénica, se asocian de forma independiente con la extensión de la OMV y con los cambios en la FEVI (García et al. 2019). En línea con este estudio, nos planteamos esclarecer la posible relación de EpCAM con la OMV tras un IAMEST reperfundido.

### **2.1.1. EpCAM y daño microvascular post-IAMEST**

EpCAM, una glucoproteína superficial transmembrana de tipo I, se encuentra en la membrana basolateral de muchas células epiteliales normales y se encuentra sobreexpresada en algunas células neoplásicas (Huang et al. 2018; Schnell et al. 2013). Se ha mostrado la asociación entre la expresión aumentada de EpCAM con la metástasis en tumores epiteliales y una supervivencia reducida de los pacientes (Mohtar et al. 2020). De hecho, actualmente algunos ensayos clínicos tienen como objetivo evaluar la eficacia de anticuerpos bloqueadores dirigidos contra EpCAM (adecatumumab o edrecolomab) como monoterapia o tratamiento de combinación para

algunos cánceres (Schmidt et al. 2012; Punt et al. 2002). No obstante, su implicación en el campo de la Cardiología es escasa.

En base a nuestros resultados (Rios-Navarro et al. 2021c), en una cohorte de 106 pacientes con IAMEST reperfundidos por técnicas percutáneas, niveles disminuidos de la concentración sérica de EpCAM se ha asociado con mayores valores de OMV y hemorragia intramiocárdica, ambos valores cuantificados por RMC en fase aguda (tras una semana del evento cardiovascular). Además, en un análisis multivariante donde se incluyeron variables clínicas y algunos biomarcadores (como la troponina y el recuento mínimo de eosinófilos), sólo la concentración de EpCAM a las 24 horas de la revascularización se relacionó de forma independiente con la OMV en fase aguda. De hecho, la concentración de EpCAM en suero es un predictor más potente de OMV en comparación con otros biomarcadores como son la troponina ultrasensible y el recuento mínimo de eosinófilos. Asimismo, en cuanto a parámetros de remodelación del ventrículo izquierdo en fase crónica, los pacientes con menores valores de EpCAM presentaban valores de FEVI más deprimidos (Figura 25).

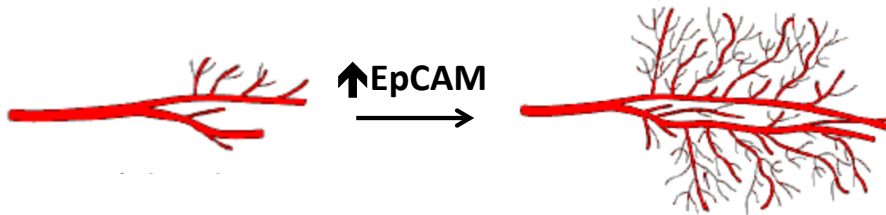
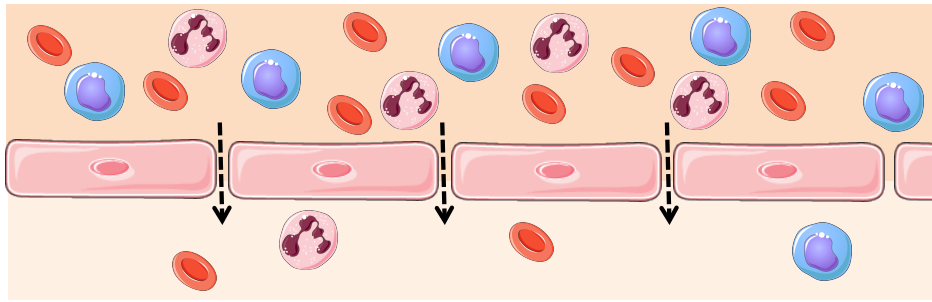
Según la base de datos *Human Protein Atlas*, a pesar de que la expresión de EpCAM es mucho más elevada en tejidos como el tracto gastrointestinal, en el músculo cardíaco también se ha detectado su expresión, aunque más leve, principalmente en células endoteliales. El mantenimiento de una perfecta integridad de la monocapa endotelial a través de uniones fuertes intercelulares es esencial dado que, si esta se pierde, conllevaría la aparición de edema y hemorragia intramiocárdica que, en última instancia, van a provocar la aparición de OMV (Ibáñez et al. 2015; Konijnenberg et al. 2020). Es por ello que, niveles más altos de esta proteína puede suponer una mayor

integridad endotelial (debido a su participación en las uniones entre células epiteliales), y, por ende, una menor extensión de hemorragia intramiocárdica y OMV (Figura 25).

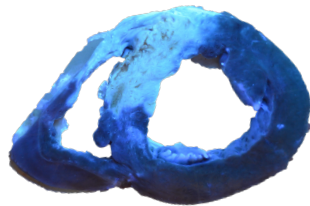
Una explicación alternativa a estos resultados radica en que se ha demostrado que EpCAM participa en la estimulación de la angiogénesis en distintos contextos. En un primer estudio llevado a término en una cohorte de 98 muestras de glioma, la sobreexpresión de EpCAM se relacionó con la malignidad del tumor y el aumento de densidad microvascular (Chen et al. 2014). Un segundo estudio realizado en cáncer de mama indica que EpCAM estimula la invasión cancerígena ya que la eliminación de esta molécula conlleva una menor formación de vasos, probablemente por su interferencia con la interleucina 8 (Sankpal et al. 2013). Por último, en pacientes con esteatohepatitis no alcohólica, se ha observado una correlación positiva entre dos moléculas pro-angiogénicas como son el VEGF y angiopoyetina-2 y los niveles de EpCAM (Siddiqui et al. 2020). En base a estos resultados y a falta de confirmación en el contexto del IAM, una segunda hipótesis de los resultados obtenidos es que EpCAM estimula la angiogénesis en el miocardio infartado, lo que daría como resultado una disminución en la OMV y un mejor remodelado ventricular (Figura 25).

Por último, señalar que nuestro objetivo no es incorporar EpCAM en la rutina clínica para el diagnóstico o la predicción de la OMV sino únicamente profundizar en el conocimiento del daño microvascular tras un IAMEST y abrir nuevas opciones diagnósticas y terapéuticas que deben ser validadas en el futuro tanto en cohortes más extensas de pacientes como en modelos experimentales.

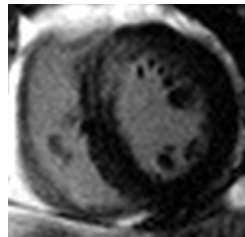
↑EpCAM → ↑Adhesión endotelial



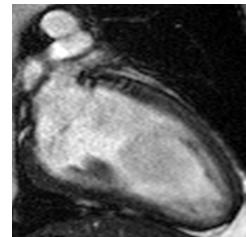
OMV NO EXTENSA



INFARTOS PEQUEÑOS



FEVI CONSERVADA



**Figura 25.** Tras un IAMEST, niveles elevados de EpCAM se asocian con una menor extensión de OMV probablemente por una mayor integridad de las células de la monocapa endotelial y por la activación de la angiogénesis.

EpCAM: *epithelial cell adhesion molecule*. FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo. IAMEST: infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST. OMV: obstrucción microvascular.

### **3. Implicación de la angiogénesis en la reparación del daño microvascular tras un IAMEST**

En estudios clínicos y experimentales se ha evidenciado la reparación espontánea del daño microvascular en fases avanzadas tras un IAMEST (Allencherril et al. 2019; Hervás et al. 2015; Ríos-Navarro et al. 2018). Además existen estudios que concluyen que la resolución de la OMV en fase crónica en pacientes con IAMEST tiene efectos beneficiosos en términos de la estructura y función cardiaca (Bodí et al. 2006; Bodí et al. 2017; Ibañez et al. 2019).

La angiogénesis se ha postulado como un potente mecanismo para reparar la pérdida de densidad microvascular tras un IAM (Badimon et al. 2018; Sabra et al. 2021). Desde etapas muy iniciales del IAM, se ha descrito el aumento en la expresión de factores pro-angiogénicos tales como el factor inducible por hipoxia-1A, el VEGF-A o la angiopoyetina-2 (Lee et al. 2000; Ríos-Navarro et al. 2018; Wu et al. 2009). Entre estos factores, el VEGF-A se considera un factor pro-angiogénico clave del cual se ha probado la existencia de diferentes isoformas. Recientemente se ha documentado la isoforma anti-angiogénica VEGF-A<sub>165b</sub> en estados angiogénicos patológicos, entre los que destaca la retinopatía diabética, la arteriopatía periférica y el cáncer (Bates et al. 2002; Bunni et al. 2015; Ganta et al. 2017; Karsten et al. 2020; Kikuchi et al. 2014; Ved et al. 2017).

#### **3.1. Participación de la isoforma VEGF-A<sub>165b</sub> en pacientes con IAMEST**

En el contexto de la cardiopatía isquémica, se constató un aumento en la expresión génica de la isoforma VEGF-A<sub>165b</sub> en células endoteliales senescentes y se asoció con una mayor prevalencia e incidencia de enfermedad coronaria (Latorre et al. 2018). No

obstante, nuestro grupo fue el primero en explorar la implicación de la isoforma VEGF-A<sub>165b</sub> en pacientes con IAMEST (Hueso et al. 2017). En este estudio se empleó un grupo de pacientes control (n = 23) y otro grupo de pacientes con IAMEST (n = 50) y se comprobó que los valores de VEGF-A<sub>165b</sub> eran máximos a las 24 y 96 horas de la reperfusión. Asimismo, al estudiar la asociación de VEGF-A<sub>165b</sub> con la función cardíaca analizada mediante RMC en fase aguda (una semana del evento cardiovascular) se detectó una asociación entre mayores valores plasmáticos de esta isoforma 24 horas después de la reperfusión y una FEVI más deprimida tras una semana (Hueso et al. 2017).

Además, se completó el estudio con muestras de corazón aislado de autopsias de pacientes con un IAM crónico (más de 6 meses de evolución). Se encontró que esta isoforma está presente también en autopsias de pacientes con infarto de más de seis meses de evolución con expresión principalmente en las células endoteliales del área infartada. Respecto al receptor sobre el cuál esta isoforma está realizando su acción, se halló la colocalización de este factor con el receptor VEGF receptor 2 (Hueso et al. 2017).

La novedad de la presente Tesis Doctoral radica en que la implicación de esta isoforma se estudia en una cohorte más extensa de pacientes con IAMEST (n = 104) y se evalúa la asociación que tiene este novedoso factor con la función sistólica a largo plazo (evaluada por RMC a los 6 meses del infarto) y con el pronóstico de los pacientes. En base a nuestros resultados, una concentración sérica elevada de VEGF-A<sub>165b</sub> a las 24 horas de la revascularización se relaciona con una FEVI más deprimida en el estudio de RMC en la fase crónica (6 meses) y con la aparición de eventos adversos (definidos como muerte, re-infarto e ingreso por insuficiencia cardíaca) durante el

seguimiento (Ríos-Navarro et al. 2021d). El valor pronóstico de los niveles circulantes de VEGF-A<sub>165b</sub> para la predicción de eventos en pacientes con IAMEST ya había sido evaluado en una cohorte más reducida (n = 23) (Harada et al. 2018). En línea con nuestros resultados, este estudio también concluyó que el ratio VEGF-A<sub>165b</sub>/VEGF podría ser una buena herramienta para evaluar el pronóstico en este grupo de pacientes.

En conjunto, una mayor concentración sérica de VEGF-A<sub>165b</sub> a las 24 horas de la revascularización se asocia con una peor función sistólica (evaluada mediante la FEVI por RMC) en fase aguda y crónica así como con un peor pronóstico de los pacientes con IAMEST.

### **3.2. Papel de la isoforma VEGF-A<sub>165b</sub> en modelos murinos de IAM**

Una vez esclarecida la implicación de esta isoforma en pacientes con IAMEST y su asociación con la función sistólica y el pronóstico de los pacientes, nos planteamos evaluar primero su implicación en modelos experimentales murinos de IAM y después investigar el potencial efecto beneficioso de su bloqueo para reparar el daño microvascular.

#### **3.2.1. Optimización de los modelos experimentales murinos de IAM**

A pesar de que no forma parte directamente de los objetivos de la presente Tesis Doctoral, indirectamente para llevar a término este objetivo, se requirió en primer lugar poner a punto en nuestro grupo dos modelos murinos de IAM: IAM no reperfundido (oclusión permanente de la arteria) e IAM reperfundido (oclusión transitoria seguida de reperfusión). Siguiendo las indicaciones de artículos previos que describían en detalle ambos modelos (Kolk et al. 2009;



Redel et al. 2008; Xu et al. 2014), confirmamos la correcta oclusión de la arteria tanto por los cambios registrados en el electrocardiograma como visualmente por el cambio de color del miocardio isquémico. Además, previamente al sacrificio (a los 21 días de la inducción del IAM) se les realizó una ecocardiografía transtorácica para evaluar la función sistólica y una prueba de tomografía por emisión de positrones/tomografía computarizada. Una vez aislado el corazón se cuantificó el tamaño de infarto de forma macroscópica utilizando la tinción con cloruro de trifeniltetrazolio, ya optimizado previamente en el modelo porcino (Hervás et al. 2015) y microscópica empleando las tinciones histológicas de hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson.

Como era de esperar debido al efecto ventajoso de la revascularización (Ibáñez, et al. 2015; Niccoli, et al. 2016), en comparación con el grupo con IAM no reperfundido, en los ratones sometidos a reperfusión coronaria el grosor de la pared infartada era mayor mientras que la FEVI y el tamaño del infarto estaban disminuidos (Figura 26). Por lo tanto, una vez puesto a punto ambos modelos murinos, se investigó en ellos la implicación de esta novedosa isoforma anti-angiogénica.

### **3.2.2.Participación del VEGF-A<sub>165b</sub> en modelos murinos de IAM**

A pesar de que la participación de la isoforma VEGF-A<sub>165b</sub> en modelos murinos de otras patologías ya ha sido explorada (Beazley-Long et al. 2013; Magnussen et al. 2010; Oltean et al. 2015; Stevens et al. 2018), hasta la fecha, no existían estudios que describan su participación en modelos murinos de IAM. En base a nuestros resultados, la concentración del VEGF-A<sub>165b</sub> circulante aumentó en ambos modelos murinos, y una mayor concentración sérica de este factor anti-angiogénico se relacionó con una peor función sistólica

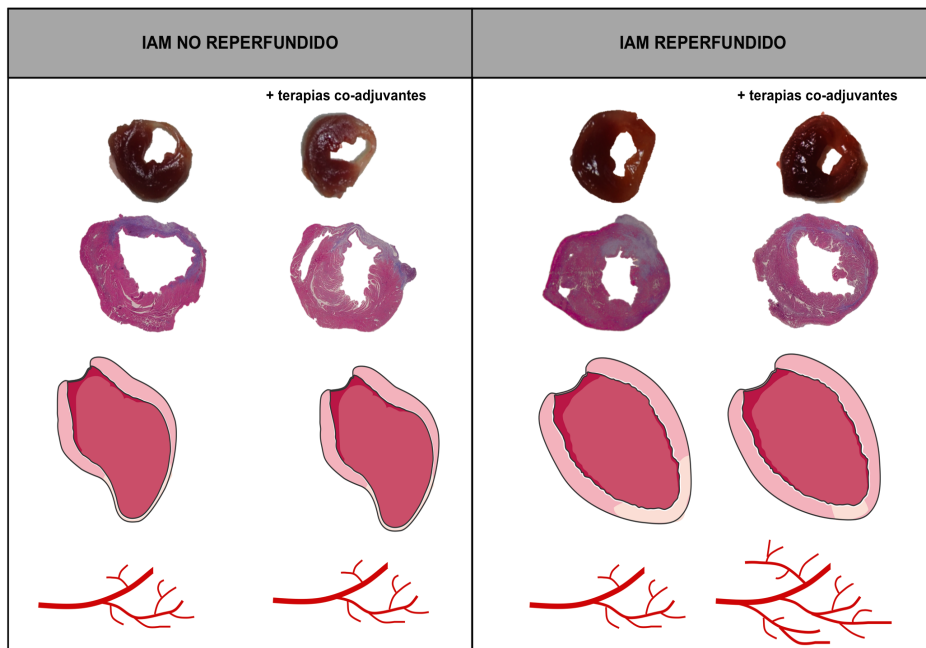
(evaluada por ecocardiografía) (Ríos-Navarro et al. 2021d). Estos resultados están en línea con los obtenidos en la clínica donde se demuestra que los pacientes con valores más elevados de esta isoforma presentan una FEVI más deprimida (Hueso et al. 2017; Ríos-Navarro et al. 2021d).

Además, cuando se evaluó el área infartada de ambos modelos murinos, se detectó un aumento de la expresión del VEGF-A<sub>165b</sub>, principalmente en las células endoteliales en comparación con el grupo control (Ríos-Navarro et al. 2021d). La co-localización de la isoforma VEGF-A<sub>165b</sub> en células endoteliales se ha descrito previamente en tejido tanto de ratón (Magnussen et al. 2010; Oltean et al. 2015) como de humano (Hueso et al. 2017).

### **3.2.3.Efecto del bloqueo de VEGF-A<sub>165b</sub> en modelos murinos de IAM**

Con respecto a los resultados clínicos (Hueso et al. 2017) y experimentales previos, se especuló que una concentración alta del VEGF-A<sub>165b</sub> circulante podría obstaculizar la tendencia endógena hacia la recuperación de la perfusión microvascular. De hecho, cuando se utilizó un ensayo *in vitro* de diferenciación de células endoteliales, la neutralización del VEGF-A<sub>165b</sub> aumentó la capacidad angiogénica del suero de los pacientes con IAMEST (Hueso et al. 2017). En realidad, en un estudio previo realizado con un modelo murino de arteriopatía periférica se puso en evidencia que el tratamiento con un anticuerpo bloqueador específico contra la isoforma del VEGF-A<sub>165b</sub> revertía la revascularización alterada en la extremidad posterior con isquemia (Ganta et al. 2017; Kikuchi et al. 2014). Por lo tanto, el siguiente paso consistió en evaluar el potencial efecto beneficioso del bloqueo del VEGF-A<sub>165b</sub> sobre la reparación de la microcirculación en ambos modelos murinos de IAM.

En base a nuestros resultados, se observó que el bloqueo de la actividad del VEGF-A<sub>165b</sub> en ratones sometidos a 45 minutos de isquemia seguido de 21 días de reperfusión coronaria aumentaba considerablemente la densidad de los capilares, disminuía el tamaño del infarto y mejoraba la función sistólica. Contrariamente, no se observaron estos efectos favorables en el modelo de IAM no reperfundido (Ríos-Navarro et al. 2021d) (Figura 26). Por consiguiente, el VEGF-A<sub>165b</sub> puede representar un nuevo objetivo farmacológico complementario a la reperfusión coronaria (el actual tratamiento de referencia para pacientes con IAMEST); aunque, se requiere primero su validación en un modelo porcino (más cercano al humano), para posteriormente validarlo a la práctica clínica.



**Figura 26.** Efecto de la revascularización coronaria y la administración de terapias co-adyuvantes sobre el tamaño de infarto, el remodelado ventricular y la densidad microvascular.

IAM: infarto agudo de miocardio.

## **VI.- CONCLUSIONS**



1. In a controlled swine model of reperfused myocardial infarction (MI), abnormalities in the three main layers of the wall from infarct-related epicardial arteries start during ischemia, peak after coronary reperfusion, and are almost resolved at chronic phase.

2. In a controlled swine model of reperfused MI, the three main layers of the wall from infarct-related epicardial arteries, but not the non-infarct-related epicardial arteries, display severe damage, which is most pronounced in the region distal than proximal to the occlusion point.

3. In ST-segment elevation MI (STEMI) patients, circulating epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) levels determined 24 hours after revascularization are associated with cardiac magnetic resonance (CMR)-derived microvascular obstruction at acute phase.

4. In STEMI patients, circulating EpCAM levels determined 24 hours after revascularization correlate with worse systolic function at chronic phase.

5. The presence of circulating and myocardial vascular endothelial growth factor (VEGF)-A<sub>165b</sub> boosts in two murine models of MI (non-reperfused and reperfused) and are associated with more depressed systolic function evaluated by echocardiography. Its blockade promotes neoangiogenesis, reduces infarct extension, and improves systolic function in the reperfused, but not in the non-reperfused, murine MI model.

6. In STEMI patients, higher circulating VEGF-A<sub>165b</sub> values determined 24 hours after revascularization are associated with long-term depressed left ventricular ejection fraction evaluated by CMR and with a higher risk of cardiac events during follow-up.





## **VII.- CONCLUSIONES**



1. En un modelo controlado porcino de IAM reperfundido, los cambios en las tres capas de la pared de la arteria epicárdica responsable del infarto comienzan durante la isquemia, se hacen más pronunciados tras la reperfusión y se resuelven prácticamente en su totalidad en la fase crónica.

2. En un modelo controlado porcino de IAM reperfundido, las alteraciones en la pared de la arteria epicárdica responsable del infarto son más acusadas en la porción distal a la oclusión en comparación con la porción proximal, manteniéndose intacta la estructura de la pared de la arteria no responsable del infarto.

3. En pacientes con IAMEST, los niveles circulantes de EpCAM a las 24 horas de la revascularización se asocian con la presencia de la OMV evaluada mediante RMC en la fase aguda.

4. En pacientes con IAMEST, los niveles circulantes de EpCAM a las 24 horas de la revascularización se relacionan con una peor función sistólica en la fase crónica.

5. La presencia del VEGF-A<sub>165b</sub> en suero y en el miocardio infartado aumenta en modelos experimentales de IAM reperfundido e IAM no reperfundido y se asocian con una función sistólica más deprimida evaluada por ecocardiografía. Su bloqueo *in vivo* fomenta la angiogénesis, limita el tamaño de infarto e induce una mejor función sistólica en el modelo murino de IAM reperfundido, pero no en el de IAM no reperfundido.

6. En pacientes con IAMEST, valores elevados de VEGF-A<sub>165b</sub> a las 24 horas de la reperfusión se asocian con una FEVI más deprimida en la fase crónica y con una mayor tasa de eventos cardiovasculares adversos durante el seguimiento.



## **VIII.- BIBLIOGRAFÍA**



Abanador-Kamper N, Karamani V, Kamper L, et al. Temporal course of microvascular obstruction after myocardial infarction assessed by MRI. *Diagn Interv Radiol.* 2016;22:151-5.

Allencherril J, Jneid H, Atar D, et al. Pathophysiology, diagnosis, and management of the no-reflow phenomenon. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2019;33:589-97.

Alvarez C, Siu H. Coronary slow-flow phenomenon as an underrecognized and treatable source of chest pain: case series and literature review. *J Investig Med High Impact Case Rep.* 2018;6:2324709618789194.

Ambrosio G, Weisman HF, Mannisi JA, et al. Progressive impairment of regional myocardial per-fusion after initial restoration of postischemic blood flow. *Circulation.* 1989;80:1846-61.

Badimon L, Borrell M. Microvasculature Recovery by Angiogenesis After Myocardial Infarction. *Curr Pharm Des.* 2018;24:2967-73.

Baldea I, Teacoe I, Olteanu DE, et al. Effects of different hypoxia degrees on endothelial cell cultures-time course study. *Mech Ageing Dev* 2018;172:45-50.

Banai S, Shweiki D, Pinson A, et al. Upregulation of vascular endothelial growth factor expression induced by myocardial ischaemia: implications for coronary angiogenesis. *Cardiovasc Res.* 1994;28:1176-9.

Bates DO, Cui TG, Doughty JM, et al. VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 2002;62:4123-31.

Beazley-Long N, Hua J, Jehle T, et al. VEGF-A165b is an endogenous neuroprotective splice isoform of vascular endothelial growth factor A in vivo and in vitro. *Am J Pathol.* 2013;183:918-29.

Bergem RP, Waard GD, Nijveldt R, et al. Intramyocardial haemorrhage after acute myocardial infarction. *Nat Rev Cardiol.* 2015;12:156-67.

Berger PB, Ellis SG, Holmes DR, et al. Relationship between delay in performing direct coronary angioplasty and early clinical outcome in patients with acute myocardial infarction: results from the global use of strategies to open occluded arteries in Acute Coronary Syndromes (GUSTO-IIb) trial. *Circulation.* 1999;100:14-20.

Best BP. Vascular and neuronal ischemic damage in cryonics patients. *Rejuvenation Res.* 2012;15:165-9.

Bodí V, Gavara J, Lopez-Lereu MP, et al. Impact of persistent microvascular obstruction late after ST-segment elevation myocardial infarction on adverse left ventricular remodelling: A CMR study. *JACC Cardiovasc Imaging.* En revisión.

Bodí V, Monmeneu JV, Ortiz-Pérez JT, et al. Prediction of reverse remodeling at cardiac MR imaging soon after first ST-segment-elevation myocardial infarction: Results of a large prospective registry. *Radiology.* 2017;278:54-63.

Bodí V, Sanchis J, López-Lereu MP, et al. Microvascular perfusion 1 week and 6 months after myocardial infarction by first-pass perfusion cardiovascular magnetic resonance imaging. *Heart.* 2006;92:1801-7.

Bodí V, Sanchis J, Núñez J, et al. Prognostic value of a comprehensive cardiac magnetic resonance assessment soon after a



first ST-segment elevation myocardial infarction. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2009a;2:835-42.

Bodí V, Sanchis J, Núñez J, et al. Post-reperfusion lymphopenia and microvascular obstruction in ST-segment elevation acute myocardial infarction. *Rev Esp Cardiol*. 2009b;62:1109-17.

Boersma E, Mercado N, Poldermans D, et al. Acute myocardial infarction. *Lancet*. 2003;361:847-58.

Bouleti C, Mewton N, Germain S. The no-reflow phenomenon: state of the art. *Arch Cardiovasc Dis*. 2015;108:661-74.

Brosh D, Assali AR, Mager A, et al. Effect of no-reflow during primary percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction on six-month mortality. *Am J Cardiol*. 2007;99:442-5.

Bunni J, Shelley-Fraser G, Stevenson K, et al. Circulating levels of anti-angiogenic VEGF-A isoform (VEGF-Axxx<sub>b</sub>) in colorectal cancer patients predicts tumour VEGF-A ratios. *Am J Cancer Res*. 2015;5:2083-9.

Cannon CP, Gibson CM, Lambrew CT, et al. Relationship of symptom-onset-to-balloon time and door-to-balloon time with mortality in patients undergoing angioplasty for acute myocardial infarction. *JAMA*. 2000;283:2941-7.

Chen X, Ma WY, Xu SC, et al. The overexpression of epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) in glioma. *J Neurooncol*. 2014;119:39-47.

Cocciolone AJ, Hawes JZ, Staiculescu MC, et al. Elastin, arterial mechanics, and cardiovascular disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2018;315:H189-205.

Cochain C, Channon KM, Silvestre JS. Angiogenesis in the infarcted myocardium. *Antioxid Redox Signal*. 2013;18:1100-13.

Dai M, Yuan F, Fu C, et al. Relationship between epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) overexpression and gastric cancer patients: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2017;12:e0175357.

Dashwood MR, Noertersheuser P, Kirchengast M, et al. 1999. Altered endothelin-1 binding following balloon angioplasty of pig coronary arteries: effect of the ETA receptor antagonist, LU135252. *Cardiovasc Res*. 1999;43:445-56.

Davidson SM, Ferdinandy P, Andreadou I, et al. Multitarget strategies to reduce myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol*. 2019;73:89-99.

de Dios E, Ríos-Navarro C, Pérez-Sole N, et al. Similar clinical course and significance of circulating innate and adaptive immune cell counts in STEMI and COVID-19. *J Clin Med*. 2020;9:3484.

de Waha S, Patel MR, Granger CB, et al. Relationship between microvascular obstruction and adverse events following primary percutaneous coronary intervention for ST-segment elevation myocardial infarction: an individual patient data pooled analysis from seven randomized trials. *Eur Heart J*. 2017;38:3502-10.

Dégano IR, Elosua R, Marrugat J. Epidemiología del síndrome coronario en España: estimación del número de casos y la tendencia de 2005 a 2049. *Rev Esp Cardiol*. 2013;66:472-81.

Dentali F, Nigro O, Squizzato A, et al. Impact of neutrophils to lymphocytes ratio on major clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes: A systematic review and meta-analysis of the

literature. *Int J Cardiol.* 2018;266:31-37.

Doherty DJ, Sykes R, Mangion K, et al. Predictors of microvascular reperfusion after myocardial infarction. *Curr Cardiol Rep.* 2021;23:21.

Feistritzer HJ, Reinstadler SJ, Klug G, et al. Multimarker approach for the prediction of microvascular obstruction after acute ST-segment elevation myocardial infarction: a prospective, observational study. *BMC Cardiovasc Disord.* 2016;16:239.

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

Ferreira-González I. Epidemiología de la enfermedad coronaria. *Rev Esp Cardiol.* 2014;67:139-44.

Forteza MJ, Novella S, Trapero I, et al. Dynamics of serum-induced endothelial cell apoptosis in patients with myocardial infarction. *Eur J Clin Invest.* 2014;44:46-53.

Fracassi F, Niccoli G. Angiogenesis and microvascular obstruction: still a research topic or a new therapeutic target?. *Rev Esp Cardiol.* 2018;71:420-22.

Frangogiannis NG. The extracellular matrix in myocardial injury, repair, and remodeling. *J Clin Invest.* 2017;127:1600-12.

Gaber A, Lenarcic B, Pasvic M. Current view on EpCAM structural biology. *Cells.* 2020;9:1361.

Ganta VC, Choi M, Kutateladze A, et al. VEGF165b Modulates Endothelial VEGFR1-STAT3 Signaling Pathway and Angiogenesis in Human and Experimental Peripheral Arterial Disease. *Circ Res.* 2017;120:282-95.

Garcia R, Bouleti C, Sirol M, et al. VEGF-A plasma levels are associated with microvascular obstruction in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 2019;291:19-24.

Gavara J, Rodriguez-Palomares JF, Valente F, et al. Prognostic value of strain by tissue tracking cardiac magnetic resonance after ST-segment elevation myocardial infarction. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2018;11:1448-57.

Gkontra P, Norton KA, Žak MM, et al. Deciphering microvascular changes after myocardial infarction through 3D fully automated image analysis. *Sci Rep.* 2018;8:1854.

Hamirani US, Wong A, Kramer CM, et al. Effect of microvascular obstruction and intramyocardial hemorrhage by CMR on LV remodeling and outcomes after myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2014;7:940-52.

Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol.* 2006;6:508-19.

Harada K, Kikuchi R, Ishii H, et al. Association between the ratio of anti-angiogenic isoform of VEGF-A to total VEGF-A and adverse clinical outcomes in patients after acute myocardial infarction. *Int J Cardiol Heart Vasc.* 2018;19:3-7.

Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest.* 2013;123:92-100.

Hervás A, de Dios E, Forteza MJ, et al. Intracoronary infusion of thioflavin-S to study microvascular obstruction in a model of myocardial infarction. *Rev Esp Cardiol.* 2015;68:928-34.

Heusch G. Myocardial ischemia-reperfusion injury and cardioprotection in perspective. *Nat Rev Cardiol.* 2020;17:773-89.

Hollander MR, de Waard GA, Konijnenberg LSF, et al. Dissecting the effects of ischemia and reperfusion on the coronary microcirculation. *PLoS One.* 2016;11:e0157233.

Huang L, Yang Y, Yang F, et al. Functions of EpCAM in physiological processes and diseases. *Int J Mol Med.* 2018;42:1771-85.

Hueso L, Ríos-Navarro C, Ruiz-Sauri A, et al. Dynamics and implications of circulating anti-angiogenic VEGF-A165b isoform in patients with ST-elevation myocardial infarction. *Sci Rep.* 2017;7:9962.

Husser O, Bodí V, Sanchis J, et al. Predictors of cardiovascular magnetic resonance-derived microvascular obstruction on patient admission in STEMI. *Int J Cardiol.* 2013;166:77-84.

Husser O, Bodí V, Sanchis J, et al. White blood cell subtypes after STEMI: temporal evolution, association with cardiac magnetic resonance – derived infarct size and impact on outcome. *Inflammation.* 2011;34:73-84.

Ibáñez B, Aletras AH, Arai AE, et al. Cardiac MRI Endpoints in Myocardial Infarction Experimental and Clinical Trials: JACC Scientific Expert Panel. *J Am Coll Cardiol.* 2019;74:238-56.

Ibáñez B, Heusch G, Ovize M, et al. Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol.* 2015;65:1454-71.

Iribarren C, Phelps BH, Darbinian JA, et al. Circulating

angiopoietins-1 and -2, angiopoietin receptor Tie-2 and vascular endothelial growth factor-A as biomarkers of acute myocardial infarction: a prospective nested case-control study. *BMC Cardiovasc Disord.* 2011;11:31.

Jianqiang P, Ping Z, Xinmin F, et al. Expression of hypoxia-inducible factor 1 alpha ameliorate myocardial ischemia in rat. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;465:691-5.

Karsten MM, Beck MH, Rademacher A, et al. VEGF-A165b levels are reduced in breast cancer patients at primary diagnosis but increase after completion of cancer treatment. *Sci Rep.* 2020;10:3635.

Keeley EC, Boura JA, Grines CL. Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomised trials. *Lancet.* 2003;361:13-20.

Kikuchi R, Nakamura K, MacLauchlan S, et al. An antiangiogenic isoform of VEGF-A contributes to impaired vascularization in peripheral artery disease. *Nat Med.* 2014;20:1464-71.

Kikuchi R, Stevens M, Harada K, et al. Anti-angiogenic isoform of vascular endothelial growth factor-A in cardiovascular and renal disease. *Adv Clin Chem.* 2019;88:1-33.

Kim HK, Kim HB, Lee JM, et al. Influence of local myocardial infarction on endothelial function, neointimal progression, and inflammation in target and non-target vascular territories in a porcine model of acute myocardial infarction. *J Korean Med Sci.* 2019;34:e145.

Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB. The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin*

Invest. 1974;54:1496-508.

Kohchi K, Takebayashi S, Hiroki T, et al. Significance of adventitial inflammation of the coronary artery in patients with unstable angina: results at autopsy. *Circulation*. 1985;71:709-16.

Kolk MV, Meyberg D, Deuse T, et al. LAD-ligation: a murine model of myocardial infarction. *J Vis Exp*. 2009:1438.

Konijnenberg LSF, Damman P, Duncker DJ, et al. Pathophysiology and diagnosis of coronary microvascular dysfunction in ST-elevation myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2020;116:787-805.

Kuhn S, Koch M, Nübel T, et al. A complex of EpCAM, claudin-7, CD44 variant isoforms, and tetraspanins promotes colorectal cancer progression. *Mol Cancer Res*. 2007;5:553-67.

Latorre E, Pilling LC, Lee BP, et al. The VEGFA156b isoform is dysregulated in senescent endothelial cells and may be associated with prevalent and incident coronary heart disease. *Clin Sci (Lond)*. 2018;132:313-25.

Lee SH, Wolf PL, Escudero R, et al. Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N Engl J Med*. 2000;342:626-33.

Li J, Zhao Y, Zhu W. Targeting angiogenesis in myocardial infarction: Novel therapeutics. *Exp Ther Med*. 2022;23:64.

Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420:868-74.

Libby P, Buring JE, Badimon L, et al. Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5:56.

Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 2011;473:317-25.

Liu KL, Lin SM, Chang CH, et al. Plasma angiopoietin-1 level, left ventricular ejection fraction, and multivessel disease predict development of 1-year major adverse cardiovascular events in patients with acute ST elevation myocardial infarction – A pilot study. *Int J Cardiol*. 2015;182:155-60.

Loor G, Schumacker PT. Role of hypoxia-inducible factor in cell survival during myocardial ischemia-reperfusion. *Cell Death Differ*. 2008;15:686-90.

Magnussen AL, Rennel ES, Hua J, et al. VEGF-A165b is cytoprotective and antiangiogenic in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51:4273-81.

Manetti M, Guiducci S, Romano E, et al. Overexpression of VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, leads to insufficient angiogenesis in patients with systemic sclerosis. *Circ Res*. 2011;109:e14-26.

Mauriello A, Sangiorgi G, Fratoni S, et al. Diffuse and active inflammation occurs in both vulnerable and stable plaques of the entire coronary tree. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45:1585-93.

Mohtar MA, Syafruddin SE, Nasir SN, et al. Revisiting the Roles of Pro-Metastatic EpCAM in Cancer. *Biomolecules*. 2020;10:255.

Niccoli G, Burzotta F, Galiuto L, et al. Myocardial no-reflow in humans. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54:281-92.

Niccoli G, Scalone G, Lerman A, et al. Coronary microvascular obstruction in acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2016;37:1024-



33.

Okamoto E, Couse T, De Leon H, et al. Perivascular inflammation after balloon angioplasty of porcine coronary arteries. *Circulation*. 2011;104:2228-35.

Oltean S, Qiu Y, Ferguson JK, et al. Vascular Endothelial Growth Factor-A165b Is Protective and Restores Endothelial Glycocalyx in Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26:1889-904.

OMS: The World Health Report 2004—Changing History. Edited by Salud OMdl 2014;120-4.

Ørn S, Manhenke C, Greve OJ, et al. Microvascular obstruction is a major determinant of infarct healing and subsequent left ventricular remodelling following primary percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J*. 2009;30:1978-85.

Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*. 2011;146:873-87.

Prabhu SD, Frangogiannis NG. The biological basis for cardiac repair after myocardial infarction: From inflammation to fibrosis. *Circ Res*. 2016;119:91-112.

Punt CJ, Nagy A, Douillard JY, et al. Edrecolomab alone or in combination with fluorouracil and folinic acid in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: a randomised study. *Lancet*. 2002;360:671-7.

Qiu Y, Hoareau-Aveilla C, Oltean S, et al. The anti-angiogenic isoforms of VEGF in health and disease. *Biochem Soc Trans*. 2009;37:1207-13.

Redel A, Jazbutyte V, Smul TM, et al. Impact of ischemia and reperfusion times on myocardial infarct size in mice in vivo. *Exp Biol Med* (Maywood). 2008;233:84-93.

Redfors B, Mohebi R, Giustino G, et al. Time Delay, Infarct Size, and Microvascular Obstruction After Primary Percutaneous Coronary Intervention for ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction. *Circ Cardiovasc Interv*. 2021;14:e009879.

Rennel ES, Harper SJ, Bates DO. Therapeutic potential of manipulating VEGF splice isoforms in oncology. *Future Oncol*. 2009;5:703-12.

Ríos-Navarro C, Daghbouche-Rubio N, Gavara J, et al. Ischemia-reperfusion injury to coronary arteries: Comprehensive microscopic study after reperfused myocardial infarction. *Ann Anat*. 2021a;238:151785.

Ríos-Navarro C, de Dios E, Forteza MJ, et al. Unraveling the thread of uncontrolled immune response in COVID-19 and STEMI: an emerging need for knowledge sharing. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2021b;320:H2240-54.

Ríos-Navarro C, Gavara J, de Dios E, et al. Deleterious effect of serum from STEMI patients on endothelial cell viability: Implication on the resulting cardiac structure. *Eur J Clin Invest*. En revisión.

Ríos-Navarro C, Gavara J, Núñez J, et al. EpCAM and microvascular obstruction in patients with STEMI: a cardiac magnetic resonance study. *Rev Esp Cardiol*. 2021c;S1885-5857(21)00135-3.

Ríos-Navarro C, Gavara J, Vidal V, et al. Characterization and implications of the dynamics of eosinophils in blood and in the infarcted myocardium after coronary reperfusion. *PLoS One*.

2018;13:e0206344.

Ríos-Navarro C, Hueso L, Díaz A, et al. Role of antiangiogenic VEGF-A165b in angiogenesis and systolic function after reperfused myocardial infarction. *Rev Esp Cardiol.* 2021d;74:131-9.

Ríos-Navarro C, Hueso L, Miñana G, et al. Coronary serum obtained after myocardial infarction induces angiogenesis and microvascular obstruction repair. Role of Hypoxia-inducible Factor-1A. *Rev Esp Cardiol.* 2018;71:440-9.

Ríos-Navarro C, Marcos-Garcés V, Bayes-Genis A, et al. Microvascular obstruction in ST-segment elevation myocardial infarction: Looking back to move forward. Focus on CMR. *J Clin Med.* 2019;8:1805.

Rommel KP, Baum A, Mende M, et al. Prognostic significance and relationship of worst lead residual ST segment elevation with myocardial damage assessed by cardiovascular MRI in myocardial infarction. *Heart.* 2014;100:1257-63.

Sabra M, Karbasiafshar C, Aboulgheit A, et al. Clinical Application of Novel Therapies for Coronary Angiogenesis: Overview, Challenges, and Prospects. *Int J Mol Sci.* 2021;22:3722.

Sandow SL, Gzik DJ, Lee RM. Arterial internal elastic lamina holes: relationship to function?. *J Anat.* 2009;214:258-66.

Sankpal NV, Fleming TP, Gillanders WE. EpCAM modulates NF- $\kappa$ B signaling and interleukin-8 expression in breast cancer. *Mol Cancer Res.* 2013;11:418-26.

Schmidt M, Rüttiger D, Sebastian M, et al. Phase IB study of the EpCAM antibody adecatumumab combined with docetaxel in

patients with EpCAM-positive relapsed or refractory advanced-stage breast cancer. *Ann Oncol.* 2012;23:2306-13.

Schnell U, Cirulli V, Giepmans BN. EpCAM: structure and function in health and disease. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1828:1989-2001.

Siddiqui H, Rawal P, Bihari C, et al. Vascular Endothelial Growth Factor Promotes Proliferation of Epithelial Cell Adhesion Molecule-Positive Cells in Nonalcoholic Steatohepatitis. *J Clin Exp Hepatol.* 2020;10:275-83.

Stamboul K, Zeller M, Rochette L, et al. Relation between high levels of myeloperoxidase in the culprit artery and microvascular obstruction, infarct size and reverse remodeling in ST-elevation myocardial infarction. *PLoS One.* 2017;12:e0179929.

Stempien-Otero A, Karsan A, Cornejo CJ, et al. Mechanisms of hypoxia-induced endothelial cell death. *J Biol Chem.* 1999;274:8039-45.

Stensjøen AL, Hommerstad A, Halvorsen S, et al. Worst lead ST deviation and resolution of ST elevation at one hour for prediction of myocardial salvage, infarct size, and microvascular obstruction in patients with ST-elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention. *Ann Noninvasive Electrocardiol.* 2020;25:e12784.

Stevens M, Neal CR, Salmon AHJ, et al. Vascular Endothelial Growth Factor-A165b Restores Normal Glomerular Water Permeability in a Diphtheria-Toxin Mouse Model of Glomerular Injury. *Nephron.* 2018;139:51-62.

Tanabe K, Sato Y, Wada J. Endogenous Antiangiogenic

Factors in Chronic Kidney Disease: Potential Biomarkers of Progression. *Int J Mol Sci.* 2018;19:1859.

Taqueti VR, Di Carli MF. Coronary microvascular disease pathogenic mechanisms and therapeutic options: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol.* 2018;72:2625-41.

Tiller C, Reindl M, Holzknecht M, et al. Relationship between admission Q waves and microvascular injury in patients with ST-elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention. *Int J Cardiol.* 2019;297:1-7.

Toldo S, Mauro AG, Cutter Z, et al. Inflammasome, pyroptosis, and cytokines in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2018;315:H1553-68.

van Kranenburg M, Magro M, Thiele H, et al. Prognostic value of microvascular obstruction and infarct size, as measured by CMR in STEMI patients. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2014;7:930-9.

Ved N, Hulse RP, Bestall SM, et al. Vascular endothelial growth factor-A165b ameliorates outer-retinal barrier and vascular dysfunction in the diabetic retina. *Clin Sci.* 2017;131:1225-43.

Wang X, Nie S. The coronary slow flow phenomenon: characteristics, mechanisms and implications. *Cardiovasc Diagn Ther.* 2011;37.

Weaver WD, Simes RJ, Betriu A, et al. Comparison of primary coronary angioplasty and intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review. *JAMA.* 1997;278:2093-8.

Widimský P, Groch L, Zelízko M, et al. Multicentre randomized trial comparing transport to primary angioplasty vs immediate

thrombolysis vs combined strategy for patients with acute myocardial infarction presenting to a community hospital without a catheterization laboratory. The PRAGUE study. *Eur Heart J*. 2000;21:823-31.

Wong DTL, Puri R, Richardson JD, et al. Myocardial “no-reflow”- diagnosis, pathophysiology and treatment. *Int J Cardiol*. 2013;167:1798-806.

Wu G, Rana JS, Wykrzykowska J, et al. Exercise-induced expression of VEGF and salvation of myocardium in the early stage of myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;296:H389-95.

Xu Z, Alloush J, Beck E, et al. A murine model of myocardial ischemia-reperfusion injury through ligation of the left anterior descending artery. *J Vis Exp*. 2014;86:51329.

Xu J, Lu X, Shi G. Vasa vasorum in atherosclerosis and clinical significance. *Int J Mol Sci*. 2015;16:11574-608.

Younger JF, Plein S, Barth J, et al. Troponin-I concentration 72 h after myocardial infarction correlates with infarct size and presence of microvascular obstruction. *Heart*. 2007;93:1547-51.

Zhou L, Zhu Y. The EpCAM overexpression is associated with clinicopathological significance and prognosis in hepatocellular carcinoma patients: A systematic review and meta-analysis. *Int J Surg*. 2018;56:274-80.

Zeijlon R, Chamat J, Enabtawi I, et al. Risk of in-hospital life-threatening ventricular arrhythmia or death after ST-elevation myocardial infarction vs. the Takotsubo syndrome. *ESC Heart Fail*. 2021;8:1314-23.

Zhu T, Peng X, Cheng Z, et al. Diagnostic rather than prognostic markers-relationship between EpCAM overexpression and lung cancer: a meta-analysis. *Ann Palliat Med.* 2021;10:4025-36.

Zou J, Fei Q, Xiao H, et al. VEGF-A promotes angiogenesis after acute myocardial infarction through increasing ROS production and enhancing ER stress-mediated autophagy. *J Cell Physiol.* 2019;234:17690-703.





## **IX.- ANEXOS**



## **ANEXO I:**

Ríos-Navarro C, Daghbouche-Rubio N, Gavara J, et al. Ischemia-reperfusion injury to coronary arteries: Comprehensive microscopic study after reperfused myocardial infarction. *Ann Anat.* 2021;238:151785.





Contents lists available at ScienceDirect

Annals of Anatomy

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/aaanat](http://www.elsevier.com/locate/aaanat)

## RESEARCH ARTICLE

## Ischemia-reperfusion injury to coronary arteries: Comprehensive microscopic study after reperfused myocardial infarction

Cesar Rios-Navarro<sup>a</sup>, Nuria Daghbouche-Rubio<sup>a</sup>, Jose Gavara<sup>a</sup>, Elena de Dios<sup>b,c</sup>,  
Nerea Perez<sup>a</sup>, Jose M. Vila<sup>a,d</sup>, Francisco J. Chorro<sup>a,b,c,e</sup>, Amparo Ruiz-Sauri<sup>a,f,\*\*</sup>,  
Vicente Bodi<sup>a,b,c,e,\*</sup>

<sup>a</sup> INCLIVA Health Research Institute, Valencia, Spain<sup>b</sup> Department of Medicine, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain<sup>c</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red – Cardiovascular, Spain<sup>d</sup> Department of Physiology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain<sup>e</sup> Cardiology Department, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain<sup>f</sup> Department of Pathology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 22 January 2021

Received in revised form 25 May 2021

Accepted 26 May 2021

Available online 16 June 2021

## Keywords:

Reperfused myocardial infarction

Coronary arteries

Microscopic damage

Ischemia-reperfusion injury

## ABSTRACT

**Background:** Coronary arteries supply oxygen and nutrients to the heart. We evaluated the dynamics of microscopic damage throughout the ischemia-reperfusion process in the wall of coronary arteries following myocardial infarction (MI).

**Methods:** In a swine model of reperfused MI, animals were divided into one control and four MI groups: 90-min ischemia without reperfusion, or followed by one minute, one week or one month reperfusion. Left anterior descending (LAD; infarct-related artery) and control right coronary arteries (RCA) were isolated. Taking the balloon inflation region as a reference, we isolated the proximal and distal LAD areas, performing histological staining and immunohistochemistry.

**Results:** Although mild changes in tunica intima were observed during ischemia, an almost complete absence of endothelium, and abnormal breaks in the internal elastic layer were found post-revascularization. In tunica media, increased thickness was observed soon after reperfusion, whereas larger thickness, disorganized muscle cell distribution and edema were found one week after reperfusion. This damage was more pronounced in distal rather than proximal LAD, whereas no changes were detected in RCA. In the tunica adventitia, vasa vasorum density decayed during ischemia in both LAD regions, but was restored after one month. Leukocyte adhesion to the artery was observed post-revascularization, developing into a massive presence in the three layers one week post-reperfusion.

**Conclusions:** Ischemia-reperfusion can itself induce damage in the wall of the epicardial coronary artery, becoming more pronounced in the region distal to balloon inflation. Exploring these abnormalities will provide insight into the pathophysiology of coronary circulation and MI.

© 2021 The Author(s). Published by Elsevier GmbH. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## 1. Introduction

Coronary circulation provides oxygen and nutrients to cardiac tissue. Thrombotic occlusion of an epicardial artery following myocardial infarction (MI) must be rapidly resolved, preferably by percutaneous techniques (Ibañez et al., 2015). It paradoxically entails hemodynamic and oxidative stress, leading to reperfusion-induced arrhythmias, myocardial stunning, microvascular obstruction and lethal myocardial reperfusion injury (Wu et al., 2018). This phenomenon is known as ischemia-reperfusion (I/R) injury, and induces the death of cardiomyocytes due to different contributory factors such as oxidative stress, calcium

**Abbreviations:** αSMA, α-smooth muscle actin; IEL, internal elastic lamina; IRA, infarct-related artery; I/R, ischemia-reperfusion; LAD, left anterior descending; MI, myocardial infarction; PCI, primary coronary intervention; RCA, right coronary artery; vWF, von Willebrand Factor.

\* Corresponding author at: Cardiology Department, Hospital Clínico Universitario, Av. Blasco Ibañez 17, 46010 Valencia, Spain.

\*\* Corresponding author at: Pathology Department, School of Medicine, University of Valencia, Av. Blasco Ibañez 15, 46010 Valencia, Spain.

E-mail addresses: [amparo.ruiz-sauri@uv.es](mailto:amparo.ruiz-sauri@uv.es) (A. Ruiz-Sauri), [vicente.bodi@uv.es](mailto:vicente.bodi@uv.es) (V. Bodi).

<https://doi.org/10.1016/j.aanat.2021.151785>

0940-9602/© 2021 The Author(s). Published by Elsevier GmbH. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

overload and mitochondrial permeability transition pore opening (Hausenloy and Yellon, 2013). However, from our knowledge, the microscopic abnormalities occurring in the epicardial circulation exclusively due to I/R injury has been barely explored.

Despite complete revascularization at the epicardial level post-MI, primary coronary intervention (PCI) shows that progression of angiographic contrast through the coronary tree is delayed in some patients. This situation, known as coronary slow flow, is strongly associated with myocardial ischemia, malignant arrhythmias and sudden cardiac death (Alvarez and Siu, 2018; Wang and Nie, 2011). Although a variety of factors might influence the appearance of coronary slow flow, damage to the epicardial artery could also exacerbate this phenomenon (Alvarez and Siu, 2018; Wang and Nie, 2011). Consequently, scrutinizing the changes in the epicardial artery due to I/R injury is also important for insight into complete coronary circulation after MI.

Therefore, our main aim in this study was to illustrate microscopic changes in the wall of epicardial arteries during the I/R process in a reperfused MI swine model. The specific objectives were: 1) To evaluate the dynamics of the histological changes in the wall of infarct-related arteries (IRA) during the I/R process after MI; 2) To assess these changes in the areas proximal and distal to the occlusion point and compare them with the non-affected control artery; 3) To determine inflammatory infiltrate through the epicardial artery.

## 2. Material and methods

### 2.1. Experimental swine model of reperfused MI

This study was approved by the local Animal Care and Use Committee (Reference: 2016/VSC/PEA/00074) and complies with the Guide for the Care and Use of Laboratory animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1993), as well as European (2010/63/EC) and national regulations (RD53/2013).

Fifteen juvenile domestic female pigs weighing 25–30 kg were used in the experimental study. In line with surgery protocol, animals were mechanically ventilated employing 50% oxygen/gas mixture, continuously monitoring heart rate, rhythm and ST-segment changes. In short, we administrated intramuscular ketamine (8 mg/kg) and medetomidine (0.1 mg/kg) for sedation and continuous intravenous 10-mg/kg/h infusion of 2% propofol for anesthesia induction. Furthermore, the pigs were pre-treated with intravenous amiodarone (300 mg) and lidocaine (30 mg) to diminish life-threatening arrhythmias. A 7 Fr sheath was introduced into the right femoral artery for blood pressure monitoring and to access the left anterior descending (LAD) coronary artery. A 7 Fr Amplatz Left 0.75 catheter was used to selectively engage the proximal LAD and a standard hydrophilic angioplasty wire was advanced and placed in the distal LAD. A 2.5 mm x 15 mm over-the-wire angioplasty balloon was inflated at 6 atm in the mid LAD distal to the first diagonal branch. Coronary artery occlusion was confirmed by contrast injection and by electrocardiographic ST-segment elevation. Further details of the experimental protocol can be consulted elsewhere (Ríos-Navarro et al., 2018a, b).

### 2.2. Experimental groups

One control group and four independent MI experimental groups were formed. In the MI groups, after 90-minutes occlusion of the mid-LAD artery by the angioplasty balloon, experiments were stratified as follows: 1) no reperfusion, or 2) one-minute, 3) one-week and 4) one-month after reperfusion (n = 3 animals per group; 15 swine in total). The control group was subjected to the same

experimental protocol used in the MI groups, but without inflating the angioplasty balloon so ischemia and infarction were not induced.

### 2.3. Macroscopic study of coronary artery samples

Anesthetized animals were euthanized by intravenous administration of potassium chloride. Once the heart was excised, coronary arteries, specifically LAD and right coronary artery (RCA), were isolated. In the LAD, we first located the area in which angioplasty balloon was inflated right after the first diagonal branch and balloon LAD sample was isolated (Fig. 1). Taking the balloon inflation region as a reference, we also separated samples from two different LAD regions: proximal and distal LAD. Proximal LAD was considered taken as 3 cm upstream from the end of balloon inflation, whereas distal LAD is the region 3 cm downstream from the beginning of the angioplasty balloon (Fig. 1). RCA was considered the non-infarct-related control artery.

### 2.4. Microscopic analysis and immunohistochemistry of coronary artery samples

All samples were fixed in 4% paraformaldehyde acid, embedded in paraffin, sectioned and mounted on double gelatin-coated glass slides. Hematoxylin and eosin stains were utilized for histological analysis. To further characterize artery samples, elastic fibers were visualized with orcein stain and Masson's trichrome stain was used for collagen deposition.

Next, representative sections (5 µm) of paraffin tissues from all groups were selected for immunohistochemistry. After peroxidase inactivation (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.3%) and blockade with horse serum, sections were incubated overnight (4 °C) with the following primary antibodies: rabbit anti-porcine CD31 (dilution 1:100, ab28364, Abcam, Cambridge, UK), rabbit anti-porcine α-smooth muscle actin (αSMA, dilution 1:500, ab28364, Abcam, Cambridge, UK), mouse anti-human von Willebrand Factor (vWF, undiluted, M061601-2, Dako, Glostrup, Denmark) and rabbit anti-porcine CD45 (dilution 1:250, ab10559, Abcam, Cambridge, UK). The primary antibody signal was amplified by 45-min incubation with biotin-conjugated goat anti-rabbit secondary antibodies (1:1000 dilution, Dako, Glostrup, Denmark) (Ríos-Navarro et al., 2018a, b). Photographs at different magnifications were taken in independent fields using optical microscope Leica DM3000 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

### 2.5. Morphometric analysis

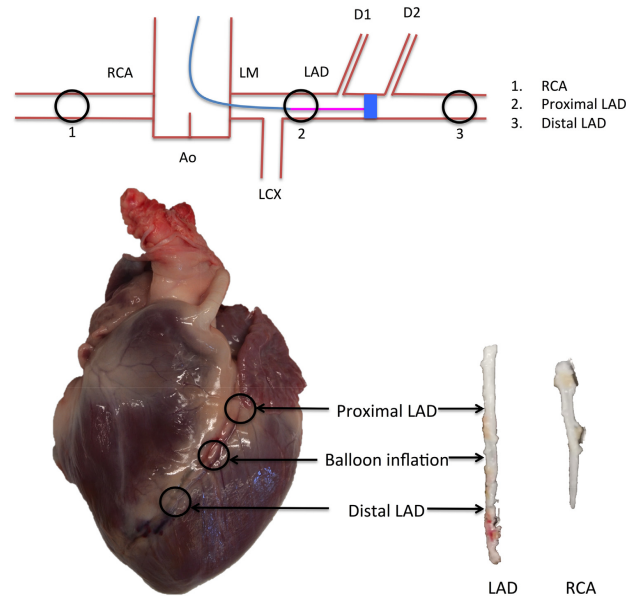
In total, 51 arterial segments were obtained and six different stains were performed for each segment. Using light microscopy and Image-Pro Plus 7.0 analysis software, we quantified damage in the internal elastic lamina (IEL) as the percentage of intact IEL to total IEL length using the orcein staining (Hsiang et al., 1990).

Next, the width of tunica media (µm), tunica adventitia (µm), and total wall (µm) was measured at ten different points in each arterial segment. The width of tunica intima was calculated as follows: Total wall width - (Tunica media width + tunica adventitia width) (µm).

The above-mentioned histologic variables underwent blinded, independent evaluation by two pathologists.

### 2.6. Transmission electron microscopy

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



**Fig. 1.** Schematic representation of sample isolation.

To induce myocardial infarction (MI), an angioplasty balloon (blue bar) was located in the mid-left anterior descending (LAD) coronary artery distal to the first diagonal branch. Taking as reference the region in which the balloon was inflated, we also separated samples from two different regions: proximal (2) and distal (3) LAD. The non-affected right coronary artery (RCA, 1) was also isolated as control.

Abbreviations: Ao: aorta; D: diagonal; LM: left main stem; LCX: left circumflex artery.

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

### 2.7. Statistical analysis

Continuous variables were expressed as mean  $\pm$  SD. One-way ANOVA analysis or unpaired t-Students' test were used for comparisons and statistical significance was considered for two-tailed p-values less than 0.05. SPSS 19.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) was used throughout.

## 3. Results

### 3.1. Dynamics of microscopic damage in distal LAD throughout the I/R process following MI

#### 3.1.1. Microscopic abnormalities in distal LAD started during ischemia and increased immediately after reperfusion

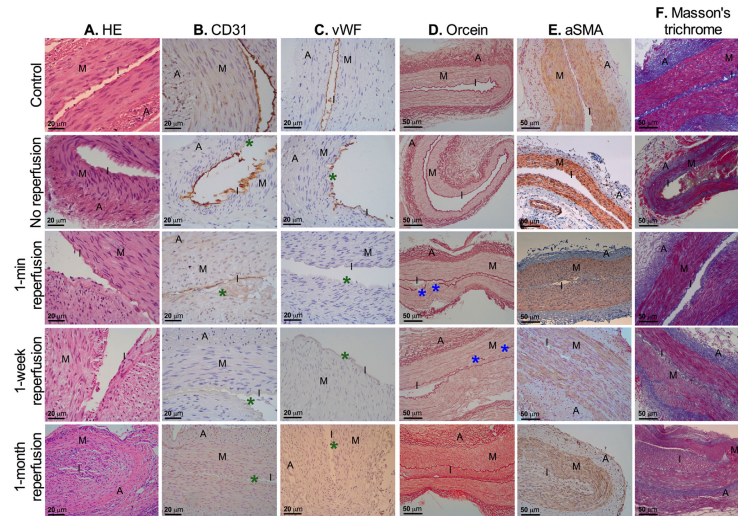
After 90 min of ischemia, the tunica intima from the distal LAD began to lose its normal structure and endothelial cell integrity (Figs. 2 and 3B). Indeed, electronic microscopy images revealed a disorganized subendothelial layer during ischemia (Fig. 3B). This damage increased dramatically after reperfusion, revealing almost total absence of CD31- and vWF-positive cells. Moreover, 6.5% of the IEL from the non-reperused group was fragmented, whereas this coefficient increased up to 16.2% one minute after coronary

reperfusion. Tunica media thickness increased in both nonreperused ( $111 \pm 7 \mu\text{m}$ ,  $p < 0.05$ ) and one minute after reperfusion ( $106 \pm 10 \mu\text{m}$ ,  $p < 0.05$ ) groups compared to controls ( $78 \pm 12 \mu\text{m}$ ) (Fig. 2). Lastly, in the tunica adventitia, a significant reduction in CD31- and  $\alpha$ SMA-positive microvessel density was detected in LAD arteries extracted from the non-reperused group after 90 min of ischemia in comparison to control, and this decay in vasa vasorum was maintained at one minute after reperfusion (Fig. 4A).

#### 3.1.2. Abnormalities in distal LAD persist one week after coronary reperfusion but are partially resolved after one month

One week after coronary reperfusion, a complete loss of endothelial monolayer was found and almost 25% of the IEL was fenestrated. In the tunica media, optic and electronic images demonstrated larger thickness, disorganized muscle cell distribution and interstitial edema (Figs. 2 and 3D). The tunica media thickness increased in the 1-week reperfusion group ( $123 \pm 9 \mu\text{m}$ ,  $p < 0.05$ ) compared to control ( $78 \pm 12 \mu\text{m}$ ). Regarding the tunica adventitia from the one-week reperfusion group, vasa vasorum density remained lower than in the control group (Fig. 4A).

At the chronic phase (one month after coronary reperfusion) we observed an increased thickness of tunica intima ( $12 \pm 3 \mu\text{m}$  vs. control  $4.5 \pm 0.8 \mu\text{m}$ ,  $p < 0.05$ ) composed mainly of CD31-positive cells, collagen fibers, CD45-positive cells and  $\alpha$ SMA-positive cells



**Fig. 2.** Changes in the distal region of infarct-related coronary arteries during ischemia and after coronary revascularization. Representative images of distal left anterior descending (infarct-related) artery isolated from control (upper panel) or 90-min ischemia followed by no reperfusion (upper-central panel) or one minute (central panel), one week (lower-central panel) or one month (lower panel) after coronary revascularization. Samples were stained with hematoxylin-eosin (HE, A column), anti-CD31 (marker of endothelial cells, B column), anti-von Willebrand Factor (anti-vWF, marker of endothelial cells, C column), orcein (elastic fibers, D column), anti-smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA, E column), and Masson's trichrome (F column). Green asterisks indicate lack of endothelial cells and blue asterisks point out at abnormal breaks in internal elastic layer. A total of 90 samples were examined. A: adventitia; I: intima; M: media.

(Fig. 2). In comparison to the one-week reperfusion group, the density of IEL pores was reduced to 4% at the chronic phase. Almost complete recovery of the tunica media was detected one month after revascularization and its thickness was similar to the control group. In the tunica adventitia, recovery was detected in vasa vasorum density (Fig. 4B).

### 3.2. Microscopic abnormalities in distal and proximal LAD compared to control RCA

In each experimental MI group, we isolated the affected (LAD) and non-affected (RCA) arteries, also separating samples from two different LAD regions: proximal and distal to balloon inflation (Fig. 1).

Immediately after coronary reperfusion the loss of endothelial monolayer was more prominent in the distal than the proximal LAD. Moreover, the percentage of abnormal breaks in IEL was higher than in proximal LAD (distal LAD: 16.2% vs. proximal LAD: 4.5%,  $p < 0.05$ ). No damage was detected in the RCA tunica intima (Fig. 5).

In the tunica media, a more disorganized disposition of muscle cells and higher presence of edema were seen in distal LAD compared to proximal LAD (Fig. 5). Likewise, tunica media thickness was heightened in distal LAD ( $123 \pm 9 \mu\text{m}$ ) in comparison to proximal LAD ( $109 \pm 6 \mu\text{m}$ ,  $p < 0.05$ ), whereas the tunica media from RCA was similar to control (Fig. 5).

Turning to vasa vasorum in tunica adventitia, in the non-reperfusion, one-minute and one-week reperfusion groups the number of CD31- or  $\alpha$ SMA-positive cells present in the tunica

adventitia were decreased in both proximal and distal LAD, showing an almost complete recovery one month after reperfusion (Fig. 4). Vasa vasorum in RCA were unaltered throughout the I/R process.

### 3.3. Inflammatory infiltration in the coronary arteries after reperfused MI

Presence of cell inflammatory infiltrate was evaluated by immunohistochemistry using an anti-CD45 antibody.

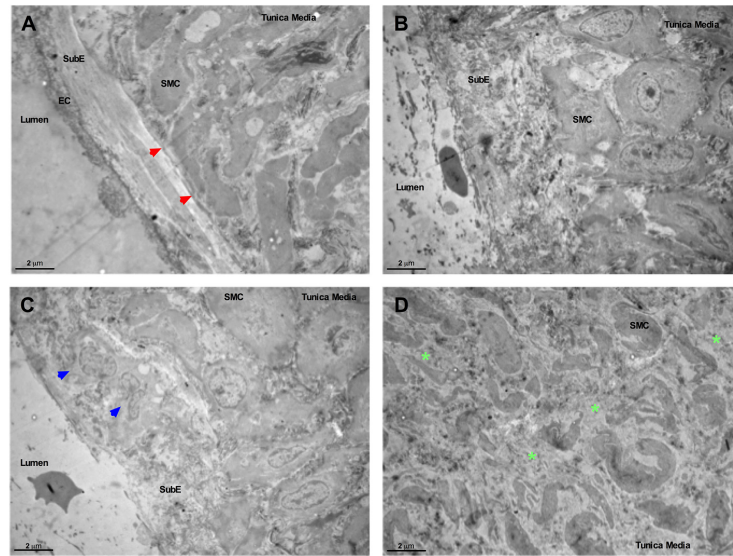
According to our results, although no inflammatory infiltrate was seen during ischemia, optical and electronic microscopy images demonstrated that leukocytes begin to adhere to the endothelium monolayer of the LAD artery soon after reperfusion (one minute) (Fig. 4C). One week after reperfusion, this process had progressed to a massive presence of CD45-positive cells along the three (intima, media, and adventitia) layers in both (distal and proximal) LAD arteries (Fig. 6).

In the chronic (one month) phase, CD45-positive cell presence was sustained in the tunica intima but not media and adventitia of distal LAD, whereas no leukocytes were observed in proximal LAD (Fig. 6). Regarding RCA, leukocyte infiltration was absent throughout the I/R process.

## 4. Discussion

The main findings of this study were that damage to the wall of the epicardial coronary artery starts during ischemia, peaks





**Fig. 3.** Changes due to ischemia-reperfusion injury in the ultrastructure of infarct-related coronary arteries in the region distal to the angioplasty balloon. Representative images from: (A) control artery. In the tunica intima, we detected an endothelial cell (EC) monolayer, subendothelial (SubE) tissue and internal elastic layer (red triangles). In the tunica media, smooth muscle cells (SMC) were found. (B) During ischemia, abnormalities in the tunica intima were detected as reflected by some damage in EC. (C) Soon after reperfusion, leukocyte infiltration (blue triangles) was observed in the SubE space. (D) At advanced phases, a disorganized deposition of SMC as well as an increased edema (green asterisks) were present in the tunica media. A total of 35 samples were examined.

after coronary reperfusion and is almost resolved at the chronic (one month) phase. The three main layers from the IRA, but not from non-affected coronary artery, displayed severe abnormalities, which were most pronounced in the region distal to balloon inflation.

#### 4.1. Consequences of I/R injury following MI in coronary circulation

MI is caused by thrombotic occlusion of a coronary artery, a situation requiring swift action to restore flow, ideally by PCI (Ibañez et al., 2015). Although revascularization is mandatory, the negative impact of reperfusion on ischemic myocardial tissue has been widely addressed (Wu et al., 2018).

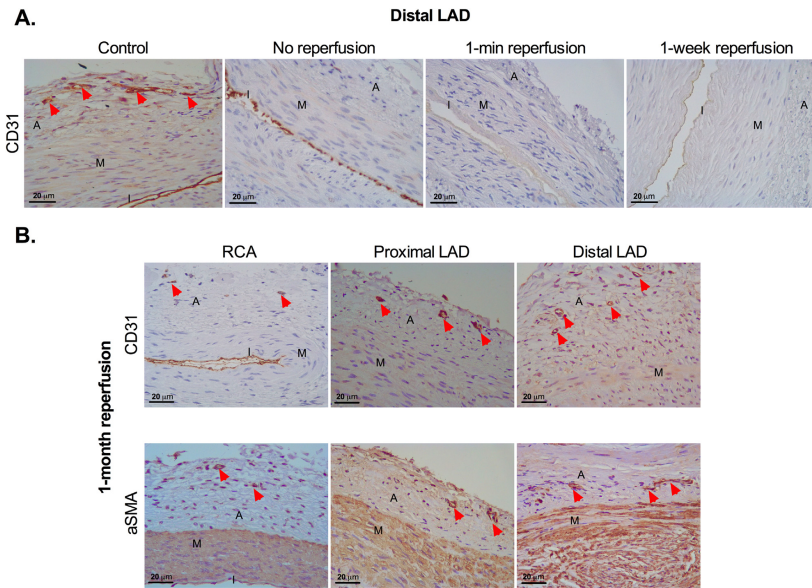
Impairment of myocardial microcirculation due to I/R injury post-MI has been extensively demonstrated in this scenario (Hollander et al., 2016; Rios-Navarro et al., 2018a). The reduction in microvascular density as well as mild ultrastructural changes are reported to begin to occur during ischemia and increase dramatically soon after coronary revascularization (Hollander et al., 2016; Rios-Navarro et al., 2018a; Yajima et al., 2019). However, the specific effects of I/R injury on coronary macrocirculation are scarce. Since epicardial arteries provide oxygen and nutrients into the myocardium, it is essential to analyze their morphological changes throughout the I/R process post-MI to further characterize MI pathophysiology.

#### 4.2. Coronary macrocirculation injury in ischemic heart disease

In the context of chronic heart disease, several studies have explored microscopic abnormalities in the epicardial arteries due to coronary atherosclerosis (Libby et al., 2011, 2019). Coronary atherosclerosis is the leading cause of global disease in Western societies and is considered one of the main triggers of MI (Libby et al., 2011).

In the MI scenario, vascular stenosis in the epicardial artery following PCI procedures and stent implantation has previously been demonstrated in both experimental and clinical scenarios (Dashwood et al., 1999; Kim et al., 2019; Okamoto et al., 2011). The microscopic impact of I/R injury on the wall of coronary arteries is, however, an understudied area. Therefore, this study sought to perform a comprehensive microscopic characterization of the walls from both IRA and non-affected arteries at different time points during the I/R process after MI.

Since other factors (e.g. coronary atherosclerosis and angioplasty procedure) might also cause microscopic coronary injury (Dashwood et al., 1999; Libby et al., 2011, 2019; Okamoto et al., 2011), precautions were taken during sample isolation to evaluate only damage related to the I/R process. We utilized juvenile animals (3 months old) without microscopic or angiographic evidence of atherosclerosis. Moreover, injury caused by angioplasty balloon overstretch was avoided by isolating IRA samples 3 mm upwards and backwards from balloon placement.



**Fig. 4.** Dynamics of vasa vasorum in epicardial circulation throughout ischemia-reperfusion injury following myocardial infarction. (A) Representative images of distal left anterior descending (LAD, infarct-related) artery isolated from control (left panel) and 90-min ischemia followed by no reperfusion (middle-left panel) or after 1-min reperfusion (middle-right panel) or 1-week reperfusion (right panel). Samples were stained with anti-CD31 (endothelial cell marker). (B) Representative images of right coronary (RCA, non-infarct-related) artery (left panel), proximal LAD (middle panel), and distal LAD (right panel) isolated after 90-min ischemia followed by 1-month reperfusion. Samples were stained with anti-CD31 (marker of endothelial cells, upper panel) and anti-smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA, lower panel). Red triangles indicate vasa vasorum. A total of 51 samples were examined. A: adventitia; I: intima; M: media.

#### 4.3. Analyzing the damage to the epicardial artery during the I/R process after MI

##### 4.3.1. Abnormalities in the tunica intima started during ischemia and were not completely resolved by the chronic phase

Tunica intima is composed of an endothelial monolayer, sub-endothelial layer, and IEL. Under physiological conditions, endothelial cells regulate nutrients and oxygen diffusion and maintain coagulation, leukocyte migration and platelet activation under control. However, their disruption could disturb vascular hemostasis, triggering deleterious effects (Jackson et al., 2019).

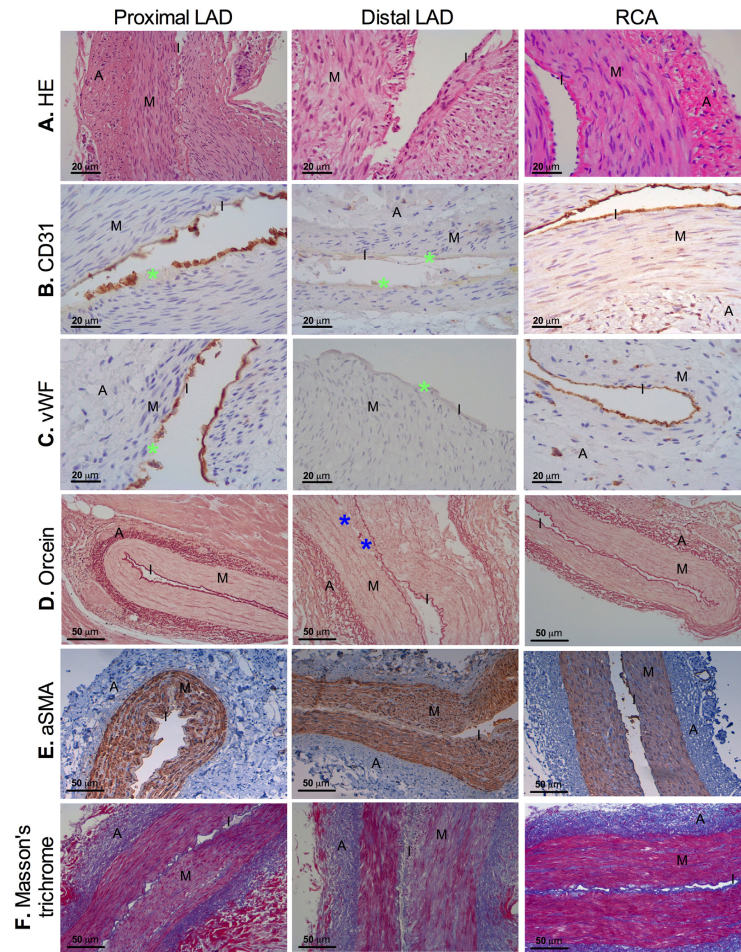
Our findings indicate that damage to the tunica intima starts during ischemia, as reflected by mild changes in the endothelial barrier; this injury dramatically increases soon after coronary reperfusion, confirmed by the almost total lack of endothelial cells and severe breaks in the IEL were also detected. This situation is exclusively present in LAD, the infarct-related artery. Although abnormalities were more pronounced in the region distal than proximal to balloon inflation, both regions are damaged.

In previous studies of myocardial microcirculation, coronary reperfusion was also the main factor contributing to microvascular damage, as indicated by exacerbated endothelium dysfunction and heightened vascular permeability soon after revascularization (Hollander et al., 2016; Ríos-Navarro et al., 2018a; Yajima et al.,

2019). Our study found that this tendency is maintained in macro-circulation: ischemia provokes mild morphological changes, while coronary revascularization exacerbates the injury.

Endothelial dysfunction in macrocirculation peaks immediately after coronary reperfusion. A previous study explored the effects of serum isolated from coronary sinus on endothelial cells. Coronary serum was shown to induce progressive loss of cell viability even during ischemia, with a nadir at four days after revascularization, probably by apoptosis activation (Forteza et al., 2014). These results mirror the dynamics of endothelium damage detected on macroscopic coronary arteries.

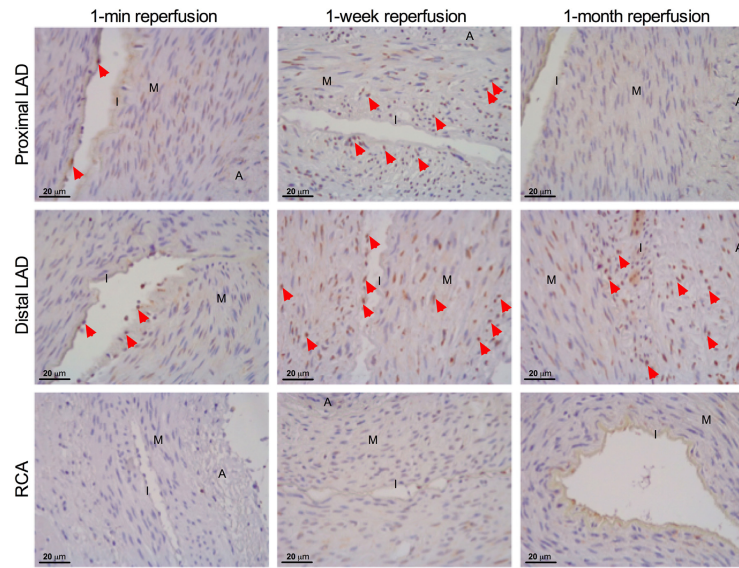
We have also observed that IEL injury (evaluated by the density of IEL pores) starts during ischemia, peaks one week after coronary reperfusion and that the number of IEL pores returns to normal after one month. IEL is a fenestrated sheet between tunica intima and media and participates in mechanical functions and transport of water, nutrients and electrolytes (Sandow et al., 2009). The resolution of IEL injury at chronic phases due to the formation of novel elastin fibers is rare since it requires a very complex process (Cocciolone et al., 2018). Alternatively, we hypothesize that the massive interstitial edema observed one week after MI in the tunica media can provoke the distension of IEL breaks. However, the almost complete resolution of edema at chronic phases (1 month) could restore the normal density of IEL pores.



**Fig. 5.** Comparison of microscopic injury at different locations of epicardial circulation one week after coronary revascularization. Representative images of proximal (left panel) and distal (middle panel) left anterior descending (LAD, infarct-related) artery and right coronary artery (RCA, non-infarct-related artery, right panel) isolated at 90-min of ischemia followed by 1-week reperfusion. Samples were stained with hematoxylin-eosin (HE, A line), anti-CD31 (marker of endothelial cells, B line), anti-von Willebrand Factor (anti-vWF, marker of endothelial cells, C line), orcein (elastic fibers, D line), anti-smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA, E line), and Masson's trichrome (F line). Green asterisks indicate lack of endothelial cells and blue asterisks point out at abnormal breaks in internal elastic layer. A total of 105 samples were examined. A: Adventitia; I: Intima; M: media.

As a result of endothelial barrier disruption, heightened cell permeability occurs, leading to interstitial edema, pro-coagulant conditions by exposing subendothelial components such as collagen fibers, as well as leukocyte activation. All these factors could play a role in the persistence of or even increase in microscopic

changes in the tunica intima detected during the reperfusion phase. In fact, this damage was sustained at the chronic (one month) phase, when a heterogeneous structure was observed to have formed from capillaries, fibroblasts, inflammatory cells and fibrin.



**Fig. 6.** Leukocyte infiltration through the epicardial circulation along the ischemia-reperfusion process after myocardial infarction. Representative images of proximal left anterior descending (LAD, infarct-related, upper panel) artery, distal LAD (central panel), and right coronary artery (lower panel) isolated after 90 min of ischemia at one minute (left panel), one week (middle panel), and one month (right panel) after coronary reperfusion. Samples were stained with anti-CD45. Red triangles indicate CD45-positive cells. A total of 30 samples were examined. A: adventitia; I: intima; M: media.

An abnormal endothelial monolayer in the wall of the epicardial artery could also participate in leukocyte and platelet activation. Based on our results, adhesion of inflammatory cells takes place in the distal LAD soon after coronary reperfusion, developing into a massive presence of white blood cells one week after coronary reperfusion. Although this dynamic was similar in both proximal and distal LAD regions, no infiltration was detected in control RCA. Leukocyte presence has previously been identified in human coronary arteries isolated from nonreperused patients who died 48 h after onset of unstable angina (Kohchi et al., 1985; Mauriello et al., 2005) or in the context of atherosclerotic plaque (Spagnoli et al., 2002). Indeed, blood cell activation might also induce formation of neutrophil plugging and thrombi post-PCI, leading to macroscopic and microscopic injury (including re-infarction and microvascular obstruction).

#### 4.3.2. Changes in the tunica media throughout the I/R process after MI

The tunica media has nearly circumferentially aligned layers of smooth muscle cells, with elastin and collagen fibers. Its main function is to control vessel caliber in order to regulate blood flow into the myocardium in response to signals received from nervi vasorum in tunica adventitia and vasodilators and vasoconstrictors released by endothelial cells on tunica intima.

According to our results, damage in tunica media was initiated soon after revascularization, as reflected by an increased thickness

compared to control arteries. However, this damage peaked at one week after coronary reperfusion, as demonstrated by the disorganized muscle cell distribution and interstitial edema detected in distal LAD, in contrast to the mild abnormalities present in the proximal LAD. The increased interstitial edema detected in the tunica media one week after coronary reperfusion might lead to a loss of cell-cell contacts between the smooth muscle cells.

Early damage to the tunica intima could disturb endothelial permeability and account for the increased edema present in the tunica media at early stages after coronary reperfusion. Since tunica media is involved in controlling vascular tone, its injury could also provoke vasospasms as well as abnormal muscular contractility, thus leading to deficient coronary blood flow.

Despite complete reperfusion at epicardial level, some patients showed delayed distal progression of the angiographic contrast. This entity, known as coronary slow flow phenomenon, is correlated with poorer outcomes and is mainly caused by microvessel disease, endothelial abnormalities, subclinical atherosclerosis and inflammation (Alvarez and Siu, 2018; Wang and Nie, 2011). However, our results suggest that damage in the tunica media of the affected artery might also participate in the etiopathogenesis of this deleterious phenomenon.

Moreover, early disruption of the endothelial barrier due to reperfusion injury could also evoke the massive presence of inflammatory cell infiltrate in the tunica media one week after coronary reperfusion in both (distal and proximal) regions of the IRA, in contrast to the non-infarcted RCA.



#### 4.3.3. Presence of vasa vasorum in the tunica adventitia diminished during ischemia and recovered at advanced phase

The external two-thirds from the walls of large blood vessels are vascularized via a network of small capillaries called vasa vasorum. This vascular network arrives at the tunica adventitia from the large vessels to supply oxygen and nutrients to the muscle cells, thus ensuring proper contractility (Xu et al., 2015). We found a severe decrease in the number of microvessels in the tunica adventitia of both (distal and proximal) LAD in comparison with controls during the ischemic phase (prior to coronary reperfusion). This reduction in the vasa vasorum persisted during the first week and the number of vasa vasorum recovered to control levels one month after reperfusion. Even though these dynamics were similar in both LAD regions, vasa vasorum from RCA remained unaltered and similar to control levels.

This decline in the number of capillaries in the tunica adventitia potentially compromises nutrient and oxygen supply to the muscle cells located in the tunica media, probably impairing its contractility. Similar to vasa vasorum, micro-vessel density in the infarcted myocardium also decreased after 90-min ischemia and was almost completely restored one month after coronary revascularization (Ríos-Navarro et al., 2018a). The recuperation of both vasa vasorum at the tunica adventitia and myocardial microvasculature at chronic phases post-MI could be due to the rapid increase in circulating levels of pro-angiogenic factors (e.g. hypoxia-inducible factor-1A and vascular endothelial growth factor) (Ríos-Navarro et al., 2018a, 2020). Hence, promoting angiogenesis could be a promising co-adjutant therapy to coronary reperfusion to enhance microvessel density not only in the infarcted myocardium but also in the vasa vasorum of epicardial arteries.

#### 4.4. Limitations of the study

The objective of this study was to exclusively explore the effects of I/R injury in coronary arteries. Since other factors (e.g. coronary atherosclerosis and angioplasty procedure) might also provoke microscopic damage in MI patients, this situation may not fully reflect the clinical situation. Moreover, an in-depth analysis of the oxidative stress status of the coronary arteries could be interesting to explore a potential pathophysiological mechanism underlying the observed structural alterations

### 5. Conclusions

I/R injury post-MI can itself compromise the microscopic structure of infarct-related coronary artery walls. Similar to the damage in myocardial tissue, abnormalities started during ischemia, peaked after coronary reperfusion, and were almost resolved at chronic (one month) phase. The three main layers of the IRA, but not the non-infarct-related coronary arteries, display severe damage, which is most pronounced in the region distal to balloon inflation. Exploring this damage is crucial to enhancing the understanding of the pathophysiology of coronary circulation and MI itself.

#### Funding

This study was supported by "Instituto de Salud Carlos III" and "Fondos Europeos de Desarrollo Regional FEDER" [research grants P117/01836, P120/00637 and CIBERCIV16/11/00486, and a postgraduate contract F118/00320 to C.R.-N.].

#### Declaration of interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgements

None.

#### References

- Alvarez, C., Siu, H., 2018. Coronary slow-flow phenomenon as an underrecognized and treatable source of chest pain: case series and literature review. *J. Investig. Med. High Impact Case Rep.* 6, 2324709618789194.
- Coccolone, A.J., Hawes, J.Z., Staiculescu, M.C., Johnson, E.O., Murshed, M., Wagenseil, J.E., 2018. Elastin, arterial mechanics, and cardiovascular disease. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 315, H1189–H1205.
- Dashwood, M.R., Noertersheuser, P., Kirchengast, M., Munter, K., 1999. Altered endothelin-1 binding following balloon angioplasty of pig coronary arteries: effect of the ETA receptor antagonist, LU135252. *Cardiovasc. Res.* 43, 445–456.
- Forteza, M.J., Novella, S., Trapero, I., Hermenegildo, C., Ruiz-Sauri, A., Chaustre, F., Bonanad, C., Oltra, R., Palacios, L., O'Connor, J.E., Chorro, F.J., Bodi, V., 2014. Dynamics of serum-induced endothelial cell apoptosis in patients with myocardial infarction. *Eur. J. Clin. Invest.* 44, 46–53.
- Hausenloy, D.J., Yellon, D.M., 2013. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J. Clin. Invest.* 123, 92–100.
- Hollander, M.R., de Waard, G.A., Konijnenberg, L.S.F., Meijer-van Putten, R.M., van den Brom, C.E., Paauw, N., de Vries, H.E., van de Ven, P.M., Aman, J., Van Nieuw-Amerongen, G.P., Hordijk, P.L., Niessen, H.W., Horrevoets, A.J., Van Royen, N., 2016. Dissecting the effects of ischemia and reperfusion on the coronary microcirculation. *PLoS One* 11, e0157233.
- Hsiang, Y., White, R.A., Kopchok, C.B., Peng, S., 1990. The role of internal elastic lamina damage in the development of canine arteriosclerosis. *J. Invest. Surg.* 3, 11–21.
- Ibañez, B., Heusch, G., Ovize, M., van de Werf, F., 2015. Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury. *J. Am. Coll. Cardiol.* 65, 1454–1471.
- Jackson, S.P., Darbousset, R., Shoenwaelder, S.M., 2019. Thromboinflammation: challenges of therapeutically targeting coagulation and other host defense mechanisms. *Blood* 133, 906–918.
- Kim, H.K., Kim, H.B., Lee, J.M., Kim, S.S., Bae, I.H., Park, D.S., Park, J.K., Shim, J.W., Na, J.Y., Lee, M.Y., Kim, J.S., Sim, D.S., Hong, Y.J., Nam, C.W., Doh, J.H., Park, J., Koo, B.K., Kim, S.U., Lim, K.S., Jeong, M.H., 2019. Influence of local myocardial infarction on endothelial function, neointimal progression, and inflammation in target and non-target vascular territories in a porcine model of acute myocardial infarction. *J. Korean Med. Sci.* 34, e145.
- Kohchi, K., Takebayashi, S., Hiroki, T., Nobuyoshi, M., 1985. Significance of adventitial inflammation of the coronary artery in patients with unstable angina: results at autopsy. *Circulation* 71, 709–716.
- Libby, P., Ridker, P.M., Hansson, G.K., 2011. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 473, 317–325.
- Libby, P., Buring, J.E., Badimon, L., Hansson, G.K., Deanfield, J., Bittencourt, M.S., Tokgözoğlu, L., Lewis, E.F., 2019. Atherosclerosis. *Nat. Rev. Dis. Primers* 5, 56.
- Mauriello, A., Sangiorgi, G., Fratoni, S., Palmieri, G., Bonanno, E., Anemona, L., Schwartz, R.S., Spagnoli, L.G., 2005. Diffuse and active inflammation occurs in both vulnerable and stable plaques of the entire coronary tree. *J. Am. Coll. Cardiol.* 45, 1585–1593.
- Okamoto, E., Couse, T., De Leon, H., Vinten-Johansen, J., Goodman, R.B., Scott, N.A., Wilcox, J.N., 2011. Perivascular inflammation after balloon angioplasty of porcine coronary arteries. *Circulation* 104, 2228–2235.
- Ríos-Navarro, C., Hueso, L., Miñana, G., Núñez, J., Ruiz-Sauri, A., Sanz, M.J., Cánoves, J., Chorro, F.J., Piqueras, L., Bodi, V., 2018a. Coronary serum obtained after myocardial infarction induces angiogenesis and microvascular obstruction repair. Role of hypoxia-inducible factor-1A. *Rev. Esp. Cardiol.* 71, 440–449.
- Ríos-Navarro, C., Gavara, J., Vidal, V., Bonanad, C., Racugno, P., Bayes-Genis, A., Miñana, G., Husser, O., Oltra, R., Núñez, J., Chorro, F.J., Bodi, V., Ruiz-Sauri, A., 2018b. Characterization and implications of the dynamics of eosinophils in blood and in the infarcted myocardium after coronary reperfusion. *PLoS One* 13, e0206344.
- Ríos-Navarro, C., Hueso, L., Díaz, A., Marcos-Garcés, V., Bonanad, C., Ruiz-Sauri, A., Vila, J.M., Sanz, M.J., Chorro, F.J., Piqueras, L., Bodi, V., 2020. Role of antiangiogenic VEGF-A165b in angiogenesis and systolic function after reperfused myocardial infarction. *Rev. Esp. Cardiol.* S1885–5857(20)30161–30164.
- Sandow, S.L., Gzik, D.J., Lee, R.M., 2009. Arterial internal elastic lamina holes: relationship to function? *J. Anat.* 214, 258–266.
- Spagnoli, L.G., Bonanno, E., Mauriello, A., Palmieri, G., Partenzi, A., Sangiorgi, G., Crea, F., 2002. Multicentric inflammation in epicardial coronary arteries of patients dying of acute myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 40, 1579–1588.
- Wang, X., Nie, S., 2011. The coronary slow flow phenomenon: characteristics, mechanisms and implications. *Cardiovasc. Diagn. Ther.* 37.

C. Ríos-Navarro, N. Daghbouche-Rubio, J. Gavara et al.

*Annals of Anatomy* 238 (2021) 151785

Wu, M.Y., Yiang, G.T., Liao, W.T., Tsai, A.P., Cheng, Y.L., Cheng, P.W., Li, C.Y., Li, C.J., 2018. Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury. *Cell. Physiol. Biochem.* 46, 1650–1667.

Xu, J., Lu, X., Shi, G., 2015. Vasa vasorum in atherosclerosis and clinical significance. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 11574–11608.

Yajima, S., Miyagawa, S., Fukushima, S., Isohashi, K., Watabe, T., Ikeda, H., Horitsugi, G., Harada, A., Sakaniwa, R., Hataza-wa, J., Sawa, Y., 2019. Microvascular dysfunction related to progressive left ventricular remodeling due to chronic occlusion of the left anterior descending artery in an adult porcine heart. *Int. Heart J.* 60, 715–727.

## **ANEXO II:**

Ríos-Navarro C, Gavara J, Núñez J, et al. EpCAM and microvascular obstruction in patients with STEMI: a cardiac magnetic resonance study. *Rev Esp Cardiol.* 2021;S1885-5857(21)00135-3.





## Original article

## EpCAM and microvascular obstruction in patients with STEMI: a cardiac magnetic resonance study

César Ríos-Navarro,<sup>a</sup> José Gavara,<sup>a</sup> Julio Núñez,<sup>a,b,c,d</sup> Elena Revuelta-López,<sup>e</sup> José V. Monmeneu,<sup>f</sup> María P. López-Lereu,<sup>f</sup> Elena de Dios,<sup>c,d</sup> Nerea Pérez-Solé,<sup>a</sup> José M. Vila,<sup>a,g</sup> Ricardo Oltra,<sup>h</sup> Francisco J. Chorro,<sup>a,b,c,d</sup> Antoni Bayés-Genís,<sup>c,e</sup> and Vicente Bodi<sup>a,b,c,d,\*</sup><sup>a</sup>Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA, Valencia, Spain<sup>b</sup>Departamento de Cardiología, Hospital Clínico Universitario de Valencia, Valencia, Spain<sup>c</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), Spain<sup>d</sup>Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universitat de Valencia, Valencia, Spain<sup>e</sup>Instituto del Corazón, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona, Spain<sup>f</sup>Unidad de Resonancia Magnética Cardiovascular, Exploraciones Radiológicas Especiales (ERESA), Valencia, Spain<sup>g</sup>Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universitat de Valencia, Valencia, Spain<sup>h</sup>Unidad de Cuidados Intensivos, Hospital Clínico Universitario de Valencia, Valencia, Spain

## Article history:

Received 4 December 2020

Accepted 15 April 2021

## Keywords:

Epithelial cell adhesion molecule

Microvascular obstruction

Cardiac magnetic resonance

ST-segment elevation myocardial infarction

## ABSTRACT

**Introduction and objectives:** Microvascular obstruction (MVO) is negatively associated with cardiac structure and worse prognosis after ST-segment elevation myocardial infarction (STEMI). Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM), involved in epithelium adhesion, is an understudied area in the MVO setting. We aimed to determine whether EpCAM is associated with the appearance of cardiac magnetic resonance (CMR)-derived MVO and long-term systolic function in reperfused STEMI.

**Methods:** We prospectively included 106 patients with a first STEMI treated with percutaneous coronary intervention, quantifying serum levels of EpCAM 24 hours postreperfusion. All patients underwent CMR imaging 1 week and 6 months post-STEMI. The independent correlation of EpCAM with MVO, systolic volume indices, and left ventricular ejection fraction was evaluated.

**Results:** The mean age of the sample was 59 ± 13 years and 76% were male. Patients were dichotomized according to median EpCAM (4.48 pg/mL). At 1-week CMR, lower EpCAM was related to extensive MVO ( $P = .021$ ) and larger infarct size ( $P = .019$ ). At presentation, EpCAM values were significantly associated with the presence of MVO in univariate (OR, 0.58; 95%CI, 0.38-0.88;  $P = .011$ ) and multivariate logistic regression models (OR, 0.55; 95%CI, 0.35-0.87;  $P = .010$ ). Although MVO tends to resolve at chronic phases, decreased EpCAM was associated with worse systolic function: reduced left ventricular ejection fraction ( $P = .009$ ) and higher left ventricular end-systolic volume ( $P = .043$ ).

**Conclusions:** EpCAM is associated with the occurrence of CMR-derived MVO at acute phases and long-term adverse ventricular remodeling post-STEMI.

© 2021 Published by Elsevier España, S.L.U. on behalf of Sociedad Española de Cardiología.

## EpCAM y obstrucción microvascular en pacientes con un IAMCEST: estudio con resonancia magnética cardíaca

## RESUMEN

**Introducción y objetivos:** La obstrucción microvascular (OMV) tiene asociación inversa con la estructura cardíaca y el pronóstico de los pacientes tras un infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST (IAMCEST). El factor *epithelial cell adhesion molecule* (EpCAM), implicado en la cohesión de las células epiteliales, está poco estudiado en el contexto de la OMV. Por ello, el objetivo de este estudio es evaluar en una cohorte de pacientes con IAMCEST la asociación entre la concentración de EpCAM circulante con la extensión de la OMV, determinada por resonancia magnética cardíaca (RMC), y la función sistólica en fases crónicas.

**Métodos:** Se incluyó prospectivamente a 106 pacientes con un primer IAMCEST tratados con angioplastia primaria percutánea. La concentración sérica de EpCAM se determinó 24 h tras la reperusión coronaria. Se estudió a todos los pacientes mediante RMC a la semana y a los 6 meses del IAMCEST. Se evaluó la correlación entre los valores de EpCAM circulante con la OMV, los índices de función sistólica y la fracción de eyección del ventrículo izquierdo.

## Palabras clave:

Epithelial cell adhesion molecule

Obstrucción microvascular

Resonancia magnética cardíaca

Infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST

\* Corresponding author: Departamento de Cardiología, Hospital Clínico Universitario, Avda. Blasco Ibáñez 17, 46010 Valencia, Spain.

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

<https://doi.org/10.1016/j.rec.2021.04.006>

1885-5857/© 2021 Published by Elsevier España, S.L.U. on behalf of Sociedad Española de Cardiología.

**Resultados:** La media de edad de la cohorte era  $59 \pm 13$  años y el 76% eran varones. Se dicotomizó a los pacientes según la mediana de EpCAM (4,48 pg/ml). Se observó que los pacientes que tenían valores más bajos de EpCAM presentaban una mayor extensión de la OMV ( $p = 0,021$ ) y un mayor tamaño de infarto ( $p = 0,019$ ) en los estudios de RMC realizados 1 semana después del evento cardiovascular. Respecto a las variables de presentación, la concentración de EpCAM se asociaron significativamente con la presencia de OMV en análisis de regresión logística binaria univariable (OR = 0,58; IC95%, 0,38-0,88;  $p = 0,011$ ) y multivariable (OR = 0,55; IC95%, 0,35-0,87;  $p = 0,010$ ). A pesar de que la OMV tiende a resolverse espontáneamente en fases crónicas, unos valores más bajos de EpCAM se correlacionaron con una peor función sistólica: fracción de eyección del ventrículo izquierdo deprimida ( $p = 0,009$ ) y mayor volumen telesistólico del ventrículo izquierdo ( $p = 0,043$ ).

**Conclusiones:** Tras un IAMCEST, la concentración de EpCAM circulante en fase aguda se asocia con la extensión de la OMV evaluada mediante RMC y con un peor remodelado ventricular en fase crónica.

© 2021 Publicado por Elsevier España, S.L.U. en nombre de Sociedad Española de Cardiología.

### Abbreviations

CMR: cardiac magnetic resonance  
EpCAM: epithelial cell adhesion molecule  
LV: left ventricle  
LVEF: left ventricular ejection fraction  
MVO: microvascular obstruction  
STEMI: ST-segment elevation myocardial infarction

### INTRODUCTION

Coronary reperfusion, mainly through percutaneous techniques, markedly diminishes acute mortality after reperfused ST-segment elevation myocardial infarction (STEMI). Despite complete reperfusion at the epicardial level, however, a considerable number of patients (30% to 50%) display abnormal myocardial perfusion.<sup>1,2</sup> This phenomenon is known as microvascular obstruction (MVO) and is associated with compromised structure and function as well as with worse prognosis.<sup>3,4</sup>

Certain baseline characteristics are useful in predicting the extent of MVO upon patient arrival. Indeed, a scoring method including 4 predisposing factors (reperfusion delay, diabetes mellitus, Killip class, and sum of ST-segment elevation) at the initial electrocardiogram has been developed to predict MVO appearance.<sup>5</sup> However, soluble biomarkers to predict the extent of MVO are scarce, highlighting a crucial need for novel molecules to gain greater insight into MVO pathophysiology and provide new therapeutic alternatives.

Although several underlying mechanisms act both simultaneously and sequentially in MVO pathophysiology, endothelial abnormalities, decreased capillary density and increased endothelial permeability are particularly important.<sup>2,6,7</sup> In this context, epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) is found in the basolateral membrane of numerous normal epithelial cells to maintain cell-to-cell adhesion, thus preserving epithelial integrity.<sup>8</sup> Despite its promising role in oncology,<sup>9</sup> the involvement of this molecule in the cardiovascular scenario is understudied.

The aim of this work was to explore the association of circulating EpCAM determined 24 hours after percutaneous coronary intervention with cardiac magnetic resonance (CMR)-derived MVO, as well as with cardiac structure and function within the first 6 months after STEMI.

### METHODS

#### Study population

This study conformed to the principles for use of human subjects outlined in the Declaration of Helsinki, the study protocol

was approved by the local Research Ethics Committee, and written informed consent was obtained from all participants.

We prospectively enrolled patients discharged between July 2013 and December 2017 with the following inclusion criteria: patients with a first STEMI as outlined in current definitions<sup>10</sup> treated with percutaneous coronary intervention within 12 hours of chest pain onset, and who underwent CMR imaging 1 week and 6 months post-STEMI. Exclusion criteria were death, reinfarction, or clinical instability during the first 6 months postdischarge or any contraindication to CMR.

#### Biomarker assays

Blood samples were isolated 24 hours after coronary revascularization, centrifuged at 2300 rpm for 15 minutes, and serum was immediately stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further analyses were performed. Serum EpCAM levels were analyzed using the Olink CARDIOVASCULAR III panel (Olink Proteomics, Uppsala, Sweden). The Proximity Extension Assay technology used for the Proseek Multiplex protocol has been described elsewhere<sup>11</sup> or in the [supplementary data](#).

High-sensitivity troponin T (Elecsys TnT assay, Roche Diagnostics, Basel, Switzerland; myocardial infarction diagnosis cutoff  $> 14$  ng/mL) was measured on admission, at 3 hours, and at 6- to 8-hour intervals for the first 24 hours.

#### White blood cell counts

Lymphocyte, and eosinophil ( $\times 1000$  cells/mL) counts were measured upon patient arrival, and at 12, 24, 48, 72, and 96 hours after revascularization using a commercial assay based on cytochemical light scatter and light absorption measurements (ADVIA 120 Hematology System from Siemens Diagnostics, Germany).

#### Cardiac magnetic resonance studies

Two CMR studies (1.5 T unit, Magnetom Sonata; Siemens, Erlangen, Germany) were performed at 7 [5-8] days (1-week CMR) and 196 [167-242] days (6-month CMR) after STEMI, in accordance with our laboratory protocol<sup>12</sup> and current recommendations. All studies were performed and analyzed by 2 cardiologists specialized in CMR with 15 years of experience, using customized software (QMASS MR 6.1.5, Medis, Leiden, The Netherlands). CMR data were prospectively recorded and immediately included in the database.

Further information about CMR acquisition, sequences and quantification can be consulted elsewhere<sup>12,13</sup> or in the [supplementary data](#).

Please cite this article in press as: Ríos-Navarro C, et al. EpCAM and microvascular obstruction in patients with STEMI: a cardiac magnetic resonance study. *Rev Esp Cardiol*. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.rec.2021.04.006>

The interobserver variability for the calculation of traditional CMR indexes used in the present study in our laboratory has been previously reported and is less than 5%.<sup>12,13</sup>

#### Endpoints and follow-up

CMR-derived MVO at 1 week was selected as the primary endpoint of this study.

The secondary endpoints were the relationship between EpCAM measured at 24 hours after percutaneous coronary intervention and long-term ventricular remodeling, as reflected by 6-month left ventricular (LV) ejection fraction (LVEF) and LV end-systolic volume index.

#### Statistical analysis

Data were tested for normal distribution using the Kolmogorov-Smirnov test. Continuous normally distributed data are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation of the mean and were compared using paired and unpaired Student *t* tests. Nonparametric data are expressed as the median [interquartile range] and were compared using the Mann-Whitney *U* test. Group percentages were compared using the chi-square test or the Fisher exact test where appropriate.

A multivariate logistic regression analysis with the forward conditional stepwise method was performed to test the association of baseline characteristics with the presence of MVO at 1 week in the entire study group. All input variables were entered

**Table 1**  
Baseline characteristics, angiographic indices, and biomarkers of the entire cohort and of patients with EpCAM above or below the median

|   | All patients     | EpCAM below median (< 4.48 pg/mL) | EpCAM above median (> 4.48 pg/mL) | P     |
|---|------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------|
| <b>Number of patients</b>                             | 106              | 53                                | 53                                |       |
| <b>Baseline characteristics</b>                       |                  |                                   |                                   |       |
| Age, y  | 59 $\pm$ 13      | 58 $\pm$ 14                       | 60 $\pm$ 12                       | .303  |
| Male sex, %   | 81 (76)          | 46 (87)                           | 35 (66)                           | .012  |
| Diabetes mellitus, %                                  | 22 (21)          | 13 (25)                           | 9 (17)                            | .338  |
| Hypertension, %                                       | 55 (52)          | 28 (53)                           | 27 (51)                           | .846  |
| Dyslipidemia, %                                       | 48 (45)          | 20 (38)                           | 28 (53)                           | .119  |
| Smoker, %   | 66 (62)          | 31 (59)                           | 35 (66)                           | .423  |
| Killip class, %                                       |                  |                                   |                                   | .549  |
| 1   | 86 (81)          | 44 (83)                           | 42 (79)                           |       |
| 2   | 15 (14)          | 8 (15)                            | 7 (13)                            |       |
| 3   | 1 (1)            | 0 (0)                             | 1 (2)                             |       |
| 4   | 4 (4)            | 1 (2)                             | 3 (6)                             |       |
| Time to reperfusion, min                              | 200 [145-390]    | 188 [124-413]                     | 210 [150-329]                     | .827  |
| GRACE risk score                                      | 133 $\pm$ 35     | 130 $\pm$ 34                      | 137 $\pm$ 37                      | .286  |
| TIMI risk score                                       | 2 [1-4]          | 2 [1-3]                           | 3 [1-4]                           | .433  |
| <b>Angiographic indices</b>                           |                  |                                   |                                   |       |
| Anterior infarction, %                                | 54 (51)          | 28 (53)                           | 26 (49)                           | .698  |
| Multivessel disease, %                                | 32 (60)          | 15 (28)                           | 17 (32)                           | .609  |
| TIMI flow grade before PCI, %                         |                  |                                   |                                   | .248  |
| 0   | 66 (62)          | 38 (72)                           | 28 (53)                           |       |
| 1   | 6 (6)            | 2 (4)                             | 4 (8)                             |       |
| 2   | 7 (7)            | 2 (4)                             | 5 (9)                             |       |
| 3   | 27 (25)          | 11 (21)                           | 16 (30)                           |       |
| TIMI flow grade after PCI, %                          |                  |                                   |                                   | .574  |
| 0   | 0 (0)            | 0 (0)                             | 0 (0)                             |       |
| 1   | 1 (1)            | 0 (0)                             | 1 (2)                             |       |
| 2   | 9 (8)            | 5 (10)                            | 4 (8)                             |       |
| 3   | 96 (91)          | 48 (90)                           | 48 (90)                           |       |
| <b>Biomarkers</b>                                     |                  |                                   |                                   |       |
| hs-TnT  | 2807 [1433-5140] | 2898 [1706-5429]                  | 2769 [624-3979]                   | .184  |
| Maximum eosinophil count (x 10 <sup>3</sup> cells/mL) | 200 [157-300]    | 200 [140-300]                     | 220 [165-305]                     | .286  |
| Minimum eosinophil count (x 10 <sup>3</sup> cells/mL) | 30 [10-80]       | 30 [15-75]                        | 30 [10-80]                        | .954  |
| Maximum lymphocyte count (x 10 <sup>3</sup> cells/mL) | 2400 [1905-3495] | 2320 [1920-3410]                  | 2510 [1900-3515]                  | .315  |
| Minimum lymphocyte count (x 10 <sup>3</sup> cells/mL) | 1260 [970-1612]  | 1290 [990-1635]                   | 1210 [940-1590]                   | .501  |
| EpCAM (pg/mL)   | 4.5 $\pm$ 1.0    | 3.7 $\pm$ 0.5                     | 5.3 $\pm$ 0.6                     | <.001 |

EpCAM, epithelial cell adhesion molecule; GRACE, Global Registry of Acute Coronary Events; hs-TnT, high-sensitive troponin T; PCI, percutaneous coronary intervention; TIMI, Thrombolysis in Myocardial Infarction.

Data are expressed as No. (%), mean  $\pm$  standard deviation, or median [range].

Please cite this article in press as: Ríos-Navarro C, et al. EpCAM and microvascular obstruction in patients with STEMI: a cardiac magnetic resonance study. *Rev Esp Cardiol*. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.rec.2021.04.006>

simultaneously to obtain the odds ratio (OR), 95% confidence interval (95%CI) for the variables not independently associated with MVO. For the multivariate regression analysis, all baseline characteristics were chosen. EpCAM was the only index independently associated with the presence of MVO at 1 week.

The association between EpCAM and CMR indices was performed using the Pearson or Spearman correlation test were appropriate.

Discrimination accuracy (c-statistic) for MVO prediction was computed for the EpCAM.

The relationship between EpCAM (pg/mL) and 1-week MVO (% of LV mass), between EpCAM (pg/mL) and 1-week infarct size (% of LV mass), and between EpCAM (pg/mL) and 1-week intramyocardial hemorrhage (number of segments) were analyzed using multivariate linear regression models in the entire study group. For the multivariate regression analyses, all baseline characteristics were chosen as covariates for the adjustment. Next, a reduced and parsimonious model was derived using backward stepwise selection.

The covariates included in the final model for 1-week infarct size were anterior infarction, Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) flow grade before percutaneous coronary intervention, high-sensitivity troponin T, and lymphocyte minimum count. For 1-week MVO, TIMI flow grade before PCI and high-sensitivity troponin T were selected in the final model. In the case of 1-week intramyocardial hemorrhage, diabetes mellitus, TIMI flow grade after percutaneous coronary intervention, anterior infarction and time to reperfusion were included in the final model.

The relationship at 6 months between EpCAM (pg/mL) and LVEF (%) and between EpCAM (pg/mL) and LV end-systolic volume index (mL/m<sup>2</sup>) were analyzed using multivariate linear regression models. All baseline characteristics were chosen as covariates for the adjustment. Next, a reduced and parsimonious model was derived using backward stepwise selection.

The covariates included in the final model for LVEF at 6 months were anterior infarction, TIMI flow grade before percutaneous

coronary intervention, minimum lymphocyte count and high-sensitivity troponin T. In the case of 6-month LV end-systolic volume index, minimum lymphocyte count and high-sensitivity troponin T were included in the final model.

Statistical significance was considered for a 2-tailed  $P < .05$ . The SPSS statistical package (version 15.0, SPSS Inc., Chicago, Illinois) and STATA (Version 9.0, StataCorp, College Station, Texas) were used throughout.

## RESULTS

We prospectively enrolled 127 consecutive patients discharged between July 2013 and December 2017 with inclusion criteria. Exclusion criteria were death (n = 2), reinfarction (n = 4), or clinical instability (n = 4) during the first 6 months postdischarge or any contraindication to CMR (n = 11). The final study group comprised 106 STEMI patients. The study patient flowchart is presented in figure 1 of the supplementary data.

The mean age of the sample was  $59 \pm 13$  years, and 81 (76%) were men. The infarct location was anterior in 54 patients (51%), and 20 patients (19%) were in Killip class  $\geq$  II. At 1-week CMR, the median MVO was 0 [0-2.3] % of LV mass and the mean LVEF was  $53 \pm 11\%$ .

### Association of EpCAM with extent of 1-week MVO

Serum levels of EpCAM were quantified 24 hours after reperfusion, with a median EpCAM of 4.48 pg/mL. The baseline characteristics of patients with EpCAM values below and above median are presented in table 1, showing a higher number of male than female patients with circulating EpCAM below the median.

For the CMR imaging variables at 1 week, patients with below median EpCAM levels displayed greater MVO (0.7 [0-4.2] vs 0 [0-1.5],  $P = .021$ ), infarct size ( $24 \pm 15$  vs  $17 \pm 12$ ,  $P = .019$ ), and intramyocardial hemorrhage (0 [0-2] vs 0 [0-0.8],  $P = .010$ ) (table 2).

**Table 2**  
CMR characteristics of the entire cohort and of patients with EpCAM above or below the median

|  | All patients | EpCAM below median (< 4.48 pg/mL) | EpCAM above median (> 4.48 pg/mL) | P    |
|--|--------------|-----------------------------------|-----------------------------------|------|
| <b>Number of patients</b>                        | 106          | 53                                | 53                                |      |
| <b>1-week CMR</b>                                |              |                                   |                                   |      |
| LVEF, %  | $53 \pm 11$  | $51 \pm 12$                       | $55 \pm 11$                       | .087 |
| LV end-diastolic volume index, mL/m <sup>2</sup> | $77 \pm 17$  | $77 \pm 18$                       | $76 \pm 17$                       | .810 |
| LV end-systolic volume index, mL/m <sup>2</sup>  | $37 \pm 14$  | $38 \pm 14$                       | $36 \pm 15$                       | .399 |
| LV mass, g/m <sup>2</sup>                        | $78 \pm 15$  | $79 \pm 16$                       | $76 \pm 13$                       | .195 |
| Edema (% of LV mass)                             | $30 \pm 16$  | $33 \pm 15$                       | $28 \pm 16$                       | .088 |
| MVO (% of LV mass)                               | 0 [0-2.3]    | 0.7 [0-4.2]                       | 0 [0-1.5]                         | .021 |
| Infarct size (% of LV mass)                      | $20 \pm 14$  | $24 \pm 15$                       | $17 \pm 12$                       | .019 |
| Myocardial salvage index, %                      | $31 \pm 28$  | $30 \pm 27$                       | $33 \pm 29$                       | .649 |
| Intramyocardial hemorrhage (No. of segments)     | 0 [0-2]      | 0 [0-2]                           | 0 [0-0.8]                         | .010 |
| <b>6-month CMR</b>                               |              |                                   |                                   |      |
| LVEF, %  | $58 \pm 12$  | $55 \pm 13$                       | $61 \pm 10$                       | .009 |
| LV end-diastolic volume index, mL/m <sup>2</sup> | $76 \pm 20$  | $77 \pm 23$                       | $74 \pm 17$                       | .414 |
| LV end-systolic volume index, mL/m <sup>2</sup>  | $33 \pm 17$  | $36 \pm 20$                       | $30 \pm 13$                       | .043 |
| LV mass, g/m <sup>2</sup>                        | $71 \pm 17$  | $71 \pm 16$                       | $71 \pm 17$                       | .957 |
| MVO (% of LV mass)                               | 0 [0-0]      | 0 [0-0]                           | 0 [0-0]                           | .658 |
| Infarct size (% of LV mass)                      | $17 \pm 11$  | $17 \pm 12$                       | $17 \pm 10$                       | .885 |

CMR, cardiovascular magnetic resonance; EpCAM, epithelial cell adhesion molecule; LV, left ventricular; LVEF, left ventricular ejection fraction; MVO, microvascular obstruction.

The data are expressed as absolute numbers, mean  $\pm$  standard deviation, or median [range].

Please cite this article in press as: Ríos-Navarro C, et al. EpCAM and microvascular obstruction in patients with STEMI: a cardiac magnetic resonance study. *Rev Esp Cardiol*. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.rec.2021.04.006>

**Table 3**  
Predictors of 1-week MVO: univariate and multivariate analysis

|   | Univariate analysis   |      | Multivariate analysis |      |
|---|-----------------------|------|-----------------------|------|
|   | Odds ratio<br>[95%CI] | P    | Odds ratio<br>[95%CI] | P    |
| Age, y  | 0.99 [0.96-1.02]      | .404 | 0.95 [0.88-1.03]      | .678 |
| Male sex, %   | 0.78 [0.31-1.96]      | .605 | 0.42 [0.10-1.81]      | .181 |
| Diabetes mellitus, %                                  | 2.07 [0.79-5.47]      | .141 | 3.18 [0.56-18.03]     | .263 |
| Hypertension, %                                       | 1.65 [0.76-3.56]      | .205 | 1.09 [0.31-3.85]      | .481 |
| Dyslipidemia, %                                       | 0.76 [0.35-1.65]      | .488 | 1.13 [0.33-3.85]      | .892 |
| Smoker, %   | 0.83 [0.38-1.82]      | .632 | 0.50 [0.14-1.80]      | .477 |
| Killip class, %                                       | 0.74 [0.41-1.36]      | .335 | 0.71 [0.17-2.93]      | .956 |
| Time to reperfusion, min                              | 1.0 [0.99-1.00]       | .311 | 1 [0.99-1.002]        | .646 |
| GRACE risk score                                      | 1.00 [0.99-1.01]      | .970 | 1.02 [0.99-1.05]      | .501 |
| TIMI risk score                                       | 0.96 [0.80-1.14]      | .609 | 0.74 [0.45-1.21]      | .991 |
| Anterior infarction, %                                | 1.52 [0.71-3.29]      | .283 | 1.29 [0.37-4.55]      | .566 |
| Multivessel disease (%)                               | 0.68 [0.29-1.60]      | .380 | 0.47 [0.13-1.68]      | .344 |
| TIMI flow grade before PCI, %                         | 0.73 [0.52-1.00]      | .049 | 0.66 [0.42-1.04]      | .057 |
| TIMI flow grade after PCI, %                          | 0.80 [0.25-2.52]      | .702 | 0.64 [0.14-2.91]      | .879 |
| hs-TnT  | 1.00 [1.00-1.00]      | .215 | 1 [0.99-1.01]         | .339 |
| Maximum eosinophil count (x 10 <sup>3</sup> cells/mL) | 1.00 [0.99-1.00]      | .788 | 1.003 [0.99-1.007]    | .340 |
| Minimum eosinophil count (x 10 <sup>3</sup> cells/mL) | 0.99 [0.98-1.00]      | .040 | 0.99 [0.98-1.005]     | .055 |
| Maximum lymphocyte count (x 10 <sup>3</sup> cells/mL) | 1.00 [1.00-1.00]      | .397 | 1 [0.99-1.001]        | .743 |
| Minimum lymphocyte count(x10 <sup>3</sup> cells/mL)   | 0.99 [0.99-1.00]      | .116 | 1 [0.99-1.001]        | .170 |
| EpCAM, pg/mL  | 0.58 [0.38-0.88]      | .011 | 0.55 [0.35-0.87]      | .010 |

95%CI, 95% confidence interval; EpCAM, epithelial cell adhesion molecule; GRACE, Global Registry of Acute Coronary Events; hs-TnT, high-sensitive troponin T; MVO, microvascular obstruction; PCI, percutaneous coronary intervention. TIMI, Thrombolysis in Myocardial Infarction.

In a univariate analysis, EpCAM (OR, 0.58; 95%CI, 0.38-0.88;  $P = .011$ ), TIMI flow grade before percutaneous coronary intervention (OR, 0.73; 95%CI, 0.52-1.00;  $P = .049$ ) and eosinophil minimum count (OR, 0.99; 95%CI, 0.98-1.00;  $P = .040$ ) were significantly associated with the presence of MVO. However, when we included all baseline clinical variables in a multivariate logistic regression model, only EpCAM levels were independently associated with MVO (OR, 0.55; 95%CI, 0.35-0.87;  $P = .010$ ) (table 3). Moreover, EpCAM showed a significantly discrimination accuracy for MVO prediction (c-statistic: 0.65; 95%CI, 0.54-0.75;  $P = .010$ , figure 1A). Baseline and CMR characteristics according to the presence of MVO at 1-week CMR are shown in table 1 of the supplementary data and table 2 of the supplementary data, respectively.

#### Left ventricular remodeling at 6 months

In the chronic phase (6 months), we detected an increase in LVEF ( $58 \pm 12$  vs  $53 \pm 11$ ,  $P < .001$ ), and a decrease in LV end-systolic volume index ( $33 \pm 17$  vs  $37 \pm 14$  mL/m<sup>2</sup>,  $P = .007$ ) and infarct size ( $17 \pm 11$  vs  $20 \pm 14$ %,  $P = .001$ ) compared with baseline characteristics. Conversely, no difference was observed in mean LV end-diastolic volume index ( $76 \pm 20$  vs  $77 \pm 17$  mL/m<sup>2</sup>,  $P = .932$ ). MVO and intramyocardial hemorrhage had almost vanished in all patients at 6 months.

For the CMR imaging variables at 6 months, patients with EpCAM levels below the median displayed lower values of LVEF ( $55 \pm 13$  vs  $61 \pm 10$ ,  $P = .009$ ) and higher values of LV end-systolic volume index ( $36 \pm 20$  vs  $30 \pm 13$ ,  $P = .043$ ) (table 2). LVEF at 6 months (OR, 1.05; 95%CI, 1.01-1.09,  $P = .012$ ) and LV end-systolic volume index at 6 months (OR, 0.97; 95%CI, 0.95-0.99;  $P = .048$ ) were significantly associated with low EpCAM levels.

#### Adjusted effect of EpCAM on short- and long-term cardiac structure and function

After multivariate adjustment including all baseline characteristics, serum EpCAM levels remained significantly and inversely associated with 1-week MVO ( $P = .014$ , figure 1B), 1-week infarct size ( $P = .113$ , figure 2A), and 1-week intramyocardial hemorrhage ( $P = .004$ , figure 2B). Serum EpCAM levels also showed a significant positive association with LVEF at 6 months ( $P = .017$ , figure 2C) and a nonsignificant negative association with LV end-systolic volume index at 6 months ( $P = .033$ , figure 2D).

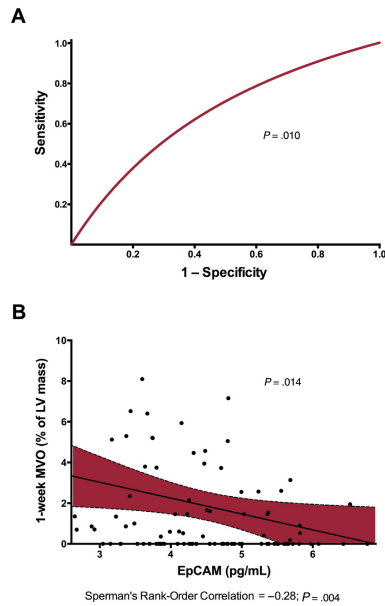
#### DISCUSSION

The main finding of our study is the association between circulating EpCAM values and CMR-derived MVO at 1 week, and long-term LV remodeling indices, in a cohort of patients with a first STEMI.

#### Microvascular obstruction

In reperfused STEMI, abnormalities in microcirculation can occur in more than 50% of patients.<sup>1,2</sup> This phenomenon is known as MVO and brings about deleterious structural and prognostic effects such as larger infarct size, more depressed systolic function, less contractile recovery and more adverse remodeling.<sup>3,4</sup> As regards prognosis, a recent meta-analysis has demonstrated that the presence of MVO increases the 2-year risk of death, reinfarction, and heart failure.<sup>14</sup> Collectively, MVO leads to adverse structural and prognostic consequences.

Please cite this article in press as: Ríos-Navarro C, et al. EpCAM and microvascular obstruction in patients with STEMI: a cardiac magnetic resonance study. Rev Esp Cardiol. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.rec.2021.04.006>



**Figure 1.** Predictive value and association of EpCAM with respect to 1-week MVO. A: EpCAM showed a significant discrimination accuracy ( $c$ -statistic) for MVO prediction. B: after adjustment for baseline characteristics, EpCAM showed a negative association with 1-week MVO in the study group. EpCAM, epithelial cell adhesion molecule; LV, left ventricular; MVO, microvascular obstruction.

The last 2 decades have seen important progress in MVO detection, ranging from purely clinical predictors (Killip class, reperfusion delay, presence of diabetes mellitus and the sum of ST-segment elevation at initial electrocardiogram),<sup>5</sup> widely available markers (leukocyte counts)<sup>15,16</sup> and invasive parameters, to the advent of sophisticated noninvasive imaging techniques.<sup>17,18</sup> However, late gadolinium enhancement CMR is currently the most reliable technique to determine the presence and extent of MVO, defined as those regions within the core of an infarcted hyper-enhanced area with lack of contrast uptake.<sup>1,5</sup>

According to our data, minimum eosinophil count, but not Killip class, the presence of diabetes and lymphocyte count were associated with the extent of CMR-derived MVO at 1 week (table 1 of the supplementary data). Although other baseline variables have been described to correlate with the occurrence of MVO, this was not confirmed in our cohort, probably due to the limited sample size.

#### Circulating biomarkers associated with microvascular obstruction

In recent years, important insights have been made into the pathophysiology and diagnosis of MVO, yet the predictive value of serum biomarkers in MVO detection and quantification is under-

studied. Some studies have reported a correlation between nonspecific biomarkers (eg, high-sensitivity troponin T, lactate dehydrogenase, and natriuretic peptides, among others) and CMR-derived MVO.<sup>19,20</sup> Although we detected a positive correlation between high-sensitivity troponin T and the extent of 1-week MVO in our cohort (table 1 of the supplementary data), this universal biomarker was not significantly associated with MVO in either the univariate or the multivariate logistic regression models. However, none of these are exclusively implicated in MVO pathophysiology. Scrutinizing biomarkers specifically related to the pathophysiology of this complication is therefore mandatory.

Although MVO is a multifactorial phenomenon with several mechanisms acting both simultaneously and sequentially in the genesis of MVO,<sup>2</sup> endothelial cells play a pivotal role. In the context of reperfusion STEMI, endothelial abnormalities, specifically decreased myocardial capillary density soon after ischemia onset, augmented endothelial permeability due to sudden swelling, and disruption of endothelial cell junctions leading to interstitial edema, have been reported to play a role in deficient cardiac microvascularization post-STEMI.<sup>6,7,21</sup> Since endothelium seems to participate actively in MVO pathophysiology, our goal was to determine whether biomarkers specifically implicated in endothelial integrity are linked to the appearance of CMR-derived MVO and the resultant cardiac structure in reperfusion STEMI.

#### EpCAM is independently associated with MVO after reperfusion STEMI

Under physiological conditions, endothelial cells control nutrients and oxygen diffusion and maintain coagulation, leukocyte migration and platelet activation under control. However, their disruption could exert deleterious effects, including edema, erythrocyte and leukocyte extravasation, as well as disturbed vascular hemostasis.<sup>22</sup> Endothelial structure and communication is mediated via tight adherens and gap junctions. EpCAM, a type I transmembrane superficial glycoprotein, is found in the basolateral membrane of multiple normal epithelial cells.<sup>5,23</sup> This protein is widely implicated in cancer development due to its overexpression in neoplastic cells. Several studies have pointed to the association of heightened EpCAM expression with metastasis in epithelial tumors and decreased patient survivorship.<sup>9</sup> Indeed, some clinical trials are currently underway in a wide variety of carcinomas to evaluate the efficacy of EpCAM-directed blocking antibodies (ie, adecatumumab or edrecolomab) as monotherapy or in combination therapy.

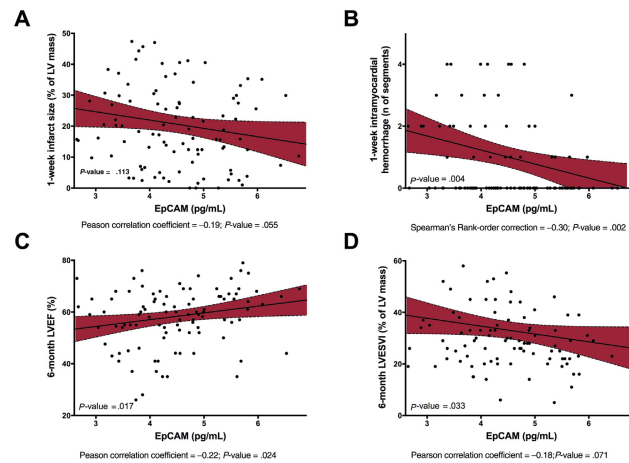
To our knowledge, this is the first study evaluating the role of EpCAM in the cardiovascular setting. According to our data, lower EpCAM expression correlates significantly with greater MVO at 1 week, as well as with depressed long-term systolic invasive function.

#### Possible interference of EpCAM in MVO via angiogenesis promotion

Angiogenesis has been reported to participate in MVO repair. Several studies performed in both clinical and experimental models have highlighted the rapid overexpression of proangiogenic markers in both serum and infarcted myocardium.<sup>7,24–26</sup> Indeed, experimental studies aimed at promoting angiogenesis have resulted in increased microvascular density, reduced infarct size, and preserved systolic function.<sup>7,27,28</sup>

The involvement of EpCAM in promoting angiogenesis has been demonstrated in different scenarios. First, in a cohort of 98 glioma samples, EpCAM overexpression correlated with cancer malignancy and angiogenesis, as reflected by a heightened microvessel

Please cite this article in press as: Ríos-Navarro C, et al. EpCAM and microvascular obstruction in patients with STEMI: a cardiac magnetic resonance study. *Rev Esp Cardiol.* 2021. <https://doi.org/10.1016/j.rec.2021.04.006>



**Figure 2.** Association of EpCAM with 1-week infarct size, 1-week intramyocardial hemorrhage, 6-month LVEF, and 6-month LVESVI. In a multivariate linear regression analysis, EpCAM showed a negative association with 1-week infarct size (A), intramyocardial hemorrhage (B) a positive relationship with 6-month LVEF (C) and 6-month LVESVI (D), after STEMI. EpCAM, epithelial cell adhesion molecule; LV, left ventricular; LVEF, left ventricular ejection fraction; LVESVI, left ventricular end-systolic volume index; STEMI, ST-segment elevation myocardial infarction.

density.<sup>29</sup> Second, in breast cancer, EpCAM seems to promote cancer invasion since specific ablation of this molecule leads to lower vessel formation, probably due to its interference with interleukin-8.<sup>30</sup> Last, in patients with nonalcoholic steatohepatitis, a positive correlation has been found between 2 proangiogenic molecules (vascular endothelial growth factor and angiotensin-2) and EpCAM.<sup>31</sup> According to these previous results, we could hypothesize that EpCAM may promote angiogenesis in the infarcted myocardium, resulting in decreased MVO and better ventricular remodeling. However, further research both at the bench and bedside is necessary to corroborate this issue.

Although this new biomarker could be incorporated into our daily armamentarium to early detect MVO in STEMI patients, this was not the objective of our research. Further research in a larger cohort of STEMI patients is mandatory to confirm the role of EpCAM levels on MVO appearance as well as their specific role in microvascular dysfunction.

#### Study limitations

This study should be interpreted in the context of certain limitations. First, as an observational study, we cannot rule out selection bias or unmeasured confounding factors; second, the lack of serial measurements precludes assessing the significance of dynamic changes in circulating EpCAM over time. Last, infarct size, MVO, and edema were quantified by manual planimetry and there are some discrepancies about the reproducibility of this technique.

#### CONCLUSIONS

Our study illustrates for the first time that circulating EpCAM values after reperfused STEMI are associated with CMR-derived MVO in the acute phases and long-term adverse ventricular

remodeling. Although further studies are necessary to corroborate the results, these findings contribute to a better understanding of MVO pathophysiology and could be helpful in biochemical assessment of the extent of MVO.

#### FUNDING

This study was funded by *Instituto de Salud Carlos III* and *Fondos Europeos de Desarrollo Regional FEDER* [research grants PI17/01836, PI20/00637 and CIBERC16/11/00486, and a postgraduate contract FI18/00320 to C. Ríos-Navarro].

#### AUTHORS' CONTRIBUTIONS

C. Ríos-Navarro, and J. Gavara contributed equally to this work. C. Ríos-Navarro<sup>1</sup> performed research, collected the data, performed the analysis, wrote the paper, and revised the final manuscript. J. Gavara conducted research, collected the data, performed the analysis, wrote the paper, and revised the final manuscript. J. Núñez conceived and designed the analysis, collected the data, and revised the final manuscript. E. Revuelta-López conducted research, collected the data, and revised the final manuscript. J.V. Monmeneu conducted research, collected the data, and revised the final manuscript. M.P. López-Lereu conducted research, collected the data, and revised the final manuscript. E. de Dios conducted research, collected the data, and revised the final manuscript. M.P. López-Lereu conducted research, collected the data, and revised the final manuscript. N. Pérez-Solé conducted research, collected the data, and revised the final manuscript. M.P. López-Lereu conducted research, collected the data, and revised the final manuscript. J.M. Vila collected the data and revised the final manuscript. R. Oltra collected the data and revised the final manuscript. F.J. Chorro collected the data, obtained

Please cite this article in press as: Ríos-Navarro C, et al. EpCAM and microvascular obstruction in patients with STEMI: a cardiac magnetic resonance study. *Rev Esp Cardiol.* 2021. <https://doi.org/10.1016/j.rec.2021.04.006>



funding, and revised the final manuscript. A. Bayés-Genís conceived and designed the analysis, obtained funding, drafted the paper, and revised the final manuscript. V. Bodi conceived and designed the analysis, obtained funding, drafted the paper, and revised the final manuscript.

#### CONFLICTS OF INTEREST

The authors have no conflicts of interest to declare.

#### WHAT IS KNOWN ABOUT THE TOPIC?

- MVO is associated with worse prognosis after STEMI. MVO is a multifactorial phenomenon in which endothelial cells play a pivotal role. EpCAM participates in endothelium physiology and its involvement is understudied in cardiovascular diseases. Exploring EpCAM as a predictor of extensive MVO is crucial to gain greater insight into MVO pathophysiology and provide new therapeutic alternatives.

#### WHAT DOES THIS STUDY ADD?

- Circulating EpCAM values at 24 hours after coronary revascularization are negatively associated with CMR-derived MVO at 1 week. Higher EpCAM values also correlate with long-term LV remodeling indices, as reflected by a reduced LVEF and increased LV end-systolic volume. These are preliminary results and future studies are needed to confirm EpCAM as a biomarker, and eventually as a biotarget in STEMI pathophysiology.

#### APPENDIX. SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data associated with this article can be found in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.rec.2021.04.006>

#### REFERENCES

- Niccoli G, Scalone G, Lerman A, Crea F. Coronary microvascular obstruction in acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2016;37:1024–1033.
- Ríos-Navarro C, Marcos-Garcés V, Bayés-Genís A, Husser O, Nuñez J, Bodi V. Microvascular obstruction in ST-segment elevation myocardial infarction: Looking back to move forward. *Focus on CMR J Clin Med*. 2019;28:1805.
- Hamirani YS, Wong A, Kramer CM, Salerno M. Effect of microvascular obstruction and intramyocardial hemorrhage by CMR on LV remodeling and outcomes after myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2014;7:940–952.
- Bodi V, Sanchis J, Nuñez J, et al. Prognostic value of a comprehensive cardiac magnetic resonance assessment soon after a first ST-segment elevation myocardial infarction. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2009;2:835–842.
- Husser O, Bodi V, Sanchis J, et al. Predictors of cardiovascular magnetic resonance-derived microvascular obstruction on patient admission in STEMI. *Int J Cardiol*. 2013;166:77–84.
- Hollander MR, de Waard GA, Konijnenberg LS, et al. Dissecting the effects of ischemia and reperfusion on the coronary microcirculation in a rat model of acute myocardial infarction. *PLoS One*. 2016;11:e0157233.
- Ríos-Navarro C, Hueso L, Miñana G, et al. Coronary serum obtained after myocardial infarction induces angiogenesis and microvascular obstruction repair. Role of hypoxia-inducible factor-1A. *Rev Esp Cardiol*. 2018;71:440–449.
- Huang L, Yang Y, Yang F, et al. Functions of EpCAM in physiology processes and diseases. *Int J Mol Med*. 2018;42:1771–1785.
- Mohr MA, Syafruddin SE, Nasir SN, Yew LT. Revisiting the roles of pro-metastatic EpCAM in cancer. *Biomolecules*. 2020;10:255.
- Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD. Third universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2012;33:2251–2267.
- Assarsson E, Lundberg M, Holmquist G, et al. Homogenous 96-plex PEA immunoassay exhibiting high sensitivity, specificity, and excellent scalability. *PLoS One*. 2014;9:e095192.
- Gavara J, Rodríguez-Palomares JF, Valente F, et al. Prognostic value of strain by tissue tracking cardiac magnetic resonance after ST-segment elevation myocardial infarction. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2018;11:1448–1457.
- Miñana G, Nuñez J, Bayés-Genís A, et al. ST2 and left ventricular remodeling after ST-segment elevation myocardial infarction: A cardiac magnetic resonance study. *Int J Cardiol*. 2018;270:336–342.
- Reichek N. Meta-analysis of MACE in MI. *What's the MO? JACC Cardiovasc Imaging*. 2014;7:953–955.
- Ríos-Navarro C, Gavara J, Vidal V, et al. Characterization and implications of the dynamics of eosinophils in blood and in the infarcted myocardium after coronary reperfusion. *PLoS One*. 2018;13:e0206344.
- Bodi V, Sanchis J, Nuñez J, et al. Post-reperfusion lymphopenia and microvascular obstruction in ST-segment elevation acute myocardial infarction. *Rev Esp Cardiol*. 2009;62:1109–1117.
- Bekkers SG, Yazdani SK, Virmani R, Waltenberger J. Microvascular obstruction: Underlying pathophysiology and clinical diagnosis. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55:1649–1660.
- Jaffe R, Charon T, Puley G, Dick A, Strauss BH. Microvascular obstruction and the no-reflow phenomenon after percutaneous coronary intervention. *Circulation*. 2008;117:3152–3156.
- Younger JF, Plein S, Barth J, Ridgway JP, Ball SC, Greenwood JP. Troponin-I concentration 72 h after myocardial infarction correlates with infarct size and presence of microvascular obstruction. *Heart*. 2007;93:1547–1551.
- Feistritzer HJ, Reinstadler SJ, Klug G, et al. Multimarker approach for the prediction of microvascular obstruction after acute ST-segment elevation myocardial infarction: a prospective, observational study. *BMC Cardiovasc Disord*. 2016;16:239.
- Yajima S, Miyagawa S, Fukushima S, et al. Microvascular dysfunction related to progressive left ventricular remodeling due to chronic occlusion of the left anterior descending artery in an adult porcine heart. *Int Heart J*. 2019;60:715–727.
- Jackson SP, Darbousset R, Shoenwaelder SM. Thromboinflammation: challenges of therapeutically targeting coagulation and other host defense mechanisms. *Blood*. 2019;133:906–918.
- Schnell U, Cirulli V, Giepmans BNG. EpCAM: Structure and function in health and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1828:1989–2001.
- Liu KL, Lin SM, Chang CH, Chen YC, Chu PH. Plasma angiotensin-1 level, left ventricular ejection fraction, and multivessel disease predict development of 1-year major adverse cardiovascular events in patients with acute ST elevation myocardial infarction – a pilot study. *Int J Cardiol*. 2015;182:155–160.
- Iribarren C, Phelps BH, Darbinian JA, et al. Circulating angiotensin-1 and -2, angiotensin receptor Tie-2 and vascular endothelial growth factor-A as biomarkers of acute myocardial infarction: a prospective nested case-control study. *BMC Cardiovasc Disord*. 2011;11:31.
- Hashimoto E, Ogita T, Nakaoka T, Matsuoka T, Takao A, Kira Y. Rapid induction of vascular endothelial growth factor expression by transient ischemia in rat heart. *Am J Physiol*. 1994;267:H1948–H1954.
- Siddiqui AJ, Blomberg P, Wårdell E, et al. Combination of angiotensin-1 and vascular endothelial growth factor gene therapy enhances arteriogenesis in the ischemic myocardium. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;310:1002–1009.
- Ríos-Navarro C, Hueso L, Diaz A, et al. Role of antiangiogenic VEGF-A 165 b in angiogenesis and systolic function after reperfusion myocardial infarction. *Rev Esp Cardiol*. 2021;74:131–139.
- Chen X, Ma WY, Xu SC, et al. The overexpression of Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) in glioma. *J Neurooncol*. 2014;119:39–47.
- Sankpal NV, Fleming TP, Gillanders WE. EpCAM modulates NF-κB signaling and interleukin-8 expression in breast cancer. *Mol Cancer Res*. 2013;11:418–426.
- Siddiqui H, Rawal P, Bihari C, Arora N, Kaur S. Vascular endothelial growth factor promotes proliferation of epithelial cell adhesion molecule-positive cells in non-alcoholic steatohepatitis. *J Clin Exp Hepatol*. 2020;10:275–283.

Please cite this article in press as: Ríos-Navarro C, et al. EpCAM and microvascular obstruction in patients with STEMI: a cardiac magnetic resonance study. *Rev Esp Cardiol*. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.rec.2021.04.006>



#### **SUPPLEMENTARY DATA**

##### **Biomarker assay**

Serum Epithelial cell adhesion molecule levels were analyzed using the Olink CARDIOVASCULAR III panel (Olink Proteomics, Uppsala, Sweden). The Proximity Extension Assay technology used for the Proseek Multiplex protocol has been well described.<sup>1</sup>

In brief, pairs of oligonucleotide-labeled antibody probes bind to their targeted protein; if the 2 probes are brought into close proximity, the oligonucleotides will hybridize in a pair-wise manner. The addition of a DNA polymerase leads to a proximity-dependent DNA polymerization event, generating a unique polymerase chain reaction target sequence. The resulting DNA sequence is subsequently detected and quantified using a microfluidic real-time polymerase chain reaction instrument (Biomark HD, Fluidigm). Data are then quality controlled and normalized using an internal extension control and an inter-plate control to adjust for intrarun and interrune variation. The final assay readout is presented in normalized protein expression values, which is an arbitrary unit on a log<sub>2</sub> scale in which a high value corresponds to a higher protein expression. All assay validation data (eg, detection limits, intraassay and interassay precision data) are available on the manufacturer's website.

##### **Cardiac magnetic resonance acquisition, sequences, and quantification**

Images were acquired by a phased-array body surface coil during breath-holds and were triggered by electrocardiography. Cine images were acquired in 2-, 3-, and 4-chamber views, and in short-axis views using a steady-state free precession sequence (repetition time/echo time: 2.8/1.2 ms; flip angle: 58 degrees; matrix: 256 × 300; field of view: 320 × 270 mm; slice thickness: 7 mm).<sup>2,3</sup>

Late gadolinium enhancement imaging was performed 10 to 15 minutes after administration of 0.1 mmol/kg of gadolinium diethylenetriaminepentaacetic acid (Magnegraf, Juste S.A.Q.F., Madrid, Spain) in the same locations as in the cine images using a segmented inversion recovery steady-state free

precession sequence (repetition time/echo time: 750/1.26 ms; flip angle: 45 degrees; matrix: 256 × 184; field of view: 340 × 235 mm; slice thickness: 7 mm). Inversion time was adjusted to null normal myocardium.<sup>2,3</sup>

Black blood, T<sub>2</sub>-weighted short TI inversion recovery sequences were obtained in the same short-axis view as the cine sequences, all in mid-diastole. A half-Fourier acquisition single-shot turbo-spin echo multisection sequence was used (recovery time: 2 R-R intervals; echo time: 33 ms; inversion time: 170 ms; slice thickness: 8 mm; interslice interval: 2 mm; flip angle: 160 degrees; matrix: 256 × 151; bandwidth: 781 Hz/pixel). Additionally, a segmented turbo-spin echo sequence was obtained with 1 slice per breath-hold (recovery time: 2 R-R intervals; echo time: 100 ms; inversion time: 170 ms; slice thickness: 8 mm; interslice interval: 2 mm; flip angle: 180 degrees; matrix: 256 × 146; bandwidth: 235 Hz/pixel).<sup>2,3</sup>

Left ventricular (LV) ejection fraction (LVEF, %), LV end-diastolic volume index (LVEDVI, mL/m<sup>2</sup>), LV end-systolic volume index (LVESVI, mL/m<sup>2</sup>), and LV mass index (g/m<sup>2</sup>) were calculated by manual planimetry of endocardial and epicardial borders in short-axis view cine images.<sup>2,3</sup>

Areas showing late gadolinium enhancement were visually quantified by manual planimetry. Infarct size (% of LV mass) was assessed as the percentage of LV mass showing late gadolinium enhancement. Microvascular obstruction (MVO, % of LV mass) was quantified by manual planimetry and defined as the percentage of LV mass showing a lack of contrast uptake in the tissue core showing late gadolinium enhancement.<sup>2,3</sup>

Myocardial edema was regarded as areas of high T<sub>2</sub> signal intensity. A core of low signal intensity surrounded by an area with high signal intensity indicated myocardial hemorrhage (included in the area of myocardial edema). For all sections, only the T<sub>2</sub>-weighted sequence with the highest image quality was used to analyze edema and hemorrhage. All short-axis sections were separately analyzed, and the presence of signal intensity at least 2 SD greater than that of a remote noninfarcted area in the same section indicated edema. Then, myocardial edema and myocardial hemorrhage were

**Revista Española de Cardiología**

Ríos-Navarro C, et al. *EpCAM and microvascular obstruction in patients with STEMI: a cardiac magnetic resonance study*

manually revised and expressed as the percentage of LV mass. The myocardial salvage index was calculated by subtracting the mass of infarcted myocardium from myocardium showing edema and expressed as the percentage of LV mass with myocardial edema.<sup>2,3</sup>

**REFERENCES**

1. Assarsson E, Lundberg M, Holmquist G, et al. Homogenous 96-plex PEA immunoassay exhibiting high sensitivity, specificity, and excellent scalability. *PLoS One* 2014;9:e95192.
2. Gavara J, Rodriguez-Palomares JF, Valente F, et al. Prognostic value of strain by tissue tracking cardiac magnetic resonance after ST-segment elevation myocardial infarction. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2018;11:1448-1457.
3. Miñana G, Núñez J, Bayés-Genís A, et al. ST2 and left ventricular remodeling after ST-segment elevation myocardial infarction: A cardiac magnetic resonance study. *Int J Cardiol*. 2018;270:336-342.

**Table 1 of the supplementary data.** Baseline characteristics, angiographic indices, and biomarkers of patients with or without 1-week MVO

|  | With MVO         | Without MVO      | P    |
|--|------------------|------------------|------|
| <b>Number of patients</b>                                | 53               | 53               |      |
| <b>Baseline characteristics</b>                          |                  |                  |      |
| Age, y   | 58 ± 12          | 60 ± 13          | .407 |
| Male sex, %  | 39 (74)          | 42 (79)          | .604 |
| Diabetes mellitus, %                                     | 14 (26)          | 8 (15)           | .136 |
| Hypertension, %  | 30 (57)          | 25 (47)          | .203 |
| Dyslipidemia, %  | 22 (42)          | 26 (49)          | .488 |
| Smoker, %  | 31 (59)          | 35 (66)          | .632 |
| Killip class, %  |                  |                  | .558 |
| 1  | 44 (83)          | 42 (79)          |      |
| 2  | 8 (15)           | 7 (13)           |      |
| 3  | 0 (0)            | 1 (2)            |      |
| 4  | 1 (2)            | 3 (6)            |      |
| Time to reperfusion, min                                 | 208 [145-395]    | 180 [143-345]    | .578 |
| GRACE risk score   | 134 ± 35         | 133 ± 36         | .970 |
| TIMI risk score  | 2 [1-4]          | 2 [1-4]          | .820 |
| <b>Angiographic indices</b>                              |                  |                  |      |
| Anterior infarction, %                                   | 29 (55)          | 25 (47)          | .283 |
| Multivessel disease, %                                   | 14 (26)          | 18 (34)          | .379 |
| TIMI flow grade before PCI, %                            |                  |                  | .093 |
| 0  | 38 (72)          | 28 (53)          |      |
| 1  | 1 (2)            | 5 (9)            |      |
| 2  | 3 (6)            | 4 (8)            |      |
| 3  | 11 (20)          | 16 (30)          |      |
| TIMI flow grade after PCI, %                             |                  |                  | .571 |
| 0  | 0 (0)            | 0 (0)            |      |
| 1  | 1 (2)            | 0 (0)            |      |
| 2  | 4 (8)            | 5 (10)           |      |
| 3  | 48 (90)          | 48 (90)          |      |
| <b>Biomarkers</b>  |                  |                  |      |
| hs-TnT   | 3555 [2279-6156] | 2313 [919-3680]  | .002 |
| Maximum eosinophil count<br>(x 10 <sup>3</sup> cells/mL) | 210 [140-333]    | 200 [170-300]    | .802 |
| Minimum eosinophil count<br>(x 10 <sup>3</sup> cells/mL) | 20 [10-60]       | 40 [20-90]       | .045 |
| Maximum lymphocyte count<br>(x 10 <sup>3</sup> cells/mL) | 2395 [1913-3205] | 2510 [1885-3610] | .417 |
| Minimum lymphocyte count<br>(x 10 <sup>3</sup> cells/mL) | 1175 [910-1535]  | 1370 [1025-1880] | .114 |
| EpCAM, pg/mL   | 4.3 ± 0.9        | 4.8 ± 1.0        | .009 |

**Revista Española de Cardiología**

*Ríos-Navarro C, et al. EpCAM and microvascular obstruction in patients with STEMI:  
a cardiac magnetic resonance study*

EpCAM, epithelial cell adhesion molecule, GRACE, Global Registry of Acute Coronary Events, hs-TnT, high-sensitive troponin T, MVO, microvascular obstruction, PCI, percutaneous coronary intervention, TIMI, Thrombolysis in Myocardial Infarction.

Data are expressed as No. (%), mean  $\pm$  standard deviation, or median [range].

**Table 2 of the supplementary data.** CMR characteristics of the entire cohort and of patients with and without 1-week MVO

|  | With MVO      | Without MVO | P     |
|--|---------------|-------------|-------|
| <i>Number of patients</i>                        | 53            | 53          |       |
| <b>1-week CMR</b>                                |               |             |       |
| LVEF, %  | 49 ± 10       | 56 ± 12     | .001  |
| LV end-diastolic volume index, mL/m <sup>2</sup> | 79 ± 16       | 75 ± 19     | .212  |
| LV end-systolic volume index, mL/m <sup>2</sup>  | 41 ± 12       | 33 ± 15     | .007  |
| LV mass, g/m <sup>2</sup>                        | 81 ± 16       | 74 ± 13     | .009  |
| Edema (% of LV mass)                             | 38 ± 14       | 23 ± 16     | <.001 |
| MVO (% of LV mass)                               | 2.3 [0.9-5.2] | 0 [0-0]     | <.001 |
| Infarct size (% of LV mass)                      | 29 ± 13       | 13 ± 10     | <.001 |
| Myocardial salvage index, %                      | 24 ± 21       | 39 ± 32     | .005  |
| Intramyocardial hemorrhage (No. of segments)     | 2 [0-3]       | 0 [0-0]     | <.001 |
| <b>6-month CMR</b>                               |               |             |       |
| LVEF, %  | 54 ± 13       | 62 ± 9      | <.001 |
| LV end-diastolic volume index, mL/m <sup>2</sup> | 83 ± 23       | 70 ± 15     | .001  |
| LV end-systolic volume index, mL/m <sup>2</sup>  | 40 ± 20       | 27 ± 9      | <.001 |
| LV mass, g/m <sup>2</sup>                        | 74 ± 18       | 68 ± 15     | .062  |
| MVO (% of LV mass)                               | 0 [0-0]       | 0 [0-0]     | .143  |
| Infarct size (% of LV mass)                      | 23 ± 10       | 12 ± 9      | <.001 |

CMR, cardiovascular magnetic resonance, LV, left ventricular, LVEF, left ventricular ejection fraction,

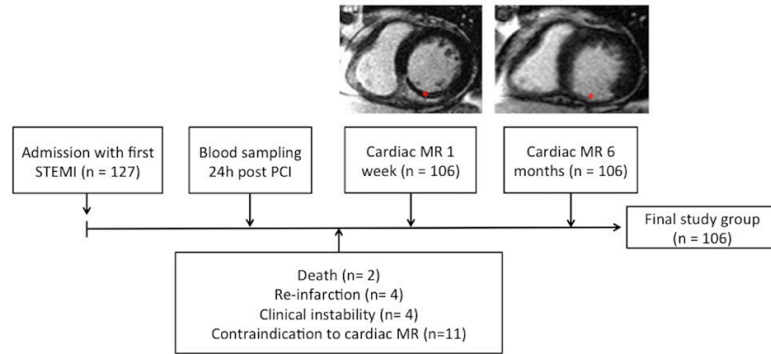
MVO, microvascular obstruction.

Data are expressed as mean ± standard deviation or median [range].

*Revista Española de Cardiología*  
Ríos-Navarro C, et al. EpCAM and microvascular obstruction in patients with STEMI:  
a cardiac magnetic resonance study

**FIGURE LEGENDS**

**Figure 1 of the supplementary data.** Flowchart of the enrolment protocol for STEMI patients. Asterisks indicate regions with MVO.



MR, magnetic resonance. MVO, microvascular obstruction, PCI, percutaneous coronary intervention, STEMI, ST-segment elevation myocardial infarction.





### **ANEXO III:**

Ríos-Navarro C, Hueso L, Díaz A, et al. Role of antiangiogenic VEGF-A<sub>165b</sub> in angiogenesis and systolic function after reperfused myocardial infarction. Rev Esp Cardiol. 2021;74:131-9.



## Original article

Role of antiangiogenic VEGF-A<sub>165b</sub> in angiogenesis and systolic function after reperfused myocardial infarction

César Ríos-Navarro,<sup>a,◇</sup> Luisa Hueso,<sup>a,◇</sup> Ana Díaz,<sup>b</sup> Víctor Marcos-Garcés,<sup>c</sup> Clara Bonanad,<sup>a,c,d</sup> Amparo Ruiz-Sauri,<sup>a,e</sup> José M. Vila,<sup>f</sup> María J. Sanz,<sup>a,g,h</sup> Francisco J. Chorro,<sup>a,c,d,i</sup> Laura Piqueras,<sup>a,g,h,\*</sup> and Vicente Bodi<sup>a,c,d,i,\*</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA, Valencia, Spain

<sup>b</sup>Unidad Central de Investigación Biomédica (UCIM), Universidad de Valencia, Valencia, Spain

<sup>c</sup>Servicio de Cardiología, Hospital Clínico Universitario de Valencia, Valencia, Spain

<sup>d</sup>Departamento de Medicina, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Valencia, Valencia, Spain

<sup>e</sup>Departamento de Patología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Valencia, Valencia, Spain

<sup>f</sup>Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Valencia, Valencia, Spain

<sup>g</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Madrid, Spain

<sup>h</sup>Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Valencia, Valencia, Spain

<sup>i</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), Madrid, Spain

## Article history:

Received 27 September 2019

Accepted 30 March 2020

Available online 28 May 2020

## Keywords:

Myocardial infarction

Angiogenesis

VEGF-A<sub>165b</sub>

## ABSTRACT

**Introduction and objectives:** Angiogenesis helps to reestablish microcirculation after myocardial infarction (MI). In this study, we aimed to further understand the role of the antiangiogenic isoform vascular endothelial growth factor (VEGF)-A<sub>165b</sub> after MI and to explore its potential as a coadjuvant therapy to coronary reperfusion.

**Methods:** Two mice MI models were formed: a) permanent coronary ligation (nonreperused MI); b) transient 45-minute coronary occlusion followed by reperfusion (reperused MI); in both models, animals underwent echocardiography before euthanasia at day 21 after MI induction. We determined serum and myocardial VEGF-A<sub>165b</sub> levels. In both experimental MI models, we assessed the functional and structural role of VEGF-A<sub>165b</sub> blockade. In a cohort of 104 ST-segment elevation MI patients, circulating VEGF-A<sub>165b</sub> levels were correlated with cardiovascular magnetic resonance-derived left ventricular ejection fraction at 6 months and with the occurrence of adverse events (death, heart failure, and/or reinfarction).

**Results:** In both models, circulating and myocardial VEGF-A<sub>165b</sub> levels were increased 21 days after MI induction. Serum VEGF-A<sub>165b</sub> levels inversely correlated with systolic function evaluated by echocardiography. VEGF-A<sub>165b</sub> blockade increased capillary density, reduced infarct size, and enhanced left ventricular function in reperused, but not in nonreperused, MI experiments. In patients, higher VEGF-A<sub>165b</sub> levels correlated with depressed ejection fraction and worse outcomes.

**Conclusions:** In experimental and clinical studies, higher serum VEGF-A<sub>165b</sub> levels are associated with worse systolic function. Their blockade enhances neoangiogenesis, reduces infarct size, and increases ejection fraction in reperused, but not in nonreperused, MI experiments. Therefore, VEGF-A<sub>165b</sub> neutralization represents a potential coadjuvant therapy to coronary reperfusion.

© 2020 Sociedad Española de Cardiología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Implicación de la isoforma antiangiogénica VEGF-A<sub>165b</sub> en la angiogénesis y la función sistólica tras un infarto de miocardio reperfundido

## RESUMEN

**Introducción y objetivos:** La angiogénesis participa en la restauración de la microcirculación después de un infarto agudo de miocardio (IAM). El objetivo de este estudio es explorar el papel que juega la isoforma anti-angiogénica del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)-A<sub>165b</sub> y explorar su potencial como terapia coadyuvante a la reperusión coronaria.

**Métodos:** Se realizaron dos modelos murinos de IAM: a) ligadura permanente de la arteria coronaria (IAM no reperfundido) y b) oclusión transitoria durante 45 minutos de la arteria coronaria seguida de reperusión (IAM reperfundido); en ambos modelos, se realizó a los animales una ecocardiografía previa a la eutanasia el día 21 pos-IAM. Se determinaron los niveles séricos y miocárdicos de VEGF-A<sub>165b</sub>. En

## Palabras clave:

Infarto agudo de miocardio

Angiogénesis

VEGF-A<sub>165b</sub>

## SEE RELATED CONTENT:

<https://doi.org/10.1016/j.rec.2020.07.019>

\* Corresponding authors: Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA. Avda. Menéndez Pelayo 4acc, 46010 Valencia, Spain.

E-mail addresses: [piqueras\\_lau@gva.es](mailto:piqueras_lau@gva.es) (L. Piqueras), [vicente.bodi@uv.es](mailto:vicente.bodi@uv.es) (V. Bodi).

◇ Both authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.rec.2020.03.013>

1885-5857/© 2020 Sociedad Española de Cardiología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

ambos modelos experimentales se evaluó la implicación funcional y estructural del bloqueo de esta isoforma. En una cohorte de 104 pacientes con IAM con elevación del segmento ST se cuantificaron los niveles circulantes de VEGF-A<sub>165b</sub> y se estudió su asociación con la fracción de eyección del ventrículo izquierdo determinada mediante resonancia magnética cardíaca a los 6 meses del IAM, así como con la aparición de eventos adversos (muerte, insuficiencia cardíaca o reinfarcto) durante el seguimiento.

**Resultados:** En ambos modelos, los niveles séricos y tisulares de VEGF-A<sub>165b</sub> habían aumentado a los 21 días de la inducción del IAM. Además, existía una correlación negativa entre los valores circulantes de VEGF-A<sub>165b</sub> y la función sistólica evaluada mediante ecocardiografía. El bloqueo *in vivo* de VEGF-A<sub>165b</sub> se relacionó con una mayor densidad microvascular, menor tamaño de infarcto y mejor fracción de eyección en el modelo de IAM reperfundido, pero no en el modelo de IAM no reperfundido. En la cohorte de pacientes, aquellos con unos niveles séricos elevados de VEGF-A<sub>165b</sub> presentaron una fracción de eyección deprimida y una mayor tasa de eventos adversos.

**Conclusiones:** En estudios experimentales y clínicos, valores séricos elevados de VEGF-A<sub>165b</sub> se asocian con una peor función sistólica. Su bloqueo incrementa la neoangiogénesis, reduce el tamaño del infarcto y aumenta la fracción de eyección en el modelo de IAM reperfundido, pero no en el de sin reperfundido. En consecuencia, la neutralización de VEGF-A<sub>165b</sub> representa una potencial opción terapéutica como coadyuvante a la reperfusión coronaria.

© 2020 Sociedad Española de Cardiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

#### Abbreviations

CMR: cardiovascular magnetic resonance  
LVEF: left ventricular ejection fraction  
MACE: major adverse cardiac events  
MI: myocardial infarction  
STEMI: ST-segment elevation myocardial infarction  
VEGF: vascular endothelial growth factor

#### INTRODUCTION

Despite complete reperfusion at the epicardial level after myocardial infarction (MI), deterioration of myocardial perfusion can persist in more than 50% of patients. This phenomenon is known as microvascular obstruction and has deleterious structural and prognostic effects.<sup>1,2</sup> To further minimize microvascular damage, it is mandatory to evaluate new coadjuvant therapies to early reperfusion.

Angiogenesis is involved in the repair process post-MI by reestablishing microvascular circulation, providing oxygen and nutrients to the cardiac tissue.<sup>3</sup> In the MI scenario, the concentration of proangiogenic vascular endothelial growth factor (VEGF)-A was increased in plasma and the infarcted myocardium soon after MI induction.<sup>4</sup> VEGF-A can be differentially spliced to generate the antiangiogenic VEGF-A<sub>165b</sub> isoform.<sup>5</sup> In a cohort of 50 ST-segment elevation MI (STEMI) patients, serum VEGF-A<sub>165b</sub> levels were reported to increase post-MI and were associated with impaired cardiac structure determined by cardiovascular magnetic resonance (CMR) at first week after MI<sup>6</sup>. However, to date, the effects of VEGF-A<sub>165b</sub> activity in experimental models of MI and the potential effects of its blockade are still unknown.

To gain further insights into the role of VEGF-A<sub>165b</sub> post-MI and explore its potential as a coadjuvant therapy to early coronary reperfusion, the specific objectives of the present study were as follows. In 2 mice experimental MI models (nonreperfused and reperfused MI): *a*) to determine the role of VEGF-A<sub>165b</sub> in serum and in the infarcted myocardium; and *b*) to investigate *in vivo* the potential effects of VEGF-A<sub>165b</sub> neutralization on capillary density, infarct size, and systolic function. In a prospective cohort of 104 STEMI patients: *c*) to evaluate circulating VEGF-A<sub>165b</sub> levels,

their association with the resultant cardiac structure evaluated at 6 months by CMR, and the occurrence of major adverse cardiac events (MACE) during follow-up.

#### METHODS

##### Animal studies

The animal protocols were performed following the guidelines of Directive 2010/63/EU of the European Parliament and were approved by the ethics review board committee (Protocol number: 2016/VCS/PEA/00075).

C57BL/6J mice were supplied by Charles River Laboratories (Chatillon-sur-Chalaronne, France). Mice (age, 16 ± 2 weeks) were bred and maintained under specific pathogen-free conditions at a constant temperature of 22 ± 2 °C and humidity of 60%-65% with a 12-hour dark/light cycle, and with free access to normal chow and autoclaved water.

##### Mouse MI model

MI was induced in mice (n = 60) by ligation of the left anterior descending coronary artery, but 8 of them died prior to sacrifice. The mice were divided into 2 MI models: *a*) nonreperfused MI (permanent coronary ligation, without reperfusion); and *b*) reperfused MI (transient 45-minute occlusion of the coronary artery followed by reperfusion). In the nonreperfused MI model, the knot was tightened with the consequent occlusion of the coronary artery. In the reperfused MI model, a 23G tube was placed between the coronary artery and the 6-0 silk suture for later removal to allow complete reperfusion following the ischemic period. The tube was positioned through the sixth intercostal space to the exterior of the animal. In both models, once ischemia onset was confirmed, both visually and in an electrocardiogram, the mice thorax was closed. In the reperfused MI model, the tube was removed after 45 minutes of occlusion to allow coronary reperfusion, which was confirmed by resolution of ST-segment elevation in the electrocardiogram.

Moreover, a sham group (n = 13) was also included in the study. These animals underwent the same surgical protocol except for coronary artery occlusion.

### Experimental groups

Mice were randomly allocated to the following treatment groups: a) sham; b) nonreperused MI with anti-IgG isotype antibody; c) nonreperused MI with VEGF-A<sub>165b</sub> blocking antibody; d) reperused MI with anti-IgG isotype antibody; and e) reperused MI with VEGF-A<sub>165b</sub> blocking antibody. Each experimental group was composed of 13 animals, thus the final study group comprised 65 mice (figure 1 of the supplementary data).

### Study in STEMI patients

The study conformed to the Declaration of Helsinki for the use of human participants. The study protocol was approved by the local ethics committee and written informed consent was obtained from all participants.

Inclusion criteria consisted of patients with a first STEMI, treated with primary coronary intervention within 12 hours of chest pain onset, and who underwent CMR imaging at 6 months post-STEMI. We prospectively enrolled 127 consecutive patients discharged between July 2013 and December 2017 with these characteristics.

Exclusion criteria comprised death (n = 2), reinfarction (n = 4), clinical instability (n = 4) during the first 6 months postdischarge and any contraindication to CMR (n = 13). Therefore, the final study group comprised 104 STEMI patients. The flowchart of patients in the study is presented in figure 2 of the supplementary data.

We recruited a control group matched in age and sex with the study group (table 1 of the supplementary data), composed of 25 patients in whom the presence of any cardiac disease was ruled out by means of a thorough clinical history, physical examination, and echocardiographic study carried out by a clinical cardiologist.

### Statistical analysis

We assessed the normality of distribution with the Kolmogorov-Smirnov test. Continuous normally distributed data are expressed as the mean ± standard deviation of the mean and were compared using the unpaired Student's t test or one-way ANOVA. Nonparametric data are expressed as the median and interquartile range and were compared using the Mann-Whitney U-test. Group percentages were compared using the chi-square test or the Fisher exact test, when appropriate. Linear correlations were assessed using the Pearson correlation coefficient. Since no previous cutoff values for serum VEGF-A<sub>165b</sub> levels were validated, patients were dichotomized according to the mean value of our cohort (405 pg/mL). The association of VEGF-A<sub>165b</sub> levels (high > 405 pg/mL) with time to first MACE was determined by the Kaplan-Meier curve and the log-rank test, respectively. In serum VEGF-A<sub>165b</sub> levels in STEMI patients, 95% confidence interval (95%CI) was calculated for each group. Statistical significance was considered for 2-tailed P-values < .05. All statistical tests were performed using SPSS 19.0 (SPSS, Inc, Chicago, IL, United States).

Further details are specified in the methods section of the supplementary data.

## RESULTS

### Circulating VEGF-A<sub>165b</sub> levels were increased after MI and associated with impaired systolic function

Circulating VEGF-A<sub>165b</sub> levels were significantly augmented 21 days after MI induction in both experimental groups:

nonreperused MI (212 ± 10 pg/mL, P < .01) and reperused MI (213 ± 12 pg/mL, P < .05) compared with sham (167 ± 7 pg/mL) (figure 1A). Next, we explored the association between parameters derived from echocardiography and circulating VEGF-A<sub>165b</sub> values prior to sacrifice. An inverse correlation between VEGF-A<sub>165b</sub> serum levels with left ventricular ejection fraction (LVEF, figure 1B) and left ventricular fraction shortening (LVFS) (figure 1C) was obtained.

### Augmented expression of endothelial VEGF-A<sub>165b</sub> in experimental MI models

A tendency toward increased VEGF-A<sub>165b</sub> expression was detected in myocardial samples obtained from the infarcted area of both MI groups compared with sham (figure 1D). Immunofluorescence studies revealed that, although a weak constitutive expression of VEGF-A<sub>165b</sub> was observed in controls, the presence of VEGF-A<sub>165b</sub> was heightened in infarct areas from both MI groups (P < .05, figure 1D,E). Furthermore, double labelling immunofluorescence confirmed the expression of VEGF-A<sub>165b</sub> in endothelial cells (CD31+) (figure 1G).

In summary, the presence of circulating and myocardial VEGF-A<sub>165b</sub> was boosted in the 2 experimental MI models (nonreperused and reperused) and was associated with more depressed systolic function evaluated by echocardiography.

### Blockade of VEGF-A<sub>165b</sub> activity improved angiogenesis, systolic function, and infarct size in mice undergoing reperused MI, but not in nonreperused MI

To explore the consequences of functional VEGF-A<sub>165b</sub> blockade *in vivo*, we included 1 experimental group for each MI model, in which animals were treated with an intraperitoneal injection of a specific blocking anti-VEGF-A<sub>165b</sub> antibody or matched anti-IgG isotype.

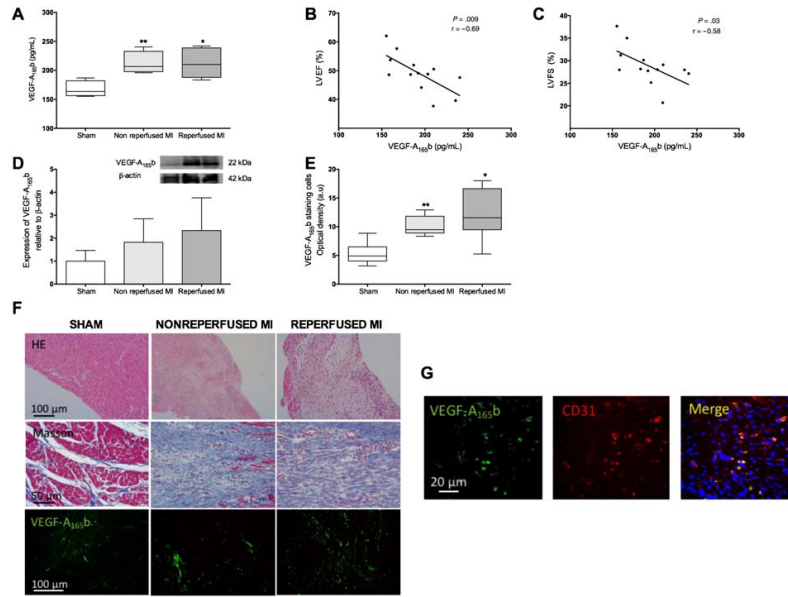
#### Effects on systolic function and infarct size

Compared with sham, animals undergoing either nonreperused or reperused MI groups and treated with anti-IgG isotype antibody displayed worse systolic function, as reflected by an increased LV end-diastolic diameter (nonreperused: 4.4 ± 4.1 mm, reperused: 4.3 ± 5.7 mm vs sham: 3.8 ± 3.5 mm, P < .01) and a decreased LVEF (nonreperused: 41.4 ± 5.8%, reperused: 49.8 ± 6.4% vs sham: 59.5 ± 8.1%, P < .01) and LVFS (nonreperused: 21.8 ± 5.4%, reperused: 28.8 ± 4.5% vs sham: 35.9 ± 6.3%, P < .01). However, no differences in systolic function were detected between nonreperused and reperused MI groups treated with anti-IgG isotype antibody (table 1).

Interestingly, in the reperused MI model, treatment with a specific anti-VEGF-A<sub>165b</sub> antibody resulted in an improved LVEF (57.1 ± 8.5% vs 49.8 ± 6.4%, P < .05) (figure 2D,E) and LVFS (34.2 ± 6.2% vs 28.8 ± 4.5%, P < .05) compared with animals treated with anti-IgG antibody (figure 2D,F). In contrast, despite VEGF-A<sub>165b</sub> blockade, no improvement in systolic function was observed in either nonreperused experimental MI groups (table 1).

Next, macroscopic analysis of hearts isolated from the 4 experimental groups were performed (figure 2A). In mice treated with anti-IgG isotype antibody, infarct size was similar between the nonreperused and reperused MI groups, whereas higher infarct wall thickness and reduced LV volume was detected in animals undergoing reperused MI compared with nonreperused MI (table 2).

Of note, treatment with a specific anti-VEGF-A<sub>165b</sub> antibody in the reperused MI model reduced infarct size compared with



**Figure 1.** Serum and myocardial levels of vascular endothelial growth factor (VEGF)-A<sub>165b</sub> are increased in experimental myocardial infarction (MI) models. A: serum VEGF-A<sub>165b</sub> levels prior to sacrifice were elevated in mice undergoing MI compared with sham. Circulating VEGF-A<sub>165b</sub> levels were indirectly associated with left ventricular ejection fraction (LVEF) (B) and left ventricular fraction shortening (LVFS) (C) evaluated by transthoracic echocardiography. D: western blot analysis of VEGF-A<sub>165b</sub> protein expression in infarct myocardial samples isolated from both MI models compared with sham. E: densitometry analysis of VEGF-A<sub>165b</sub> immunofluorescence analysis. Myocardial sections were incubated with an antimouse VEGF-A<sub>165b</sub> antibody and specific labelling was visualized using Alexa Fluor 488 (VEGF-A<sub>165b</sub>, green). Images were captured and digitized and were then analyzed with Image-Pro Plus analysis software. Scoring was performed blinded on coded slides. F: representative images of hematoxylin-eosin (HE, upper panel), Masson's trichrome (central panel), and specific immunofluorescence for VEGF-A<sub>165b</sub> (lower panel, green). G: representative images showing colocalization of CD31/VEGF-A<sub>165b</sub> in infarct myocardial tissue. Immunoreactivity was visualized using Alexa Fluor 594 (CD31, red) and Alexa Fluor 488 (VEGF-A<sub>165b</sub>, green) secondary antibodies. Nuclei were stained with DAPI (blue). The correlation of VEGF-A<sub>165b</sub> with the variables derived from echocardiography (B, C) was assessed using the Pearson correlation coefficient. Continuous normally distributed data (n = 13 animals per group) are expressed as mean ± standard deviation and were analyzed by 1-way ANOVA analysis followed by the Bonferroni test. \*P < .05, \*\*P < .01 vs sham in A and E.

**Table 1**  
Echocardiography parameters prior to sacrifice of animals in the 5 experimental groups

|           | Nonreperfusion MI |                         |                                      | Reperfusion MI          |                                      |
|-----------|-------------------|-------------------------|--------------------------------------|-------------------------|--------------------------------------|
|           | SHAM (n = 13)     | Anti-IgG (n = 10)       | Anti-VEGF-A <sub>165b</sub> (n = 13) | Anti-IgG (n = 12)       | Anti-VEGF-A <sub>165b</sub> (n = 13) |
| LVEDD, mm | 38.2 ± 3.5        | 44.4 ± 4.1 <sup>a</sup> | 43.5 ± 4.8 <sup>b</sup>              | 43.8 ± 5.7 <sup>a</sup> | 41.9 ± 4.6                           |
| LVEF, %   | 59.5 ± 8.1        | 41.4 ± 5.8 <sup>a</sup> | 48.6 ± 6.0 <sup>a</sup>              | 49.8 ± 6.4 <sup>a</sup> | 57.1 ± 8.5 <sup>c</sup>              |
| LVFS, %   | 35.9 ± 6.3        | 21.8 ± 5.4 <sup>a</sup> | 26.1 ± 5.1 <sup>a</sup>              | 28.8 ± 4.5 <sup>a</sup> | 34.2 ± 6.2 <sup>c</sup>              |

LVEDD, left ventricular end-diastolic diameter; LVEF, left ventricular ejection fraction; LVFS, left ventricular fraction shortening; MI, myocardial infarction; VEGF, vascular endothelial growth factor.

Data are expressed as mean ± standard deviation and were analyzed by the Student t test.

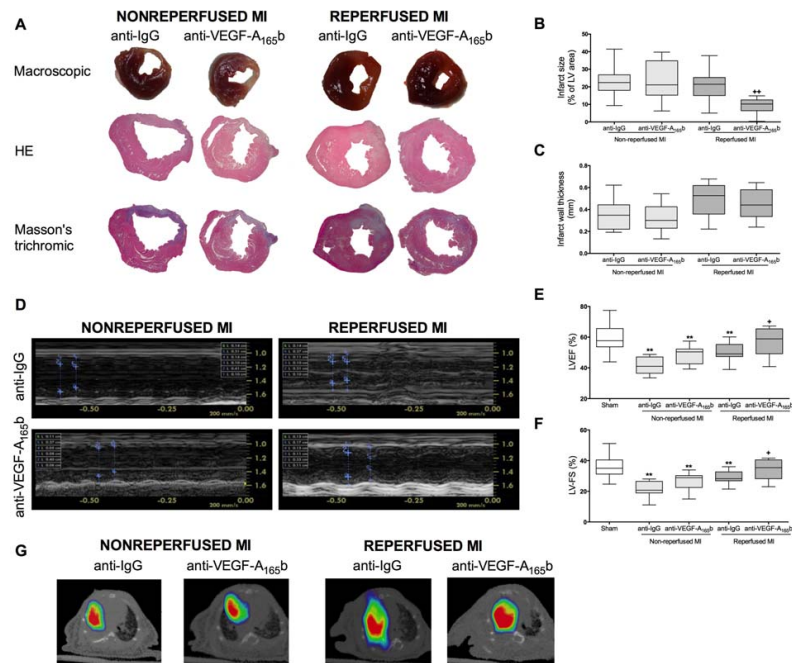
<sup>a</sup> P < .01 vs sham group.

<sup>b</sup> P < .05.

<sup>c</sup> P < .05 vs animals undergoing reperfusion MI treated with anti-IgG antibody.

treatment with anti-IgG antibody (9.4 ± 4.2% vs 20.8 ± 8.8%, P < .01) (figure 2B), but no changes were detected in infarct wall thickness (0.5 ± 0.1 mm vs 0.5 ± 0.1 mm) (figure 2C). In contrast, in the nonreperfusion MI model, blocking the antiangiogenic VEGF-A<sub>165b</sub> isoform had no effect on infarct size or infarct wall thickness (table 2).

Last, in positron emission tomography/computed tomography images, VEGF-A<sub>165b</sub> blockade in mice undergoing reperfusion MI reduced infarct size (figure 2G). Hence, not only VEGF-A<sub>165b</sub> blockade but also coronary reperfusion are necessary to improve the resultant systolic function and minimize infarct size.



**Figure 2.** Blockade of vascular endothelial growth factor (VEGF)-A<sub>165b</sub> in reperfusion, but not in nonreperfusion, myocardial infarction (MI) models resulted in a reduced infarct size and enhanced systolic function. A: representative images at macroscopic (upper panel) and microscopical level stained with hematoxylin-eosin (HE, central panel), and Masson's trichrome (lower panel). In the reperfusion MI model, treatment with a specific anti-VEGF-A<sub>165b</sub> antibody resulted in a reduced infarct size (B), whereas no changes in infarct wall thickness (C) were observed. Prior to sacrifice, systolic function was evaluated by echocardiography performed in a blinded manner. D: representative M-mode echocardiography images. In the reperfusion MI model, treatment with a specific anti-VEGF-A<sub>165b</sub> antibody resulted in an improved (E) left ventricular ejection fraction (LVEF) and (F) left ventricular fraction shortening (LVFS), whereas treatment had no effect in the nonreperfusion MI model. (G) Representative positron emission tomography/computed tomography images from the 4 MI groups. Continuous normally distributed data (n = 13 mice per group) are expressed as mean ± standard deviation. Data were analyzed by the unpaired Student t test. Scoring was performed by a blinded observer unaware of the experimental group. LV, left ventricle. \*\*P < .01 vs sham group. \*P < .05, \*\*P < .01 vs animals undergoing reperfusion MI treated with anti-IgG antibody.

**Table 2**  
Analysis of cardiac structure from the 5 experimental groups

|                               | Nonreperfusion MI |                        |   | Reperfusion MI         |   |
|-------------------------------|-------------------|------------------------|---|------------------------|---|
|                               | SHAM<br>(n = 13)  | Anti-IgG<br>(n = 13)   | Anti-VEGF-A <sub>165b</sub><br>(n = 13) | Anti-IgG<br>(n = 12)   | Anti-VEGF-A <sub>165b</sub><br>(n = 13) |
| LV area, mm <sup>2</sup>      | 0.6 ± 0.3         | 1.0 ± 0.5 <sup>a</sup> | 1.3 ± 0.6 <sup>b</sup>                  | 0.7 ± 0.2 <sup>c</sup> | 0.8 ± 0.2                               |
| Infarct area, mm <sup>2</sup> | 0.0 ± 0.0         | 0.8 ± 0.3              | 0.7 ± 0.3                               | 0.6 ± 0.2              | 0.3 ± 0.2 <sup>d</sup>                  |
| Infarct size, %               | 0.0 ± 0.0         | 23.2 ± 7.9             | 23.6 ± 11.0                             | 20.8 ± 8.8             | 9.4 ± 4.2 <sup>d</sup>                  |
| Infarct wall thickness, mm    | 0.0 ± 0.0         | 0.4 ± 0.1              | 0.3 ± 0.1                               | 0.5 ± 0.1 <sup>c</sup> | 0.5 ± 0.1                               |

LV, left ventricle; MI, myocardial infarction; VEGF, vascular endothelial growth factor.

Data are expressed as mean ± standard deviation and were analyzed by the Student t test.

<sup>a</sup> P < .05.

<sup>b</sup> P < .01 vs sham group.

<sup>c</sup> P < .05 vs animals undergoing nonreperfusion MI treated with anti-IgG antibody.

<sup>d</sup> P < .01 vs animals undergoing reperfusion MI treated with anti-IgG antibody.

Implications of in vivo VEGF-A<sub>165b</sub> blockade on neangiogenesis

Circulating VEGF-A<sub>165b</sub> levels were similar in the 4 experimental MI models independently of the treatment received (figure 3A). In the reperfused MI models, capillary density evaluated by immunohistochemistry was significantly heightened in animals treated with anti-VEGF-A<sub>165b</sub> antibody (666 ± 211 cells/mm<sup>2</sup>, P < .05) compared with anti-IgG (451 ± 115 cells/mm<sup>2</sup>). However, VEGF-A<sub>165b</sub> blockade had no effect on capillary density in either group undergoing nonreperfused MI model (anti-VEGF-A<sub>165b</sub>: 377 ± 60 cells/mm<sup>2</sup> vs anti-IgG: 478 ± 75 cells/mm<sup>2</sup>) (figure 3B,C). Indeed, western blotting analysis revealed increased CD31 protein expression in the infarcted myocardium isolated from reperfused MI animals treated with anti-VEGF-A<sub>165b</sub> antibody compared with anti-IgG (figure 3D).

Compared with controls, AKT phosphorylation was significantly elevated in heart samples from the reperfused MI group, whereas blockade of VEGF-A<sub>165b</sub> function reduced AKT phosphorylation (figure 3E). However, circulating interleukin-6 levels were unaltered in both reperfused MI groups compared with sham (anti-VEGF-A<sub>165b</sub>: 11.1 ± 3.6 pg/mL, anti-IgG: 14.9 ± 5.7 pg/mL vs sham: 11.7 ± 3.0 pg/mL) (figure 3F).

In summary, VEGF-A<sub>165b</sub> blockade promoted neangiogenesis, improved systolic function, and reduced infarct in the reperfused, but not in the nonreperfused MI model.

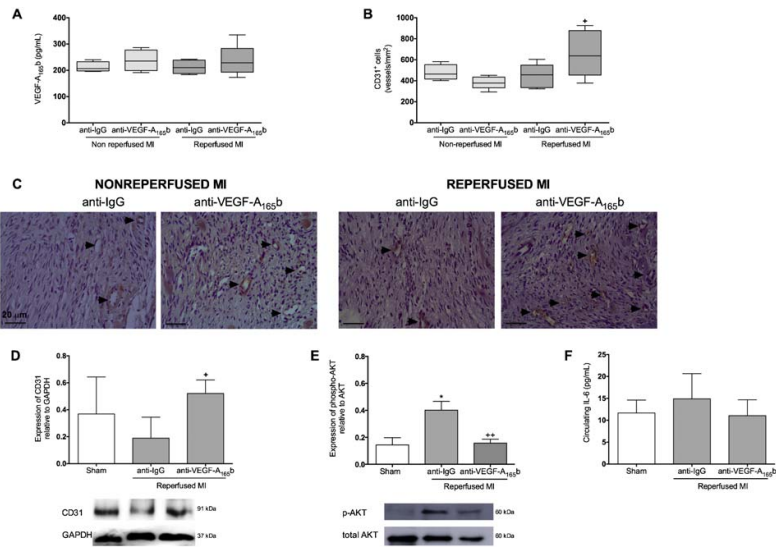
Increased serum VEGF-A<sub>165b</sub> levels in STEMI patients associated with more depressed systolic function at chronic phases and the occurrence of MACE during follow-up

Characterization of VEGF-A<sub>165b</sub> after STEMI

Serum VEGF-A<sub>165b</sub> levels were quantified in samples drawn 24 hours after coronary revascularization from 104 STEMI patients and 25 control participants. Circulating VEGF-A<sub>165b</sub> levels were significantly elevated in STEMI patients (405 ± 26 pg/mL, 95%CI, 355-458, P < .01) compared with controls (234 ± 35 pg/mL, 95%CI, 161-307) (figure 4A).

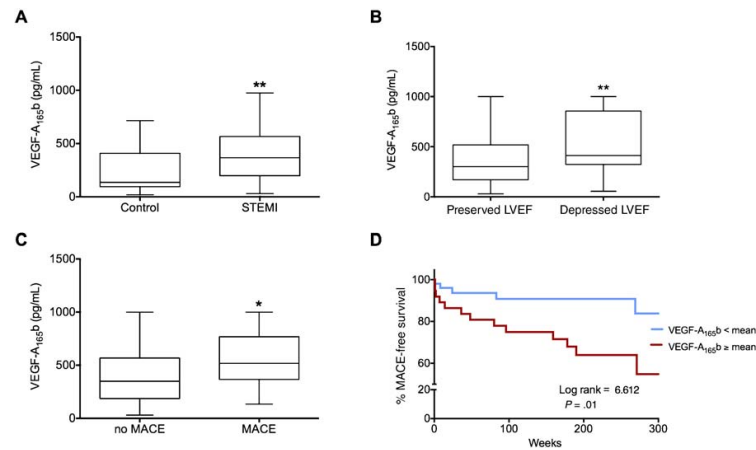
Role of VEGF-A<sub>165b</sub> levels in the resultant systolic function

Next, we sought to evaluate the relationship between VEGF-A<sub>165b</sub> levels at this time point and LVEF evaluated at the 6-month CMR. For this purpose, STEMI patients were dichotomized into those with depressed and those with preserved LVEF. Lower levels of circulating VEGF-A<sub>165b</sub> at 24 hours after coronary reperfusion were detected in patients with preserved LVEF at the 6 month CMR (preserved: 362 ± 32 pg/mL, 95%CI, 298-427, vs depressed: 533 ± 44 pg/mL, 95%CI, 444-621, P < .01) (figure 4B).



**Figure 3.** Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A<sub>165b</sub> blockade increased capillary density in animals undergoing reperfused, but not in nonreperfused, myocardial infarction (MI). A: serum VEGF-A<sub>165b</sub> levels prior to sacrifice were similar in all 4 experimental groups. B: quantification of CD31<sup>+</sup> vessels. Five independent images from the infarcted area isolated from the 4 independent MI groups were taken and then analyzed by a blinded observer unaware of the experimental group. C: representative images from infarcted tissue isolated from the 4 experimental groups stained with the specific vascular marker CD31. D: western blotting analysis of CD31 protein expression in myocardial tissue isolated from sham and both reperfused MI groups treated with anti-IgG or anti-VEGF-A<sub>165b</sub> blocking antibody. E: western blotting analysis of phospho AKT/total AKT in the infarct tissue isolated from sham and both reperfused MI groups treated with anti-IgG or anti-VEGF-A<sub>165b</sub> blocking antibody. F: circulating interleukin (IL)-6 levels from both reperfused MI groups treated with anti-IgG or anti-VEGF-A<sub>165b</sub> blocking antibody. Continuous normally distributed data (n = 13 animals per group) are expressed as mean ± standard deviation and were analyzed by the unpaired Student t test. \*P < .05 vs sham. \*P < .05; \*\*P < .01 vs animals undergoing reperfused MI treated with anti-IgG antibody.





**Figure 4.** Increased circulating vascular endothelial growth factor (VEGF)-A<sub>165b</sub> in ST-segment elevation myocardial infarction (STEMI) patients was associated with more depressed cardiovascular magnetic resonance (CMR)-derived LVEF at 6 months and the occurrence of adverse events during follow-up. A: serum levels of VEGF-A<sub>165b</sub> at 24 hours after coronary reperfusion are boosted in STEMI patients (n = 104) compared with control participants (n = 23). Elevated VEGF-A<sub>165b</sub> levels are detected in STEMI patients displaying (B) depressed left ventricular ejection fraction (LVEF) at 6 months and (C) major adverse cardiac events (MACE: cardiac death, reinfarction, or readmission for heart failure) during follow-up. D: circulating VEGF-A<sub>165b</sub> and outcome Kaplan-Meier curves for MACE-free survival during follow-up depending on serum VEGF-A<sub>165b</sub> levels. Continuous normally distributed data are expressed as mean ± standard error of the mean and 95% confidence interval (95% CI) and were analyzed by unpaired the Student *t* test. The association of VEGF-A<sub>165b</sub> levels with time to first MACE (D) were determined by the Kaplan-Meier curve and the log-rank test, respectively. \**P* < .05, \*\**P* < .01 vs control group.

#### Association of VEGF-A<sub>165b</sub> with the occurrence of MACE

During follow-up (median: 186 weeks; range [33–242] weeks), there were 21 MACE (5 cardiac deaths, 9 nonfatal myocardial infarctions, and 7 readmissions for heart failure) occurred.

Patients with MACE showed augmented serum VEGF-A<sub>165b</sub> levels ( $552 \pm 56$  pg/mL, 95%CI, 435–670, *P* < .05) compared with patients without MACE ( $413 \pm 32$  pg/mL, 95%CI, 350–475) (figure 4C). Indeed, as shown in the survival curves analysis (figure 4D), VEGF-A<sub>165b</sub> levels higher than 405 pg/mL (mean) were strongly associated with an increased probability of MACE (lower: 10% vs higher: 35%, *P* < .01). Thus, in STEMI patients, VEGF-A<sub>165b</sub> values within the first 24 hours after reperfusion were associated with a higher risk of cardiac events during follow-up.

#### DISCUSSION

Serum and myocardial VEGF-A<sub>165b</sub> levels were notably heightened in 2 experimental mice models (nonreperused and reperused MI) and were associated with more depressed systolic function evaluated by echocardiography. In vivo VEGF-A<sub>165b</sub> blockade improved capillary density, reduced infarct size, and enhanced systolic function in the reperused, but not in the nonreperused MI model. Last, in a cohort of STEMI patients, augmented serum VEGF-A<sub>165b</sub> concentration correlated with depressed CMR-derived LVEF in the chronic phase (6 months) after MI and with the occurrence of MACE during follow-up.

In STEMI patients, a prompt coronary reperfusion is mandatory to limit infarct size and increase patient life expectancy. Despite successful reperfusion at the epicardial level, the microvasculature is compromised in 50% to 60% of patients. Known as microvascular obstruction, this phenomenon plays a deleterious role in the

resultant structural damage and the survival of STEMI patients.<sup>1,2</sup> However, clinical and experimental studies have solidly demonstrated the spontaneous repair of microcirculation after STEMI, probably by the endogenous upregulation of proangiogenic factors soon after MI induction.<sup>7</sup>

Angiogenesis has been addressed as a potent mechanism to repair microcirculation loss post-MI, consequently producing beneficial effects on infarct healing, systolic recovery, and adequate LV remodeling. Angiogenesis consists of the development of new microvessels from preexisting capillaries in response to different signals and factors.<sup>3</sup> Hence, understanding pathophysiological pathways that promote angiogenesis is crucial in seeking coadjunct therapeutic alternatives, beyond prompt coronary reperfusion, to minimize the burden of MI in terms of morbidity and mortality.

#### Role of VEGF-A<sub>165b</sub> in mice undergoing MI

VEGF-A is actively involved in tissue repair by regulating angiogenesis, vascular permeability, and inflammation. Following MI, its role has been assessed in serum and the infarcted myocardium in both patients and experimental models.<sup>4</sup> However, alternative splicing of VEGF-A produces several mRNA isoforms, which include a distal splice-site selection in exon 8 to generate an exon 8b sequence, yielding the antiangiogenic isoform VEGF-A<sub>165b</sub>.<sup>5</sup> In pathological angiogenic states such as diabetic retinopathy and cancer, VEGF-A<sub>165b</sub> levels are shown to decrease.<sup>8,9</sup> In contrast, VEGF-A<sub>165b</sub> correlates with a compromised capillary density in peripheral artery disease.<sup>10,11</sup> Particularly after MI, a previous study first reported that circulating VEGF-A<sub>165b</sub> levels rapidly peaked in the early phases (1 week) in STEMI patients, suggesting that this isoform may also contribute to the impaired neovascularization in the acute phase post-MI.<sup>6</sup>

Since no *in vivo* studies have so far investigated the role of VEGF-A<sub>165b</sub> post-MI, we aimed to elucidate the role of VEGF-A<sub>165b</sub> isoform in 2 experimental MI models: nonreperused and reperused MI.

Based on our results, circulating VEGF-A<sub>165b</sub> levels were increased in both mice models, and higher serum levels of this antiangiogenic factor were associated with lower LVEF and LVFS. Moreover, when evaluating the infarcted area from both MI models, increased expression of VEGF-A<sub>165b</sub> was detected, mainly present in the endothelial cells. Thus, the regulation of VEGF-A splicing may also be important in the context of MI in mice.

#### VEGF-A<sub>165b</sub> blockade as a potent target to recover capillary density and enhance systolic function after MI

Regarding the previous clinical<sup>6</sup> and experimental results, we speculate that high circulating levels of VEGF-A<sub>165b</sub> might hamper the endogenous tendency toward recovery of microvascular perfusion. In fact, when we used an *in vitro* coronary endothelial cell differentiation assay, VEGF-A<sub>165b</sub> blockade increased the angiogenic capacity of serum from STEMI patients.<sup>9</sup> Indeed, a previous study in a murine model of peripheral artery disease demonstrated that treatment with a blocking antibody against VEGF-A<sub>165b</sub> isoform reversed impaired revascularization in ischemic hind limb.<sup>10,11</sup>

In the MI scenario, clinical and experimental studies have demonstrated that, although microvessel density is diminished a few minutes after coronary occlusion, massive and macroscopic microvascular obstruction appears soon after coronary reperfusion.<sup>2,7</sup> This phenomenon is spontaneously restored due to the increased expression of proangiogenic factors immediately after ischemia onset.<sup>7</sup> Therefore, investigating the functional blockade of VEGF-A<sub>165b</sub> in a basic model of MI could be the first step in the discovery of a promising novel therapeutic option to accelerate neoangiogenesis in the infarcted area.

Compared with the nonreperused MI group, mice undergoing coronary reperfusion displayed an augmented infarct wall thickness, whereas LVEF and infarct size were still compromised. Timely coronary reperfusion is the main therapeutic goal to minimize irreversible apoptosis of cardiomyocytes, and consequently reduce cardiac injury. However, although early reperfusion is necessary in terms of adverse remodeling, clinical and experimental studies have reported its association with certain hemodynamic and oxidative stress damage.<sup>1,12</sup> Therefore, discovering new coadjuvant therapies beyond reperfusion will further diminish infarct size and improve patient outcomes.

In this context, we found that blockade of VEGF-A<sub>165b</sub> activity in mice undergoing 45 minutes of ischemia followed by 21 days of coronary reperfusion significantly increased capillary density, decreased infarct size, and enhanced systolic function. However, these beneficial effects were absent in the nonreperused MI model. Based on our *in vivo* results, VEGF-A<sub>165b</sub> might be a promising coadjuvant therapy beyond reperfusion to further diminish infarct size and microvascular damage.

To understand the mechanistic role of VEGF-A<sub>165b</sub>, we evaluated AKT expression due to its implication in multiple signaling pathways in the regulation of angiogenesis mediated by VEGF-A.<sup>13</sup> Our present data suggest that the AKT signaling pathway is activated post-MI and that the antiangiogenic effect of VEGF-A<sub>165b</sub> could be partially caused by AKT activation.

VEGF-A<sub>165b</sub> has been reported to reduce tumor necrosis factor- $\alpha$  in retinal pigmented epithelial cells, thus exerting anti-inflammatory effects.<sup>9</sup> However, according to our results, serum interleukin-6 levels in both reperused MI groups at day 21 post-MI were similar to those in controls, probably due to the almost complete resolution of the proinflammatory milieu occurring during the first few days after MI induction.

In conclusion, VEGF-A<sub>165b</sub> may represent a new coadjuvant pharmacological target to coronary reperfusion (the current gold standard therapy for STEMI patients), since its blockade might boost the activities of proangiogenic growth factors released at the very beginning of ischemia.<sup>7</sup>

#### Systolic and prognostic implications of VEGF-A<sub>165b</sub> in STEMI patients

Impaired microcirculation in STEMI patients correlates with adverse ventricular remodeling and the occurrence of cardiac events during follow-up.<sup>12</sup> Therefore, understanding the role of a novel potent regulator of angiogenesis in this scenario might be crucial.

As noted previously in a preliminary cohort of 50 patients,<sup>6</sup> and confirmed here, circulating VEGF-A<sub>165b</sub> levels are notably elevated in STEMI patients compared with healthy patients. Indeed, higher messenger ribonucleic acid (mRNA) expression of this antiangiogenic factor has been demonstrated in peripheral blood from patients with coronary heart disease.<sup>14</sup> Although elevated VEGF-A<sub>165b</sub> values have already been reported to correlate with compromised systolic function in the acute phase (1 week post-MI), the novelty of this study lies in associating circulating VEGF-A<sub>165b</sub> values with the resultant systolic function in the chronic phase (6 months post-MI) and patient prognosis in the largest cohort of STEMI patients so far. Based on our results, higher serum VEGF-A<sub>165b</sub> levels are associated with more depressed CMR-derived LV function in the chronic phase (6 months) post-MI and the occurrence of MACE during follow-up. Harada et al.<sup>15</sup> also noted the role of this isoform in patient prognosis in a very small cohort of STEMI patients.

Our specific objective was to establish an association between this novel factor and LV function, both in the acute<sup>6</sup> and chronic phases, as well as with patient prognosis. In this study, we did not intend to demonstrate its independent value for risk stratification of STEMI patients beyond the current armamentarium already available for this goal.

In summary, and regarding the clinical and experimental results, higher VEGF-A<sub>165b</sub> levels were associated with worse systolic function and patient prognosis. This is probably due to its interference in the endogenous physiological reestablishment of the compromised microcirculation driven by the upregulation of proangiogenic molecules in the infarct region.<sup>7</sup> Hence VEGF-A<sub>165b</sub> blockade might represent a promising therapeutic strategy to improve angiogenesis after STEMI, and consequently to increase systolic function and patient life expectancy.

#### Study limitations

Due to the small number of patients, this is only a proof of concept study to explore a marker in an animal model and in a limited number of patients. Further validation is required in a larger cohort of STEMI patients.

#### CONCLUSIONS

We provide evidence that endogenous VEGF-A<sub>165b</sub> is significantly elevated in experimental animal models of MI and in STEMI patients. Its *in vivo* neutralization promotes angiogenesis, reduces infarct size, and enhances systolic function as long as coronary reperfusion is allowed. In STEMI patients, increased concentrations of this isoform are correlated with worse systolic function and a higher incidence of adverse events during follow-up. Pharmacological modulation of VEGF-A<sub>165b</sub> might represent a potential novel target as a coadjuvant therapy to coronary reperfusion and merits further clinical research.

**FUNDING**

This work was supported by Instituto de Salud Carlos III and Fondos Europeos de Desarrollo Regional FEDER (research grants PIE15/00013, PI17/01836, PI18/00209, and CIBERCIV16/11/00486 and a postgraduate contract F18/00320 to C. R.–N. and F119/00033 to L. H.); the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (SAF2017–89714-R); by Sociedad Española de Cardiología (SEC2017 grant); and by Generalitat Valenciana (GV/2018/116, CDEI-04/20 and AICO/2019/250).

**CONFLICTS OF INTEREST**

Nothing to declare.

**WHAT IS KNOWN ABOUT THE TOPIC?**

- Despite complete revascularization, the myocardial microvasculature is impaired in approximately 50% of MI patients. Discovering coadjuvant therapies to diminish microvascular damage is essential. Angiogenesis helps to reestablish compromised microvasculature post-MI. We aimed to assess the role of the antiangiogenic VEGF-A<sub>165b</sub> isoform.

**WHAT DOES THIS STUDY ADD?**

- We demonstrate that experimental MI models displayed elevated circulating and myocardial VEGF-A<sub>165b</sub> levels. Its in vivo blockade increased neoangiogenesis, reduced infarct size, and enhanced systolic function in reperfused, but not in nonreperfused, MI models. In patients, higher VEGF-A<sub>165b</sub> values correlated with depressed ejection fraction and worse outcomes. Blocking this antiangiogenic factor may exert beneficial effects post-MI.

**APPENDIX. SUPPLEMENTARY DATA**

Supplementary data associated with this article can be found in the online version available at <https://doi.org/10.1016/j.rec.2020.03.013>

**REFERENCES**

- Ibañez B, Heusch G, Ovize M, van de Werf F. Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65:1454–1471.
- Niccoli G, Scalone G, Lerman A, Crea F. Coronary microvascular obstruction in acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2016;37:1024–1033.
- Cochain C, Channon KM, Silvestre JS. Angiogenesis in the infarcted myocardium. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2013;18:1100–1113.
- Banal S, Shweiki D, Pinson A, Chandra M, Lazarovici G, Keshet E. Upregulation of vascular endothelial growth factor expression induced by myocardial ischaemia: implications for coronary angiogenesis. *Cardiovasc Res*. 1994;28:1176–1179.
- Qiu Y, Hoareau-Aveilla C, Oltean S, Harper SJ, Bates DO. The anti-angiogenic isoforms of VEGF in health and disease. *Biochem Soc Trans*. 2009;37:1207–1213.
- Hueso L, Ríos-Navarro C, Ruiz-Sauri A, et al. Dynamics and implications of circulating anti-angiogenic VEGF-A<sub>165b</sub> isoform in patients with ST-elevation myocardial infarction. *Sci Rep*. 2017;7:9962.
- Ríos-Navarro C, Hueso L, Miñana G, et al. Coronary serum obtained after myocardial infarction induces angiogenesis and microvascular obstruction repair. Role of hypoxia-inducible factor-1A. *Rev Esp Cardiol*. 2018;71:440–449.
- Bates DO, Cui TG, Doughty JM, et al. VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res*. 2002;62:4123–4131.
- Ved N, Hulse RP, Bestall SM, Donaldson LF, Bainbridge JW, Bates DO. Vascular endothelial growth factor-A165b ameliorates outer-retinal barrier and vascular dysfunction in the diabetic retina. *Clin Sci*. 2017;131:1225–1243.
- Kikuchi R, Nakamura K, MacLauchlan S, et al. An antiangiogenic isoform of VEGF-A contributes to impaired vascularization in peripheral artery disease. *Nat Med*. 2014;20:1464–1471.
- Ganta VC, Choi M, Kutateladze A, Annex BH. VEGF165b modulates endothelial VEGFR1-STAT3 signaling pathway and angiogenesis in human and experimental peripheral arterial disease. *Circ Res*. 2017;120:282–295.
- Davidson SM, Ferdinandy P, Andreadou I, et al. Multitarget strategies to reduce myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol*. 2019;73:89–99.
- Shiojima I, Walsh K. Regulation of cardiac growth and coronary angiogenesis by the Akt/PKB signaling pathway. *Genes Dev*. 2006;20:3347–3365.
- Latorre E, Pilling LC, Lee RP, et al. The VEGFA165b isoform is dysregulated in senescent endothelial cells and may be associated with prevalent and incident coronary heart disease. *Clin Sci*. 2018;132:313–325.
- Harada K, Kikuchi R, Ishii H, et al. Association between the ratio of anti-angiogenic isoform of VEGF-A to total VEGF-A and adverse clinical outcomes in patients after acute myocardial infarction. *Int J Cardiol Heart Vasc*. 2018;19:3–7.

**SUPPLEMENTARY DATA****METHODS****Mouse myocardial infarction model**

Briefly, before any surgical procedure, intraperitoneal buprenorphine (0.1 mg/kg) and meloxicam (0.3 mg/kg) were administered and then mice were anesthetized by inhalation of 5% isoflurane (Abbott Laboratories, Chicago, IL, United States) delivered in 100% oxygen medical grade air in an anesthetic chamber. The mice were then placed on the surgical board and underwent tracheal intubation connected to a rodent ventilator (Minivent type 845, Panlab Harvard Apparatus, Barcelona, Spain) set at a tidal volume of 200  $\mu$ L, and a rate of 110 breaths per minute supplemented with 100% oxygen and isoflurane (2%) at a flow rate of 0.2 L/min. The mice were maintained at a constant temperature of 37°C with a heating pad. During the experiments, the electrocardiogram and animal temperature via a rectal probe were continuously monitored (Mouse Monitor S, Indus Instruments, Webster, TX, United States). After opening the thorax, a left minithoracotomy was performed at the height of the fourth intercostal space. Then part of the pericardium was removed and the coronary artery was located with a microscope for surgery. The occlusion process was carried out using a needle holder for microsurgery and 6-0 monofilament suture thread. The occlusion point was passed approximately 1-2 mm from the apex of the left atrium when in its normal position.

**Drug administration protocol**

Intraperitoneal buprenorphine (0.05 mg/kg, twice daily) and meloxicam (0.3 mg/kg, once daily) was administered for 5 days after surgery. As previously reported, vascular endothelial growth factor (VEGF)-A<sub>165b</sub> blocking antibody (5  $\mu$ g/mL, cat# MAB3045, R&D Systems, Minneapolis, MN) was administered ip 1 hour after myocardial infarction (MI) induction and on postoperative days 1, 3, 7, and 14.<sup>1</sup> As control, nonspecific mouse IgG was administered in a similar manner.

**Positron emission tomography/computed tomography**

One day prior to sacrifice, mice were starved for 8 hours before  $^{18}\text{F}$ -2-fluor-2-deoxyglucose ( $^{18}\text{F}$ -FDG; Curium Pharma, Madrid, Spain) injection. Mice were anesthetized with isoflurane (2% in 100% oxygen; Abbott Laboratories, Chicago, IL, United States) and afterwards  $^{18}\text{F}$ -FDG (0.2-0.3 mCi in 0.2 mL) was injected ip. The administered dose (FDG activity) was corrected for body weight. Sixty minutes after  $^{18}\text{F}$ -FDG injection, anesthetized animals were placed in a supine body position and 20 minutes of static positron emission tomography (PET) images and 7 minutes of computed tomography (CT) images were acquired. The PET images were obtained with the Albira small animal PET (Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Germany).  $^{18}\text{F}$ -FDG biodistribution in the heart was compared between all experimental groups. Regions of interest/volume of interest ( $\text{kBq}/\text{cm}^3$ ) were manually drawn over the heart with AMIDE software.

**Echocardiography**

Prior to sacrifice, mice were anesthetized with isoflurane and a transthoracic echocardiogram of the left ventricle (LV) was obtained using a 50-MHz linear array scan-head interfaced with Vivid S5 equipment (GE Healthcare, Chicago, IL, United States). Mice were placed on a heating pad under light anesthesia with isoflurane and measurements were taken by a blinded operator. From the M-mode images, LV end-diastolic and end-systolic diameter, fractional shortening, and ejection fraction were calculated.

**Blood sampling**

Twenty-one days after MI induction, animals were reanesthetized, placed in a supine position, and a blood sample was drawn from the cava vein. Next, the anesthetized mice were sacrificed by cervical dislocation. Blood was centrifuged at 2500 rpm for 15 min, and serum was immediately stored at  $-80^\circ\text{C}$  until further analyses were performed.

**Infarct size analysis**

After sacrifice, hearts were removed and cut into 1-mm thick short-axis slices. First, each slide was viewed under room light and photographed. Second, slices were incubated in 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (Sigma Aldrich, San Luis, MO) solution at 37°C for 20 minutes. Subsequently they were viewed under room light and photographed.

Myocardial slices were fixed in 4% paraformaldehyde acid, embedded in paraffin, sectioned (5 µm), and mounted on double gelatin-coated glass slides. To further characterize mice myocardium, heart samples were stained with hematoxylin-eosin (Sigma Aldrich, San Luis, MO) for histological analysis and infarct size quantification and with Masson's trichromic staining (PanReac AppliChem, Chicago, IL) to detect the presence of fibrosis.

After digitizing the images, manual offline quantification of all microscopic images was performed in a dedicated laboratory by a trained observer unaware of the experimental protocol applied. All numerical data analyses were performed using Image-Pro Plus analysis software (Media Cybernetics Inc, Rockville, MD).

**VEGF-A<sub>165</sub>b detection**

Mouse serum levels of VEGF-A<sub>165</sub>b were measured using commercially available ELISA kit (cat# MBS9357293 MyBiosource Inc, San Diego, CA), according to the manufacturer's recommendations.

*VEGF-A<sub>165</sub>b detection and neoangiogenesis quantification in myocardial tissue samples*

For neovascularization detection, the dehydrated sections were treated with proteinase K (cat#s3020, Dako, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) for 30 minutes at room temperature for antigen retrieval. After incubation with peroxidase blocking solution (cat# s3023, Dako, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) and blockage with goat serum (15%) (cat# ab7481, Abcam, Cambridge, UK), samples were incubated overnight (4°C) with the antibody rabbit polyclonal antimouse-CD31 (1:50 dilution, cat# ab28364, Abcam) diluted in Antibody Diluent (cat# s2022, Dako, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, United States).

Specific labelling was detected with a labelled polymer-HRP antirabbit secondary antibody and revealed with 3,3'-diaminobenzidine (cat# 4010, Dako, Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

For VEGF-A<sub>165</sub>b detection, double immunofluorescence analysis was performed, the samples were incubated overnight (4°C) with mouse anti-VEGF-A<sub>165</sub>b antibody, clone 56/1 (1:50 dilution, cat# MABC595, Sigma Aldrich, San Luis, MO) and rabbit polyclonal antimouse-CD31 (1:50 dilution, cat# ab28364, Abcam). Specific labelling was detected with an Alexa Fluor 488 goat antimouse secondary antibody (1:1000 dilution, cat# A11001, ThermoFisher Scientific, MA) or an Alexa Fluor 594 goat antirabbit secondary antibody (1:1000 dilution, cat# A11037, ThermoFisher Scientific, MA). Nuclei were stained with DAPI. To confirm the specificity of antibodies, isotype controls (cat# 172730, Abcam, Cambridge, UK) or secondary antibodies only were used as negative controls. Five independent fields from each infarct or control sections were captured (Axio Observer A1, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany), digitized and then analyzed with Image-Pro Plus analysis software (Media Cybernetics Inc, Rockville, MD). Scoring was performed blinded on coded slides.

#### **Western blotting**

After sacrifice, infarct myocardial samples were lysed, and protein concentration was determined using the Bradford method.<sup>2</sup> Samples were denatured, subjected to SDS-PAGE using a 10% running gel, and transferred to a nitrocellulose membrane. Nonspecific binding sites were blocked with 3% bovine serum albumin in TBS solution and membranes were incubated overnight with rabbit polyclonal antibodies against mouse phospho-AKT (Ser473) (1:200 dilution, cat# 4085, Cell Signaling Technology, Danvers, MA), AKT (1:200 dilution, cat#4685, Cell Signaling Technology, Danvers, MA), CD31 (1:500, cat# 28364, Abcam, Cambridge, UK), and GAPDH (1:2000 cat# G8795, ThermoFisher Scientific, MA). Membranes were subsequently washed, incubated for 1 additional hour with the secondary HRP-linked antirabbit antibody (1:2000 dilution, cat#0448, Dako, Glostrup, Denmark) and developed using an ECL procedure (GE Healthcare, Madrid, Spain). Signals were recorded using a luminescent analyser (FujiFilm Image Reader LAS 4000, Fuji, Tokyo, Japan).

#### **Interleukin (IL)-6 detection**

Mouse serum levels of IL-6 were measured using a commercially available ELISA kit (cat# M6000B Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, MN), according to the manufacturer's recommendations.

#### **Study in ST-segment elevation myocardial infarction patients**

##### *Baseline characteristics and blood samples*

Baseline characteristics were prospectively registered in all cases. Thrombolysis in Myocardial Infarction flow grade in the culprit artery (before and after reperfusion) was analyzed. Patients were managed both in-hospital and after discharge by a specific ST-segment elevation myocardial infarction (STEMI) unit, and current recommendations were strictly followed.<sup>3</sup> Further details on patients' characteristics are shown in table 2 of the supplementary data.

Blood samples were isolated 24 hours after coronary revascularization, centrifuged at 2300 rpm for 15 minutes and serum was immediately stored at -80 °C until further analyses were performed.

#### **Cardiovascular magnetic resonance**

Cardiovascular magnetic resonance (CMR) (1.5 T unit, Magnetom Sonata; Siemens, Erlangen, Germany) was performed 182 ± 40 days (6-month CMR) after STEMI, in accordance with our laboratory protocol and current recommendations.<sup>4,5</sup> All studies were performed and analyzed by 2 cardiologists specialized in CMR with 15 years of experience using customized software (QMASS MR 6.1.5, Medis, Leiden, The Netherlands). CMR data were prospectively recorded and immediately included in the database.

Images were acquired by a phased-array body surface coil during breath-holds and were triggered by electrocardiography. Cine images were acquired in 2-, 3-, and 4-chamber views, and in short-axis views using a steady-state free precession sequence (repetition time/echo time: 2.8/1.2 ms; flip angle: 58 degrees; matrix: 256 × 300; field of view: 320 × 270 mm; slice thickness: 7 mm).<sup>4,5</sup>



Late gadolinium enhancement imaging was performed 10 to 15 minutes after administration of 0.1 mmol/kg of gadolinium diethylenetriaminepentaacetic acid (Magnograf, Juste S.A.Q.F., Madrid, Spain) in the same locations as in the cine images using a segmented inversion recovery steady-state free precession sequence (repetition time/echo time: 750/1.26 ms; flip angle: 45 degrees; matrix: 256 × 184; field of view: 340 × 235 mm; slice thickness: 7 mm). Inversion time was adjusted to nullify normal myocardium.<sup>4,5</sup>

Black blood, T<sub>2</sub>-weighted short T<sub>1</sub> inversion recovery sequences in the same short-axis view as the cine sequences, all in mid-diastole, were carried out. A half-Fourier acquisition single-shot turbo-spin echo multisection sequence was used (recovery time: 2 R-R intervals; echo time: 33 ms; inversion time: 170 ms; slice thickness: 8 mm; interslice interval: 2 mm; flip angle: 160 degrees; matrix: 256 × 151; bandwidth: 781 Hz/pixel). Additionally, a segmented turbo-spin echo sequence was obtained with 1 slice per breath-hold (recovery time: 2 R-R intervals; echo time: 100 ms; inversion time: 170 ms; slice thickness: 8 mm; interslice interval: 2 mm; flip angle: 180 degrees; matrix: 256 × 146; bandwidth: 235 Hz/pixel).<sup>4,5</sup>

The interobserver variability for the calculation of traditional CMR indexes used in the present study in our laboratory has been previously reported and is less than 5%.<sup>5</sup>

LV ejection fraction (%) represents the most robust CMR index for predicting patient outcomes<sup>6</sup> and was calculated by manual planimetry of endocardial and epicardial borders in short-axis view cine images. Cutoff value for LV ejection fraction dichotomization (depressed vs preserved) was based on previously validated data.<sup>4,5</sup>

#### **Follow-Up**

Major adverse cardiac events consisted of cardiac death, admission for nonfatal reinfarction, or for heart failure, whichever occurred first. Current definitions were applied.<sup>3,7</sup> Major adverse cardiac events were systematically reviewed from the medical history of each patient available on the hospital database and consensus between 2 cardiologists was required to finally classify a cardiac event.

**VEGF-A<sub>165</sub>b detection**

Human serum levels of VEGF-A<sub>165</sub>b were measured using commercially available ELISA kit (cat #MBS109074, My Biosource Inc, San Diego, CA), according to the manufacturer's recommendations.

**REFERENCES**

1. Kikuchi R, Nakamura K, MacLauchlan S, et al. An antiangiogenic isoform of VEGF-A contributes to impaired vascularization in peripheral artery disease. *Nat Med*. 2014;20:1464-1471.
2. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1978;72:248-254.
3. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD. Third universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2012;33:2551-2567.
4. Bodi V, Monmeneu JV, Ortiz-Perez JT, et al. Prediction of reverse remodeling at cardiac MR imaging soon after first ST-segment-elevation myocardial infarction: Results of a large prospective registry. *Radiology*. 2016;278:54-63.
5. Gavara J, Rodriguez-Palomares JF, Valente F, et al. Prognostic value of strain by tissue tracking cardiac magnetic resonance after ST-segment elevation myocardial infarction. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2018;11:1448-1457.
6. Ibañez B, Aletras AH, Arai AE, et al. Cardiac MRI endpoints in myocardial infarction experimental and clinical trials. *J Am Coll Cardiol*. 2019;75:238-256.
7. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, et al. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2016;37:2129-2200.

**Table 1 of the supplementary data**

Comparison of baseline characteristics between STEMI patients and controls.

|                         | STEMI<br>n = 104 | Controls<br>n = 25 | P    |
|-------------------------|------------------|--------------------|------|
| Age, y                  | 60 ± 13          | 64 ± 12            | .16  |
| Male sex, %             | 79 (76)          | 18 (72)            | .52  |
| Diabetes mellitus, %    | 27 (26)          | 7 (28)             | .75  |
| Hypertension, %         | 60 (58)          | 15 (60)            | .77  |
| Hypercholesterolemia, % | 47 (45)          | 11 (44)            | .89  |
| Smoker, %               | 59 (57)          | 7 (28)             | <.01 |

STEMI, ST-segment elevation myocardial infarction.

Data are expressed as No. (%) or mean ± standard deviation.

**Table 2 of the supplementary data**

Baseline, electrocardiographic, laboratory, and angiographic characteristics of all STEMI patients.

|                              | All patients<br>n = 104 |
|------------------------------|-------------------------|
| Age, y                       | 60 ± 13                 |
| Male sex, %                  | 79 (76)                 |
| Diabetes mellitus, %         | 27 (26)                 |
| Hypertension, %              | 60 (58)                 |
| Hypercholesterolemia, %      | 47 (45)                 |
| Smoker, %                    | 59 (57)                 |
| Heart rate, beats per minute | 73 ± 16                 |
| Systolic pressure, mmHg      | 134 ± 30                |
| Time to reperfusion, min     | 187 [139–393]           |
| ST-segment resolution, %     | 76 ± 25                 |
| Anterior infarction, %       | 54 (52)                 |
| Multivessel disease, %       | 31 (30)                 |

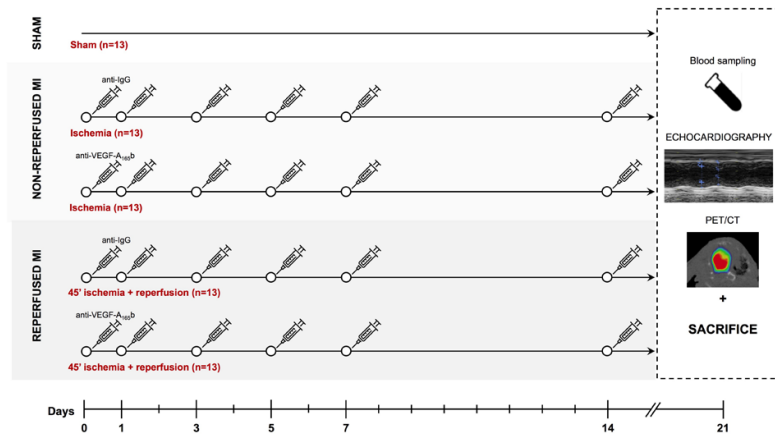
STEMI, ST-segment elevation myocardial infarction.

Time to reperfusion is expressed as median [percentile 25–percentile 75].

Data are expressed as No. (%) or mean ± standard deviation

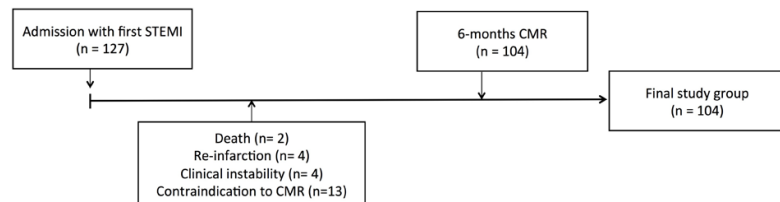
SUPPLEMENTARY FIGURES

**Figure 1 of the supplementary data.** Schematic diagram showing experimental groups, treatment, and tests conducted in mice. MI, myocardial infarction; PET/CT, positron emission tomography/computed tomography; VEGF, vascular endothelial growth factor.



**Figure 2 of the supplementary data.** Flowchart showing the enrolment protocol of STEMI patients.

CMR, cardiovascular magnetic resonance; STEMI, ST-segment elevation myocardial infarction.





## **ANEXO IV:**

Otras publicaciones y premios derivados  
del desarrollo de la tesis





**Publicaciones como primer autor:**

1. de Dios E\*, **Ríos-Navarro C\***, Pérez-Solé N, Gavara J, Marcos-Garcés V, Forteza MJ, Oltra R, Vila JM, Chorro FJ, Bodí V. Overexpression of genes involved in lymphocyte activation and regulation are associated with reduced CRM-derived cardiac remodelling after STEMI. *Int Immunopharmacol.* 2021;95:107490.

2. **Ríos-Navarro C**, Hueso L, Diaz A, Marcos-Garcés V, Bonanad C, Ruiz-Sauri A, Sanz MJ, Chorro FJ, Piqueras L, Bodí V. El bloqueo de la isoforma anti-angiogénica VEGF-A<sub>165b</sub> mejora el tamaño de infarto, la función sistólica y la angiogénesis en un modelo murino de infarto de miocardio reperfundido. *e-Latido.* 2021:48-59.

3. **Ríos-Navarro C**, Ortega M, Marcos-Garcés V, Gavara J, de Dios E, Pérez-Sole N, Chorro FJ, Bodí V, Ruiz-Sauri A. Interstitial changes after reperfused myocardial infarction in swine: morphometric and genetic analysis. *BMC Vet Res.* 2020;16(1):262.

4. de Dios E\*, **Ríos-Navarro C\***, Pérez-Sole N, Gavara J, Marcos-Garcés V, Rodríguez E, Carratalá A, Forner MJ, Navarro J, Blasco ML, Bondia E, Signes-Costa J, Vila JM, Forteza MJ, Chorro FJ, Bodí V. Similar clinical course and significance of circulating innate and adaptive immune cell counts in STEMI and COVID-19. *J Clin Med.* 2020;9(11):3484.

5. **Ríos-Navarro C**, Dios E, Forteza MJ, Bodí V. Unraveling the thread of uncontrolled immune response in COVID-19 and STEMI: an emerging need for knowledge sharing. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2021;320(6):H2240-H2254.

6. **Ríos-Navarro C**, Marcos-Garcés V, Bodí V. La obstrucción microvascular en el infarto agudo de miocardio. *REC:CardioClinics.* 2019;54:65-70.

7. **Ríos-Navarro C**, Ruiz-Sauri A, Gavara J, Vidal V, Bonanad C, Miñana G, Chorro FJ, Bodí V. Dinámica de los eosinófilos en sangre y en el tejido cardíaco tras un infarto agudo de miocardio reperfundido. Estudio en un modelo porcino. *Latido* 2019;60-8.

8. **Ríos-Navarro C**, Marcos-Garcés V, Bayes-Genis A, Husser O, Núñez J, Bodí V. Microvascular obstruction in ST-segment elevation myocardial infarction: looking back to move forward. focus on CMR. *J Clin Med*. 2019;8:1805.

9. **Ríos-Navarro C**, Gavara J, Vidal V, Bonanad C, Racugno P, Bayes-Genis A, Miñana G, Husser O, Oltra R, Núñez J, Chorro FJ, Bodí V, Ruiz-Sauri A. Characterization and implications of the dynamics of eosinophils in blood and in the infarcted myocardium after coronary reperfusion. *PLoS One* 2018;13:e0206344.

10. **Ríos-Navarro C**, Hueso L, Miñana G, Núñez J, Ruiz-Saurí A, Sanz MJ, Cànoves J, Chorro FJ, Piqueras L, Bodí V. Coronary Serum Obtained After Myocardial Infarction Induces Angiogenesis and Microvascular Obstruction Repair. Role of Hypoxia-inducible Factor-1A. *Rev Esp Cardiol*. 2018;71(6):440-449.

11. Hueso L\*, **Ríos-Navarro C\***, Ruiz-Sauri A, Chorro FJ, Núñez J, Sanz MJ, Bodí V, Piqueras L. Dynamics and implications of circulating anti-angiogenic VEGF-A<sub>165b</sub> isoform in patients with ST-elevation myocardial infarction. *Sci Rep*. 2017;7(1):9962.

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

13. Alvarez A\*, **Ríos-Navarro C\***, Blanch-Ruiz MA, Collado-Diaz V, Andujar I, Martinez-Cuesta MA, Orden S, Esplugues JV. Abacavir induces platelet-endothelium interactions by interfering with purinergic signalling: A step from inflammation to thrombosis. *Antiviral Res.* 2017;141:179-185.

14. **Ríos-Navarro C**, de Pablo C, Collado-Diaz V, Orden S, Blas-Garcia A, Martínez-Cuesta MÁ, Esplugues JV, Alvarez A. Differential effects of anti-TNF- $\alpha$  and anti-IL-12/23 agents on human leukocyte-endothelial cell interactions. *Eur J Pharmacol.* 2015;765:355-65.

**Otras publicaciones:**

1. Marcos-Garcés V, Perez N, Gavara J, Lopez-Lereu MP, Monmeneu JV, **Ríos-Navarro C**, de Dios E, Merenciano-González H, Gabaldon-Pérez A, Cànoves J, Racugno P, Bonanad C, Minana G, Nunez J, Moratal D, Chorro FJ, Valente F, Lorenzatti D, Ortiz-Pérez JT, Rodríguez-Palomares JF, Bodi V. Risk score for early risk prediction by cardiac magnetic resonance after acute myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 2022;349:150-154.

2. Marcos-Garcés V, Merenciano-Gonzalez H, Gabaldón-Pérez A, Núñez-Marin G, Lorenzo-Hernandez M, Gavara J, Pérez N, **Ríos-Navarro C**, De Dios E, Bonanad C, Racugno P, Lopez-Lereu MP, Monmeneu JV, Chorro FJ, Bodí V. Exercise ECG Testing and Stress Cardiac Magnetic Resonance for Risk Prediction in Patients With Chronic Coronary Syndrome. *J Cardiopulm Rehabil Prev.* 2022;42:E7-12.

3. Gavara J, Rodriguez-Palomares JF, **Ríos-Navarro C**, Valente F, Monmeneu JV, Lopez-Lereu MP, Ferreira-Gonzalez I, Garcia Del Blanco B, Otaegui I, Canoves J, de Dios E, Pérez N, Racugno P, Bonanad C, Minana G, Marcos V, Barrabes JA, Evangelista A, Moratal D, Bayes-Genis A, Núñez J, Chorro FJ, Bodí V. Longitudinal strain in remote non-infarcted myocardium by tissue tracking CMR: characterization, dynamics, structural and prognostic implications. *Int J Cardiovasc Imaging.* 2021;37:241-253.

4. Gabaldón-Pérez A, Bonanad C, García-Blas S, Gavara J, **Ríos-Navarro C**, Pérez-Solé N, de Dios E, Marcos-Garcés V, Merenciano-González H, Monmeneu JV, López-Lereu MP, Núñez J, Chorro FJ, Bodí V. Stress cardiac magnetic resonance for mortality prediction and decision-making: registry of 2496 elderly patients with

chronic coronary syndrome. *Rev Esp Cardiol.* 2021;S1885-5857(21)00250-4.

5. Gavara J, Marcos-Garcés V, Lopez-Lereu MP, Monmeneu JV, **Ríos-Navarro C**, de Dios E, Pérez N, Merenciano H, Gabaldón A, Cànoves J, Racugno P, Bonanad C, Minana G, Núñez J, Núñez E, Moratal D, Chorro FJ, Valente F, Lorenzatti D, Rodríguez-Palomares JF, Ortiz-Pérez JT, Bodí V. Magnetic resonance assessment of left ventricular ejection fraction at any time post-infarction for prediction of subsequent events in a large multicenter STEMI registry. *J Magn Reson Imaging.* 2021;10.1002/jmri.27789.

6. Marcos-Garcés V, Pérez N, Gavara J, Lopez-Lereu MP, Monmeneu JV, **Ríos-Navarro C**, de Dios E, Merenciano-González H, Gabaldón-Pérez A, Cànoves J, Racugno P, Bonanad C, Minana G, Núñez J, Moratal D, Chorro FJ, Valente F, Lorenzatti D, Ortiz-Pérez JT, Rodríguez-Palomares JF, Bodí V. Risk score for early risk prediction by cardiac magnetic resonance after acute myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 2021:S0167-5273(21)01866-0.

7. Miñana G, Núñez J, Marcos-Garcés V, Gavara J, **Ríos-Navarro C**, Bodí V. Long-term prognostic implications of revascularization in patients with known or suspected chronic coronary syndromes without ischemia in vasodilator stress cardiovascular magnetic resonance. *Int J Cardiol.* 2021;335:15-18.

8. Marcos-Garcés V, Merenciano-Gonzalez H, Gabaldón-Pérez A, Núñez-Marin G, Lorenzo-Hernandez M, Gavara J, Pérez N, **Ríos-Navarro C**, De Dios E, Bonanad C, Racugno P, Lopez-Lereu MP, Monmeneu JV, Chorro FJ, Bodí V. Exercise ECG testing and stress cardiac magnetic resonance for risk prediction in patients with chronic coronary syndrome. *J Cardiopulm Rehabil Prev.* 2021;10.1097/HCR.0000000000000621.

9. Valente FX, Gavara J, Gutierrez L, **Ríos-Navarro C**, Rello P, Maymi M, Fernandez-Galera R, Monmeneu JV, Sao-Aviles A, Lopez-Lereu MP, Gonzalez-Alujas MT, Moratal D, Cuellar H, Barrabés J, Otaegui I, Evangelista A, Ferreira I, Bodí V, Rodriguez-Palomares J. Predictive value of cardiac magnetic resonance feature tracking after acute myocardial infarction: A comparison with dobutamine stress echocardiography. *J Clin Med*. 2021;10:5261.

10. Gavara J, Pérez N, Marcos-Garcés V, Monmeneu JV, Lopez-Lereu MP, **Ríos-Navarro C**, De Dios E, Bonanad C, Cánoves J, Moratal D, Palau P, Miñana G, Núñez J, Chorro FJ, Bodí V. Combined assessment of stress cardiovascular magnetic resonance and angiography to predict the effect of revascularization in chronic coronary syndrome patients. *Eur J Prev Cardiol*. 2021:zwab170.

11. Miñana G, Núñez J, Monmeneu JV, López-Lereu MP, Gavara J, Marcos-Garcés V, **Ríos-Navarro C**, Pérez N, de Dios E, Fernández-Cisnal A, Núñez E, Chorro FJ, Sanchis J, Bodí V. Sex differences in mortality in stable patients undergoing vasodilator stress cardiovascular magnetic resonance. *Open Heart*. 2021;8:e001619.

12. Gabaldón-Pérez A, Marcos-Garcés V, Gavara J, **Ríos-Navarro C**, Miñana G, Bayes-Genis A, Husser O, Sanchis J, Núñez J, Chorro FJ, Bodí V. Coronary revascularization and long-term survivorship in chronic coronary syndrome. *J Clin Med*. 2021;10:610.

13. Núñez J, Lorenzo M, Miñana G, Palau P, Monmeneu JV, López-Lereu MP, Gavara J, Marcos-Garcés V, **Ríos-Navarro C**, Pérez N, de Dios E, Núñez E, Sanchis J, Chorro FJ, Bayés-Genís A, Bodí V. Sex differences on new-onset heart failure in patients with known or suspected coronary artery disease. *Eur J Prev Cardiol*. 2021; zwab078.

14. Merenciano-Gonzalez H, Gavara J, Marcos-Garcés V, Pedro-Tudela A, Gabaldón-Pérez A, Pérez N, **Ríos-Navarro C**, de Dios E, Monmeneu JV, Lopez-Lereu MP, Bonanad C, Racugno P, Chorro FJ, Bodí V. Elevación residual del segmento ST tras un infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST: asociación con el pronóstico a largo plazo y daño estructural en resonancia magnética cardiaca. *e-Latido*. 2021;21-27.

15. Marcos-Garcés V, Gavara J, Monmeneu JV, Lopez-Lereu MP, Bosch MJ, Merlos P, Pérez N, **Ríos-Navarro C**, De Dios E, Bonanad C, Racugno P, Bellver Navarro A, Ventura Pérez B, Aguilar Botella J, Ventura S, Mainar L, Canoves J, Pellicer M, Moratal D, Miñana G, Núñez J, Chorro FJ, Bodí V. Vasodilator Stress CMR and all-cause mortality in stable ischemic heart disease: a large retrospective registry. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2020;13:1674-1686.

16. Marcos-Garcés V, Gavara J, Monmeneu JV, Lopez-Lereu MP, Pérez N, **Ríos-Navarro C**, De Dios E, Moratal D, Miñana G, Núñez J, Chorro FJ, Bodí V. A novel clinical and stress cardiac magnetic resonance (C-CMR-10) score to predict long-term all-cause mortality in patients with known or suspected chronic coronary syndrome. *J Clin Med*. 2020;9:1957.

17. Marcos-Garcés V, Gavara J, Lopez-Lereu MP, Monmeneu JV, **Ríos-Navarro C**, de Dios E, Pérez N, Cànoves J, Gonzalez J, Minana G, Núñez J, de la Espriella R, Santas E, Moratal D, Chorro FJ, Valente F, Lorenzatti D, Rodríguez-Palomares JF, Ortiz-Pérez JT, Bodí V. Ejection fraction by echocardiography for a selective use of magnetic resonance after infarction. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2020;13:e011491.

18. Carretero A, Gomez-Cabrera MC, **Ríos-Navarro C**, Salvador-Pascual A, Bodí V, Viña J. Early reductive stress and late onset

overexpression of antioxidant enzymes in experimental myocardial infarction. *Free Radic Res.* 2020;54:173-184.

19. Miñana G, Núñez J, Bayés-Genís A, Revuelta-López E, **Ríos-Navarro C**, Núñez E, Chorro FJ, López-Lereu MP, Monmeneu JV, Lupón J, Sanchis J, Bodí V. Role of PCSK9 in the course of ejection fraction change after ST-segment elevation myocardial infarction: a pilot study. *ESC Heart Fail.* 2020;7:117-122.

20. Garcia-Bustos V, Sebastian R, Izquierdo M, **Ríos-Navarro C**, Bodí V, Chorro FJ, Ruiz-Sauri A. Changes in the spatial distribution of the Purkinje network after acute myocardial infarction in the pig. *PLoS One.* 2019;14:e0212096.

21. Almenar S, **Ríos-Navarro C**, Ortega M, Molina P, Ferrandez-Izquierdo A, Ruiz-Sauri A. Anatomy, immunohistochemistry, and numerical distribution of human splenic microvessels. *Ann Anat.* 2019;224:161-171.

22. Pérez-Terol I, **Ríos-Navarro C**, de Dios E, Morales JM, Gavara J, Pérez-Sole N, Diaz A, Minana G, Segura-Sabater R, Bonanad C, Bayés-Genís A, Husser O, Monmeneu JV, Lopez-Lereu MP, Núñez J, Chorro FJ, Ruiz-Sauri A, Bodí V, Monleon D. Magnetic resonance microscopy and correlative histopathology of the infarcted heart. *Sci Rep.* 2019;9:20017.

23. Rodriguez-Palomares JF, Gavara J, Ferreira-González I, Valente F, **Ríos C**, Rodríguez-García J, Bonanad C, García Del Blanco B, Miñana G, Mutuberria M, Núñez J, Barrabés J, Evangelista A, Bodí V, García-Dorado D. Prognostic value of initial left ventricular remodeling in patients with reperfused STEMI. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2019;12:2445-2456.



24. Ait Abderrahim L, Taïbi K, Ait Abderrahim N, Boussaid M, **Ríos-Navarro C**, Ruiz-Saurí A. Euphorbia honey and garlic: Biological activity and burn wound recovery. *Burns*. 2019;45(7):1695-1706.

25. Gavara J, Rodriguez-Palomares JF, Valente F, Monmeneu JV, Lopez-Lereu MP, Bonanad C, Ferreira-Gonzalez I, Garcia Del Blanco B, Rodriguez-Garcia J, Mutuberria M, de Dios E, **Ríos-Navarro C**, Pérez-Sole N, Racugno P, Paya A, Minana G, Canoves J, Pellicer M, Lopez-Fornas FJ, Barrabes J, Evangelista A, Núñez J, Chorro FJ, Garcia-Dorado D, Bodí V. Prognostic value of strain by tissue tracking cardiac magnetic resonance after ST-segment elevation myocardial infarction. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2018;11:1448-1457.

26. Forteza MJ, Trapero I, Hervás A, de Dios E, Ruiz-Sauri A, Minana G, Bonanad C, Gómez C, Oltra R, **Ríos-Navarro C**, Ketelhuth DFJ, Núñez J, Chorro FJ, Bodí V. Apoptosis and Mobilization of Lymphocytes to Cardiac Tissue Is Associated with Myocardial Infarction in a Reperfused Porcine Model and Infarct Size in Post-PCI Patients. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:1975167.

27. de Gonzalo-Calvo D, Cediél G, Bär C, Núñez J, Revuelta-Lopez E, Gavara J, **Ríos-Navarro C**, Llorente-Cortes V, Bodí V, Thum T, Bayes-Genis A. Circulating miR-1254 predicts ventricular remodeling in patients with ST-segment-elevation myocardial infarction: A cardiovascular magnetic resonance study. *Sci Rep*. 2018;8:15115.

28. Miñana G, Núñez J, Bayés-Genís A, Revuelta-López E, **Ríos-Navarro C**, Núñez E, Chorro FJ, López-Lereu MP, Monmeneu JV, Lupón J, Bodí V. ST2 and left ventricular remodeling after ST-segment elevation myocardial infarction: A cardiac magnetic resonance study. *Int J Cardiol*. 2018;270:336-342.

29. Cambroneró-Cortinas E, Bonanad C, Monmeneu JV, Lopez-Lereu MP, Gavara J, de Dios E, **Ríos C**, Pérez N, Racugno P, Paya A, Escribano D, Minana G, Pellicer M, Cànoves J, Núñez J, Chorro FJ, Moratal D, Bodí V. incidence, outcomes, and predictors of ventricular thrombus after reperfused ST-segment-elevation myocardial infarction by using sequential cardiac MR imaging. *Radiology*. 2017;284(2):372-380.

30. Hervás A, Ruiz-Sauri A, Gavara J, Monmeneu JV, de Dios E, **Ríos-Navarro C**, Pérez-Sole N, Pérez I, Monleon D, Morales JM, Minana G, Núñez J, Bonanad C, Diaz A, Vila JM, Chorro FJ, Bodí V. A multidisciplinary assessment of remote myocardial fibrosis after reperfused myocardial infarction in swine and patients. *J Cardiovasc Transl Res*. 2016;9(4):321-33.

31. Victor VM, Rovira-Llopis S, Bañuls C, Diaz-Morales N, Martínez de Marañón A, **Ríos-Navarro C**, Alvarez A, Gomez M, Rocha M, Hernández-Mijares A. insulin resistance in PCOS patients enhances oxidative stress and leukocyte adhesion: Role of myeloperoxidase. *PLoS One*. 2016;11(3):e0151960.

32. Agra RM, Al-Daghri NM, Badimon L, Bodí V, Carbone F, Chen M, Cubedo J, Dullaart RP, Eiras S, García-Monzón C, Gary T, Gnoni A, González-Rodríguez Á, Gremmel T, Hafner F, Hakala T, Huang B, Ickmans K, Irace C, Kholová I, Kimer N, Kytö V, März W, Miazgowski T, Møller S, Montecucco F, Niccoli G, Nijs J, Ozben S, Ozben T, Papassotiriou I, Papastamataki M, Reina-Couto M, **Ríos-Navarro C**, Ritsch A, Sabico S, Seetho IW, Severino A, Sipilä J, Sousa T, Taszarek A, Taurino F, Tietge UJ, Tripolino C, Verloop W, Voskuil M, Wilding JP. Research update for articles published in *EJCI* in 2014. *Eur J Clin Invest*. 2016;46(10):880-94.

33. Victor VM, Rovira-Llopis S, Bañuls C, Diaz-Morales N, Lopez-Domenech S, Escribano-López I, **Ríos-Navarro C**, Alvarez A, Gomez M, Rocha M, Hernandez-Mijares A. Metformin modulates human leukocyte/endothelial cell interactions and proinflammatory cytokines in polycystic ovary syndrome patients. *Atherosclerosis*. 2015;242(1):167-73.

34. Orden S, De Pablo C, **Ríos-Navarro C**, Martinez-Cuesta MA, Peris JE, Barrachina MD, Esplugues JV, Alvarez A. Efavirenz induces interactions between leucocytes and endothelium through the activation of Mac-1 and gp150,95. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69(4):995-1004.

**Premios obtenidos en congresos como primer autor**

1. European Society of Cardiology Congress 2016. Best Poster Presentation en el área de Angiogénesis a la comunicación titulada “Serum-induced angiogenesis parallels the dynamics of microvascular obstruction after reperfused myocardial infarction in an in vivo model”.

2. XXXIII Congreso de la Sociedad Valenciana de Cardiología. Mejor Comunicación sobre Cardiología Experimental e Investigación básica a la comunicación titulada “La neoangiogénesis inducida por suero es paralela a la dinámica de la obstrucción microvascular tras un infarto de miocardio reperfundido.

3. XXXV Congreso de la Sociedad Valenciana de Cardiología. Mejor Comunicación sobre Cardiología Experimental e Investigación básica a la comunicación titulada “La eosinopenia tras un infarto de miocardio se asocia con una peor estructura cardíaca y es paralela a la migración de los eosinófilos al tejido infartado”.

4. XXXVII Congreso de la Sociedad Valenciana de Cardiología. Mejor Comunicación sobre Cardiología Experimental e Investigación básica a la comunicación titulada “Implicación de la isoforma antiangiogénica VEGF-A<sub>165b</sub> en la angiogénesis y la función sistólica tras un infarto agudo de miocardio”.

5. Congreso de la Sociedad Española de Cardiología 2020. Tercer premio de la Sociedad Española de Cardiología a las Mejores Comunicaciones del Congreso SEC a la comunicación titulada “Implicación de la isoforma anti-angiogénica VEGF-A<sub>165b</sub> en la angiogénesis y la función sistólica tras un infarto agudo de miocardio”.

6. XXXVIII Congreso de la Sociedad Valenciana de Cardiología. Mejor Comunicación sobre Cardiología Experimental e Investigación básica a la comunicación titulada “Pérdida de viabilidad y permeabilidad endotelial inducida por el suero de pacientes con infarto agudo de miocardio”.

## **ANEXO V:**

Fuentes de financiación



La presente Tesis Doctoral ha sido realizada bajo los siguientes proyectos de investigación públicos:

1. Proyecto Prometeo para Grupos de Excelencia de la Comunidad Valenciana PROMETEO/2013/007 “Inmunidad y metabolismo: exploración de nuevas vías fisiopatológicas y oportunidades terapéuticas en el infarto agudo de miocardio”. Financiado por la Conselleria d’Educació, Generalitat Valenciana. IP: Vicente Bodí Peris. 2013-2016.

2. Proyecto PI14/00271 “Fibrosis miocárdica tras un infarto de miocardio. estudio traslacional para la innovación diagnóstica con resonancia magnética y para el entendimiento de los mecanismos reguladores”. Financiado por Instituto de Salud Carlos III y cofinanciado por los fondos FEDER. IP: Vicente Bodí Peris. 2015-2017.

3. Proyecto PIE15/0013 “A multidisciplinary project to advance in basic mechanisms, diagnosis, prediction, and prevention of cardiac damage in reperfused acute myocardial infarction”. Financiado por Instituto de Salud Carlos III y cofinanciado por los fondos FEDER. IP: Vicente Bodí Peris. 2016-2018.

4. Proyecto PI17/01836 “Estudio multidisciplinar de la obstrucción microvascular y su reparación tras un infarto agudo de miocardio: de la arteria coronaria a la microcirculación. foco en el factor VEGFA<sub>165b</sub>”. Financiado por Instituto de Salud Carlos III y cofinanciado por los fondos FEDER. IP: Vicente Bodí Peris. 2018-2020.

5. Proyecto PI20/00637 “Resolución de la obstrucción microvascular tras un infarto de miocardio: evaluación de las consecuencias estructurales y clínicas y búsqueda de nuevas

opciones terapéuticas”. Financiado por Instituto de Salud Carlos III y cofinanciado por los fondos FEDER. IP: Vicente Bodí Peris. 2021-2023.

6. Proyecto PROMETEO para Grupos de Excelencia de la Comunidad Valenciana PROMETEO/2021/008 “A multidisciplinary study to advance in the understanding of the basic mechanisms and clinical implications of microvascular obstruction after acute myocardial infarction. Exploration of novel diagnostic and therapeutic opportunities”. Financiado por la Consellería d’Educació, Generalitat Valenciana. IPs: Vicente Bodí Peris y Amparo Ruiz Saurí. 2021-2024.

Asimismo, el licenciado César Ríos Navarro ha realizado el presente trabajo con las siguientes fuentes de financiación:

1. Contrato Predoctoral asociado al proyecto PROMETEO/2013/007. Financiado por la Consellería d’Educació, Generalitat Valenciana (Mayo 2016 – Diciembre 2016).

2. Contrato de Coordinador asociado al proyecto PIE15/00013. Financiado por Instituto de Salud Carlos III y cofinanciado por los fondos FEDER (Enero 2017 – Diciembre 2018).

3. Contrato Predoctoral de Formación en Investigación en Salud (PFIS) F118/00320. Financiado por Instituto de Salud Carlos III y cofinanciado por los fondos FEDER (Enero 2019 – actualidad).

4. EMBO Scientific Exchange Grant 9079. Financiada por la Organización Europea de Biología Molecular (Julio 2021 – Septiembre 2021).



## **ANEXO VI:**

Comités de ética





Hospital Clínic Universitari



DEPARTAMENT CLÍNIC MALVA-ROSA

**INFORME DEL COMITE ETICO DE INVESTIGACION CLINICA DEL HOSPITAL CLINIC UNIVERSITARI DE VALENCIA**

Dña. Cristina Gomis Gozalbo, Secretaria del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínic Universitari de Valencia

CERTIFICA

Que en este Comité, en su reunión de fecha 25 de febrero de 2016, y según consta en el acta de la misma, se han analizado los aspectos éticos y científicos relacionados al proyecto de investigación que lleva por título:

***A multidisciplinary project to advance in basic mechanisms, diagnosis, prediction, and prevention of cardiac damage in reperfused acute myocardial infarction.***

Mismo que será llevado a cabo en el Servicio de Cardiología y cuyo investigador principal es el Dr. Vicent Bodí Peris, acordando que reúne las características adecuadas referentes a información a los pacientes y cumplimiento de los criterios éticos para la investigación médica y biomédica establecidos en la **Declaración de Helsinki** (Junio 1964, Helsinki, Finlandia) de la Asamblea Médica Mundial, y sus revisiones (Octubre 1975, Tokio, Japón), (Octubre 1983, Venecia, Italia), (Septiembre 1989, Hong Kong), (Octubre 1996, Somerset West, Sudáfrica), (Octubre 2000, Edimburgo), (Octubre 2008 Seúl, Corea) y (Octubre 2013 Fortaleza, Brasil) y en la **Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos del Hombre de la UNESCO** y los acuerdos del **Protocolo Adicional del Consejo de Europa para la protección de los Derechos del Hombre y de la dignidad del ser humano frente a la aplicaciones de la biología y de la medicina** (París 12-1-1998, ratificado el 23-7-1999).

Lo que certifico a efectos oportunos de la convocatoria de Ayudas a Proyectos en Investigación en Salud del Instituto de Salud Carlos III.

Valencia, 25 de febrero de 2016.

Fdo. : Dra. Dña. Cristina Gomis Gozalbo  
Secretaria del Comité Ético de Investigación Clínica



**AUTORIZACION PROCEDIMIENTO 2017/VSC/PEA/00104**

Vista la solicitud realizada en fecha 25/05/17 con nº reg. entrada 23562 por D/D<sup>a</sup>. Pilar Campins Falcó, Vicerrectora de Investigación y Política Científica, centro usuario ES462500001003, para realizar el procedimiento:

***“Código Referencia: A143784155005 Un estudio multidisciplinar para avanzar en el entendimiento de la dinámica, los mecanismos básicos y el diagnóstico en la obstrucción microvascular tras un infarto agudo de miocardio”***

Teniendo en cuenta la documentación aportada, según se indica en el artículo 33, punto 5 y 6, y puesto que dicho procedimiento se halla sujeto a autorización en virtud de lo dispuesto en el artículo 31 del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero,

Vista la propuesta del jefe del servicio de Producción y Sanidad Animal.

**AUTORIZO:**

la realización de dicho procedimiento al que se le asigna el código: 2017/VSC/PEA/00104 tipo 2, de acuerdo con las características descritas en la propia documentación para el número de animales, especie y periodo de tiempo solicitado. Todo ello sin menoscabo de las autorizaciones pertinentes, por otras Administraciones y entidades, y llevándose a cabo en las siguientes condiciones:

Usuario: Universitat de Valencia

Responsable del proyecto: César Rios Navarro

Establecimiento: Animalario Facultad de Medicina – Campus Blasco Ibañez

Necesidad de evaluación retrospectiva:

Condiciones específicas:

Observaciones:

Valencia a, fecha de la firma electrónica

El director general de Agricultura, Ganadería y Pesca

Signat per Rogelio Llanes Ribas el  
14/05/2017 14:10:26

CSV:D24HXGUM-FXUK7DT9-XMYU33E6 URL validación:<https://www.tramita.gva.es/csv-front/index.faces?cadena=D24HXGUM-FXUK7DT9-XMYU33E6>

**AUTORIZACION PROCEDIMIENTO 2017/VSC/PEA/00106**

Vista la solicitud realizada en fecha **25/05/17** con nº reg. entrada **23564** por D/D<sup>a</sup>. **Pilar Campins Falcó**, Vicerrectora de Investigación y Política Científica, centro usuario **ES462500001003**, para realizar el procedimiento:

**“Código de Referencia: A1487851562573 “Un estudio multidisciplinar para avanzar en el entendimiento de la dinámica, los mecanismos básicos, el diagnóstico y la exploración de nuevas oportunidades terapéuticas en la obstrucción microvascular tras un infarto agudo de miocardio””**

Teniendo en cuenta la documentación aportada, según se indica en el artículo 33, punto 5 y 6, y puesto que dicho procedimiento se halla sujeto a autorización en virtud de lo dispuesto en el artículo 31 del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero,

Vista la propuesta del jefe del servicio de Producción y Sanidad Animal.

**AUTORIZO:**

la realización de dicho procedimiento al que se le asigna el código: **2017/VSC/PEA/00106** tipo 2, de acuerdo con las características descritas en la propia documentación para el número de animales, especie y periodo de tiempo solicitado. Todo ello sin menoscabo de las autorizaciones pertinentes, por otras Administraciones y entidades, y llevándose a cabo en las siguientes condiciones:

Usuario: **Universitat de Valencia**

Responsable del proyecto: **César Ríos Navarro**

Establecimiento: **Animalario Facultad de Medicina – Campus Blasco Ibañez**

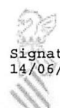
Necesidad de evaluación retrospectiva:

Condiciones específicas:

Observaciones:

Valencia a, fecha de la firma electrónica

El director general de Agricultura, Ganadería y Pesca



Signat per Rogelio Llanes Ribas el  
14/06/2017 14:10:26