



Facultat de Medicina i Odontologia

Departament de Patologia

Programa de doctorat: 3139 Medicina

**Estudi histològic i transcriptòmic dels canvis
endevinguts en la matriu extracel·lular cardíaca
després d'un infart de miocardi**

Tesi Doctoral presentada per:

Carme Maria Ortega Albiach

Dirigida per:

Dra. Amparo Ruiz Saurí

Dr. Vicente Bodí Peris

Dr. César Ríos Navarro

Juliol 2024

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGIA
DEPARTAMENT DE PATOLOGIA

Dra. Amparo Ruiz Saurí, Catedràtica de la Universitat de València.

Dr. Vicente Bodí Peris, Catedràtic de la Universitat de València i Cap de la Secció d'hospitalització de la Sala de Cardiologia de l'hospital Clínic Universitari de València.

Dr. César Ríos Navarro, Investigador postdoctoral de l'Institut de Investigació Sanitària INCLIVA i Professor Associat de la Universitat de València.

CERTIFIQUEN:

Que la present Tesi Doctoral titulada “Estudi histològic i transcriptòmic dels canvis endevinguts en la matriu extracel·lular cardíaca després d'un infart de miocardi”, presentada per la Graduada en Biologia **Carme Maria Ortega i Albiach**, s'ha realitzat baix la nostra direcció en el Departament de Patologia de la Facultat de Medicina i Odontologia de la Universitat de València.

Conclòs el treball experimental i bibliogràfic, autoritzem la presentació i defensa d'esta Tesi Doctoral.

Per tal que així conste als efectes oportuns, s'expedeix la present certificació en València, a 1 de juliol de 2024.

Dra. Amparo Ruiz Saurí Dr. Vicente Bodí Peris Dr. César Ríos Navarro

*“¡Hazlo! Como si ya no te jugaras nada,
como si fueras a morir mañana,
aunque lo veas demasiado lejos”*

Leiva

Agraïments

Primer de tot, m'agradaria donar les gràcies a la meua directora de tesi, Amparo, tu que em vas veure aparèixer un dia al teu despatx, em vas mirar amb dubte perquè et vaig canviar els plans, però deu minuts més tard em vas donar tota la teua confiança. A dia d'avui, gràcies a tu seguisc investigant i aprenent amb tot el que faig. Gràcies per transmetre'm que amb treball, esforç i passió tot surt endavant. Sens dubte, gràcies a Vicente, per permetre'm investigar i desenvolupar projectes en els quals moltes vegades confies tu més que jo. I sens dubte, al tercer de bord, César, hauria abandonat si no fos per la teua dedicació als meus projectes i les teves ganes de continuar aprenent. Gràcies César per fer-ho tot més fàcil, per suportar-me cada dia quinze minuts i no cedir quan m'obstine en alguna cosa.

A més, no puc deixar d'agrair a Tamara i a Jose, per tot el que m'han ajudat al llarg de tot aquest procés, per suportar-me quan ni jo sé el que faig, i per ajudar-me a fugir a temps del vostre despatx.

Gràcies al meu pare, eixa persona que ha estat cada dia desde xicoteta injectant-me la ciència en vena, i sent racional i científic per a totes les explicacions, per donar-me suport en cada decisió que prenc i haver lluitat contra qualsevol adversitat per a permetre'm ser qui vullga.

Gràcies a les dives i les altres, per totes les vegades que ens vam riure de les nostres desgràcies, per permetre'm queixar-me sempre i haver-me donat suport cada dia. Sou inspiradores i exemple de superació.

Gràcies Carol i Jaime, per confiar sempre en mi, per fer-me créixer cada dia amb els vostres comentaris, i per fer-me riure tots els dies a la feina.

Sens dubte, moltíssimes gràcies a Jose, aquella persona que va aparèixer a la meua vida per ajudar-me a arribar on vull i fins i tot on no sabia que volia, per demostrar-me que ets un exemple de superació i animar-nos a la resta a ser-ho, per donar-me suport decidisca el que decidisca fer, però ser el primer en fer-me tocar de peus a terra. Sempre t'estimaré.

I, per últim, però no menys important, gràcies a MI, per haver-me despertat cada dia amb energia per seguir amb tots els projectes, per no haver-me rendit i per haver demostrat que molta gent s'equivocava.

Això només és el principi de nous objectius i projectes. Res no acaba ací.

Moltes gràcies a tots

ÍNDEX

ABREVIATURES

LLISTAT DE FIGURES

LLISTAT DE TAULES

RESUM

RESUMEN

I.- INTRODUCCIÓ

1. Cardiopatia isquèmica

- 1.1. Descripció
- 1.2. Tipus principals
- 1.3. Infart de miocardi
 - 1.3.1. Fisiopatologia
 - 1.3.2. Tractament de revascularització
 - 1.3.3. Dany per isquèmia-reperfusió després de l'IAM

2. Matriu extracel·lular

- 2.1. Importància de la MEC en la funció i estructura cardíaca
- 2.2. Components principals

3. Canvis en la MEC després d'un infart de miocardi

- 3.1. Fases de reparació cardíaca després d'un IAM
 - 3.1.1. Fase inflamatòria
 - 3.1.2. Fase resolutiva
 - 3.1.3. Fase proliferativa
- 3.2. Importància d'un bon control d'este procés
- 3.3. Paper del col·lagen i les MMPs

4. Tecnologies moleculars per a la detecció d'expressió gènica

- 4.1. Seqüenciació massiva
 - 4.1.1. NGS en altres disciplines
 - 4.1.2. NGS en Cardiologia

5. Contribució original de l'autor

II.- HIPÒTESIS

III.- OBJECTIUS

IV.-RESUM DE MANUSCRITS

- 1. Interstitial changes after reperfused myocardial infarction in swine: morphometric and genetic analysis.** (Ríos-Navarro*, Ortega*, et al. BMC Vet Res 2020, 16, 262)
- 2. Meta-Analysis of Extracellular Matrix Dynamics after Myocardial Infarction Using RNA-Sequencing Transcriptomic Database.** (Ortega*, Ríos-Navarro*, et al. Int J Mol Sci 2022, 23, 15615)
- 3. Novel fibrillar and non-fibrillar collagens involved in fibrotic scar formation after myocardial infarction.** (Ortega*, Fábrega-García*, et al. Int J Mol Sci 2024, 25, 6625)

V.- DISCUSSIÓ

1. Canvis en la MEC després d'un IAM en la zona d'infart i en la zona salvada

- 1.1. Comparació de l'interstici cardíac en el miocardi infartat i salvat al llarg de la isquèmia coronària
- 1.2. Diferències en la composició de la MEC entre la zona infartada i salvada en els dies posteriors a la reperfusió

2. Evolució temporal dels canvis de la MEC al llarg del procés d'isquèmia

- 2.1. Regulació gènica de la MEC després de l'IAM
- 2.2. Canvis en la expressió de les MMPs i TIMPs després d'un IAM

3. Implicació de nous col·làgens en la formació de la cicatriu fibròtica després de l'IAM

- 3.1. Estudi estructural dels col·làgens de la MEC després de l'IAM
- 3.2. Estudi funcional dels col·làgens de la MEC després de l'IAM

VI.- CONCLUSIONS

VII.- BIBLIOGRAFIA

VIII.- ANNEXOS

Annex I: Ríos-Navarro C*, Ortega M*, et al. BMC Vet Res. 2020; 16:262.

Annex II: Ortega M*, Ríos-Navarro C*, et al. Int J Mol Sci. 2022; 23(24):15615.

Annex III: Ortega M*, Fábrega-García MM*, et al. Int J Mol Sci. 2024, 25, 6625.

Annex IV: Altres publicacions derivades del desenvolupament de la tesi

Annex V: Fonts de financiació

Annex VI: Comitès d'ètica

ABREVIATURES

ADA: artèria descendent anterior

ADN: àcid desoxiribonucleic

ARN: àcid ribonucleic

ARN-Seq: seqüenciació massiva d'ARN

BP: procés biològic

BSG: basigin

CTGF: *connective tissue growth factor*

DEG: gen diferencialment expressat

ERO: espècies reactives d'oxigen

GAG: glicosaminglicans

GO: *Gene Ontology*

IAM: infart agut de miocardi

MEC: matriu extracel·lular

MMP: metal·loproteïnases de la matriu extracel·lular

NGS: *Next Generation Sequencing*

PCR: reacció en cadena de la polimerasa

RT: transcripció reversa

SPARC: proteïna àcida secretada rica en cisteïna

TGF- β : *transforming growth factor- β*

TIMP: inhibidors de metal·loproteïnases de la matriu extracel·lular

TNF- α : factor de necrosi tumoral- α

LLISTAT DE FIGURES

Figura 1. Composició de la placa ateroscleròtica.

Figura 2. Coronariografia d'un pacient amb l'artèria oclusa i reperfosa després d'una angioplàstia coronària transluminal percutània.

Figura 3. Fases de resolució després d'un IAM.

Figura 4. Resposta immune a l'àrea infartada durant la fase inflamatòria.

Figura 5. Fase de proliferació durant la qual es produeix la diferenciació cap a miofibroblasts.

Figura 6. Secció transversal del miocardi del cor obtinguda del model porcí d'IAM per a estudi macroscòpic.

Figura 7. Imatges representatives dels components de la matriu extracel·lular a l'àrea necròtica i salvada després de 90 minuts d'isquèmia sense reperfusió.

Figura 8. Imatges representatives de les fibres que componen la MEC a l'àrea necròtica i salvada del miocardi aïllades després d'una setmana i un mes després de la reperfusió coronària.

Figura 9. Diagrama de flux de PRISMA del metanàlisi.

Figura 10. Anàlisi d'enriquiment funcional de GO BPs filtrats pels termes "matrix" o "extracellular".

Figura 11. Mapes de calor dels Log2FoldChange dels gens que codifiquen per col·lagen, MMPs i TIMPs en diferents punts temporals després de l'inici de l'oclusió coronària.

Figura 12. Expressió d'ARN missatger de les subunitats tipus II, VIIIa1, VIIIa2, XI i XII de col·lagen en models experimentals murins d'IAM.

Figura 13. Associació entre la mida de l'infart i l'expressió gènica de les subunitats de col·lagen tipus II, VIIIa1, VIIIa2, XI i XII en un model murí experimental controlat d'IAM.

Figura 14. Presència dels col·làgens tipus II, VIIIa1, VIIIa2, XI i XII a la cicatriu fibròtica de pacients amb un infart crònic.

Figura 15. Canvis a la MEC durant la isquèmia i posterior reperfusió al miocardi necròtic i salvat després d'un IAM.

Figura 16. Canvis produïts a la MEC a diferents temps d'isquèmia.

Figura 17. Participació dels col·làgens tipus II, VIII, XI i XII a la cicatriu fibròtica formada després de l'IAM.

LLISTAT DE TAULES

Taula 1. Components de la MEC en el cor adult sa.

Taula 2. Nivells d'ARN missatger dels factors relacionats amb el remodelat de la MEC.

Taula 3. Resum dels datasets de *Gene Expression Omnibus* seleccionats per al metanàlisi.

RESUM

L'infart agut de miocardi (IAM) és una de les principals causes de morbiditat i mortalitat als països desenvolupats. El maneig òptim d'aquests pacients consisteix en la reperfusió primerenca, completa i sostinguda de l'artèria obstruïda responsable de l'infart emprant, idealment, mètodes percutanis. Tot i que el ràpid restabliment del flux coronari ha aconseguit reduir significativament l'extensió de la mida de l'infart i minimitzar el remodelat ventricular advers, aquest també comporta una sèrie d'efectes nocius coneguts com a dany per isquèmia-reperfusió. En la histopatologia de l'IAM, s'han descrit canvis evidents en la matriu extracel·lular (MEC) cardíaca durant la isquèmia i posterior reperfusió que, en última instància, acabaran produint una cicatriu fibròtica sòlida a la zona danyada per la isquèmia coronària. Com que la formació d'aquesta cicatriu fibròtica ha d'estar perfectament regulada per evitar el deteriorament en la funció sistòlica resultant i l'aparició d'esdeveniments cardiovasculars adversos, l'objectiu principal de la present Tesi Doctoral és aprofundir en el coneixement dels canvis dinàmics de la composició de la MEC després d'un IAM, així com descriure nous gens implicats en la generació d'aquesta cicatriu fibròtica.

En el primer article es van analitzar els canvis morfomètrics i genètics en els components de la MEC des de l'inici de la isquèmia fins a les fases tardanes (setmanes) després de la reperfusió coronària en el miocardi necròtic i salvat, utilitzant un model porcí controlat d'IAM realitzat de forma percutània. Es van utilitzar porcs joves que es van dividir en un grup control i tres grups d'IAM sotmesos a 90 minuts d'isquèmia: un sense reperfusió i dos seguits d'una setmana o un mes de reperfusió. Es van quantificar morfomètricament els diferents components de la MEC així com els nivells d'expressió gènica de diversos factors implicats en el remodelat de la MEC.

En el grup amb isquèmia sense reperfusió es va observar un augment de la fibronectina, laminina i fibres elàstiques tant a l'àrea necròtica com a la salvada, un increment de l'expressió d'inhibidors de les metal·loproteïnases de la matriu extracel·lular (TIMP)-1, TIMP2 i TIMP3, així com del factor de creixement del teixit connectiu. No obstant això, després de la reperfusió, es va evidenciar una major presència de col·lagen I i III, fibres elàstiques, glicosoaminoglicans, laminina i fibronectina en el miocardi necròtic però no en el salvat, així com una sobreexpressió de TIMP1, TIMP2, TIMP3 i de les metal·loproteïnases de la matriu extracel·lular (MMP)-2 i MMP9 en el miocardi necròtic en relació amb el teixit salvat.

Per tant, el remodelat de la MEC s'inicia immediatament després de l'inici de la isquèmia tant en el teixit necròtic com en el salvat, tot i que la composició de la MEC a l'àrea salvada és similar a un miocardi control diverses setmanes després de la reperfusió. La ràpida reobertura de l'artèria oclusa no només ens permet salvar cardiomiòcits, sinó que també preserva la MEC evitant la formació d'una cicatriu fibròtica extensa, prevenint, en conseqüència, la incidència d'insuficiència cardíaca post-IAM.

Com que la MEC és una xarxa complexa que proporciona suport estructural a diferents tipus cel·lulars i participa activament en la regulació de diversos processos cel·lulars, el segon article es va centrar en identificar gens implicats en el remodelat de l'interstici cardíac post-IAM a través d'un metanàlisi de dades de seqüenciació massiva d'ARN. Per a això es va fer una cerca a la base de dades pública *Gene Expression Omnibus* de la qual es van seleccionar un total de vuit estudis que incloïen 92 ratolins sotmesos a diferents temps d'isquèmia coronària (induïda mitjançant lligadura coronària permanent). Posteriorment, es van identificar els gens diferencialment expressats i es va dur a terme una anàlisi d'enriquiment funcional dels

mateixos amb l'objectiu de posar en evidència quins processos biològics es trobaven sobrerrepresentats al llarg del procés de reparació del miocardi isquèmic.

Segons les nostres dades, es va detectar una regulació positiva de processos relacionats amb l'organització de la MEC i la resposta a estímuls extracel·lulars des de les primeres hores després de l'inici de la isquèmia. Específicament, els processos relacionats amb el desassemblatge de la MEC es van evidenciar entre els dies 1 i 7 després de l'inici de la isquèmia, mentre que l'assemblatge de la nova MEC a partir del dia 7. A més, es va descriure la sobreexpressió de 18 MMPs, 3 TIMPs i 26 subunitats de col·lagen.

Amb tot això, aquest segon estudi proporciona una visió detallada dels canvis dinàmics esdeinguts en l'interstici cardíac després d'un IAM. Es va observar que els canvis genètics orientats a la reparació de la MEC comencen en les primeres 6 hores després de la inducció de l'infart, fomentant-se el desassemblatge de la MEC en moments inicials, així com l'assemblatge després del dia 7. L'expressió de gens que codifiquen MMPs i TIMPs, així com subunitats de col·lagen, varia significativament durant aquest procés, subratllant la importància d'aquests components en la formació d'una sòlida cicatriu fibròtica post-IAM. Aquestes dades poden ser fonamentals per al disseny de futures investigacions experimentals i clíniques destinades a comprendre millor la reparació de la MEC en el context d'un IAM.

Per últim, en el tercer dels articles, es van utilitzar les dades del metanàlisi previ per caracteritzar la presència de subunitats de col·lagen que, fins a la data, no havien estat evidenciades en la fisiopatologia de l'IAM. En concret, es va analitzar la presència de col·làgens fibril·lars (tipus II i XI) i no fibril·lars (tipus VIII i XII) en models experimentals murins d'IAM (reperfós i no reperfós) així com

en mostres de miocardi procedents d'autòpsies de pacients amb un IAM crònic (més de 6 mesos d'evolució).

Les dades dels models murins demostren un increment de l'ARN missatger d'aquests col·làgens als 21 dies de la inducció de l'IAM en relació amb el miocardi control, sent majors com més extens era la mida de la cicatriu fibròtica. En les mostres humanes, tot i que no es va detectar un augment a nivell transcriptòmic, sí que es va detectar la presència dels col·làgens tipus II, VIII, XI i XII en la cicatriu fibròtica mitjançant immunohistoquímica. Per finalitzar, un estudi bioinformàtic de les funcions moleculars en les quals han estat descrits aquests col·làgens va permetre hipotetitzar que aquestes subunitats de col·lagen contribueixen a la resistència i la cohesió dels components de la MEC. Aquests resultats posen en evidència la participació de noves subunitats de col·lagen que no havien estat prèviament explorades en el context del remodelat de l'interstici cardíac post-IAM.

Aquesta Tesi Doctoral, realitzada mitjançant un compendi d'articles científics, pretén avançar en el coneixement de la fisiopatologia de l'IAM i, més concretament, en els canvis dinàmics que pateix la MEC cardíaca durant el procés d'isquèmia-reperfusió, així com proposar nous gens implicats en la modulació d'aquest procés. Un millor enteniment d'aquests canvis resulta essencial per evitar el remodelat advers del ventricle esquerre post-infart i, subseqüentment, reduir l'aparició d'insuficiència cardíaca.

RESUMEN

El infarto agudo de miocardio (IAM) es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en los países desarrollados. El manejo óptimo de estos pacientes consiste en la reperfusión temprana, completa y sostenida de la arteria obstruida responsable del infarto empleando, idealmente, métodos percutáneos. A pesar de que el rápido restablecimiento del flujo coronario ha conseguido reducir significativamente la extensión del tamaño de infarto y minimizar el remodelado ventricular adverso, éste también entraña una serie de efectos deletéreos conocidos como daño por isquemia-reperfusión. En la histopatología del IAM, se han descrito cambios evidentes en la matriz extracelular (MEC) cardíaca durante la isquemia y posterior reperfusión que, en última instancia, acabarán produciendo una cicatriz fibrótica sólida en la zona dañada por la isquemia coronaria. Debido a que la formación de esta cicatriz debe estar perfectamente regulada para evitar el deterioro en la función sistólica resultante y la aparición de eventos cardiovasculares adversos, el principal objetivo de la presente Tesis Doctoral es profundizar en el conocimiento de los cambios dinámicos de la composición de la MEC tras un IAM así como describir nuevos genes implicados en la generación de esta cicatriz fibrótica.

En el primer artículo, se analizaron los cambios morfométricos y genéticos en los componentes de la MEC desde el inicio de la isquemia hasta las fases tardías (semanas) después de la reperfusión coronaria en el miocardio necrótico y salvado, utilizando un modelo porcino controlado de IAM realizado de forma percutánea. Se utilizaron cerdos jóvenes que se dividieron en un grupo control y tres grupos de IAM sometidos a 90 minutos de isquemia: uno sin reperfusión y dos seguidos de 1 semana o 1 mes de reperfusión. Se cuantificaron morfométricamente los diferentes componentes de la

MEC así como los niveles de expresión génica de diversos factores implicados en el remodelado de la MEC.

En el grupo con isquemia sin reperusión se observó un aumento de la fibronectina, laminina y fibras elásticas tanto en el área necrótica como en la salvada, así como un incremento de la expresión de inhibidores de las metaloproteinasas de la matriz extracelular (TIMP)-1, TIMP2 y TIMP3 y del factor de crecimiento del tejido conectivo. Sin embargo, tras la reperusión, se evidenció una mayor presencia de colágeno I y III, fibras elásticas, glicosaminglicanos, laminina y fibronectina en el miocardio necrótico, pero no en el salvado, así como una sobreexpresión de TIMP1, TIMP2, TIMP3 y de las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP)-2 y MMP9 en el miocardio necrótico en relación con el tejido salvado.

Por tanto, la remodelación de la MEC se inicia inmediatamente tras el inicio de la isquemia tanto en el tejido necrótico como en el salvado, aunque la composición de la MEC en el área salvada es similar a un miocardio control varias semanas después de la reperusión. La rápida reapertura de la arteria ocluída no sólo nos permite salvar cardiomiocitos, sino que también preserva la MEC evitando la formación de una cicatriz fibrótica extensa, previniendo, en consecuencia, la incidencia de insuficiencia cardiaca post-IAM.

Como la MEC es una red compleja que proporciona soporte estructural a diferentes tipos celulares y participa activamente en la regulación de los diversos procesos celulares, el segundo artículo se centró en identificar genes implicados en el remodelado del intersticio cardiaco post-IAM a través de un metanálisis de datos de secuenciación masiva de ARN. Para ello se realizó una búsqueda en la base de datos pública *Gene Expression Omnibus* de la que se seleccionaron un total de ocho estudios que incluían 92 ratones

sometidos a diferentes tiempos de isquemia coronaria (inducida mediante ligadura coronaria permanente). Posteriormente, se identificaron los genes diferencialmente expresados y se llevó a cabo un análisis de enriquecimiento funcional de los mismos con el objetivo de evidenciar qué procesos biológicos se encontraban sobrerrepresentados a lo largo del proceso de reparación del miocardio isquémico.

Según nuestros datos, se detectó una regulación positiva de procesos relacionados con la organización de la MEC y la respuesta a estímulos extracelulares desde las primeras horas tras el inicio de la isquemia. Específicamente, los procesos relacionados con el desensamblaje de la MEC se evidenciaron entre los días 1 y 7 tras el inicio de la isquemia, mientras que el ensamblaje de la nueva MEC a partir del día 7. Además, se describió la sobreexpresión de 18 MMPs, 3 TIMPs y 26 subunidades de colágeno.

Con todo ello, este segundo estudio proporciona una visión detallada de los cambios dinámicos acontecidos en el intersticio cardiaco después de un IAM. Se concluyó que los cambios genéticos orientados a la reparación de la MEC comienzan en las primeras 6 horas tras la inducción del infarto, fomentándose el desensamblaje de la MEC en momentos iniciales, así como el ensamblaje tras el día 7. La expresión de genes que codifican MMPs y TIMPs, así como subunidades de colágeno varía significativamente durante este proceso, subrayando la importancia de estos componentes en la formación de una sólida cicatriz fibrótica post-IAM. Estos datos pueden ser fundamentales para el diseño de futuras investigaciones experimentales y clínicas destinadas a comprender mejor la reparación del MEC en el contexto de un IAM.

Por último, en el tercero de los artículos, se emplearon los datos del metanálisis previo para caracterizar la presencia de subunidades de colágeno que, hasta la fecha, no habían sido evidenciadas en la fisiopatología del IAM. En concreto, se analizó la presencia de colágenos fibrilares (tipos II y XI) y no fibrilares (tipos VIII y XII) en modelos experimentales murinos de IAM (reperfundido y no reperfundido) así como en muestras de miocardio procedentes de autopsias de pacientes con un IAM crónico (más de 6 meses de evolución).

Los datos de los modelos murinos demuestran un incremento del ARN mensajero de estos colágenos a los 21 días de la inducción del IAM en relación con el miocardio control, siendo mayores cuanto más extenso era el tamaño de la cicatriz fibrótica. En las muestras humanas, aunque no se detectó un aumento a nivel transcriptómico, sí que se detectó la presencia de los colágenos tipo II, VIII, XI y XII en la cicatriz fibrótica mediante inmunohistoquímica. Para finalizar, un estudio bioinformático de las funciones moleculares en las que han sido descritas estos colágenos permitió hipotetizar que estas subunidades de colágeno contribuyen a la resistencia y la cohesión de los componentes de la MEC tras un infarto. Estos resultados ponen en evidencia la participación de nuevas subunidades de colágeno que no habían sido previamente exploradas en el contexto de la remodelación del intersticio cardiaco post-IAM.

Esta Tesis Doctoral, realizada mediante compendio de artículos científicos, pretende avanzar en el conocimiento de la fisiopatología del IAM y, más concretamente, en los cambios dinámicos que sufre la MEC cardiaca durante el proceso de isquemia-reperusión así como proponer nuevos genes implicados en la modulación de este proceso. Un mejor entendimiento de estos cambios resulta esencial para evitar el remodelado adverso del ventrículo izquierdo post-infarto y,

subsecuentemente, reducir la aparición de insuficiencia cardíaca y mejorar el pronóstico de los pacientes.

I.- INTRODUCCIÓ

1. Cardiopatia isquèmica

A principis del segle XX, les malalties cardiovasculars suposaven menys d'un 10% de les defuncions al món. A mitjans del segle XX, aquestes ja eren la principal causa de mort als països desenvolupats i, a més, a partir del 2001, també als països en desenvolupament (Gaziano et al., 2006; World Health Organization, 2002). L'any 2019, les malalties cardiovasculars van suposar gairebé 20 milions de defuncions, és a dir, un terç de les produïdes al món. L'elevada prevalença de les malalties cardiovasculars suposa també una pèrdua de salut per a molts pacients, així com un cost excessiu per al sistema de salut (Roth et al., 2020). Segons l'Organització Mundial de la Salut, el nombre de pacients que han patit cardiopatia isquèmica ha augmentat arreu del món des de l'inici del segle XXI i això ha suposat tant un increment de les defuncions com una pèrdua de salut.

A Espanya, les malalties cardiovasculars suposen la principal causa de mortalitat, constituint una de cada quatre en homes i una de cada tres en dones. En els homes, la cardiopatia isquèmica és la responsable del major nombre de morts per malaltia cardiovascular. Espanya és un país amb Sistema Nacional de Salut de caràcter tributari i cobertura universal que assegura a tots els seus ciutadans l'atenció hospitalària de manera gratuïta, no obstant això, aquest país s'enfronta en el futur a un gran repte. A causa de l'augment de l'esperança de vida, s'ha estimat un increment dels pacients amb malalties cardiovasculars durant les pròximes dècades, fet que suposa un augment dels costos en atenció mèdica (Bueno & Pérez-Gómez, 2019). Per tant, resulta rellevant en el context actual l'estudi i desenvolupament de noves estratègies terapèutiques que permeten reduir la incidència d'esdeveniments cardíacs, així com incrementar la qualitat de vida dels pacients que els han patit.

1.1. Fisiopatologia

El terme cardiopatia isquèmica engloba un conjunt d'entitats caracteritzades per una disminució en l'aportació de sang al miocardi en relació a la demanda, i que en la majoria dels casos ve precedida per una aterosclerosi coronària. En última instància, es reduirà significativament l'aportació d'oxigen i nutrients al miocardi (Chorro et al., 2007).

La placa ateroscleròtica està formada per un nucli lipídic en conjunt amb macròfags i altres cèl·lules inflamatòries a l'espai subintimal de la paret arterial. Aquest nucli està envoltat per una capa de matriu composta principalment per col·lagen i cèl·lules de múscul llis que serà coberta per cèl·lules endotelials (Figura 1). Les cèl·lules inflamatòries, entre les quals es troben els limfòcits T i els macròfags, infiltren la lesió i estan implicades en la progressió de la placa (Figura 1). Aquestes lesions amb el temps maduren i creixen, reduint l'aportació de sang cap al miocardi. Els dos esdeveniments que poden donar lloc a trombosi són la ruptura de la placa i l'erosió superficial de la mateixa. Quan aquests es produeixen, donen lloc a una trombosi suboclusiva o oclusiva, la qual cosa provoca un esdeveniment coronari agut (Vergallo & Crea, 2020). La formació de les plaques d'ateroma té una relació directa amb els anomenats factors de risc que es classifiquen en no modificables (edat, sexe, factors hereditaris) o modificables (tabac, hipercolesterolèmia, hipertensió arterial, obesitat, diabetis) (Ruff & Braunwald, 2011).

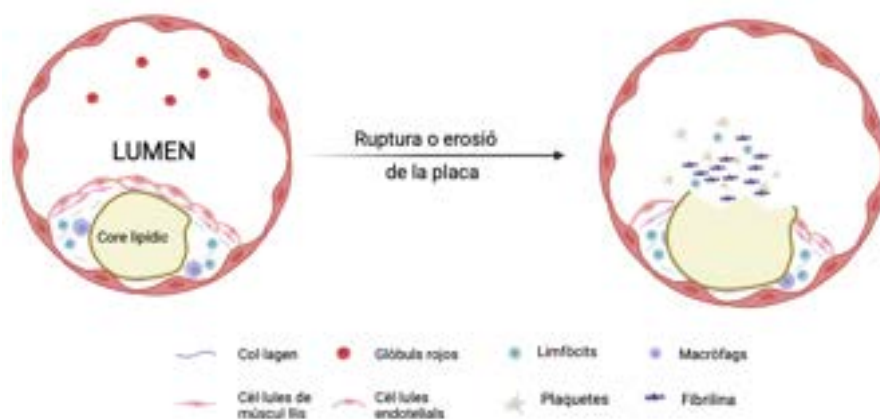


Figura 1: Components de la placa ateroscleròtica i posterior ruptura amb la consegüent alliberació de material trombòtic, responsable de la gènesi de l'infart agut de miocardi en la majoria de casos.

1.2. Classificació

La isquèmia miocàrdica es pot classificar, segons l'evolució de la placa ateroscleròtica, en un síndrome crònic o estable, o en un d'agut o inestable.

Els pacients amb síndrome isquèmic crònic o estable són aquells amb angina de pit estable. Aquesta es produeix per l'obstrucció de les artèries epicàrdiques a causa de la formació d'una placa ateroscleròtica estable (Valgimigli & Biscaglia, 2014). La clínica típica és una molèstia al pit després d'un elevat esforç físic, ja que l'aportació d'oxigen no arriba a ser suficient per a la demanda del miocardi, provocant així isquèmia miocàrdica (Joshi & de Lemos, 2021; Knuuti et al., 2020; Virani et al., 2020). Els pacients amb aquesta dolència poden arribar a desenvolupar circulació col·lateral que contraresta els problemes de l'obstrucció arterial.

En contraposició amb aquests últims, un síndrome isquèmic agut o inestable pot ser una angina de pit inestable o un infart agut de miocardi (IAM). A diferència de la placa quiescent que trobem en els pacients amb angina de pit estable, un síndrome coronari agut es produeix quan la placa es trenca o erosiona, la qual cosa estimula la formació de trombes rics en plaquetes que poden arribar a obstruir el flux sanguini coronari (Libby et al., 2019) (Figura 1). La majoria de les ruptures de la placa es produeixen als llocs amb més tensió mecànica, com és la unió de la superfície de la placa i la capa íntima de l'artèria (Cheng et al., 1993; Richardson et al., 1989), però també poden produir-se per l'acció de les proteïnases secretades pels macròfags que degraden enzimàticament la coberta fibrosa (Henney et al., 1991; Libby, 1995; Moreno et al., 1994; Welgus et al., 1990). La ruptura de la placa pot portar a una completa oclusió coronària que provoca l'IAM amb elevació del segment ST, o una oclusió coronària incompleta que condueix a una angina de pit inestable.

1.3. Infart de miocardi

1.3.1. Fisiopatologia

L'aterosclerosi és la causa subjacent de la majoria de les malalties cardiovasculars, inclòs l'IAM. Aquestes malalties suposen la principal causa de mort a nivell mundial degut a, entre altres factors, l'acumulació de factors de risc metabòlics com l'obesitat i la diabetis, així com a l'augment de l'esperança de vida de la població (Hansson et al., 2006).

L'IAM es desencadena per la formació d'un trombe alliberat de la ruptura d'una placa inestable d'ateroma a la llum de les artèries coronàries que causa un bloqueig de la perfusió coronària. El cessament de la perfusió provoca una situació d'hipòxia i manca de nutrients en el miocardi, cosa que condueix a una situació d'isquèmia que, si es perllonga en el temps,

produeix una necrosi irreversible del teixit cardíac perfós per aquesta artèria. A més, es poden produir altres esdeveniments adversos com són arrítmies malignes amb la consegüent mort sobtada (Karve et al., 2007; Zeijlon et al., 2021).

1.3.2. Tractament de revascularització

L'IAM causa més de 2,4 milions de morts als Estats Units, més de 4 milions de defuncions a Europa i el nord d'Àsia, i més d'un terç de les morts anuals als països desenvolupats (Nichols et al., 2014; Yeh et al., 2010). Els canvis en l'estil de vida i l'ús de teràpies basades en evidència científica han reduït en les últimes dècades la mortalitat derivada d'aquestes malalties coronàries, però l'IAM continua afectant més de 7 milions de persones a l'any arreu del món, fet que suposa un impacte econòmic molt elevat per al sistema sanitari (Nichols et al., 2014).

Segons les guies clíniques, l'objectiu principal del tractament de l'IAM és la reperfusió primerenca, completa i sostinguda de l'artèria responsable de l'infart i, per a això, es duu a terme una reobertura de l'artèria oclosa (Figura 2). Actualment, la ràpida restauració del flux coronari anterògrad i la perfusió tissular, ja sigui mitjançant l'ús de fàrmacs trombolítics o mitjançant intervencionisme coronari percutani, són factors clau en el tractament de l'IAM i en la reducció de la mortalitat derivada d'aquest (Ibáñez et al., 2015).

L'any 1978, es va demostrar que la reperfusió primerenca mitjançant recanalització transluminal era factible (Rentrop & Feit, 2015), cosa que converteix fins a la data l'angioplàstia transluminal percutània en el tractament d'elecció en la majoria dels pacients després d'un IAM. Breument, el procediment consisteix en la reobertura de l'artèria obstruïda a través de la introducció de catèters aconseguint una millor



Figura 2: Coronariografia d'un pacient amb l'artèria descendent anterior oclusa (esquerra) i reperfosa (dreta) després de practicar una angioplàstia coronària transluminal percutània.

perfusió de la zona infartada i una menor incidència de re-oclusió (Elízaga Corrales, 1998).

L'oclusió trombòtica d'una artèria coronària resulta en una lesió que s'estén des del subendocardi fins al subepicardi de manera dependent del temps, de manera que, després de la detenció de l'aportació sanguínia, existeix una zona de miocardi en risc que es podrà reduir com més aviat es produïska la reperfusió. En models experimentals, s'ha demostrat que la taxa de necrosi miocàrdica es completa a les 6 hores després de l'oclusió (Reimer et al., 1977). A més, la mida de l'infart és determinant en la funció del ventricle esquerre així com en la mortalitat a llarg termini després de l'IAM (Sadanandan & Hochman, 2000). Amb això, es va establir el temps fins a la reperfusió i, per tant, fins al restabliment del flux coronari com un factor crític en la recuperació del pacient (Sadanandan & Hochman, 2000). No obstant això, la millora de les taxes de mortalitat ha comportat un augment de la prevalença de la malaltia coronària i de les seves complicacions a llarg termini com és la insuficiència cardíaca (Dégano et al., 2013; Ferreira-González, 2014).

Hi ha estudis que demostren el paper beneficiós del restabliment primerenc del flux sanguini en l'artèria oclusa després de l'IAM pel que fa a la mida de l'infart, la funció sistòlica del ventricle esquerre i la mortalitat. No obstant això, l'arribada ràpida de sang oxigenada al miocardi prèviament isquèmic també s'ha descrit com a perjudicial en alguns aspectes, coneixent-se aquest fenomen com a dany per isquèmia-reperfusió.

També s'ha suggerit el paper deletèri de la reperfusió després d'un IAM, ja que existeixen evidències científiques adverses d'aquesta després de l'IAM, com ara el remodelat inadequat del ventricle esquerre i, a llarg termini, un infart transmural extens per obstrucció microvascular, amb la consegüent reoclusió de l'artèria coronària (Sadanandan & Hochman, 2000).

Després de les evidències disponibles amb el tractament de reperfusió implantat les últimes dècades, s'han descrit dos fenòmens després de la reperfusió: el dany per isquèmia-reperfusió i el mecanisme de reparació del miocardi infartat, que poden ser rellevants per al pronòstic dels pacients. L'estudi de tots dos mecanismes fisiopatològics després d'un IAM serà essencial per millorar l'evolució clínica dels pacients i buscar noves oportunitats terapèutiques.

1.3.3. Dany per isquèmia-reperfusió després de l'IAM

Després de l'oclusió trombòtica coronària que caracteritza un IAM, es produeix una situació d'isquèmia al miocardi que comporta una manca d'oxigen i de nutrients cap al mateix. El tractament realitzat per eliminar aquesta oclusió és la reperfusió primerenca de l'artèria infartada, que permet tant la reducció de la mida de l'infart, com la millora de la funció ventricular, així com la reducció de la mortalitat dels pacients

(Sadanandan & Hochman, 2000). Així i tot, hi ha problemes derivats de la pròpia reperfusió que tenen efectes deleteris sobre el miocardi. Aquest fenomen anomenat dany per reperfusió condueix a la mort cel·lular i s'ha estimat que representa fins a la meitat de la mida final de l'infart (Yellon & Hausenloy, 2007).

El 1960 es van descriure per primera vegada els efectes derivats de la reperfusió en un model animal (Jennings et al., 1960), i posteriorment el 1977 es van descriure aquests mateixos efectes en una cohort de pacients reperfosos (Bulkely & Hutchins, 1977). Va ser ja el 1985 quan aquest dany va ser atribuït a la reperfusió, que va ser descrita com “una arma de doble fil” després de l'IAM (Braunwald & Kloner, 1985).

Durant la reperfusió, la cascada inflamatòria facilita que els glòbuls blancs alliberen mediadors inflamatoris com les interleucines i el complement activat que condueixen a la lesió miocàrdica. Amb la reperfusió, es genera un ambient protrombòtic en què les plaquetes i els neutròfils s'activen, la qual cosa pot resultar en un “taponament plaquetari” de la microvasculatura. A més, les restes ateromatoses de la placa es trenquen durant la reperfusió, afavorint una embolització distal, i produint una oclusió distal a nivell de la microvasculatura. Paral·lelament, la reintroducció d'oxigen cap al miocardi potencia la formació d'espècies reactives d'oxigen (ERO), així com l'acumulació de calci intracel·lular, amb la qual cosa es danyen les proteïnes cel·lulars, els orgànuls i les membranes plasmàtiques. Aquests danys activen la cascada de senyalització proapoptòtica, per la qual cosa es potencia encara més la lesió dels cardiomiòcits. A més, l'alliberament de ferro per part dels dipòsits de glòbuls rojos per l'hemorràgia formada, contribueix a la reacció inflamatòria posterior (Bainey & Armstrong, 2014; Hausenloy & Yellon, 2013; Heusch, 2020; Ibáñez et al., 2015).

Per tant, aquest tractament comporta dos esdeveniments diferents. D'una banda, la isquèmia provoca la mort d'un elevat nombre de cardiomiòcits i danys en la matriu extracel·lular (MEC), cosa que es tradueix en un deteriorament tant estructural com funcional del miocardi. Aquests cardiomiòcits perduts seran reemplaçats per un teixit fibròtic, compost fonamentalment de col·lagen. Aquest teixit es dipositarà tant a l'àrea infartada com a l'àrea propera a l'infart, cosa que pot portar a un remodelat ventricular advers, una reducció de la capacitat contràctil del ventricle així com a un pitjor pronòstic dels pacients (Khan & Sheppard, 2006; Stacey & Hundley, 2021; Yang et al., 2019). D'altra banda, el restabliment del flux sanguini en un nombre elevat de pacients porta a una reperfusió incompleta a nivell microvascular. Aquest fenomen es coneix com a obstrucció microvascular i té una profunda repercussió negativa després d'un IAM, ja que s'associa amb una major mida d'infart, una menor fracció d'ejecció ventricular, un remodelat advers del ventricle esquerre i pitjors resultats clínics (Hausenloy & Yellon, 2013).

2. Matriu extracel·lular

El cor dels mamífers està compost per diverses poblacions cel·lulars, incloent-hi cardiomiòcits, fibroblasts, cèl·lules endotelials, pericits i cèl·lules de múscul llis, que es troben embegudes en la MEC cardíaca (Valiente-Alandi et al., 2016). L'interstici cardíac està constituït per una xarxa estructural que connecta els diferents components miocàrdics, així com proteïnes solubles que regulen vies de senyalització per a la supervivència i el correcte funcionament de les cèl·lules musculars cardíques. En altres paraules, la MEC proporciona un bastiment perquè el component cel·lular del miocardi funcione coordinadament com una xarxa, cosa que, en última instància, redundarà en una exquisida coordinació a nivell mecànic i elèctric (Kassiri & Khokha, 2005).

2.1. Importància de la MEC en la funció y estructura cardíaca

Com s'ha comentat anteriorment, la MEC és una estructura complexa i dinàmica que manté l'arquitectura i la dinàmica del teixit. No obstant això, fa més d'una dècada ja es va qüestionar aquesta funcionalitat merament estructural, passant a ser un subjecte actiu en la funció cardíaca, de manera que se li atribueix un paper rellevant en les interaccions cel·lulars que regulen el creixement, la supervivència, la propagació, la proliferació, la diferenciació i la migració cel·lular a través de la intrincada relació entre els components del teixit cel·lular i acel·lular. Aquesta elevada complexitat en les funcions que exerceix la converteixen en part responsable de la remodelació patològica després d'una lesió miocàrdica. La versatilitat de les interaccions cèl·lules-MEC permet la generació de respostes adaptatives i reparadores estretament regulades mitjançant senyals intracel·lulars a través de la membrana cel·lular (Valiente-Alandi et al., 2016). La MEC també és essencial per a una funció cardíaca eficient a través de l'alineació dels cardiomiòcits, la regulació del flux sanguini durant la contracció, el compliment i el manteniment de la tensió tissular, de manera que resulta crucial per al manteniment de la integritat cardíaca i la funció de bombament (Curtis & Russell, 2011).

L'interstici cardíac ha de presentar una composició precisa que li permeta dur a terme les funcions cardíacques de forma adequada. Quant als col·làgens, els subtipus I i III són els més abundants i seran essencials per determinar la rigidesa del miocardi. Entre els components de la membrana basal, tant la fibronectina com la laminina són crucials en l'adhesió cel·lular i la interacció cèl·lula-cèl·lula. Així mateix, el teixit cardíac està àmpliament irrigat per vasos, i en aquests també trobem components de la MEC com el col·lagen o l'elastina (Kassiri & Khokha, 2005).

En condicions fisiològiques, els fibroblasts seran els responsables de degradar i dipositar la MEC, mentre que en un procés patològic, seran els responsables de la deposició massiva de fibres de col·lagen tipus I, constituint una cicatriu fibròtica (Tallquist, 2020).

A més, l'homeòstasi en la composició de la MEC es basa en un estret equilibri entre les metal·loproteïnes de la matriu extracel·lular (MMPs) i els inhibidors tissulars de les metal·loproteïnes (TIMPs) que regulen els components de la MEC durant la remodelació cardíaca en diferents situacions patològiques (Ahmed et al., 2006; Benjamin & Khalil, 2012; Jugdutt, 2003).

2.2. Components principals

La MEC del teixit miocàrdic és un entorn dinàmic que varia en organització i composició al llarg del curs de la malaltia cardíaca, així com durant el desenvolupament cardíac normal. Per tant, la descripció dels canvis que es produeixen en els diferents components de la MEC pot ajudar a la comprensió, detecció i tractament de la malaltia cardíaca (Frangogiannis, 2017; Schelbert et al., 2014).

En els teixits, és rellevant el fet que les cèl·lules es troben envoltades en un marc on es cohesionen i comuniquen intercel·lularment de forma adequada, tenint contacte amb altres cèl·lules així com amb la MEC per poder funcionar correctament (Hansen et al., 2015). És per això que la MEC està composta d'una elevada varietat d'elements, tots ells rellevants i amb funcions clau en la forma en què les cèl·lules es comuniquen i responen al seu microambient, entre els quals trobem els col·làgens, proteïnes matricel·lulars, proteoglicans, entre d'altres, i que es detallen a la Taula 1.

Tabla 1: Components de la MEC en el cor adult sa.

CATEGORIA	COMPONENT	REFERÈNCIA
COL·LÀGENS FIBRILARS	Col·lagen I, III, V	(Fan et al., 2012; Keene et al., 1988; Pozzi et al., 2017; Weber, 1989; Wenstrup et al., 2006)
COL·LÀGENS NO FIBRILARS	Col·lagen IV, VI	
PROTEÏNES MATRICE·LULARS	Trombospondines, SPARC, Tenascina, Osteopontina, Periostina, CCN	(Frangogiannis, 2012; Pinto, 2021)
ALTRES GLICOPROTEÏNES	Elastina, Laminina, Fibronectina, Fibrilina	(Kielty et al., 2002; Mao & Schwarzbauer, 2005; Pozzi et al., 2017)
PROTEOGLICANS DE LA SUPERFÍCIE CEL·LULAR	Sindecà, Glipicà	(Bernfield & Sanderson, 1990; Pomin & Mulloy, 2018)
PROTEOGLICANS	Agrecà, Perlecà, Nidogen	(Pomin & Mulloy, 2018; Pozzi et al., 2017)
XICOTETS PROTEOGLICANS RICS EN LEUCINA	Biglicà, Decorina, Asporin, Fibromodulina, Podocà	(Pomin & Mulloy, 2018)
GLICOSAMINGLICANS	Hialuronat, Condroitin sulfat, Heparan sulfat, Dermatan sulfat	(Pomin & Mulloy, 2018)
PROTEASES I ELS SEUS INHIBIDORS	MMPs, ADAMS, ADAMTS, TIMPs	(Ahmed et al., 2006; Benjamin & Khalil, 2012; Malemud, 2019; White, 2003)

ADAMS: desintegrina i metal·loproteïnases, ADAMTS: desintegrina i metal·loproteïnasa amb domini trombospondina, CCN: proteïna rica en cisteïna 61, MEC: Matriu Extracel·lular, MMP: metal·loproteïnases de la matriu extracel·lular, SPARC: proteïna secretada, àcida i rica en cisteïna, TIMP: inhibidor de metal·loproteïnases de la matriu extracel·lular.

En el miocardi, la MEC està formada principalment per col·lagen fibril·lar, organitzat en tres nivells interconnectats: l'endomisi que envolta els cardiomiòcits de forma individual, el perimisi que estableix o defineix els feixos principals i l'epimisi que embolcalla el múscul cardíac en la seva totalitat (Leonard et al., 2012; Medugorac & Jacob, 1983). El component estructural majoritari d'aquesta xarxa és el col·lagen tipus I (85-90% de la MEC), tot i que també es mostra en una elevada proporció el col·lagen tipus III (5-11%) (Frangogiannis, 2017; Weber, 1989). En proporcions menys abundants podem trobar altres col·làgens com els tipus IV, V i VI (Fan et al., 2012). El col·lagen tipus V forma fibril·les amb el col·lagen tipus I i regula la fibril·logènesi del mateix; el col·lagen tipus IV és el component principal de la membrana basal i forma unions amb laminina, nidogen i perlecà, proporcionant estabilitat mecànica a la membrana basal, així com mantenint una adequada funció de les cèl·lules endotelials; i el col·lagen tipus VI és l'encarregat d'organitzar els col·làgens fibril·lars i d'ancorar-los a la membrana basal (Keene et al., 1988; Pozzi et al., 2017; Wenstrup et al., 2006).

A més d'aquesta xarxa de col·lagen, la MEC està formada per elastina, fibrilina, glicosaminoglicans i proteoglicans que serveixen com a reservoris de factors de creixement i proteases que poden activar-se amb un procés patològic (Frangogiannis, 2017). L'elastina i la fibrilina formen fibres elàstiques que proporcionen resistència i elasticitat al cor (Kielty et al., 2002), la fibronectina s'organitza en una xarxa a la superfície cel·lular, unint-se a altres components de la MEC com el col·lagen, la fibrilina i l'heparan sulfat, de manera que influeix tant a nivell estructural com mecànic en la MEC i en el comportament de les cèl·lules a les quals s'adhereix (Mao & Schwarzbauer, 2005). A nivell cardíac, les glucoproteïnes, proteoglicans i glicosaminoglicans (GAG) enumerats a la Taula 1, són components de la MEC no estructurals (Borg et al., 1996; Frangogiannis, 2012).

Les anomenades “proteïnes matricel·lulars”, per la seva banda, són una família de macromolècules extracel·lulars que no tenen un paper estructural en la MEC, sinó que s'indueixen després d'una lesió i modulen les interaccions intercel·lulars i entre les cèl·lules i la MEC.

La MEC, per tant, està formada per una elevada diversitat de components organitzats al voltant dels diferents tipus cel·lulars del miocardi, formant una xarxa tridimensional. La interacció entre aquests components cel·lulars i la MEC és dinàmica i respon a senyals fisiològiques tant durant el desenvolupament, com en la homeòstasi normal i en processos patològics. Un dels processos patològics cardíacs de major rellevància en l'actualitat és l'IAM, i el tractament d'aquest és la reperfusió primerenca de l'àrea afectada. És per això que la present Tesi Doctoral se centra en l'estudi dels canvis en els diferents components de la MEC durant la isquèmia coronària i posterior reperfusió, ja que una millor comprensió dels canvis espacials i temporals de cadascun dels components de la MEC és clau per poder arribar a comprendre el paper que hi juga en els processos patològics.

3. Canvis en la MEC després d'un IAM

La mort de cardiomiòcits a causa de la isquèmia coronària i la posterior reperfusió provoca una reacció inflamatòria que, a més de dur a terme una neteja a l'àrea infartada de les cèl·lules necròtiques i restes de MEC danyada, activarà les vies intracel·lulars encarregades de la correcta resolució de l'àrea infartada amb la subseqüent formació de la cicatriu fibròtica. El cor adult d'un mamífer té una capacitat regenerativa insignificant, per la qual cosa l'única opció per a la resolució d'aquest esdeveniment és la formació d'una cicatriu fibròtica (Frangogiannis, 2015).

La resposta inflammatòria que dóna lloc a la resolució de l'infart depèn de les molècules alliberades per les cèl·lules afectades per la isquèmia. A més, els fagòcits encarregats d'eliminar les cèl·lules mortes i els restes de MEC activen vies antiinflamatòries, la qual cosa condueix a la supressió de la senyalització de citocines i quimiocines. L'activació del sistema renina-angiotensina-aldosterona i l'alliberament del *transforming growth factor-β* (TGF-β) indueixen la conversió de fibroblasts en miofibroblasts. Tots aquests processos, de forma conjunta i interrelacionada, promouran el dipòsit de proteïnes d'una nova MEC (Frangogiannis, 2015).

Aquest procés de deposició fibròtica a l'àrea danyada per a la formació de la cicatriu implica la interacció entre diferents tipus cel·lulars com les cèl·lules inflammatòries, les cèl·lules endotelials, els fibroblasts i els miofibroblasts. Aquest complex procés de reparació pot dividir-se en tres fases que se superposen: la fase inflammatòria, la fase proliferativa i la fase de maduració (Frangogiannis, 2015).

A grans trets, durant la fase inflammatòria, la degradació de les proteïnes de la MEC genera matrikines que activen les cascades inflammatòries i reparadores. A més, durant la fase proliferativa, la MEC indueix el dipòsit de proteïnes matricel·lulars que modulen el fenotip cel·lular, així com activen proteases i factors de creixement que transdueixen cascades de senyalització (Frangogiannis, 2012). Aquesta mateixa fase estarà caracteritzada per la deposició de grans quantitats de proteïnes que formen part de la MEC per part dels miofibroblasts. Finalment, en la fase de maduració, es forma una cicatriu estable per la reticulació de la MEC (Figura 3). Per tant, al llarg d'aquestes tres fases de reparació de l'àrea danyada per l'IAM, els canvis que es produeixen en la composició de la MEC cobren especial rellevància, ja que són elements reguladors de la resposta cel·lular que medien en la reparació cardíaca i, per tant, que requereixen d'una organització perfecta en temps i lloc (Dobaczewski et

al., 2010). Per això, una millor comprensió d'aquest procés serà fonamental per aprofundir en l'enteniment de la fisiopatologia de l'infart, la qual cosa posteriorment donarà lloc a noves investigacions encaminades a buscar oportunitats terapèutiques novedoses en aquest escenari.

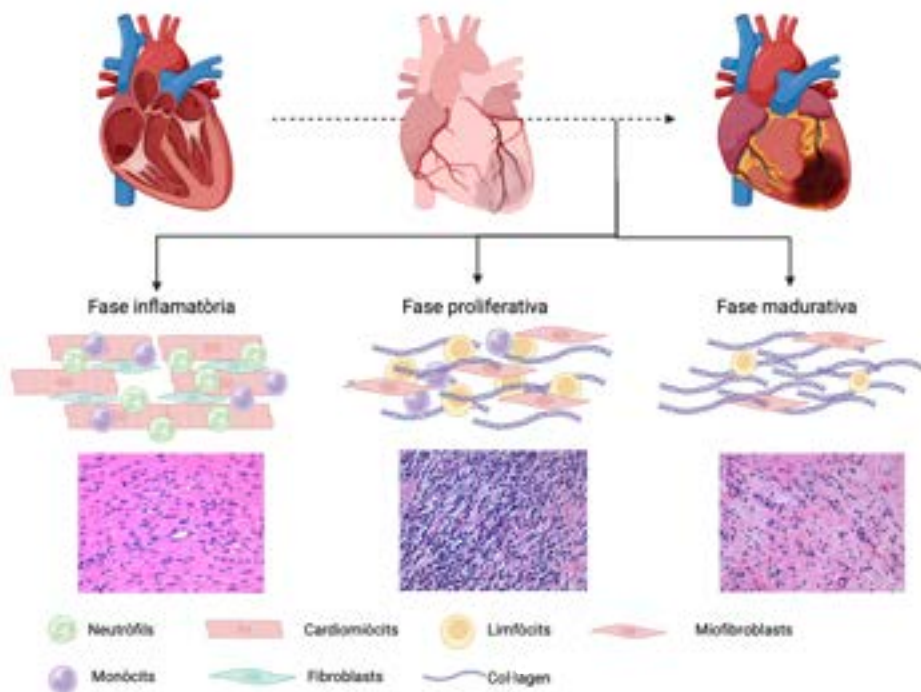


Figura 3: Fases de resolució després d'un infart agut de miocardi. Després de l'oclusió de l'artèria, s'observa inicialment una fase inflamatòria, seguida d'una fase proliferativa, i finalment una fase madurativa que donen com a resultat la formació d'una cicatriu fibròtica.

3.1. Fases de reparació cardíaca després d'un IAM

3.1.1. Fase inflamatòria

L'oclusió coronària produeix immediatament un ambient d'hipòxia que comporta la mort de cardiomiòcits, així com l'activació de MMPs. L'activació d'aquestes últimes ha estat demostrada ja a l'interstici cardíac als deu minuts després de l'oclusió coronària (Etoh et al., 2001), i comporta la generació de fragments de MEC (Cannon et al., 1983; Etoh et al., 2001; Whittaker et al., 1991), abans fins i tot de poder ser detectada qualsevol lesió irreversible en els cardiomiòcits. Les MMPs poden activar-se per la generació d'ERO produïdes per la isquèmia (Wang et al., 2002). A més, la necrosi dels cardiomiòcits accentua la resposta de degradació de la MEC, per la qual cosa aquestes cèl·lules, juntament amb fibroblasts, cèl·lules endotelials i neutròfils, sintetitzen elevades quantitats de MMPs (Alfonso-Jaume et al., 2006).

Les MMPs seran les responsables de la fragmentació de la MEC i, per tant, de la formació de matrikines (Adair-Kirk & Senior, 2008; Wells et al., 2015). Ha estat àmpliament descrit el fet que aquests fragments presenten activitat quimiotàctica cap a cèl·lules inflamatòries. La llista de pèptids derivats de la MEC amb aquesta activitat inclou col·làgens tipus I i IV, elastina, fibronectina, laminina, entre d'altres, de manera que és possible que alguns fragments de la MEC puguin reclutar cèl·lules inflamatòries (Adair-Kirk & Senior, 2008). No obstant això, no s'ha demostrat el paper de les matrikines com a elements proinflamatoris actius en humans, tot i que en models animals s'han evidenciat tant matrikines procedents de col·làgens tipus I i IV, fibronectina i hialuronà (Lauten et al., 2014; Taylor et al., 2004; Trial et al., 1999; Villarreal et al., 2004). Malgrat això, el paper dels fragments de matriu endògena en la regulació de les respostes fibrogèniques i angiogèniques després d'un IAM segueix estant poc descrit.

La MEC degradada a l'àrea infartada serà reemplaçada per una matriu provisional que és la responsable de regular la resposta inflamatòria (Dobaczewski et al., 2006). La formació ràpida de factor de creixement endotelial vascular augmenta la permeabilitat vascular, permetent l'extravasació de fibrinogen i fibronectina, components principals d'aquesta nova xarxa matricial (Dobaczewski et al., 2006). La funció d'aquesta matriu provisional ha estat escassament explorada, tot i que s'ha hipotetitzat la seva funció hemostàtica, així com de bastiment per a la migració de cèl·lules inflamatòries i suport per a la proliferació de cèl·lules endotelials i fibroblasts (Clark, 1998).

La matriu provisional podria jugar un paper essencial en la transició cap a la fase proliferativa en un escenari de reparació cardíaca, ja que serveix com a reservori de citocines i factors de creixement, que poden activar tant els fibroblasts reparadors com les cèl·lules vasculars (Frangogiannis, 2017; Martino et al., 2013).

Pel que fa a la resposta immune a l'àrea infartada, amb la mort dels cardiomiòcits, es produeix una activació del sistema immune i, per tant, el reclutament de les cèl·lules inflamatòries cap al teixit infartat (van den Borne et al., 2010). Entre aquestes cèl·lules participen seqüencialment els neutròfils, monòcits i macròfags i, finalment, els limfòcits (Figura 4).



Figura 4: Resposta immune a l'àrea infartada durant la fase inflamatòria. Imatges representatives d'un teixit aïllat després de 90 minuts d'isquèmia i 7 dies de reperfusió tenyit amb hematoxilina-eosina i amb tècniques immunohistoquímiques per evidenciar la presència de neutròfils, monòcits i limfòcits T en el teixit infartat.

Els neutròfils són la primera línia de defensa que es troba en el teixit infartat al llarg dels primers 5 dies després d'un IAM. Aquests secretaran enzims proteolítics, molècules oxidants i proteases que participen en la degradació de la MEC, així com sintetitzaran mediadors proinflamatoris que augmenten la resposta inflamatòria. D'altra banda, els neutròfils també reforcen la resposta immune promovent el reclutament de monòcits. Els monòcits i macròfags són cèl·lules inflamatòries que infiltraran el teixit cardíac danyat entre el segon i el tercer dia. Aquests presenten la capacitat de sintetitzar factor de necrosi tumoral- α (TNF- α) que, després de la seva activació, secreta enzims que regulen la síntesi de proteïnes així com regula la resposta inflamatòria (Frangogiannis, 2020; Tian et al., 2015). Inicialment, predominen els monòcits proinflamatoris que tenen com a objectiu l'eliminació tant de les cèl·lules mortes com dels restes de MEC. Posteriorment, els monòcits presents en el teixit infartat, canvien cap a un caràcter més antiinflamatori i la seva funció se centra a estimular la síntesi i deposició de fibres de col·lagen per part dels fibroblasts i miofibroblasts, contribuint d'aquesta manera al desenvolupament de la fibrosi miocàrdica (González et al., 2011).

A més, els limfòcits T seran els responsables de l'activació de la resposta immune adaptativa. Els limfòcits Th1 alliberen citocines proinflamatòries

augmentant la resposta inflamatòria prèvia, i els limfòcits Th2 alliberen citocines per mitigar l'acció dels Th1. En l'IAM, s'ha descrit un desequilibri de la ràtio Th1/Th2 a favor dels primers (Bodi et al., 2008). A més, els limfòcits T reguladors s'infilren a la zona infartada i, a través de l'alliberament d'interleucina-10 i TGF- β , supprimeixen la resposta inflamatòria. Un correcte equilibri de la resposta inflamatòria és essencial per a la correcta cicatrització del miocardi infartat.

3.1.2. Fase proliferativa

En aquesta fase cobra especial importància el TGF- β . La seva activació resulta fonamental en la transició del procés inflamatori cap a la resposta reparativa (Frangogiannis, 2014). El TGF- β latent s'emmagatzema en el miocardi i després d'una lesió pot activar-se ràpidament a través de la generació d'ERO, la producció de proteïnes matricel·lulars i l'activació de proteases (Frangogiannis, 2014). A mesura que es reprimeix la senyalització proinflamatòria, el TGF- β promou la diferenciació de fibroblasts cardíacs a miofibroblasts i la preservació de col·làgens i fibronectina, de manera que s'estimula la producció de proteïnes de la MEC a través de l'expressió de TIMPs. L'activació del TGF- β podria resultar important en la supressió de l'expressió de citocines proinflamatòries, resolent així l'infiltrat inflamatori. A més, el TGF- β és capaç de modular l'activitat dels leucòcits promovent la formació del teixit de granulació que es formarà al voltant del quart dia després de l'infart (Bujak & Frangogiannis, 2007). En aquest teixit de granulació participen cèl·lules inflamatòries, vasos sanguinis i cèl·lules de tipus fibroblàstic que produeixen col·lagen (van den Borne et al., 2010).

Durant la formació del teixit de granulació també té lloc un procés de fibril·logènesi o fase de proliferació. Aquest teixit està format per fibroblasts que es diferencien a miofibroblasts (Figura 5). En condicions

normals, els fibroblasts que resideixen en el teixit cardíac, no presenten microfilaments contràctils ni expressen proteïnes contràctils com l'actina. Després de la necrosi i la conseqüent pèrdua de l'arquitectura del teixit cardíac, els fibroblasts sotmesos a estrès mecànic es converteixen en proto-miofibroblasts, i, després de l'exposició al TGF- β produït per macròfags i fibroblasts, es produeix la diferenciació cap a miofibroblasts (González et al., 2011; van den Borne et al., 2010). Aquests nous miofibroblasts expressen proteïnes contràctils i exhibeixen propietats migratòries, proliferatives i secretòries. A més, responen a l'extensió mecànica i als factors autocrins i paracrins generats en el miocardi. Alguns d'aquests factors són els pèptids vasoactius com l'angiotensina II i els factors de creixement com el TGF- β (van den Borne et al., 2010) (Figura 5).

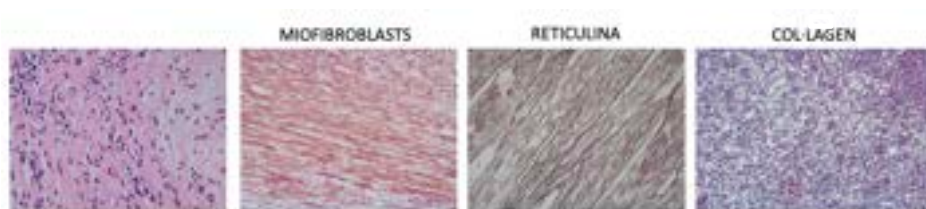


Figura 5: Fase de proliferació durant la qual es produeix la diferenciació cap a miofibroblasts. Imatges representatives d'un teixit aïllat després de 90 minuts d'isquèmia i 21 dies de reperfusió tenyit amb Hematoxilina-Eosina i amb tècniques immunohistoquímiques per evidenciar la presència de miofibroblasts, reticulina i col·lagen en el teixit infartat.

Els canvis en la composició de la MEC són de especial rellevància ja que comporten un canvi en la resposta cel·lular reparadora durant la fase proliferativa de la reparació cardíaca. Els fagòcits seran els encarregats d'eliminar els fragments de la MEC, així com d'activar senyals antiinflamatòries. La lisi d'aquesta matriu provisional formada ve seguida de la formació d'una xarxa formada per fibronectina, hialuronà, proteoglicans i proteïnes matricel·lulars (Dobaczewski et al., 2006).

Aquests canvis en la MEC durant la fase proliferativa proporcionen senyals essencials per a la diferenciació descrita anteriorment, de fibroblasts a miofibroblasts, així com per a l'activació de vies angiogèniques necessàries per al subministrament d'oxigen cap a l'àrea infartada metabòlicament activa (Dobaczewski et al., 2010).

L'eliminació de la xarxa de fibrilina formada es duu a terme mitjançant proteòlisi pel sistema plasminogen/plasmina i mitjançant endocitosi dels macròfags (Motley et al., 2016; Schäfer et al., 1994). La disgregació d'aquesta matriu provisional de fibrilina ve seguida de la secreció per part dels fibroblasts i macròfags de fibronectina, així com la deposició de hialuronà i versicà, formant una matriu provisional que augmentarà la seva complexitat amb l'addició de macromolècules matricel·lulars (Frangogiannis, 2012; Ulrich et al., 1997).

Durant tota aquesta fase proliferativa de la reparació cardíaca, la MEC es convertirà en un centre regulador que transduirà senyals per a l'activació de fibroblasts reparadors i de cèl·lules vasculars. La completa reparació del dany dependrà del reclutament i l'activació de fibroblasts, que arriben a diferenciar-se en miofibroblasts, i per tant expressen proteïnes contràctils i secreten col·lagen (González et al., 2011; van den Borne et al., 2010). Aquesta diferenciació, a més de dependre de factors de creixement solubles com el TGF- β , també estarà influenciada per diferents components de la matriu provisional, com la fibronectina (Arslan et al., 2011).

Les proteïnes matricel·lulars que durant la fase proliferativa passen a depositar-se i formar part de la matriu provisional no compleixen una funció estructural, sinó que regulen les respostes de les citocines i els factors de creixement, modulant el fenotip i la funció cel·lular (Bornstein, 2009; Murphy-Ullrich, 2001). La majoria dels membres que formen part de les proteïnes matricel·lulars mostren una expressió baixa en el

miocardi normal, però estan sobreexpressades després d'una lesió miocárdica, protegint-lo d'una remodelació adversa (Frangogiannis et al., 2005; Murry et al., 1994; Willems et al., 1996). Aquestes són secretades a l'interstici per fibroblasts, cèl·lules immunes o vasculars, i transdueixen senyals o activen citocines, factors de creixement i proteases (Bornstein, 2009; Bornstein & Sage, 2002; Dobaczewski et al., 2006). A la zona que exerceix de frontera entre l'àrea infartada i la que la voreja, la inducció localitzada de trombospondina-1 forma una barrera que prevé l'expansió de la inflamació cap a àrees del miocardi viables (Frangogiannis et al., 2005).

De diferents maneres, les proteïnes matricel·lulars mostren una funció de protecció de les àrees no infartades enfront de les afectades per la isquèmia. Tot i la disparitat en les seves funcions, és destacable la localització de totes elles a la zona fronterera de l'infart, així com l'efecte regulador que posseeixen sobre l'àrea afectada. A més, aquestes proteïnes s'expressen de forma transitòria durant la fase proliferativa, de manera que la reducció en l'expressió d'aquestes pot servir a l'àrea infartada com un senyal de parada, és a dir, com una forma de prevenir la fibrosi descontrolada (Frangogiannis, 2017). Les proteïnes matricel·lulars poden exercir un paper clau en la regulació de la diferenciació cel·lular.

Queda patent, per tant, que les diferents proteïnes que formen part de la matriu provisional formada amb l'objectiu de reparar l'àrea infartada jugaran un paper rellevant en la transducció de senyals, així com en la diferenciació cel·lular dels fibroblasts a miofibroblasts.

3.1.3. Fase de maduració

Aquesta última fase de reparació de la zona infartada està caracteritzada per una reducció de la cel·lularitat que compon el teixit de granulació format en la fase anterior, és a dir, el teixit es converteix en una cicatriu en la qual la presència de cèl·lules inflamatòries i miofibroblasts estarà significativament reduïda (Frangogiannis, 2017) degut a una elevada apoptosi de les mateixes (Takemura et al., 1998; Zhao et al., 2004). Aquest teixit fibròtic va ser descrit inicialment com un reemplaçament passiu dels cardiomiòcits necròtics, però cada vegada queda més evident la seva elevada activitat, ja que participa tant en la formació del nou col·lagen que forma la matriu, com en la contracció del teixit cicatritzat (van den Borne et al., 2010).

La cicatriu fibròtica final serà el resultat de l'equilibri entre la síntesi i la degradació de col·lagen durant el remodelat cardíac. Els miofibroblasts seran els principals responsables de la regulació d'aquest procés, sintetitzant una molècula de procol·lagen que ha de ser processada per endopeptidases per a la seva conversió en col·lagen (Kalman et al., 2012). Una vegada processades, són ensamblades en fibres de col·lagen a través de diverses reaccions químiques en què intervenen molècules com el TGF- β (Smith-Mungo & Kagan, 1998).

El remodelat de la MEC després d'un infart requereix de l'expressió i activitat d'enzims proteolítics que degraden l'anterior MEC com les MMPs que inclouen col·lagenases (MMP1 i MMP13) i gelatineses (MMP2 i MMP9) i que estan regulades pels seus inhibidors anomenats TIMPs. Després d'un IAM, l'equilibri d'expressió entre MMPs i TIMPs que existeix en homeòstasi s'altera cap a una elevada activitat proteolítica (Etoh et al., 2001).

En aquesta fase de maduració, els fibroblasts han de reduir la formació de MEC, per la qual cosa s'ha de regular aquesta desactivació dels

fibroblasts de manera que es protegeix el cor d'una fibrosi progressiva (Hinz, 2007; Tomasek et al., 2002). A més, la força contràctil elevada que generen els miofibroblasts és adequada durant el remodelat del teixit, però es torna excessiva i, per tant, perjudicial si arriba a generar cicatrius hipertròfiques (Hinz, 2007). Idealment, en aquells pacients amb un IAM ben cicatritzat, la deposició de col·lagen té lloc a l'àrea infartada i el seu objectiu és preservar la geometria del cor (van den Borne et al., 2010). Per contra, després d'un IAM amb grans conseqüències, a més de l'àrea afectada, les àrees de miocardi viable que queden al voltant també mostren fibrosi intersticial que ha estat relacionada amb les càrregues de pressió i volum, comportant un deteriorament de la funció ventricular i de l'activitat elèctrica del cor (Weber et al., 2013). A aquest dipòsit fibròtic se li ha denominat "fibrosi remota". La inflamació i la fibrosi es supprimeixen a l'infart en curació, cosa que condueix a la formació d'una cicatriu madura formada fonamentalment per col·lagen, però a la zona viable no infartada que l'envolta, l'augment de la tensió de la paret pot activar localment macròfags i fibroblasts, desencadenant una expansió crònica progressiva de la matriu intersticial cardíaca (Chen & Frangogiannis, 2016; Sager et al., 2016). La correcta formació de la cicatriu a l'àrea infartada és la conseqüència d'una correcta regulació de tots els elements que participen en aquest procés i és clau per a la prevenció del remodelat advers.

Pel que fa a la resposta angiogènica durant la maduració de la cicatriu, els microvasos de l'àrea afectada adquireixen una capa de cèl·lules murals mitjançant l'activació per la senyalització del receptor del factor de creixement derivat de plaquetes β . En conseqüència, els vasos sense aquest estímul activador retrocedeixen; és a dir, durant la maduració de la cicatriu, la densitat arteriolar augmenta a l'àrea infartada (Ren et al., 2002), i aquesta es caracteritza per un recobriment de pericits així com pel desenvolupament d'una capa muscular marcada. Les proteïnes de la

MEC han estat implicades en la modulació de les interaccions entre les cèl·lules endotelials i els pericits (Davis et al., 2015; Rivera & Brekken, 2011).

3.2. Importància d'un bon control d'este procés

Després d'un IAM, el remodelat del ventricle esquerre és clau per a la correcta recuperació del pacient. Perquè la formació de la cicatriu fibròtica sobre l'àrea infartada es produísca de manera correcta, ha de donar-se una comunicació perfecta entre els diferents elements que participen en les diferents fases de reparació. Si això ocorre, el miocardi torna a una nova homeòstasi de manera que tant la mida com la qualitat de la cicatriu són suficients per preservar l'arquitectura i funció sistòlica del ventricle esquerre (Mouton et al., 2018). Aquesta recuperació ideal de l'àrea infartada no sempre es compleix, cosa que pot derivar en un remodelat advers que pot progressar fins a una insuficiència cardíaca.

A la pràctica clínica, la insuficiència cardíaca que es genera després de la resolució d'un IAM extens continua sent un problema important. Una vegada la isquèmia dels cardiomiòcits arriba a un punt de no retorn, es desencadena la resposta inflamatòria, i durant tot aquest procés es produirà una intercomunicació entre cardiomiòcits, neutròfils, macròfags, fibroblasts, cèl·lules endotelials i les cèl·lules inflamatòries. La inflamació que comporta tot aquest procés, i una falta de resolució adequada d'aquesta, ha estat associada amb un defecte en el remodelat del ventricle esquerre i per tant forma la base per al desenvolupament de la insuficiència cardíaca. Les cèl·lules del sistema immune tindran efectes tant protectors com nocius en la resolució de l'IAM, la qual cosa ha portat, després de diversos assajos clínics, a la revisió de l'administració de teràpies antiinflamatòries als pacients durant l'IAM (Ali et al., 2018; Mouton et al., 2018; Roubille et al., 2024).

Després d'un IAM, la fibrosi desenvolupada es pot classificar en dos tipus: la fibrosi de reemplaçament i la fibrosi reactiva. La fibrosi de reemplaçament és aquella que forma la cicatriu a l'àrea infartada amb l'objectiu de prevenir la ruptura de la paret ventricular després d'una lesió isquèmica (van den Borne et al., 2010). La fibrosi reactiva és aquella que es dona en àrees no afectades per l'infart, és a dir, on els cardiomiòcits no han patit necrosi, i que ha estat relacionada amb l'augment d'estrès mecànic després de l'IAM, així com amb mediadors hormonal i paracrins. Aquests canvis porten a una distensió del ventricle i a un augment de la rigidesa del mateix (Talman & Ruskoaho, 2016), així com a defectes en la funció elèctrica normal del cor (Weber et al., 2013). La fibrosi cardíaca en general s'ha identificat com un factor de risc que predisposa els pacients amb insuficiència cardíaca a la mort sobtada, la qual cosa augmenta la mortalitat (Gulati et al., 2013).

Els mecanismes exactes i la forma de regulació de la fibrosi reactiva no estan clars, però sembla demostrat que la tensió mecànica a què està subjecta la paret del ventricle no infartada induïx l'activació de TGF- β . A més, els miofibroblasts activats que es troben a la cicatriu de l'infart continuen secretant factors profibròtics que poden arribar a les àrees remotes induïnt l'activació i proliferació de fibroblasts, amb el consegüent augment de la deposició de col·lagen (Weber et al., 2013). Aquesta fibrosi reactiva s'acumula preferentment a la capa adventícia de les artèries i arterioles coronàries, podent arribar a causar una reducció de la llum del vas, disminuint el subministrament d'oxigen al miocardi (Dai et al., 2012).

Després de l'IAM, una adequada regulació tant de la resposta inflamatòria com de la formació i deposició de la cicatriu fibròtica són essencials per assegurar la correcta remodelació del ventricle esquerre afectat, i per tant, per poder determinar un bon pronòstic en el pacient. Tot i que existeixen moltes investigacions en aquest sentit, resulta

important seguir caracteritzant els canvis en l'interstici cardíac post-infart que, en última instància, donaran lloc a la formació d'una cicatriu fibròtica sòlida i localitzada. Aquests avenços, a més, permetrien desenvolupar noves dianes terapèutiques en el tractament del pacient després d'un IAM per assegurar la correcta formació de la cicatriu i evitar una resposta immune exagerada.

3.3. Paper del col·lagen i les MMPs

Els principals components de la MEC cardíaca inclouen proteïnes estructurals com el col·lagen i la fibronectina, i altres proteïnes com la proteïna àcida secretada rica en cisteïna (SPARC), trombospondina, així com MMPs. Les MMPs són una família d'enzims que degraden els diferents elements que formen la MEC. A més, els TIMPs són els inhibidors endògens de les MMPs.

Els col·làgens tipus I i tipus III són els principals components de la MEC després de l'IAM. Un model animal knock-out per a aquests col·làgens no pot desenvolupar-se, ja que és embrionàriament letal, però s'ha desenvolupat un model de ratolí amb col·lagen resistent a l'escissió, i aquests no van mostrar cap efecte en el remodelat del ventricle esquerre després de l'IAM (Lindsey et al., 2003). A més, en un altre model animal nul per a col·lagen tipus VI, es va observar una disminució en la mida de l'infart, una apoptosi dels cardiomiòcits accelerada, però una reducció de l'apoptosi en fases cròniques (Luther et al., 2012).

Tot i això, fins a l'actualitat s'han descrit 28 subunitats de col·lagen diferents, encara que la majoria no ha estat descrita en el teixit cardíac després de l'IAM (Frangogiannis et al., 2019).

L'activació de les MMPs després de l'IAM ja ha estat observada durant la fase inflamatòria de reparació d'aquest, i aquestes funcionen com a

proteïnases de degradació de la MEC, per la qual cosa seran les responsables de la formació de matrikines ja descrites prèviament, així com de la degradació del col·lagen, component principal de la MEC cardíaca en un teixit sa.

L'avaluació de diferents MMPs (MMP2, MMP3, MMP7, MMP9, MMP10, MMP12, MMP13, MMP14 i MMP28) i els quatre TIMPs en models animals inhibidors per a cada una, ha permès conèixer la implicació que presenten en el remodelat del ventricle esquerre després de l'IAM. Tanmateix, en humans, la translació d'aquests resultats resulta complicada, ja que, fins i tot el moment en què s'inhibeixen les diferents molècules porta a canvis en la resolució de l'IAM (Mouton et al., 2018).

Tot i els elevats esforços per a la descripció de les funcions de cadascun d'aquests elements de la MEC, no ha estat descrit fins avui cap tractament basat en la inhibició o activació d'aquests components, per la qual cosa es fa evident la necessitat de continuar coneixent el comportament de cadascun d'aquests en l'àrea infartada després d'un IAM, amb l'objectiu de poder determinar els elements que porten alguns pacients amb IAM extens a desenvolupar una cicatriu amb pitjor pronòstic. Per tant, l'estudi de la elevada complexitat de la fisiopatologia de l'IAM, necessita nous enfocaments en els que es puga estudiar la patologia com una entitat completa, i no com a una suma d'elements que participen d'un procés.

4. Tecnologies moleculars per a la detecció d'expressió gènica

La biologia molecular va experimentar un canvi dràstic als anys 80, quan Kary Mullis, juntament amb els seus col·laboradors, van donar a conèixer una nova tècnica, la reacció en cadena de la polimerasa (PCR), per la qual va guanyar el Premi Nobel de Química el 1993 (Saiki et al., 1985).

Amb aquesta tècnica, es permetia a la ciència disposar d'una quantitat de còpies d'àcid desoxiribonucleic (ADN) molt elevada respecte a la inicial, a través d'un procés cíclic. Aquesta tecnologia ha anat patint modificacions fins al desenvolupament de la PCR en temps real (Higuchi et al., 1992), fent possible el càlcul d'ADN de partida de la mostra. Tota aquesta tecnologia va ser posteriorment aplicada a l'àcid ribonucleic (ARN) a través del desenvolupament de la transcripció reversa (RT), de manera que mitjançant RT-PCR es permetia quantificar la quantitat inicial d'ARN en una mostra (Gibson et al., 1996). Aquesta quantitat d'ARN s'entén com el valor d'expressió gènica d'un gen en el moment d'obtenció de la mostra. Actualment, aquesta és la tècnica utilitzada de rutina als laboratoris d'investigació per avaluar els nivells d'expressió gènica. Tanmateix, l'ús d'aquesta tecnologia requereix, entre altres, de cebadors oligonucleotídics que estan dissenyats específicament per flanquejar la seqüència genètica que es pretén amplificar, és a dir, és una tecnologia dissenyada per amplificar una regió ja coneguda prèviament (Kubista et al., 2006). Per això, en última instància, això es tradueix en l'estudi d'un nombre de gens limitats en cada estudi.

El 2001, amb la publicació del primer esborrany del genoma humà, es va evidenciar l'àmplia complexitat que posseïa, i amb això la variabilitat existent entre organismes i per la necessitat de continuar desgranant tota la informació continguda en el genoma buscant formes alternatives i més barates de seqüenciar (Venter et al., 2001). Aquest primer esborrany està format per una seqüència de 2,91 mil milions de parells de bases i inclou 26.588 transcrits que codifiquen proteïnes.

El 2005, sota la necessitat d'una tecnologia que facilités l'estudi del genoma complet de forma ràpida, més barata i amb una taxa d'error baixa, es va desenvolupar una nova tècnica de seqüenciació que es va denominar seqüenciació de segona generació o *Next Generation Sequencing* (NGS) (Schuster, 2008). Amb aquesta última tecnologia es

poden arribar a seqüenciar milions de petits fragments d'ADN en paral·lel, de manera que l'anàlisi bioinformàtic posterior permet encaixar tots aquests fragments. Aquesta tecnologia permet ampliar les aplicacions de la seqüenciació en seqüenciar tant genomes complets com àrees d'interès delimitades amb volums de mostra reduïts (Behjati & Tarpey, 2013).

4.1. Seqüenciació massiva

La NGS és una tecnologia que ha revolucionat la investigació genòmica, ja que permet reduir el temps i el cost empleat per tecnologies anteriors. El cost, factor de major limitació en la investigació actual, s'ha reduït des del milió de dòlars per mostra de 2001 fins als 1.000 dòlars de 2015 (van Dijk et al., 2014). En conseqüència, això suposa posar a l'abast de laboratoris petits la seqüenciació del genoma complet. Actualment existeixen diferents plataformes de NGS, però totes tenen en comú la seqüenciació en paral·lel de milions de fragments d'ADN o ARN. Tots aquests fragments són posteriorment reconstruïts mitjançant anàlisis bioinformàtiques, assignant-los a una regió concreta del genoma, amb l'objectiu de formar una única seqüència.

Les tecnologies de NGS han estat aplicades en els últims anys a una àmplia varietat d'objectius. En seqüenciació genòmica, la genètica forense, la genòmica agrícola, la detecció de brots de soques de patògens, la vigilància de malalties infeccioses i el diagnòstic clínic són algunes de les àrees que s'han beneficiat d'aquesta tecnologia. En ARN-Seq, la investigació i la pràctica clínica són algunes de les disciplines que han passat a utilitzar aquestes noves tecnologies de seqüenciació, permetent-los la descripció de nous transcrits i la detecció de fusions gèniques. A més, noves tecnologies desenvolupades a partir de la

seqüenciació han permès descriure les interaccions entre ADN, ARN i les proteïnes in vivo en una cèl·lula (van Dijk et al., 2014).

L'ARN-Seq permet conèixer l'estat transcripcional d'una mostra biològica en un moment específic, i per a això es segueixen els següents passos: i) Fragmentació de l'ARN, ii) Transcripció reversa de l'ARN fragmentat, iii) Ensamblatge dels adaptadors, iv) Amplificació i v) Quantificació (H. Zhang et al., 2018). La quantificació i l'anàlisi de dades posterior requereixen de l'ús d'un elevat nombre de programes bioinformàtics i bioestadístics.

4.1.1. NGS en altres disciplines

Les variacions que poden donar-se en l'ADN del genoma comprenen petits canvis de bases (substitucions), insercions i delecions d'ADN, grans delecions genòmiques d'exons o gens complets i reordenaments com inversions i translocacions, i totes elles poden ser detectades mitjançant NGS (Behjati & Tarpey, 2013). La seqüenciació massiva ha esdevingut cada vegada més popular en els estudis genòmics a mesura que han estat perfeccionades les tecnologies, i recentment han passat a utilitzar-se en la pràctica clínica.

La utilitat clínica de major renom en l'actualitat és en oncologia clínica amb l'objectiu de millorar les teràpies contra el càncer a través de la detecció de mutacions no descrites prèviament, així com els enfocaments terapèutics específics coneguts com a medicina personalitzada. La premissa fonamental de la genòmica del càncer és que les neoplàsies estan causades per mutacions somàtiques. Aquesta medicina personalitzada permet minimitzar despeses mèdiques ja que es duu a terme un enfocament individualitzat dels tractaments oncològics, així com una classificació i un pronòstic més precisos de la malaltia. A

més, la NGS ha permès accelerar el diagnòstic precoç de malalties (Behjati & Tarpey, 2013; Hussien et al., 2022).

En microbiologia es pretén anar reemplaçant la caracterització convencional basada en la morfologia, propietats de tinció i criteris metabòlics per la definició genòmica dels patògens. Aquesta informació genòmica conté, a més, informació rellevant sobre sensibilitat als medicaments, així com pot permetre el rastreig de fonts de brots d'infecció (Behjati & Tarpey, 2013). Aquest últim aspecte ha estat posat de manifest en els darrers anys amb el rastreig de les diferents soques del virus SARS-CoV-2.

A més, la seqüenciació de l'ARN ha estat demostrada en la detecció de variants en l'ADN d'importància incerta per a la patogenicitat en oncologia de precisió i en l'atenció de persones amb trastorns mendelians rars. En pacients no diagnosticats, la seqüenciació de l'ARN ha proporcionat evidència de la patogenicitat de variants que prèviament es van passar per alt o es van malinterpretar mitjançant la seqüenciació de l'ADN, la qual cosa va conduir a una millora del 7,5% al 36% en la taxa de diagnòstic molecular (Murdock et al., 2021; Yépez et al., 2022). La seqüenciació de l'ARN també ha permès en la pràctica clínica l'estudi de reordenaments no detectables en l'ADN, així com transcripcions gèniques errònies. A més, en recerca, les seqüenciacions de l'ARN s'apliquen cada vegada més a l'estudi de l'expressió gènica, de forma que es pot analitzar l'expressió de milers de gens, sense necessitat de coneixer prèviament el gen que es vol analitzar (Zhang et al., 2018).

4.1.2. NGS en Cardiologia

L'IAM és actualment una causa important de mortalitat i morbiditat a tot el món. Amb tot i això, a diferència de les malalties amb un patró d'herència

conegut, entre les quals els defectes cardíacs congènits (Dorn et al., 2014; Qiao et al., 2019) o les cardiopaties familiars (Melas et al., 2022; Wilcox & Hershberger, 2018), que han estat àmpliament estudiats mitjançant NGS, l'IAM continua sent un procés patològic degut a la interacció entre factors ambientals i genètics. Per això, estudis recents s'han plantejat la qüestió de quin paper juga la genètica en tot aquest procés. El tractament personalitzat de les diferents malalties cardiovasculars a través de les dades recollides relatives a la genètica, pot facilitar la predicció del risc d'IAM incident o recurrent, guiar els tractaments farmacològics i fins i tot ajudar amb la prevenció i el tractament de malalties amb teràpies gèniques (Khawaja et al., 2023).

En els darrers cinc anys, la capacitat d'accedir en diferents laboratoris a les tecnologies de seqüenciació massiva ha portat l'àrea de cardiologia a endinsar-se en aquest món, portant a terme diferents estudis entre els quals trobem: i) *micro-RNA* (Kanuri et al., 2018; Wang et al., 2021), ii) *circular-RNA* (Yin et al., 2021), iii) *long-non-coding-RNA* (Meng et al., 2019; Ponnusamy et al., 2019; Zheng et al., 2020; Zhong et al., 2018), iv) estudis d'expressió gènica (Eicher et al., 2016; Ge et al., 2018; Jeon et al., 2023; Kontou et al., 2018; Mujalli et al., 2020; Qiu & Liu, 2019; Yegorova et al., 2021; Zhang et al., 2021), v) seqüenciació de l'exoma i el genoma (Brænne et al., 2014; Khera et al., 2019; Ouwehand & Bloodomics and Cardiogenics Consortia, 2009), vi) seqüenciació de cèl·lula única (Hesse et al., 2021; Li et al., 2019; Paik et al., 2020; Pan et al., 2020; Ruiz-Villalba et al., 2020; Song et al., 2022; Zhou et al., 2022), i vii) estudis de metilació (Agha et al., 2019).

Tots aquests estudis han contribuït a un major coneixement de l'IAM, tant a través de models animals com en estudis sobre pacients. No obstant això, segueix sent una incògnita el resultat que ens proporcionarà la capacitat d'establir un pronòstic o de determinar el tractament específic a portar a terme sobre el pacient.

El perfil genètic i l'estratificació del risc d'IAM tenen el potencial de revolucionar la prevenció, el diagnòstic i el tractament d'aquest procés patològic. Així i tot, ens enfrontem a diversos desafiaments. En l'àmbit estrictament genètic, els diferents loci que han estat proposats per a la determinació del risc d'IAM són difícils de determinar a causa de les complexes interrelacions entre múltiples gens i factors ambientals (Khawaja et al., 2023). A més, les implicacions funcionals de moltes variants continuen sense estar clares, per la qual cosa caldria dur a terme un estudi detallat de les vies biològiques afectades després d'un IAM, amb l'objectiu de realitzar una estratificació eficaç del risc, així com intervencions específiques.

Aquests desafiaments, per contra, estan sent superats dia a dia gràcies a la creixent investigació genòmica, les diverses tecnologies de seqüenciació desenvolupades i els diferents mètodes d'anàlisi de dades, de manera que podríem estar davant d'una nova medicina personalitzada a través de perfils genòmics per a l'estratificació del risc i la prevenció de l'IAM.

5. Contribució original de l'autor

Aquesta és una Tesi Doctoral realitzada per compendi de 3 articles científics publicats en revistes científiques internacionals indexades dins del *Journal of Citation Report*. L'autora ha dut a terme l'adquisició i anàlisi de les dades estudiades; a més de participar en la redacció dels manuscrits, exercint en els tres les funcions necessàries com a primera autora.

II.- HIPÒTESIS

La composició de la MEC, així com l'expressió gènica dels principals reguladors del remodelat de l'interstici cardíac, és homogènia a tot el territori sotmès a isquèmia coronària; tanmateix, gràcies a la reperfusió coronària primerenca, la MEC evoluciona de manera diferent per conformar la regió infartada i el miocardi salvat.

Les tècniques de seqüenciació massiva permeten descriure els canvis dinàmics que es produeixen en el remodelat de l'interstici cardíac després de la isquèmia coronària, així com caracteritzar noves subunitats de col·lagen, MMPs i TIMPs implicades en la fisiopatologia de la reparació del miocardi infartat que no havien estat descrites prèviament.

En models experimentals i mostres de pacients amb infart, la presència de nous col·làgens a nivell gènic i proteic demostren la seua participació en la fisiopatologia cardíaca post-infart.

III.- OBJECTIUS

Utilitzant els següents enfocaments: a) model controlat porcí d'isquèmia-reperfusió, b) dades d'ARN-Seq procedents de ratolins sotmesos a diferents temps d'isquèmia, c) dos models murins d'IAM reperfós (oclusió transitòria de l'artèria coronària) i no reperfós (isquèmia coronària permanent) i d) autòpsies de pacients amb un IAM en fase crònica, l'objectiu principal d'aquesta Tesi Doctoral és:

Caracteritzar mitjançant tècniques morfomètriques i moleculars els canvis dinàmics que es produeixen en els components de la MEC després d'un IAM, així com demostrar la participació de noves molècules en el remodelat de l'interstici cardíac després d'un infart.

En concret, s'han plantejat els següents objectius específics:

1. Comparar mitjançant morfometria la composició histològica de la MEC cardíaca durant la isquèmia i posterior reperfusió entre l'àrea necròtica i el miocardi salvat.
2. Descriure els canvis en l'expressió gènica dels principals reguladors del remodelat de l'interstici cardíac post-infart a l'àrea necròtica i el miocardi salvat.
3. Determinar l'evolució dels BPs implicats en el remodelat de la MEC cardíaca a diferents temps d'isquèmia coronària utilitzant dades derivades d'estudis d'ARN-Seq en models murins.
4. Establir els nivells transcriptòmics dels gens encarregats de la síntesi de MMPs, TIMPs i subunitats de col·lagen al llarg del procés d'isquèmia coronària, basant-se en dades derivades d'estudis d'ARN-Seq en models murins.
5. Quantificar l'expressió gènica de les subunitats de col·lagen fibril·lar (tipus II i XI) i no fibril·lar (tipus VIII i XII) en miocardi aïllat de

models experimentals murins d'IAM (reperfós i no reperfós) i la seva associació amb la mida de l'infart.

6. Determinar els nivells gènics i proteics de les subunitats de col·lagen fibril·lar (tipus II i XI) i no fibril·lar (tipus VIII i XII) en miocardi aïllat d'autòpsies de pacients amb un IAM en fase crònica.

IV.- RESUM DE MANUSCRITS

1. Interstitial changes after reperfused myocardial infarction in swine: morphometric and genetic analysis (Anex I)

Rios-Navarro, C*, **Ortega, M***, et al. Interstitial changes after reperfused myocardial infarction in swine: morphometric and genetic analysis. BMC Vet Res 2020; 16:262.

Antecedents y objectiu: Actualment, el tractament d'elecció en pacients amb IAM amb elevació del segment ST és la revascularització ràpida amb l'objectiu de restablir l'aportació de nutrients i oxigen al miocardi afectat. No obstant això, aquesta tècnica presenta associats certs efectes nocius coneguts com a dany per isquèmia-reperfusió.

El paper que juga la MEC després d'un IAM ha estat prèviament descrit (Frangogiannis, 2017; van den Borne et al., 2010), però hi ha pocs estudis que descriuen els canvis en cadascun dels elements de la MEC de forma exhaustiva en un model experimental preclínic d'isquèmia-reperfusió. Per tant, l'objectiu d'aquest primer treball va ser avaluar els canvis morfològics i moleculars en la MEC que ocorren en el miocardi infartat i salvat des de l'inici de la isquèmia fins a fases més avançades després de la posterior reperfusió.

Mètodes: En aquest treball es van avaluar, mitjançant tincions histològiques tradicionals, immunohistoquímiques i qRT-PCR, els canvis en els components de la MEC en les àrees de miocardi necròtic i salvat en un model porcí d'IAM.

Model experimental

El model experimental s'ha dut a terme en porcs comuns juvenils femelles amb un pes entre 25 i 30 kg. Amb l'ajuda d'un catèter transfemoral 6F Amplatz Left 0,75, es va col·locar un globus d'angioplàstia (2,5 × 16 mm) a la part mitjana de l'artèria descendent anterior esquerra (ADA), i es va induir la isquèmia coronària durant 90 minuts mitjançant el inflat del globus. El protocol experimental ha estat prèviament descrit i àmpliament detallat en publicacions anteriors (Hervas et al., 2016; Ríos-Navarro et al., 2017).

Grups d'estudi

Es van formar un grup control i tres grups amb IAM. En els tres grups d'IAM, després de l'oclusió durant 90 minuts de l'ADA, els animals es van classificar com: i) sense reperfusió o seguits de ii) 1 setmana o iii) 1 mes de reperfusió. El grup control va ser sotmès al mateix protocol experimental utilitzat en els grups d'IAM, però el globus d'angioplàstia no es va inflar i, per tant, no es va induir isquèmia ni infart. Els 4 grups estan formats per 5 animals cadascun.

Estudi macroscòpic

L'àrea que va estar en isquèmia a causa de l'oclusió coronària va poder ser determinada per la infusió de tioflavina-S al 4% (Sigma Aldrich, MO) a través del globus d'angioplàstia prèviament al sacrifici dels animals mitjançant clorur de potassi (0,9%). Després d'això, el cor va ser aïllat i es van realitzar talls seriatos en el ventricle esquerre de 5 mm de gruix. La visualització de la tioflavina-S sota la llum ultraviolada va fer evident en blau clar l'àrea de risc (Figura 6). A més, l'extensió de l'àrea infartada es va poder determinar amb la incubació de les mostres en una solució de clorur de 2,3,5-trifeniltetrazoli al 2% (Sigma Aldrich, MO) durant 15 minuts i posterior visualització en llum

ambient. Després del tractament amb aquestes dues solucions, es va poder discernir l'àrea necròtica (a la zona de risc i no tenyida amb trifeniltetrazoli) i l'àrea salvada (a la zona de risc i tenyida amb trifeniltetrazoli) (Figura 6).

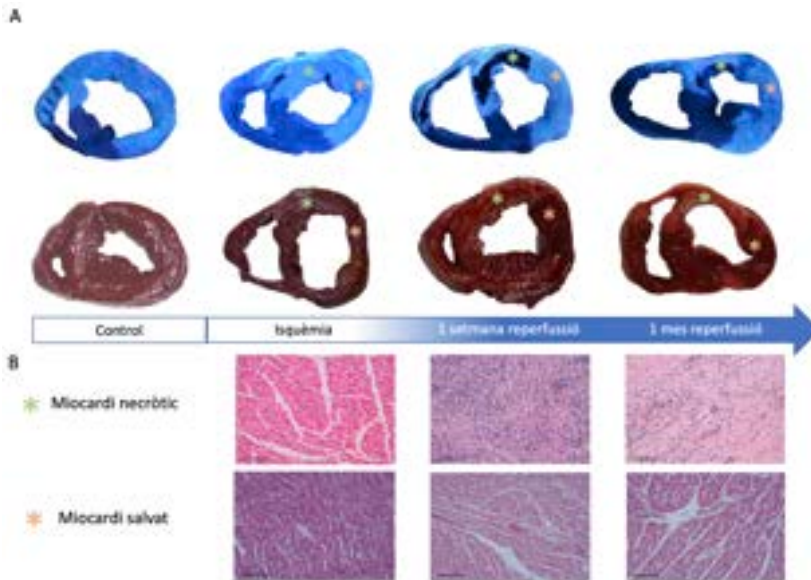


Figura 6: Secció transversal del miocardi del cor obtinguda del model porcí per a estudi macroscòpic (A) i seccions histològiques tenyides amb Hematoxilina-Eosina de les àrees d'interès (B). El miocardi salvat es va definir com l'àrea no infartada dins de l'àrea de risc (es marca amb *). El miocardi necròtic es va determinar com l'àrea de miocardi no tenyida amb una solució de clorur de 2,3,5-trifeniltetrazoli (es marca amb *).

Estudi microscòpic

Totes les mostres de miocardi obtingudes van ser fixades en paraformaldehid al 4% i incloses en parafina per al seu posterior tall en seccions de 3 µm.

Els talls de cada mostra, de la regió necròtica i salvada, van ser tenyits amb Hematoxilina-Eosina per a la descripció microscòpica, orceïna per a fibres elàstiques, tricròmic de Masson per a la

determinació de col·lagen tipus I, reticulina per a col·lagen tipus III, i àcid periòdic de Schiff per a GAG. Per a la determinació de laminina, fibronectina, SPARC i perlecà es van dur a terme tincions immunohistoquímiques.

Tots els talls van ser codificats per al seu posterior anàlisi de forma cega. Per a cada tall i en cada tinció es van realitzar 8 fotografies amb el microscopi òptic Leica DM3000 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanya) i es van analitzar morfològicament amb el programa Image ProPlus 7.0 (Media Cybernetics Inc., Rockville, MD).

qRT-PCR

Per a l'estudi genètic, l'ARN va ser extret amb RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanya) seguint les instruccions del fabricant. L'expressió gènica es va determinar mitjançant qRT-PCR (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Els valors de cicle umbral (Ct) es van calcular per triplicat i es van normalitzar en funció del gen GAPDH.

Estudi estadístic

Es va utilitzar l'ANOVA d'una via o el t-test de Student per a les comparacions i es va considerar estadísticament significatiu un p-valor < 0,05. L'anàlisi estadística es va dur a terme amb SPSS 19.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL).

Resultats: Els experiments es van dur a terme amb èxit en els controls (n=5) i en cada grup d'estudi (sense reperfusió coronària (n=5), reperfusió d'1 setmana (n=5) i reperfusió d'1 mes (n=5)).

Pel que fa al model d'isquèmia sense reperfusió, es va observar un augment de fibres elàstiques, laminina, fibronectina i no hi va haver canvis en l'expressió de col·lagen tipus I i tipus III, a l'àrea necròtica i salvada del miocardi, en comparació amb el grup control. Segons aquests resultats, el remodelat de la MEC s'inicia de forma primerenca després de la isquèmia, i és similar en tot el miocardi sotmès a isquèmia (independentment de si després es transforma en teixit necròtic o miocardi salvat) (Figura 7).

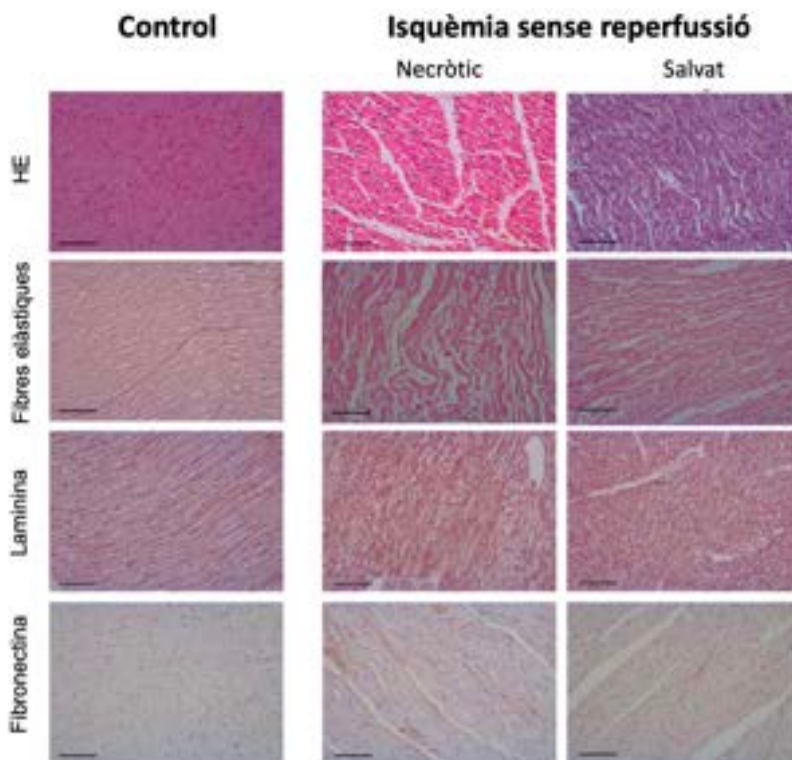


Figura 7: Imatges representatives dels components de la matriu extracel·lular en el miocardi salvat i necròtic després de 90 minuts d'isquèmia sense reperfusió. HE: Hematoxilina-Eosina.

Pel que fa als nivells gènics d'altres molècules clau en la fisiopatologia de l'IAM, es va observar que TIMP1 i TIMP2 estan

sobreexpressats en ambdues regions (infartada i salvada), mentre que TIMP3 només en l'àrea necròtica respecte al teixit control. Per contra, TIMP4 no presenta diferències significatives en el grup de 90 minuts d'isquèmia sense reperfusió en comparació amb el control. D'entre les MMPs estudiades (MMP2, MMP9, MMP14, MMP15 i MMP16), només MMP14 presenta diferències significatives en l'àrea salvada, però no en l'àrea necròtica, respecte al control. A més, quan es van analitzar factors de transcripció clau implicats en el remodelat de la MEC [*connective tissue growth factor* (CTGF), TNF- α , Basigin (BSG) i TGF- β], només CTGF presenta diferències significatives en l'àrea necròtica i salvada del model d'isquèmia sense reperfusió respecte al miocardi control (Taula 2). Igual que amb els components de la MEC, l'expressió dels factors genètics que participen en el remodelat de la MEC va ser comparable en ambdues regions després de 90 minuts d'isquèmia. Per tant, abans de la reperfusió coronària, l'interstici de tota l'àrea en risc (que comprèn el futur teixit necròtic i el miocardi salvat) canvia simultàniament durant la isquèmia.

Taula 2: Nivells d'ARN missatger de gens relacionats amb el remodelat de la matriu extracel·lular.

	Control	Isquèmia sense reperfussió		1 setmana reperfussió		1 mes reperfussió	
		Necròtic	Salvat	Necròtic	Salvat	Necròtic	Salvat
MMP2	1,05 ± 0,13	1,98 ± 0,65	3,26 ± 1,30	27,08 ± 7,5**	3,95 ± 2,28	15,97 ± 4,24**	4,09 ± 2,26
MMP9	1,02 ± 0,22	5,79 ± 7,64	4,62 ± 4,08	95,98 ± 69,45*	7,05 ± 6,65	272,31 ± 140,89**	5,95 ± 6,70
MMP14	1,03 ± 0,22	2,78 ± 0,93	2,18 ± 0,71**	2,95 ± 2,54	0,28 ± 0,22*	6,21 ± 2,79*	0,15 ± 0,07*
MMP15	1,03 ± 0,30	2,12 ± 1,02	1,82 ± 0,90	1,13 ± 1,07	0,41 ± 0,13	1,13 ± 1,07	0,62 ± 0,73
MMP16	1,05 ± 0,35	2,43 ± 1,14	2,04 ± 0,58	1,15 ± 0,68	0,58 ± 0,32	6,39 ± 2,70*	1,55 ± 0,87
TIMP1	1,02 ± 0,23	6,50 ± 2,92*	5,64 ± 3,19*	27,14 ± 17,37**	1,92 ± 1,32	30,92 ± 18,14**	1,15 ± 0,75
TIMP2	1,00 ± 0,08	3,08 ± 0,98**	2,60 ± 0,85**	4,19 ± 1,77*	0,99 ± 0,86	32,50 ± 20,41**	0,89 ± 0,47
TIMP3	0,96 ± 0,15	2,82 ± 1,45*	1,77 ± 0,47	1,06 ± 0,88	0,58 ± 0,29	4,83 ± 2,80*	0,81 ± 0,40
TIMP4	1,29 ± 0,35	1,45 ± 0,59	1,51 ± 0,30	1,32 ± 0,45	0,37 ± 0,16**	1,14 ± 0,60	0,36 ± 0,21**
CTGF	1,24 ± 0,77	7,40 ± 1,27**	3,01 ± 1,00*	3,10 ± 2,66	0,28 ± 0,09	28,25 ± 13,64**	0,98 ± 0,32
TNF-α	1,10 ± 0,54	6,52 ± 4,44	6,26 ± 3,18	20,59 ± 11,10**	7,54 ± 6,17	60,98 ± 21,55**	11,30 ± 10,35
BSG	1,01 ± 0,18	1,35 ± 0,25	1,31 ± 0,22	0,38 ± 0,07*	0,27 ± 0,22*	0,74 ± 0,47	0,52 ± 0,50
TGF-β	1,06 ± 0,42	2,06 ± 0,24	1,81 ± 0,32	2,79 ± 1,49	0,48 ± 0,22	16,62 ± 12,04**	0,65 ± 0,79

*BSG: basigin, CTGF: connective tissue growth factor, MMP: metal·loproteïnasa de matriu, TGF: transforming growth factor, TIMP: inhibidor de les metal·loproteïnases de matriu, TNF: factor de necrosi tumoral. Les dades es mostraren com a mitjana ± SD i van ser analitzats mitjançant t-test de Student. * p<0,05, **p<0,01 vs. control.*

Quant als models d'isquèmia-reperfusió amb una setmana o un mes de reperfusió, es va detectar un augment significatiu de col·lagen tipus I i fibres elàstiques a l'àrea necròtica després d'una setmana i un mes de reperfusió. En aquest últim escenari, també s'observa un augment de col·lagen tipus III a l'àrea necròtica, així com un augment en l'expressió gènica tant de col·lagen I com de col·lagen III (Figura 8). L'estudi de l'organització de les fibres de col·lagen mitjançant la transformada ràpida de Fourier mostra una major organització de les fibres a l'àrea necròtica, mentre que l'organització d'aquestes és similar a l'àrea salvada i al control, presentant aquestes una major desorganització. En ambdós models (una setmana i un mes de reperfusió), s'ha observat un augment de GAG, SPARC, laminina i fibronectina a la zona necròtica però no a la salvada.

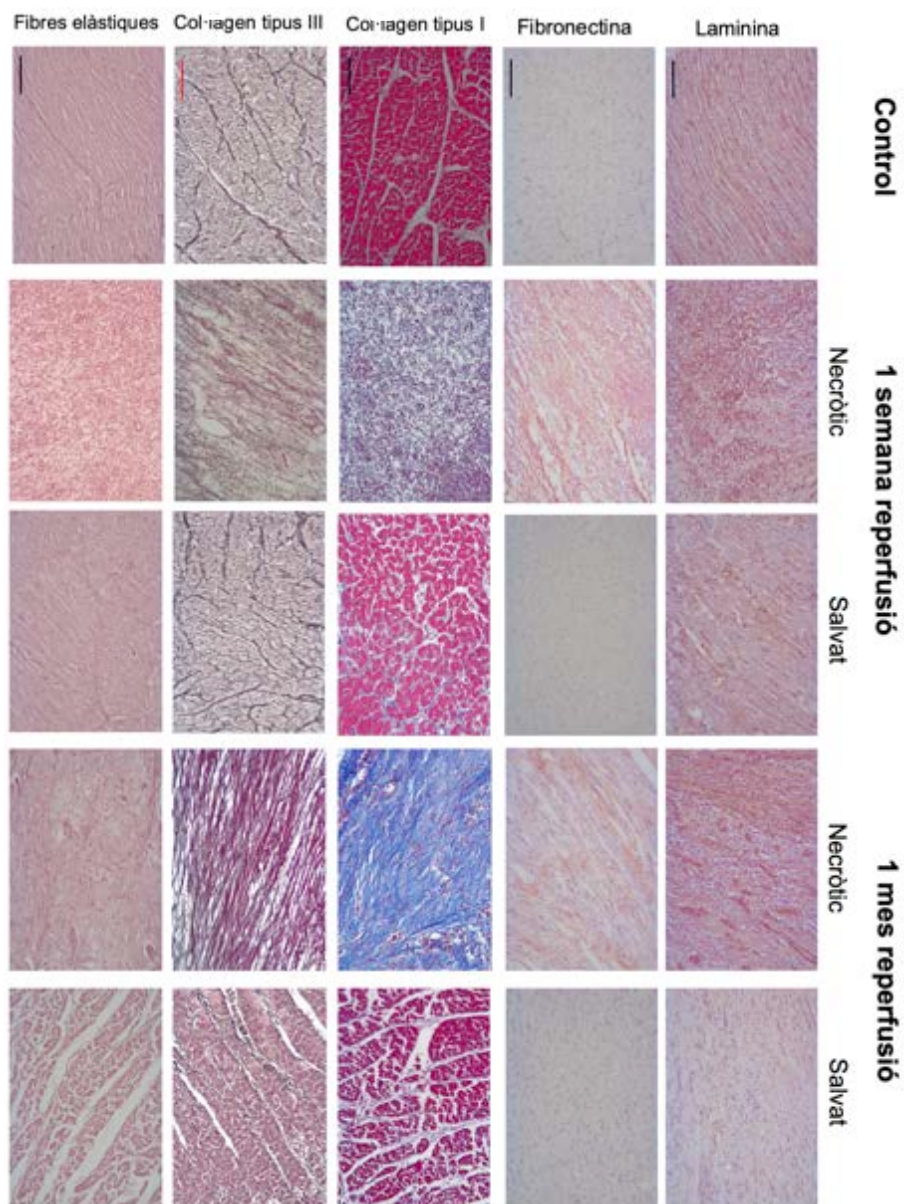


Figura 8: Imatges representatives dels components de la matriu extracel·lular del miocardi salvat i necròtic després d'una setmana i un mes de reperfusió després de l'oclusió coronària.

Finalment, es van avaluar els gens involucrats en el remodelat de la MEC. L'expressió de TIMP1 i TIMP2 presenta un augment significatiu en ambdós models a la zona necròtica, però TIMP3 només després d'un mes de reperfusió. Els nivells d'expressió de MMP2 i MMP9 es troben significativament augmentats a l'àrea necròtica en ambdós models, i MMP14 i MMP16 només després d'un mes de reperfusió. En el miocardi infartat, s'observa sobreexpressió de TNF- α i infraexpressió de BSG després d'una setmana de reperfusió, mentre que TNF- α , CTGF i TGF- β es troben sobreexpressats en fases més avançades de la reparació del teixit cardíac (Taula 2). De forma paral·lela als resultats morfomètrics, l'expressió de gens clau implicats en el remodelat de la MEC va ser diferent en el miocardi necròtic i salvat després de la reperfusió coronària.

Conclusió: Després d'un període d'isquèmia coronària, els canvis en la MEC es produeixen de manera precoç, com podem veure en els elevats nivells de fibronectina, laminina i fibres elàstiques. Així i tot, després de la reperfusió, l'àrea de miocardi salvada retorna a una composició similar a la del miocardi control. Per tant, la reperfusió precoç després de la isquèmia permetrà salvar cardiomiòcits, així com preservar la MEC.

2. Meta-Analysis of Extracellular Matrix Dynamics after Myocardial Infarction Using RNA-Sequencing Transcriptomic Database (Annex II)

Ortega, M*, Rios-Navarro, C*, et al. Meta-Analysis of Extracellular Matrix Dynamics after Myocardial Infarction Using RNA-Sequencing Transcriptomic Database. *Int J Mol Sci* 2022, 23,15615.

Antecedents i objectiu: Després d'un IAM, es produeixen canvis tant a nivell cel·lular com en la composició de la MEC amb l'objectiu de preservar el teixit, formant-se a la zona afectada una cicatriu fibròtica composta principalment per col·lagen de tipus I i III (Nielsen et al., 2019; Hervas et al., 2016). Tots aquests canvis s'han de dur a terme de manera completament ordenada per evitar el remodelat ventricular advers que provoque una deficient funció ventricular i l'aparició d'esdeveniments adversos. Les tecnologies de seqüenciació massiva desenvolupades recentment han permès l'obtenció de grans quantitats de dades genètiques i transcriptòmiques que permeten analitzar els mecanismes moleculars en una malaltia. És per això que l'objectiu principal d'aquest estudi va ser dur a terme un metanàlisi utilitzant dades transcriptòmiques d'ARN-Seq procedents de bases de dades públiques per estudiar els canvis en l'expressió dels gens implicats en la composició de la MEC i la seua regulació després d'un IAM.

Mètodes: La selecció dels estudis per al nostre metanàlisi, procedents de la base de dades *Gene Expression Omnibus*, es mostra a la Figura 9. La cerca es va dur a terme fins al setembre de 2021, i els criteris d'inclusió van ser estudis realitzats en *Mus musculus*, sotmesos a un IAM o controls, i amb un estudi d'ARN-Seq dut a terme sobre el miocardi. Finalment, es van seleccionar un total

de 8 estudis. Després de la selecció de dades, es van descarregar i processar els arxius fins a obtenir els nivells d'expressió dels diferents gens seqüenciats. Els anàlisis d'expressió diferencial es van dur a terme entre cada grup amb isquèmia i el grup control. Els gens diferencialment expressats (DEGs) es van determinar amb un p-valor ajustat $< 0,05$ i un $\text{Log2FoldChange} > 2$ o $\text{Log2FoldChange} < 2$. L'anàlisi d'enriquiment funcional es va dur a terme amb els BPs de Gene Ontology (GO).

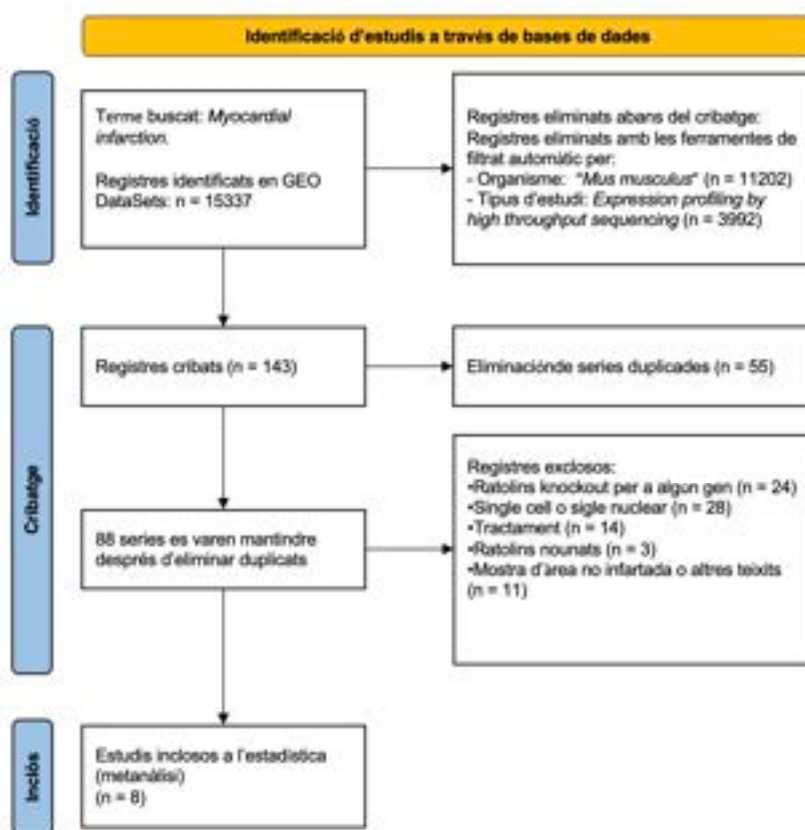


Figura 9: Diagrama de flux de PRISMA del metanàlisi. GEO: Gene Expression Omnibus.

Resultats: Es van incloure en l'estudi un total de 92 mostres, entre controls i diferents temps d'isquèmia: control (n=30), 6 hores (n=8), 1 dia (n=16), 3 dies (n=10), 7 dies (n=7), 14 dies (n=10) i 21 dies (n=11) (Taula 3).

Taula 3: Resum dels datasets de GEO seleccionats per al metanàlisi.

GEO DataSet	Nombre de mostres						
	Control	6 hores reperfusió	1 dia reperfusió	3 dies reperfusió	7 dies reperfusió	14 dies reperfusió	>=21 dies reperfusió
GSE153494	3	3	3	3			
GSE153493	3		3			3	
GSE151834				4	4	4	8
GSE114695	9		3		3		3
GSE153485	10	5	5				
GSE154072						3	
GSE104187	4		2	2			
GSE83350	1			1			
Total	30	8	16	10	7	10	11

GEO: Gene Expression Omnibus.

Després de comparar amb el grup control, es van trobar els següents DEGs en cada grup d'isquèmia: 6.447 (6h), 14.246 (1 dia), 14.354 (3 dies), 13.869 (7 dies), 9.449 (14 dies) i 12.129 (21 dies). Després de l'anàlisi d'enriquiment funcional, es van filtrar els BPs i es van obtenir només aquells relacionats amb la MEC.

En tots els temps d'isquèmia es va observar sobrerrepresentació dels següents BPs: *Extracellular structure organization* (GO: 0043062), *Extracellular matrix organization* (GO: 0030198), *Protein localization to the extracellular region* (GO: 0071692) i *Establishment of protein localization to the extracellular region* (GO: 0035592). L'organització

de la MEC s'inicia després d'1 dia d'isquèmia, com podem veure amb la sobrerrepresentació de *Regulation of Extracellular matrix organization* (GO: 1903053) i *Regulation of Extracellular matrix disassembly* (GO: 0010715). També es va observar un canvi en el comportament de la MEC després de 3 dies d'isquèmia amb la sobrerrepresentació del BP *Extracellular matrix disassembly* (GO: 0022617), fins als 7 dies després de l'inici de la isquèmia. Contràriament, el BP *Extracellular matrix assembly* (GO: 0085029) apareix sobrerrepresentat des dels 7 dies d'isquèmia i fins als 21 dies d'isquèmia (Figura 10).

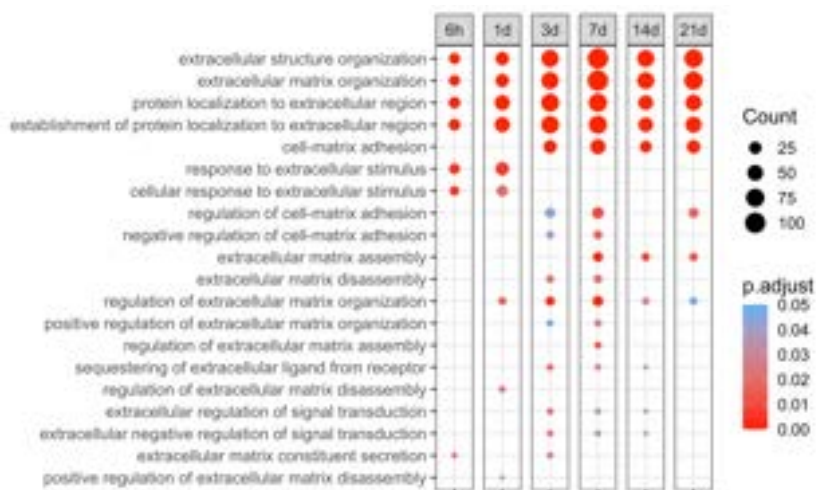


Figura 10: Anàlisi d'enriquiment funcional de Gene Ontology utilitzant processos biològics filtrats pels termes "matrix" o "extracellular". Els processos biològics sobrerrepresentats en cada punt temporal després de l'inici de la isquèmia. Els grups d'infart de miocardi es mostren en columnes, i en files es representen els diferents processos biològics. La mida dels cercles indica el nombre de gens implicats, mentre que el rang de color de roig a blau representa el p-valor ajustat.

Es va evidenciar, a més, que aquest canvi de comportament es veia reforçat pels DEGs sobreexpressats en cada grup d'estudi. Apareixen 41 DEGs als 7 dies d'isquèmia que es mantenen sobreexpressats fins

als 21 dies. Després de 14 dies d'isquèmia, només 6 nous DEGs apareixen sobreexpressats, de manera que els canvis en l'expressió de gens relacionats amb els canvis en la MEC són mínims després dels 7 dies d'isquèmia.

Un cop avaluats els BPs relacionats amb els canvis de la MEC, es van explorar els canvis d'expressió en els gens que codifiquen per a les subunitats de col·lagen, les MMPs i els TIMPs. D'acord amb el nostre estudi, un total de 19 MMPs, 4 TIMPs i 26 subunitats de col·lagen presenten una diferència d'expressió en els grups sotmesos a isquèmia enfront del control (Figura 11).

MMP8 i MMP9 apareixen sobreexpressades a les 6 hores d'isquèmia, però tornen a nivells de control el dia 7. Les MMP10, MMP19, MMP24 i MMP25 també mostren sobreexpressió molt precoç (6 hores) encara que la mantenen fins a fases tardanes (21 dies). Un segon grup de MMPs, que inclou MMP16, MMP17 i MMP27, inicia la seva sobreexpressió entre el dia 3 i el dia 7 i la mantenen fins als 21 dies. Un tercer grup (MMP11, MMP23 i MMP28) presenta un comportament bimodal: en fases inicials es mostren infraexpressades, mentre que trobem sobreexpressió significativa a partir del dia 7. Finalment, MMP15 es mostra infraexpressat al llarg de tots els temps d'isquèmia (Figura 11).

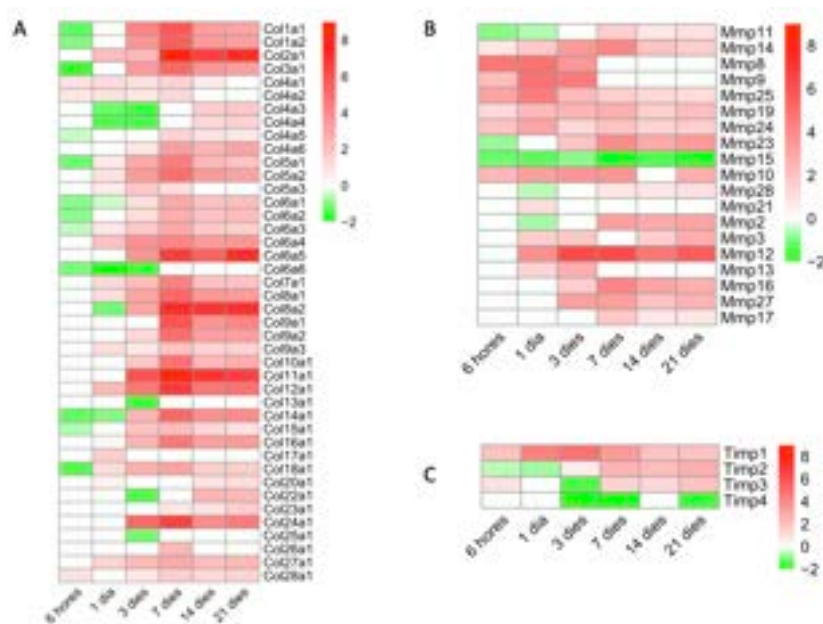


Figura 11: Mapes de calor dels Log2FoldChange dels gens que codifiquen per a col·lagen (A), MMPs (B) i TIMPs (C) en diferents punts temporals després de l'inici de l'oclusió coronària. Els diferents grups d'infart de miocardi es mostren en columnes, i els gens en files. L'expressió s'ha codificat en un rang de color entre el roig i el verd. El roig indica sobreexpressió gènica, mentre que el verd implica infraexpressió gènica. MMP: metal·loproteïnasa de matriu, TIMP: Inhibidors de les metal·loproteïnases de matriu.

Pel que fa als inhibidors de les MMPs, TIMP1 es mostra sobreexpressada al llarg de tots els temps d'isquèmia, mentre que TIMP2 i TIMP3 només augmenten la seva expressió a partir del dia 7. Contràriament, TIMP4 presenta infraexpressió en diferents temps després de la isquèmia (Figura 11).

Un total de 42 gens implicats en la transcripció de 26 subunitats de col·lagen diferents presenten variacions d'expressió gènica enfront del control. El comportament d'aquests gens és bimodal: en estadis primerencs d'isquèmia existeix infraexpressió, seguida d'una sobreexpressió a partir del dia 3. Els nivells d'expressió gènica més elevats en col·lagen es van trobar després de 7 dies d'isquèmia,

obtenint-se resultats de Log2FoldChange entre 5 i 9 en: Col1a1, Col1a2, Col3a1, Col8a1, Col8a2, Col9a1, Col9a2, Col11a1, Col12a1, Col14a1 i Col24a1.

Conclusió: Aquest és probablement el primer metanàlisi en què s'utilitzen dades transcriptòmiques procedents d'ARN-Seq per avaluar els canvis que es produeixen en la MEC després de la isquèmia coronària. Els canvis tant en els BPs com en els gens relacionats amb el remodelat de la MEC s'inicien en moments primerencs després de l'inici de la isquèmia (6 hores). Tots els canvis ocorreguts succeeixen d'una manera perfectament orquestrada, de manera que el desassemblatge de la MEC té lloc en moments primerencs fins als 7 dies, i els mecanismes encaminats a l'assemblatge d'una nova MEC ocorren des del dia 7 en endavant. A més, a la zona afectada, s'han observat un total de 19 MMPs, 4 TIMPs i 26 subunitats de col·lagen amb diferències d'expressió enfront del control. No obstant això, es requereixen futurs estudis que corroborin els resultats obtinguts en el present estudi amb diferents tècniques.

3. Novel fibrillar and non-fibrillar collagens involved in fibrotic scar formation after myocardial infarction (Annex III)

Ortega M*, Fábrega-García, MM*, et al. Novel fibrillar and non-fibrillar collagens involved in fibrotic scar formation after myocardial infarction. *Int J Mol Sci.* 2024; 25,6625.

Antecedents y objectius: La reducció de l'aport d'oxigen i nutrients després d'un IAM ha de ser contrarestada amb l'objectiu de limitar la mida de l'infart (Rios-Navarro et al., 2020). Després de l'IAM, el dipòsit de col·lagen per part dels miofibroblasts porta a la formació d'una cicatriu fibròtica. Aquesta està composta principalment per col·lagen tipus I i III (Francis Stuart et al., 2016; Prabhu i Frangogiannis, 2016), encara que recentment ha estat descrita la participació d'altres col·làgens (Frangogiannis et al., 2019). L'estudi post-IAM mitjançant seqüenciació massiva dut a terme en la present Tesi Doctoral suggereix la presència de col·làgens no descrits previament, de manera que l'objectiu d'aquest estudi va ser aprofundir en la composició de la cicatriu fibròtica formada després de l'IAM, analitzant col·làgens no descrits prèviament en la mateixa (col·làgens tipus II, VIII, XI i XII) en tres escenaris diferents: i) Estudi transcriptòmic de ratolins sotmesos a diferents temps d'isquèmia. ii) Estudi proteic i genètic dels col·làgens d'interès en un model de ratolí reperfós i sense perfusió després de l'IAM. iii) Estudi gènic i proteic en mostres de pacients amb infart crònic.

Mètodes:

Metanàlisi transcriptòmic

Es va dur a terme una recerca de dades de seqüenciació d'ARN publicades relatives a ratolins amb diferents temps d'isquèmia permanent. Després de l'anàlisi bioinformàtic es van determinar els DEGs (p-valor ajustat $< 0,05$ i $\text{Log2FoldChange} \geq 2$), així com els comptatges per milió dels gens que codifiquen per als col·làgens d'interès, així com per al Col·lagen I i III, i diferents moduladors de la fibrosi miocàrdica (*acta2*, *ccn2* i *tgfb1*). Es va dur a terme un anàlisi d'enriquiment funcional per determinar les funcions moleculars sobrerrepresentades i relacionades amb els col·làgens d'interès.

Model experimental de ratolí de IAM

Ratolins C57BL/6J van ser dividits de forma aleatòria en tres grups: un primer grup va ser el control, i els altres dos grups van ser sotmesos a una lligadura de l'artèria coronària descendent anterior esquerra. La diferència entre els dos últims grups va ser que en un d'ells la lligadura no va ser seguida de reperfusió (n=8, lligadura permanent de la coronària) i l'altre va ser reperfós després de la lligadura (45 minuts d'oclusió de l'artèria seguit de 21 dies de reperfusió). De cada ratolí es va extreure l'ARN, i l'expressió gènica dels col·làgens tipus I, II, III, VIII, XI i XII i dels gens moduladors de la fibrosi (*acta2*, *ccn2* i *tgfb1*) va ser determinada mitjançant qRT-PCR.

Estudi cardíac en humà

Vuit mostres de pacients amb infart reperfós en fase crònica (més de 6 mesos després de l'event agut) van ser seleccionades d'autòpsies. Sobre aquestes mostres es van dur a terme tincions immunohistoquímiques i l'estudi d'expressió gènica mitjançant qRT-PCR dels col·làgens tipus II, VIII, XI i XII.

Resultats:

Expressió gènica de col·lagen tipus II, VIII, XI i XII mitjançant ARN-Seq de ratolins sotmesos a IAM no reperfós.

Es van incloure en el metanàlisi un total de 92 ratolins, entre controls i diferents temps d'isquèmia: control (n=30), 6 hores (n=8), 1 dia (n=16), 3 dies (n=10), 7 dies (n=7), 14 dies (n=10) i 21 dies (n=11).

L'expressió dels gens que codifiquen les subunitats de col·lagen tipus II, VIIIa i XII mostra un augment a les 24 hores després de la isquèmia. Des del dia 3 en endavant, tots els gens estudiats (col·lagen tipus II, VIIIa, VIIIb, XI i XII) es van mostrar sobreexpressats fins a fases subagudes (21 dies). L'expressió de gens reguladors de la fibrosi cardíaca i dels gens que codifiquen per a col·lagen I i III presenten un increment dels seus nivells transcriptòmics en els primers dies d'isquèmia.

L'anàlisi d'enriquiment funcional va mostrar funcions moleculars que van permetre hipotetitzar la funció de cada tipus de col·lagen en l'escenari de l'IAM. Resumidament, aquests tipus de col·làgens participen en la fisiopatologia de l'IAM proporcionant resistència al teixit infartat i formant fibres de col·lagen que assegurin la cohesió dels diferents components de la MEC.

Diferència d'expressió de col·làgens tipus II, VIII, XI i XII en models de IAM amb i sense reperfusió

L'expressió d'ARN missatger dels col·làgens d'interès en ratolins sotmesos a lligadura permanent coronària (sense reperfusió després de l'IAM) i en ratolins sotmesos a 45 minuts d'oclusió coronària seguida de 21 dies de reperfusió va ser diferent entre ells. Els col·làgens tipus II i XII van mostrar comportaments oposats: el primer va augmentar només en IAM no reperfós, mentre que el segon va

augmentar només en el model reperfós. Tant el col·lagen tipus VIII com l'XI presentaren un augment significatiu en ambdós models (Figura 12). Els gens que codifiquen per a col·lagen I i III i els diferents reguladors de la fibrosi cardíaca es van mostrar alterats en ambdós models murins d'IAM.

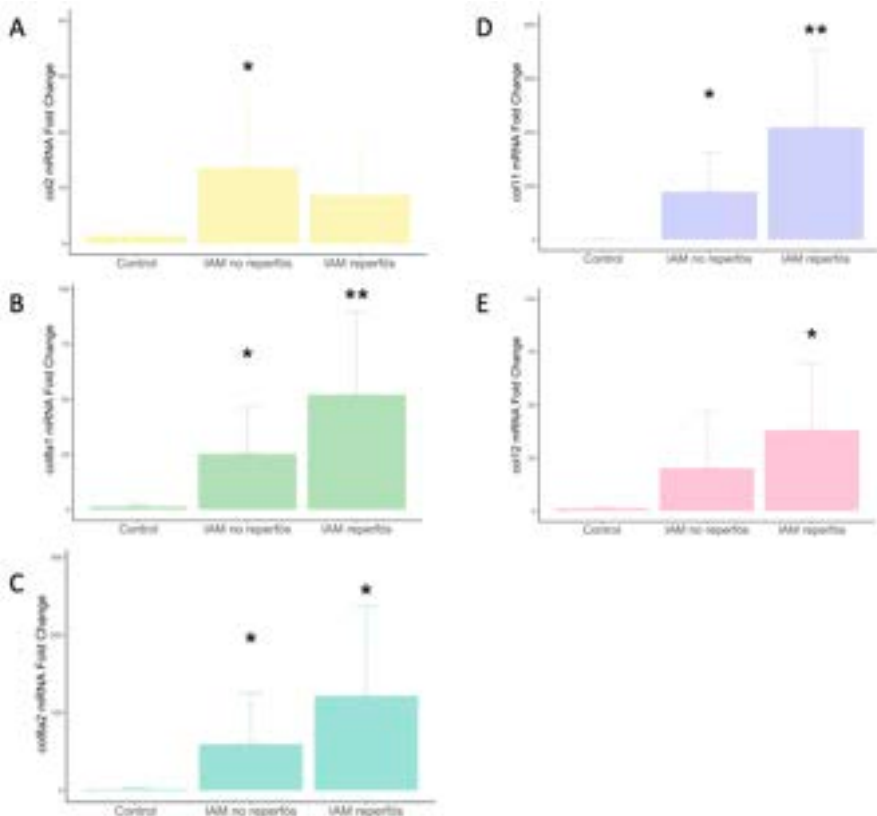


Figura 12: Expressió d'ARN missatger de les subunitats tipus II (A), VIIIa1 (B), VIIIa2 (C), XI (D) i XII (E) de col·lagen en models experimentals murins d'IAM. Ratolins sotmesos a lligadura coronària permanent (IAM no reperfós, n=8) i oclusió coronària transitòria de 45 minuts seguida de reperfusió (IAM reperfós, n=8) i un grup control (n=6). Els nivells transcriptòmics van ser mesurats als 21 dies de la inducció de l'IAM. Les dades mostren una distribució normal i estan expressades com a mitjana $\pm$ SD i van ser analitzades mitjançant el t-test de Student no aparellat. *P<0,05 **P<0,01 vs. Control. IAM: infart agut de miocardi.

Els resultats de l'expressió gènica van ser correlacionats amb la mida de l'infart quantificat mitjançant histologia, obtenint-se una correlació positiva amb tots els tipus de col·lagen (Figura 13). Aquests resultats reforcen la teoria de la implicació d'aquestes subunitats en la formació de la cicatriu fibròtica.

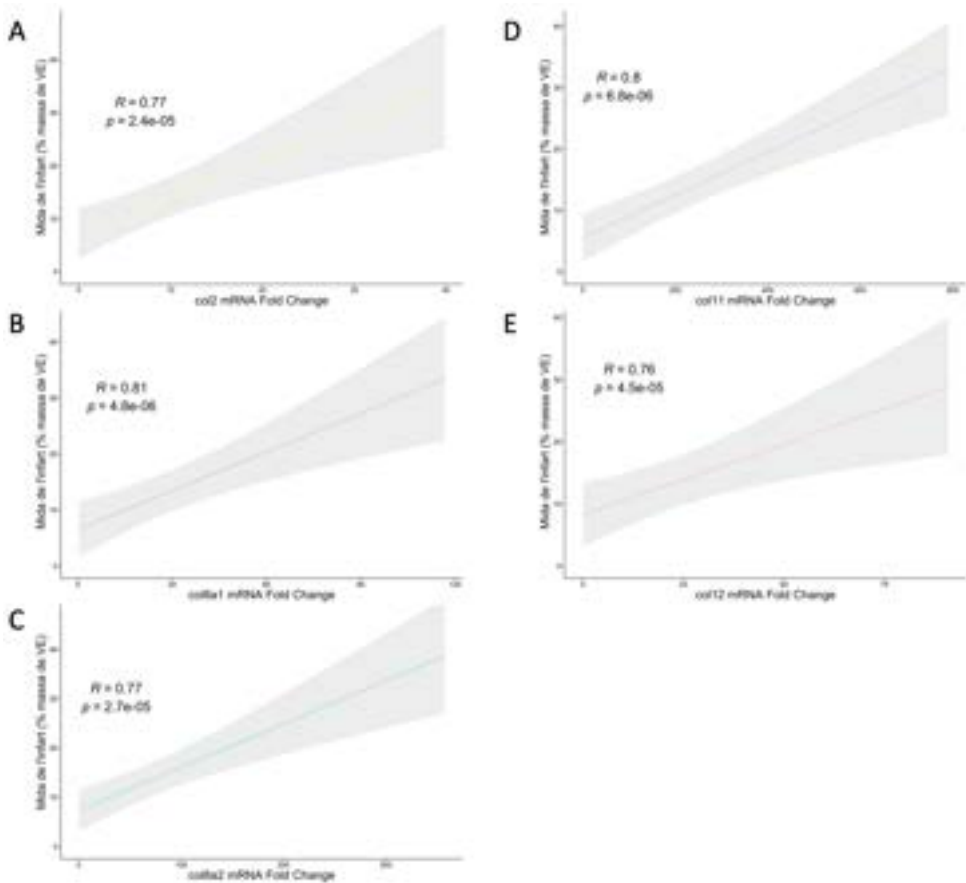


Figura 13: Associació entre la mida de l'infart i l'expressió gènica de les subunitats de col·lagen tipus II (A), VIIIa1 (B), VIIIa2 (C), XI (D) i XII (E) en un model murí experimental controlat d'infart de miocardi. VE: ventricle esquerre.

Participació dels col·làgens tipus II, VIII, XI i XII en la formació de la cicatriu fibròtica en pacients amb infart crònic

La presència a nivell proteic dels col·làgens tipus II, VIII, XI i XII va ser quantificada en la cicatriu tenyida mitjançant immunohistoquímica. Tots ells van ser identificats en la cicatriu (Figura 14). A nivell gènic, comparat amb mostres cardíques d'autòpsies sense antecedents d'IAM, no es van observar diferències en l'expressió dels diferents tipus de col·lagen d'interès. Aquests resultats van indicar que l'expressió d'aquests col·làgens augmenta unes hores després de l'oclusió coronària, però en fases cròniques no es mostra alterada.

Conclusió: Els resultats aportats demostren la presència dels tipus de col·lagen II, VIII, XI i XII després d'un IAM a través de tres aproximacions diferents: i) ARN-Seq en ratolins als quals se'ls va induir diferents temps d'isquèmia sense reperfusió, ii) model de ratolí sotmès a IAM amb i sense reperfusió, i iii) mostres de pacients amb infart crònic. Aquests nous avanços en la composició de la cicatriu fibròtica poden portar a un millor enteniment del remodelat ventricular ocorregut després de l'IAM.

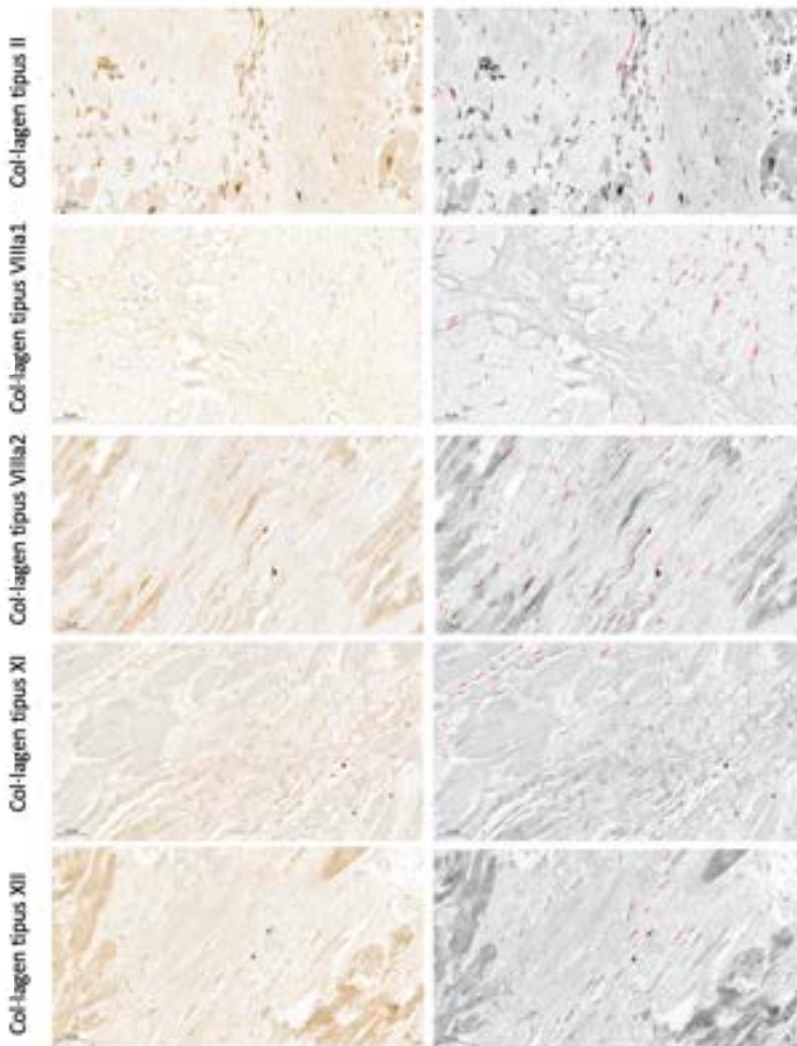


Figura 14: Presència dels col·làgens tipus II, VIIIa1, VIIIa2, XI i XII en la cicatriu fibròtica de pacients amb un infart crònic. Imatges representatives del teixit infartat d'humans (panells esquerres) amb marcadors específics per a cada subunitat de col·lagen i l'anàlisi morfomètric corresponent utilitzant el programari Imagen ProPlus (panells drets). Les barres indiquen 50 μm .

V.- DISCUSSIÓ

Les malalties cardiovasculars suposen actualment una de les causes de mort més comuns a Europa amb més de 60 milions de defuncions anuals (Townsend et al., 2022) i la principal causa de mortalitat al món (Goldsborough et al., 2022). A més, en els darrers vint anys, la prevalença de les malalties cardiovasculars s'ha duplicat, i es preveu que continue augmentant en el futur (Townsend et al., 2022).

Anualment, més de 3 milions de persones al món pateixen un IAM (Salari et al., 2023), i es manté com la principal causa de mort (Moraes-Silva et al., 2017). Així mateix, els costos sanitaris derivats d'aquesta patologia suposen un detriment en el sistema sanitari (Salari et al., 2023), augmentant cada any el nombre d'atencions hospitalàries degudes a IAM a causa de l'increment de l'esperança de vida de la població espanyola (Dégano et al., 2013).

La fisiopatologia de l'IAM consisteix en una oclusió aguda de l'artèria coronària a causa de l'alliberament d'un trombe format per una placa d'ateroma inestable. El maneig principal d'aquesta entitat consisteix en la reperfusió completa del vas oclòs, idealment mitjançant tècniques percutànies. D'aquesta manera, s'aconsegueix reduir la mida de l'àrea infartada, així com el desenvolupament del remodelat ventricular advers i la incidència d'esdeveniments deleteris (Vogel et al., 2019). Aquesta reperfusió, per tant, és completament necessària per a la recuperació del teixit. En canvi, també s'ha associat amb efectes negatius descrits com a dany per reperfusió que arriben a afectar el pronòstic dels pacients (Bahit et al., 2018; Cahill & Kharbanda, 2017).

La MEC cardíaca està formada principalment per fibres i substància fonamental i té com a funció principal proporcionar suport estructural als diferents tipus cel·lulars, encara que també s'ha descrit la seua participació en la modificació de l'activitat cel·lular i regulació de la

mateixa, així com migració i participació en la resposta inflamatòria (Frangogiannis, 2017; Li et al., 2018). En la fisiopatologia de l'IAM, diversos estudis han demostrat els canvis dinàmics que esdevenen a nivell de la MEC així com la importància que tenen per optimitzar el pronòstic dels pacients.

Després de la isquèmia, l'apoptosi de cardiomiòcits i les alteracions de la MEC han de produir-se de manera seqüencial en temps i localització. Per a això, una reacció immune inicial permet l'eliminació dels elements miocàrdics danyats, tant a nivell cel·lular com dels components de la MEC danyats (Ong et al., 2018; Prabhu & Frangogiannis, 2016). Seguidament, els miofibroblasts comencen a secretar col·lagen que formarà part de la cicatriu fibròtica, és a dir, s'inicia una fase antiinflamatòria reparativa, amb l'objectiu de formar una xarxa tridimensional capaç de respondre adequadament al dany sofert (Nielsen et al., 2019; Prabhu & Frangogiannis, 2016). Un error en la transició entre ambdues etapes pot portar a un remodelat advers del ventricle esquerre. A més, la capacitat regenerativa dels cardiomiòcits adults és molt reduïda, per la qual cosa ha d'existir una fibrosi que els substituisca i, amb això, forme una cicatriu sòlida que permeti prevenir un remodelat inadequat del ventricle esquerre i preserve, per tant, la funció sistòlica (Frangogiannis, 2017, 2019; Talman & Ruskoaho, 2016).

En aquest sentit, en la present Tesi Doctoral, s'ha comparat, per una banda, la composició de la MEC cardíaca i els principals gens reguladors de remodelat entre el miocardi infartat i salvat (miocardi dins de l'àrea isquèmica però que no acaba desenvolupant fibrosi) a diferents temps d'isquèmia i posterior reperfusió. En segon lloc, s'han utilitzat tècniques de seqüenciació massiva per entendre millor els canvis a nivell de la MEC després d'un IAM així com descriure noves molècules que podrien estar participant en el remodelat de la MEC

postinfart. Entre aquestes, quatre noves subunitats de col·lagen, que prèviament no havien estat descrites en la fisiopatologia de l'IAM, han estat explorades amb més detall utilitzant models experimentals controlats d'isquèmia-reperfusió i mostres aïllades de pacients amb IAM crònic.

1. Canvis en la MEC després d'un IAM en la zona d'infart i en la zona salvada

El miocardi és capaç de tolerar períodes breus d'isquèmia (15 minuts) sense mort dels cardiomiòcits, de manera que pateixen un dany reversible si es restableix ràpidament l'aportació de nutrients i oxigen (Kloner & Jennings, 2001a, 2001b). No obstant això, l'augment d'aquest temps d'isquèmia pot portar a danys majors que afecten tant els cardiomiòcits com la MEC que els envolta.

Actualment, la reperfusió representa la teràpia d'elecció per al maneig dels pacients amb IAM, ja que permet restaurar la perfusió cardíaca de manera precoç (Rentrop & Feit, 2015). En canvi, a aquesta mateixa teràpia se li han associat danys miocàrdics produïts a través de l'atordiment del miocardi, la lesió microvascular i endotelial, el dany cel·lular irreversible i l'estrès metabòlic i oxidatiu (dany per isquèmia-reperfusió) (Ambrosio & Tritto, 1999; Verma et al., 2002; Yao et al., 2023). A més, la teràpia de reperfusió comporta també problemes a llarg termini per als pacients, com és l'aparició de la insuficiència cardíaca amb una incidència entre el 14 i el 36%, la qual, en última instància, comporta efectes adversos sobre el ventricle (Bahit et al., 2018; Cahill & Kharbanda, 2017).

Un gran nombre d'estratègies farmacològiques han estat dissenyades per contrarestar el dany per isquèmia-reperfusió, però, fins ara, no

existeix un consens en l'estratègia de tractament que permeti reduir-lo (Yao et al., 2023). Això pot radicar en l'elevat nombre de tipus cel·lulars que es veuen afectats pel dany per isquèmia-reperfusió, entre els quals trobem cardiomiòcits, fibroblasts, cèl·lules endotelials o macròfags. Per contra, pocs estudis han explorat com afecta aquest dany específicament a la MEC, podent ser aquesta un objectiu de desenvolupament de noves teràpies.

L'avaluació de l'àrea en risc, és a dir, el territori irrigat per l'artèria relacionada amb l'infart que podria haver patit un dany irreversible, respecte a la mida de l'infart, permet establir l'àrea de miocardi salvada (Hausenloy et al., 2019). En conseqüència, després d'un IAM, en el ventricle afectat es poden distingir dues àrees segons el procés patològic sofert: àrea infartada (dany miocàrdic irreversible) i salvada (dany miocàrdic reversible) (Figura 6) (Hammer-Hansen et al., 2014). Encara que ambdues zones es troben afectades per la isquèmia coronària inicial, la gran majoria d'investigacions actuals se centren en la descripció dels mecanismes subjacents dins de l'àrea infartada, deixant en un segon pla el miocardi salvat. Per això, l'objectiu d'aquest primer article va ser determinar les diferències en la MEC entre la zona infartada i la salvada durant el procés d'isquèmia, així com la diferència entre ambdues zones en les setmanes posteriors a la reperfusió (Figura 15).

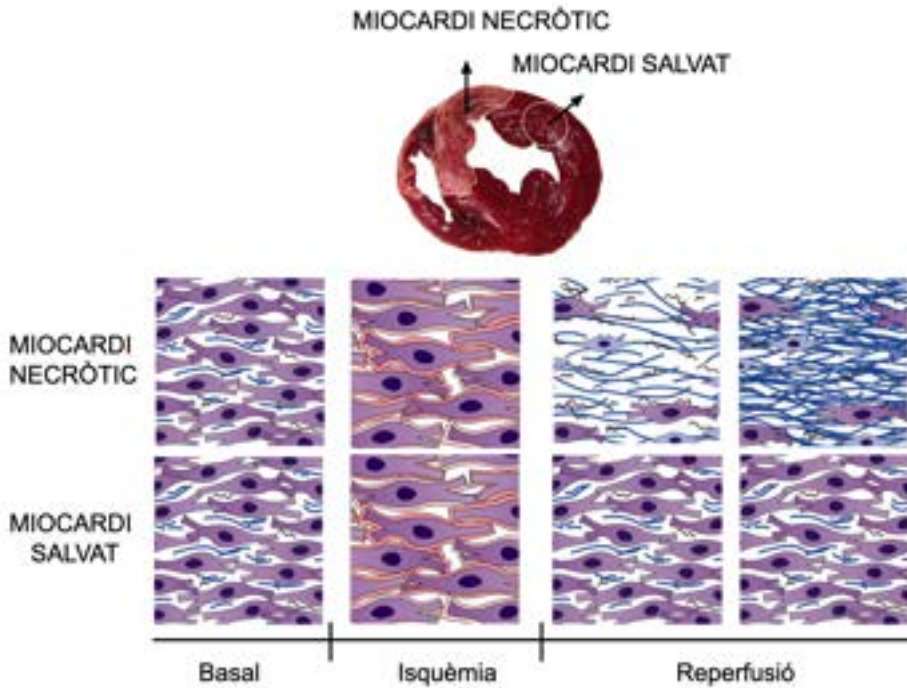


Figura 15: Canvis en la matriu extracel·lular cardíaca durant la isquèmia i posterior reperfusió en el miocardi necròtic i salvat després d'un infart agut de miocardi.

Després de l'estudi realitzat a nivell histològic i molecular, podem evidenciar que tant l'àrea necròtica (infartada) com la salvada presenten un remodelat similar de la MEC durant el període d'isquèmia. No obstant això, després de la reperfusió coronària, a l'àrea necròtica es forma la cicatriu fibròtica mentre que, a les àrees salvades, es restaura la MEC, equiparant-se la seva composició a la d'un miocardi sa (Rios-Navarro et al., 2020). D'aquesta manera, es demostra que la reperfusió coronària no només comporta una reducció de l'apoptosi cel·lular, sinó que també permet el manteniment d'una composició adequada de la MEC.

1.1. Comparació de l'interstici cardíac en el miocardi infartat i salvat durant la isquèmia coronària

En un escenari d'isquèmia miocàrdica provocat per l'oclusió coronària, es requereix una reacció immediata que permeti el remodelat de la composició i l'estructura de la MEC miocàrdica per fer front a l'estrès mecànic i metabòlic. El deteriorament en la fisiologia dels cardiomiòcits i la conseqüent apoptosi cel·lular han estat evidenciats poc després de l'inici de la isquèmia (Burke & Virmani, 2007) a través de diferents marcadors de necrosi de miòcits com la troponina cardíaca, detectable a les 2-3 hores després de l'inici de la isquèmia (Reed et al., 2017). La mort sobtada de milions de cardiomiòcits després de l'IAM supera la capacitat regenerativa del cor humà (Frangogiannis, 2017). Aquest fet implica la necessitat de la formació d'una matriu provisional que asseguri tant estructuralment com funcionalment el cor durant la hipòxia, així com per proporcionar un esquelet sobre el qual actuen les diferents cèl·lules reparadores (Frangogiannis, 2017; Li et al., 2018).

Basat en els nostres resultats en un model porcí controlat, després de 90 minuts d'isquèmia (abans de permetre la reperfusió coronària), la matriu provisional formada es caracteritza per presentar laminina i fibronectina, tant a l'àrea necròtica com a la salvada (Rios-Navarro et al., 2020). Ambdues molècules s'han vist augmentades en pacients en sang circulant després de l'IAM (Dinh et al., 2009; Orem et al., 2002), per contra, en el nostre estudi no s'observa un augment dels nivells d'ARN missatger que codifiquen aquestes proteïnes, de manera que el miocardi isquèmic no és capaç de generar-les. Aquestes proteïnes poden arribar al miocardi a través de la circulació sistèmica ja que, després d'un infart, hi ha un augment significatiu de la permeabilitat vascular, amb la conseqüent formació d'edema (Frangogiannis, 2017). A nivell proteic, han estat avaluades les fibres

elàstiques, que s'han vist augmentades tant a l'àrea necròtica com a la salvada, de manera que aquestes formen part de la MEC provisional.

La laminina, la fibronectina i les fibres elàstiques exerceixen un paper essencial en l'estructura cel·lular i la preservació del teixit cardíac després d'una isquèmia. La laminina ancla les cèl·lules a la MEC i facilita la unió de proteïnes receptores, mentre que la fibronectina contribueix a la resistència del teixit i regula l'adhesió i migració cel·lular (Frangogiannis, 2017; Li et al., 2018; Ma et al., 2014). La presència de fibres elàstiques és essencial per mantenir l'estirament d'òrgans com el cor, de manera que el restabliment de les propietats elàstiques del mateix és vital per evitar la dilatació cardíaca o el deteriorament ventricular després de l'IAM (Li et al., 2012). En estudis previs, ha estat demostrada la reducció de la mida de l'infart així com una millor funció cardíaca en un model d'IAM en rata tractat amb cèl·lules transfectades amb elastina (Mizuno et al., 2005).

A l'àrea afectada per la isquèmia cardíaca sense reperfusió, la laminina se situa envoltant els cardiomiòcits (endomisi), mentre que la fibronectina es troba al voltant dels fascicles musculars (perimisi). Estudis mostren una presència elevada de fibronectina al voltant dels cardiomiòcits necròtics poc després d'iniciar-se la isquèmia en models IAM murins (Casscells et al., 1990). Aquesta ràpida aparició de laminina, fibronectina i fibres elàstiques després de l'inici de la isquèmia podria indicar un mecanisme defensiu per preservar l'arquitectura del teixit cardíac davant la necrosi cel·lular.

L'anàlisi d'expressió gènica ens permet observar un augment de la transcripció de TIMP1, TIMP2 i TIMP3, mentre que no s'observen variacions en l'expressió de les MMPs avaluades (MMP2, MMP9, MMP14, MMP15 i MMP16). Aquests resultats estan en línia amb la

nostra hipòtesi basada en què inicialment es bloqueja la degradació en una fase hiperaguda després de l'inici de la isquèmia amb l'objectiu de mantenir l'estructura miocàrdica, evitant així la degradació primerenca de la MEC miocàrdica.

Els cardiomiòcits danyats, en fases avançades després d'un IAM, secreten CTGF, que participa en el desenvolupament de la fibrosi. Amb tot i això, en aquest estudi podem veure l'augment de l'expressió gènica del mateix tant en el miocardi necròtic com en el salvat, de manera que podria tenir un paper rellevant en la reducció de l'àrea d'infart. Això vol dir que també participaria en el manteniment inicial de l'estructura miocàrdica, com ja s'ha vist amb ratolins transgènics amb lligadura permanent de l'artèria coronària (Gravning et al., 2012).

Amb tot això, els canvis morfomètrics i d'expressió gènica en l'interstici cardíac es poden evidenciar minuts després de començar la isquèmia a l'àrea en risc (miocardi necròtic i salvat) (Rios-Navarro et al., 2020). Aquesta estructura microscòpica provisional pot exercir un paper important en permetre la protecció del múscul cardíac de la manca d'aportació d'oxigen i nutrients, assegurant una funció cardíaca adequada malgrat la mort programada de cèl·lules cardíques i facilitant la posterior regeneració tissular.

1.2. Diferències en la composició de la MEC entre la zona infartada i salvada en els dies posteriors a la perfusió

L'àrea de miocardi salvada, és a dir, l'àrea miocàrdica en risc sotmesa a isquèmia perquè es troba irrigada per la coronària oclosa, encara que finalment no necrosada després de l'IAM (Hausenloy et al., 2019; Pennell, 2006), mostra una correlació positiva amb el nombre de

cardiomiòcits conservats així com amb la proporció d'elements de l'interstici cardíac sa.

Com s'ha mostrat anteriorment, l'àrea infartada i l'àrea salvada al llarg de la isquèmia mostren el mateix comportament, no obstant això, la reperfusió permet desenvolupar diferències entre ambdues, observades tant a nivell morfològic com molecular. A l'àrea necròtica podem evidenciar el desenvolupament de la cicatriu fibròtica definitiva que estarà composta principalment per col·lagen de tipus I i III, mentre que la MEC de l'àrea salvada es caracteritza per tenir una proporció d'elements similars al teixit control.

Després de la reperfusió s'ha observat un increment en l'expressió gènica de MMPs i els seus inhibidors, així com de factors de transcripció implicats en la regulació del remodelat cardíac, tot i que només a l'àrea necròtica però no a la salvada. Respecte als components de la MEC, s'ha demostrat un augment de col·lagen, GAGs, SPARC, laminina i fibronectina a l'àrea necròtica, però una presència similar al teixit control a les àrees de miocardi salvat. Aquests resultats reforcen la idea que la revascularització de la coronària permet augmentar l'àrea de miocardi viable, així com reduir l'apoptosi de cardiomiòcits (Nepper-Christensen et al., 2018; Stiermaier et al., 2017) i el manteniment de l'adequada composició de la MEC miocàrdica.

En resum, amb aquest estudi som capaços de concloure que el cor davant la isquèmia desenvolupa un mecanisme de protecció a través de la MEC en tota l'àrea de risc, independentment de la mida de l'infart final. Aquests canvis són reversibles, com veiem a l'àrea salvada després de l'inici de la reperfusió, però faciliten la preparació cap a un posterior escenari de miocardi necròtic. La reperfusió primerenca de l'artèria oclusa exerceix un efecte beneficiós a nivell

cel·lular sobre el miocardi afectat, i també permet la preservació de la MEC, de manera que es produeix una reducció de la mida de l'infart i una millora del pronòstic dels pacients.

2. Evolució temporal dels canvis en la MEC durant el procés d'isquèmia

La MEC regula tant la resposta inflamatòria, reparativa, fibròtica i regenerativa, de manera que podem entendre-la com una entitat dinàmica capaç de respondre davant els danys a través de transformacions tant estructurals com de composició (Frangogiannis, 2017). Tots aquests canvis en la MEC han de produir-se de manera coordinada, de manera que la nova matriu formada siga capaç de dur a terme totes les funcions que se li atribueixen i afrontar tots els danys soferts pel teixit afectat. Per això, inicialment es desenvolupa una resposta immune i posteriorment es forma la cicatriu fibròtica, composta principalment de col·lagen de tipus I i III.

Els diferents elements que componen l'interstici cardíac en els processos isquèmics han estat descrits prèviament. No obstant això, en els últims anys, s'han desenvolupat tècniques de seqüenciació massiva que ens permeten realitzar un abordatge complet dels gens que pateixen un canvi en la seva expressió durant el remodelat cardíac post-infart. A més, no només podem descriure els components de la MEC, sinó també les funcions i rutes alterades en què aquests estan implicats.

Com a conseqüència, el segon objectiu d'aquesta Tesi Doctoral va ser establir una línia temporal dels canvis en els gens relacionats amb la MEC a diferents punts temporals després d'un IAM, així com

descriure nous components implicats en tot aquest procés i en la formació de la cicatriu fibròtica (Ortega et al., 2022).

2.1. Regulació gènica de la MEC després d'un IAM

La investigació a través del metanàlisi permet integrar les diferents evidències que provenen d'estudis independents, de manera que s'aconsegueix augmentar la potència estadística. A més, la inclusió de grups de ratolins sotmesos a diferents temps d'isquèmia permet mostrar una imatge temporal dels canvis succeïts a la MEC després de l'IAM. Així doncs, la forma de plantejar els estudis ha sofert un canvi dràstic, ja que la seqüenciació massiva permet l'anàlisi d'expressió de milers de gens simultàniament, així com la integració de totes aquestes dades amb l'objectiu d'analitzar els BPs implicats.

Després de l'anàlisi d'enriquiment funcional realitzat sobre els gens sobreexpressats en el nostre metanàlisi, podem veure que ja a les 6 hores després de l'inici de la isquèmia existeix comunicació entre la matriu i els diferents tipus cel·lulars, amb la consegüent regulació del desassemblatge de la MEC i la sobrerrepresentació de BPs involucrats en la resposta a estímuls extracel·lulars, així com canvis en l'organització de la MEC a les 24 hores d'oclusió de l'artèria coronària. En l'interstici, a més, veiem un canvi de comportament als 3 dies d'isquèmia amb un augment dels gens implicats en el desassemblatge de la MEC, que augmenten fins al dia 7, d'acord amb resultats d'altres autors (Yan et al., 2013), que han descrit un pic de resposta immune als 7 dies post-IAM. Un moment crític en tot aquest procés el trobem als 7 dies, en què es produeix tant desassemblatge de la MEC com assemblatge d'una nova MEC, que continua fins a fases cròniques (21 dies després de l'inici de l'oclusió) (Figura 16).

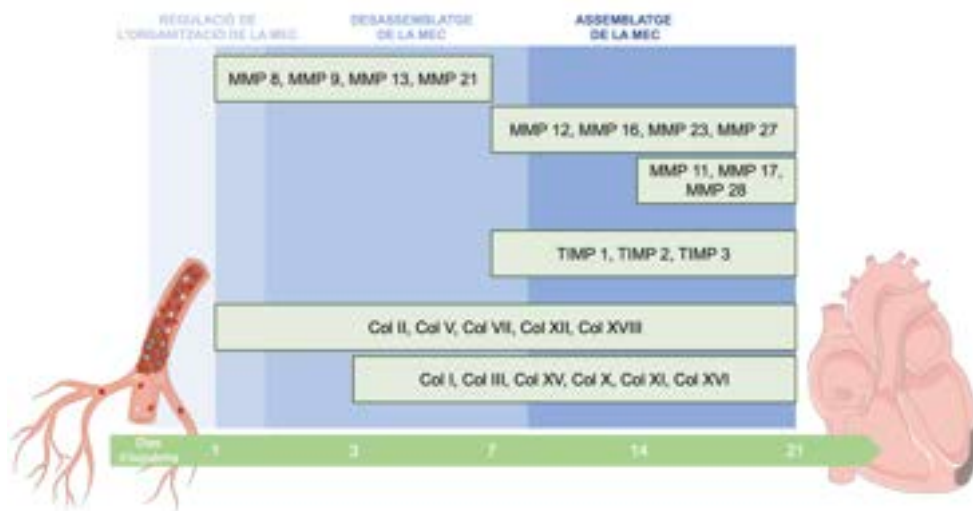


Figura 16: Canvis en l'expressió de col·lagen, MMPs i TIMPs a diversos temps d'isquèmia. MMP: metal·loproteïnasa de la matriu extracel·lular, TIMP: inhibidor de metal·loproteïnases de la matriu extracel·lular

És per això que, si l'objectiu és desenvolupar teràpies encaminades a promoure factors relacionats amb la formació de la MEC, el punt temporal per començar la seva administració seria al voltant de la setmana de l'esdeveniment agut.

Tots aquests resultats ens indiquen que existeix una resposta ràpida de la MEC després de l'oclusió coronària, activant-se mecanismes moleculars que permeten netejar i reparar l'àrea infartada. A més, veiem que el desassemblatge de la MEC ocorre en els primers 7 dies, mentre que a partir d'aquest moment es formarà una nova MEC que sigui capaç d'afrontar el dany sofert.

2.2. Canvis en la expressió de MMPs i TIMPs després de l'IAM

Després de la isquèmia, l'inici de l'apoptosi dels cardiomiòcits desencadena l'activació de la resposta inflamatòria. Amb això, les primeres cèl·lules en infiltrar-se a l'àrea afectada per l'infart són neutròfils i macròfags, tots dos responsables de l'alliberament de mediadors inflamatoris com les MMPs i TIMPs, que promouran la degradació i eliminació dels diferents components de l'interstici cardíac (Nielsen et al., 2019). Per tant, l'estudi de l'expressió de les MMPs i TIMPs és crucial per entendre el procés de reparació post-IAM, i amb això la descripció de possibles biomarcadors predictius (DeLeon-Pennell et al., 2017; Kaminski et al., 2020).

Segons el nostre estudi, al llarg del procés d'isquèmia s'observa un canvi en l'expressió gènica d'un total de 19 MMPs i 4 TIMPs. Pel que fa a les MMPs, es mostra una expressió bimodal, és a dir, hi ha MMPs que s'expressen de manera primerenca durant el desassemblatge de la MEC, mentre que altres se sobreexpressen en etapes tardanes (durant l'assemblatge de la mateixa). Per això, hipotetitzem l'existència de dos grups de MMPs amb funcions diverses: un primer grup que participa en l'eliminació dels elements danyats, i un segon grup que participa en la formació de la cicatriu fibròtica (Figura 16). Els resultats obtinguts pel que fa a la dinàmica d'expressió de les TIMPs van en línia amb la hipòtesi prèvia, ja que 3 d'elles (TIMP1, TIMP2 i TIMP3) se sobreexpressen de manera tardana, de manera que serien les responsables d'inhibir les MMPs encarregades de la degradació, deixant pas a l'acció de les responsables de l'assemblatge. Addicionalment, les dades obtingudes en el metanàlisi de teixit de ratolí aïllat a diferents temps d'isquèmia coronària són paral·lels als reportats anteriorment pel nostre grup en un model d'IAM porcí (Rios-Navarro et al., 2020).

Respecte a la dinàmica en l'expressió gènica mostrada per cada MMP, han estat àmpliament descrites les MMP2, MMP3, MMP8, MMP9, MMP13, MMP14 i MMP28, i els resultats estan en línia amb els obtinguts en aquest metanàlisi (Chen et al., 2005; Iyer et al., 2016; Lindsey, 2018; Ma et al., 2013; Rios-Navarro et al., 2020; Talman & Ruskoaho, 2016). No obstant això, després d'un IAM, un estudi recent (Kaminski et al., 2020) mostra una dinàmica en les MMP10, MMP11, MMP15, MMP16, MMP17, MMP18, MMP23, MMP24, MMP25 i MMP27 que difereix del trobat en el metanàlisi. Aquestes disparitats poden ser degudes al disseny de l'estudi, ja que es determina l'expressió gènica només de macròfags i fibroblasts, mentre que el nostre estudi porta a terme una anàlisi del teixit cardíac complet.

Per tant, aquest metanàlisi mostra la falta de coneixement existent actualment sobre l'expressió de les diferents MMPs després de l'IAM en l'àrea infartada, de manera que futurs dissenys experimentals podrien anar orientats a augmentar la comprensió de la funció de cadascuna d'aquestes MMPs en l'escenari de l'IAM. Per a això es podrien plantejar estudis d'expressió proteica en el teixit infartat de models experimentals o de pacients amb un infart, així com models murins knock-out per a alguna d'aquestes MMPs que permetrien establir la funció de les mateixes en la cicatriu fibròtica.

3. Implicació de nous col·làgens en la formació de la cicatriu fibròtica després de l'IAM

Tota la transició entre la resposta immune inicial i la resposta reparativa que la segueix ha d'estar perfectament regulada tant en temps com en lloc, ja que la fibrosi presenta un doble efecte sobre el cor. Encara que la formació de col·lagen és essencial per a la prevenció de la dilatació ventricular així com per mantenir la funció

sistòlica, una acumulació massiva de col·lagen provoca rigidesa, manca d'elasticitat en el miocardi i, per tant, una major incidència d'arrítmies. Això ha estat demostrat en pacients amb remodelat cardíac advers i desenvolupament d'insuficiència cardíaca després d'un IAM, els quals mostren una acumulació massiva de col·lagen (Biernacka & Frangogiannis, 2011; Khan & Sheppard, 2006; Talman & Ruskoaho, 2016).

L'element principal pel qual està composta la cicatriu fibròtica és el col·lagen, encara que tradicionalment els investigadors s'han centrat en l'estudi del col·lagen I i III, sent aquests els components principals del cor infartat després de la reparació (Frangogiannis, 2019; Rios-Navarro et al., 2020). Altres subunitats de col·lagen han estat estudiades en aquest context, tot i que el coneixement que es té actualment sobre elles és limitat.

El grup de Frangogiannis va publicar la revisió més recent coneguda en la qual es descriuen els col·làgens fibril·lars i no fibril·lars presents en el teixit cardíac després d'un IAM o després de la insuficiència cardíaca isquèmica (Frangogiannis, 2019). En aquesta revisió queda reflectida la manca d'estudis relatius a 17 subunitats diferents de col·lagen en aquests escenaris (Col II, VII, VIII, IX, X, XII, XIII, XV, XVI, XVII, XXI, XXII, XXIII, XXIV, XXV, XXVII i XXVIII). A més, un estudi recent en què s'empren tecnologies de seqüenciació mostra l'expressió de subunitats com Col VIII, XI, XII, XV i XVI, no descrits prèviament a l'àrea infartada (Yokota et al., 2020). Per això, el nostre grup va publicar un metanàlisi en què s'evidenciava la sobreexpressió de fins a 26 subunitats de col·lagen diferents, moltes d'elles no descrites prèviament en l'escenari de l'IAM (Ortega et al., 2022). En conseqüència, en el tercer manuscrit que compon la present tesi doctoral, es va plantejar com a objectiu esclarir més en detall la

participació de quatre subunitats de col·lagen (II, VIII, XI i XII) en la cicatriu fibròtica post-IAM.

Les diferents subunitats de col·lagen poden dividir-se en fibril·lars i no fibril·lars, que tant estructuralment com funcionalment presenten diferències. Els col·làgens fibril·lars confereixen resistència mecànica i suport estructural en l'organització del teixit, a més de presentar la funció de transducció de senyals entre la matriu i les cèl·lules (Bella & Hulmes, 2017). D'ells, després de la isquèmia, les subunitats I i III conformen l'eix principal de la cicatriu fibròtica, tot i que també ha estat descrit el col·lagen tipus V (Barallobre-Barreiro et al., 2012; Frangogiannis, 2019; Yokota et al., 2020). Els col·làgens no fibril·lars poden presentar-se associats a subunitats fibril·lars per regular l'ancoratge, la xarxa i l'organització de la MEC, així com unir-se a receptors de la superfície cel·lular participant en la modulació del fenotip cel·lular i regulant la resposta cel·lular (Shamhart & Meszaros, 2010). Entre els no fibril·lars, les subunitats de col·lagen tipus IV, VI, XIV i XVIII han estat descrites en models d'IAM o fallada cardíaca per isquèmia (Barallobre-Barreiro et al., 2012; Isobe et al., 2010; Lauten et al., 2009; Luther et al., 2012; Naugle et al., 2006; Panchal et al., 2004; Yamanishi et al., 1998).

El nostre metanàlisi d'estudis de seqüenciació d'ARN va mostrar un total de 26 subunitats de col·lagen sobreexpressades després de l'oclusió coronària en un model de ratolí amb lligadura coronària permanent, amb un pic màxim de transcripció als 7 dies. La majoria d'elles (22 subunitats) es mantenen sobreexpressades als 21 dies després de l'inici de l'oclusió (Ortega et al., 2022).

Per tant, l'últim objectiu d'aquesta Tesi Doctoral va ser demostrar a nivell gènic i proteic la presència de les subunitats de col·lagen II i XI (fibril·lars), i VIII i XII (no fibril·lars) en la cicatriu fibròtica formada

després de l'IAM (Figura 17). Específicament, la participació d'aquestes quatre subunitats ha estat demostrada en tres escenaris diferents: i) expressió gènica mitjançant seqüenciació de l'àrea infartada de ratolins sotmesos a oclusió coronària permanent, ii) expressió gènica en ratolins amb lligadura coronària permanent o oclusió coronària transitòria, i iii) expressió gènica i proteica a l'àrea infartada d'autòpsies de pacients amb infart crònic.

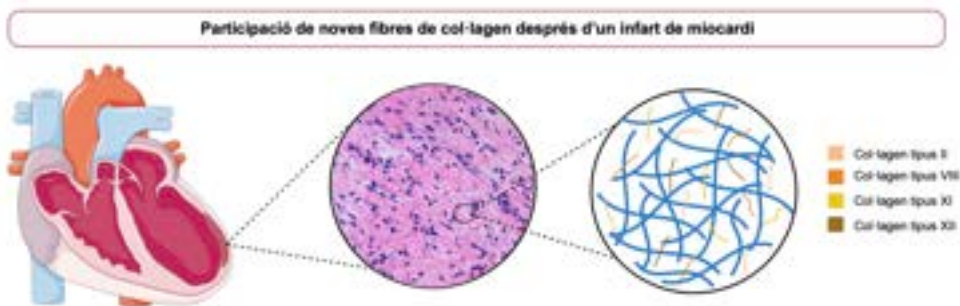


Figura 17: Resum gràfic. Participació dels col·làgens tipus II, VIII, XI i XII en la cicatriu fibròtica formada després de l'IAM, en el nostre estudi, demostrat per sobreexpressió d'ARN missatger després de l'aïllament de mostres de miocardi d'un model animal d'IAM i mitjançant la demostració de proteïna en autòpsies de pacients amb un infart crònic. IAM: infart agut de miocardi, ARN: àcid ribonucleic

3.1. Estudi estructural dels col·làgens de la MEC després de l'IAM

En primer lloc, el metanàlisi transcriptòmic va mostrar un augment de l'expressió de les subunitats II, VIII, XI i XII al llarg del procés d'oclusió de la coronària, i un pic d'expressió màxima als 7 dies d'isquèmia. Tots aquests resultats van ser validats mitjançant una tècnica ortogonal (RT-PCR) en un model de ratolí amb IAM seguit o no de

reperfusió, mostrant diferències en l'expressió (Ortega et al., 2024). El nostre estudi suggereix que l'expressió gènica del tipus VIII i XI augmenta en ambdós models. No obstant això, el tipus II se sobreexpressa en el model sense reperfusió, mentre que el tipus XII únicament en el grup reperfós després de l'IAM. A més, es va dur a terme l'estudi de l'expressió gènica d'aquestes subunitats en mostres de pacients amb infart crònic, però no es va veure un augment de l'expressió respecte a un control. Tot això ens indica que aquestes quatre subunitats de col·lagen tenen una elevada expressió gènica els primers dies després de l'esdeveniment agut, però que, en fases més avançades (mesos), els nivells transcriptòmics d'aquestes molècules tornen a nivells basals (Ortega et al., 2024).

Cal tenir en compte que un canvi en l'expressió gènica pot no traduir-se en un canvi a nivell de proteïna, per la qual cosa es va validar la presència de les quatre subunitats de col·lagen a nivell proteic en les mostres humanes mitjançant immunohistoquímica. Es va determinar la presència de col·lagen tipus II, VIII, XI i XII en l'àrea de cicatriu fibròtica de cors procedents d'autòpsies humanes, amb major presència de col·làgens no fibril·lars que de col·làgens formadors de fibril·les (tipus II i XI) (Ortega et al., 2024). Estudis previs a nivell de proteïna han demostrat la presència de col·lagen tipus XII, però no de les altres tres subunitats en un model porcí (Barallobre-Barreiro et al., 2012). Les nostres dades evidencien la presència proteica d'aquestes quatre subunitats formant part d'una cicatriu ja establerta, és a dir, en la qual no s'està generant nou col·lagen, i per tant no ho veiem a nivell d'expressió gènica en fases cròniques, tot i que sí unes poques hores després de l'inici de la isquèmia (Ortega et al., 2024).

3.2. Estudi funcional dels col·làgens de la MEC després de l'IAM

Als col·làgens fibril·lars se'ls atribueixen funcions genèriques de resistència mecànica i suport estructural del teixit, a més de funcionar com a transductors de senyals entre les cèl·lules i la MEC (Bella & Hulmes, 2017). El col·lagen II ha estat àmpliament descrit com a component principal del cartílag, i es coneix la seva expressió transitòria en la morfogènesi de la vàlvula cardíaca, però no ha estat descrita la seva expressió i per tant tampoc la seva funció en la cicatriu fibròtica després de l'IAM. El col·lagen XI regula la fibril·logènesi dels col·làgens tipus I i II, i s'expressa en cartílag articular, tendons i os trabecular. Encara que ha estat més àmpliament descrit en pacients amb adenocarcinoma ductal pancreàtic i càncer de vies biliars (Christensen et al., 2023; Nissen et al., 2021), en teixit cardíac participa en el desenvolupament de vàlvules cardíques i trabècules del ventricle esquerre.

Després de l'anàlisi d'enriquiment funcional en l'escenari de l'IAM, sembla probable pensar que ambdós participen conferint resistència a la tracció a l'interstici cardíac, així com en la unió de diferents elements de la MEC com poden ser el heparan sulfat, GAG o el factor de creixement derivat de plaquetes (Ortega et al., 2024).

Respecte als col·làgens no fibril·lars, solen presentar-se associats a subunitats fibril·lars de manera que participen en la regulació de l'ancoratge, la xarxa i l'organització de la MEC, tot i que també se'ls atribueixen funcions com a receptors de la superfície cel·lular (Shamhart & Meszaros, 2010). El col·lagen VIII participa en la cardiogènesi, de manera que en el cor adult la seva expressió és reduïda, però ha estat descrit en diferents situacions patològiques cardíques com la insuficiència cardíaca derivada de la dilatació

cardíaca després d'una sobrecàrrega de pressió, la distensibilitat de l'artèria caròtida i la fibril·lació auricular (Mohabeer et al., 2021; Skrbic et al., 2015; van den Berg et al., 2021). A més, s'ha demostrat la seva implicació en processos patològics que comporten angiogènesi i remodelat vascular (Hansen et al., 2016; Schönborn et al., 2020). L'estudi de Schönborn mostra que els ratolins *knock-out* per al col·lagen XII presenten una major desorganització de la MEC en processos de reparació de la pell (Schönborn et al., 2020). Per últim, el col·lagen XII ha estat descrit en processos patològics no relacionats amb afeccions cardíques (Tzortzaki et al., 2003), tot i que també en situacions patològiques com la insuficiència cardíaca, s'ha observat sobreexpressió en cèl·lules progenitores cardíques (Marro et al., 2016). Ambdós col·làgens no fibril·lars (VIII i XII) poden conferir resistència a la tracció i organització a la MEC cardíaca, tot i que es requereix un major nombre d'estudis per confirmar el seu paper en la fisiopatologia de l'IAM (Ortega et al., 2024).

Per tant, els nostres resultats mostren la presència de subunitats de col·lagen prèviament no reportades en la cicatriu fibròtica formada després de l'IAM, específicament els tipus II, VIII, XI i XII. Aquests resultats assenten les bases per a una millor comprensió en la composició de la cicatriu fibròtica després de l'IAM, la qual cosa podria arribar a millorar la comprensió del remodelat ventricular.

VI.- CONCLUSIONS

1. En un model porcí d'isquèmia-reperfusió, els canvis en la composició histològica de la MEC cardíaca es produeixen de manera homogènia en tot el miocardi isquèmic. Per contra, després de la reperfusió, els elements de l'interstici cardíac són diferents a l'àrea necròtica, on es forma la cicatriu fibròtica, i al miocardi salvat, amb una MEC similar al teixit cardíac sa.
2. L'alteració a nivell transcriptòmic dels principals reguladors del remodelat de l'interstici cardíac post-infart és similar en tot el miocardi exposat a 90 minuts d'isquèmia, però difereix significativament entre el teixit cardíac infartat i el miocardi salvat en els dies posteriors a la reperfusió coronària.
3. L'anàlisi bioinformàtic d'estudis d'ARN-Seq realitzats en ratolins sotmesos a diferents períodes d'isquèmia coronària revela que la reorganització de la MEC cardíaca en resposta a estímuls extracel·lulars comença les primeres hores després de l'inici de la isquèmia, evidenciant-se la participació de BP relacionats amb el desassemblatge de la MEC entre els dies 1 i 7 després de l'inici de la isquèmia i el posterior assemblatge a partir del dia 7.
4. Segons dades d'ARN-Seq obtingudes de ratolins exposats a diferents temps d'oclusió coronària permanent, un total de 19 MMPs, 4 TIMPs i 26 subunitats de col·lagen participen en la histopatologia del remodelat cardíac post-infart.
5. En miocardi aïllat de models experimentals murins d'infart (reperfós i no reperfós), l'expressió gènica de les subunitats de col·lagen fibril·lar (tipus II i XI) i no fibril·lar (tipus VIII i XII) estan incrementades respecte a un miocardi sa i es correlacionen positivament amb la mida de l'infart quantificat mitjançant anàlisi histològica.

6. La presència de les subunitats de col·lagen fibril·lar (tipus II i XI) i no fibril·lar (tipus VIII i XII) s'evidencia a nivell proteic en teixit cardíac aïllat d'autòpsies de pacients amb un infart en fase crònica, no detectant-se una sobreexpressió a nivell gènic en relació amb un miocardi sa.

VII.- BIBLIOGRAFIA

Adair-Kirk, T. L., & Senior, R. M. (2008). Fragments of extracellular matrix as mediators of inflammation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(6-7), 1101-1110.

Agha, G., Mendelson, M. M., Ward-Caviness, C. K., Joehanes, R., Huan, T., Gondalia, R., Salfati, E., Brody, J. A., Fiorito, G., Bressler, J., Chen, B. H., Ligthart, S., Guarrera, S., Colicino, E., Just, A. C., Wahl, S., Gieger, C., Vandiver, A. R., Tanaka, T., ... Baccarelli, A. A. (2019). Blood Leukocyte DNA Methylation Predicts Risk of Future Myocardial Infarction and Coronary Heart Disease. *Circulation*, 140(8), 645-657.

Ahmed, S. H., Clark, L. L., Pennington, W. R., Webb, C. S., Bonnema, D. D., Leonardi, A. H., McClure, C. D., Spinale, F. G., & Zile, M. R. (2006). Matrix metalloproteinases/tissue inhibitors of metalloproteinases: Relationship between changes in proteolytic determinants of matrix composition and structural, functional, and clinical manifestations of hypertensive heart disease. *Circulation*, 113(17), 2089-2096.

Alfonso-Jaume, M. A., Bergman, M. R., Mahimkar, R., Cheng, S., Jin, Z. Q., Karliner, J. S., & Lovett, D. H. (2006). Cardiac ischemia-reperfusion injury induces matrix metalloproteinase-2 expression through the AP-1 components FosB and JunB. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 291(4), H1838-1846.

Ali, M., Girgis, S., Hassan, A., Rudick, S., & Becker, R. C. (2018). Inflammation and coronary artery disease: From pathophysiology to Canakinumab Anti-Inflammatory Thrombosis Outcomes Study (CANTOS). *Coronary Artery Disease*, 29(5), 429-437.

Ambrosio, G., & Tritto, I. (1999). Reperfusion injury:

Experimental evidence and clinical implications. *American Heart Journal*, 138(2 Pt 2), S69-75.

Arslan, F., Smeets, M. B., Riem Vis, P. W., Karper, J. C., Quax, P. H., Bongartz, L. G., Peters, J. H., Hoefer, I. E., Doevendans, P. A., Pasterkamp, G., & de Kleijn, D. P. (2011). Lack of fibronectin-EDA promotes survival and prevents adverse remodeling and heart function deterioration after myocardial infarction. *Circulation Research*, 108(5), 582-592.

Bahit, M. C., Kochar, A., & Granger, C. B. (2018). Post-Myocardial Infarction Heart Failure. *JACC. Heart Failure*, 6(3), 179-186.

Bainey, K. R., & Armstrong, P. W. (2014). Clinical perspectives on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *American Heart Journal*, 167(5), 637-645.

Barallobre-Barreiro, J., Didangelos, A., Schoendube, F. A., Drozdov, I., Yin, X., Fernández-Caggiano, M., Willeit, P., Puntmann, V. O., Aldama-López, G., Shah, A. M., Doménech, N., & Mayr, M. (2012). Proteomics analysis of cardiac extracellular matrix remodeling in a porcine model of ischemia/reperfusion injury. *Circulation*, 125(6), 789-802.

Behjati, S., & Tarpey, P. S. (2013). What is next generation sequencing? *Archives of Disease in Childhood. Education and Practice Edition*, 98(6), 236-238.

Bella, J., & Hulmes, D. J. S. (2017). Fibrillar Collagens. *Sub-Cellular Biochemistry*, 82, 457-490.

Benjamin, M. M., & Khalil, R. A. (2012). Matrix metalloproteinase inhibitors as investigative tools in the pathogenesis

and management of vascular disease. *Experientia Supplementum* (2012), 103, 209-279.

Bernfield, M., & Sanderson, R. D. (1990). Syndecan, a developmentally regulated cell surface proteoglycan that binds extracellular matrix and growth factors. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 327(1239), 171-186.

Biernacka, A., & Frangogiannis, N. G. (2011). Aging and Cardiac Fibrosis. *Aging and Disease*, 2(2), 158-173.

Bodi, V., Sanchis, J., Nunez, J., Mainar, L., Minana, G., Benet, I., Solano, C., Chorro, F. J., & Llacer, A. (2008). Uncontrolled immune response in acute myocardial infarction: Unraveling the thread. *American Heart Journal*, 156(6), 1065-1073.

Borg, T. K., Rubin, K., Carver, W., Samarel, A., & Terracio, L. (1996). The cell biology of the cardiac interstitium. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 6(2), 65-70.

Bornstein, P. (2009). Matricellular proteins: An overview. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 3(3-4), 163-165.

Bornstein, P., & Sage, E. H. (2002). Matricellular proteins: Extracellular modulators of cell function. *Current Opinion in Cell Biology*, 14(5), 608-616.

Brænne, I., Reiz, B., Medack, A., Kleinecke, M., Fischer, M., Tuna, S., Hengstenberg, C., Deloukas, P., Erdmann, J., Schunkert, H., & Cardiogenics consortium. (2014). Whole-exome sequencing in an extended family with myocardial infarction unmasks familial hypercholesterolemia. *BMC Cardiovascular Disorders*, 14, 108.

Braunwald, E., & Kloner, R. A. (1985). Myocardial reperfusion: A double-edged sword? *The Journal of Clinical Investigation*, 76(5), 1713-1719.

Bueno, H., & Pérez-Gómez, B. (2019). Global Rounds. *Circulation*, 140(1), 13-15.

Bujak, M., & Frangogiannis, N. G. (2007). The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovascular Research*, 74(2), 184-195.

Bulkely, B. H., & Hutchins, G. M. (1977). Myocardial consequences of coronary artery bypass graft surgery. The paradox of necrosis in areas of revascularization. *Circulation*, 56(6), 906-913.

Burke, A. P., & Virmani, R. (2007). Pathophysiology of acute myocardial infarction. *The Medical Clinics of North America*, 91(4), 553-572; ix.

Cahill, T. J., & Kharbanda, R. K. (2017). Heart failure after myocardial infarction in the era of primary percutaneous coronary intervention: Mechanisms, incidence and identification of patients at risk. *World Journal of Cardiology*, 9(5), 407-415.

Cannon, R. O., Butany, J. W., McManus, B. M., Speir, E., Kravitz, A. B., Bolli, R., & Ferrans, V. J. (1983). Early degradation of collagen after acute myocardial infarction in the rat. *The American Journal of Cardiology*, 52(3), 390-395.

Casscells, W., Kimura, H., Sanchez, J. A., Yu, Z. X., & Ferrans, V. J. (1990). Immunohistochemical study of fibronectin in experimental myocardial infarction. *The American Journal of Pathology*, 137(4), 801-810.

Chen, B., & Frangogiannis, N. G. (2016). Macrophages in the Remodeling Failing Heart. *Circulation research*, 119(7), 776-778.

Chen, J., Tung, C.-H., Allport, J. R., Chen, S., Weissleder, R., & Huang, P. L. (2005). Near-Infrared Fluorescent Imaging of Matrix Metalloproteinase Activity After Myocardial Infarction. *Circulation*, 111(14), 1800-1805.

Cheng, G. C., Loree, H. M., Kamm, R. D., Fishbein, M. C., & Lee, R. T. (1993). Distribution of circumferential stress in ruptured and stable atherosclerotic lesions. A structural analysis with histopathological correlation. *Circulation*, 87(4), 1179-1187.

Chorro Gascó, F. J., García Civera, R., Lopez Merino, V (2007). Cardiología clínica. *Universitat de València*

Christensen, T. D., Jensen, C., Larsen, O., Leerhøy, B., Hansen, C. P., Madsen, K., Høgdall, D., Karsdal, M. A., Chen, I. M., Nielsen, D., Johansen, J. S., & Willumsen, N. (2023). Blood-based tumor fibrosis markers as diagnostic and prognostic biomarkers in patients with biliary tract cancer. *International Journal of Cancer*, 152(5), 1036-1049.

Clark, R. A. F. (1998). Overview and General Considerations of Wound Repair. En *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair* (pp. 3-33).

Curtis, M. W., & Russell, B. (2011). Micromechanical Regulation in Cardiac Myocytes and Fibroblasts: Implications for Tissue Remodeling. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 462(1), 105-117.

Dai, Z., Aoki, T., Fukumoto, Y., & Shimokawa, H. (2012). Coronary perivascular fibrosis is associated with impairment of

coronary blood flow in patients with non-ischemic heart failure. *Journal of Cardiology*, 60(5), 416-421.

Davis, G. E., Norden, P. R., & Bowers, S. L. K. (2015). Molecular Control of Capillary Morphogenesis and Maturation by Recognition and Remodeling of the Extracellular Matrix: Functional Roles of Endothelial Cells and Pericytes in Health and Disease. *Connective tissue research*, 56(5), 392-402.

Dégano, I. R., Elosua, R., & Marrugat, J. (2013). Epidemiology of acute coronary syndromes in Spain: Estimation of the number of cases and trends from 2005 to 2049. *Revista Espanola De Cardiologia (English Ed.)*, 66(6), 472-481.

DeLeon-Pennell, K. Y., Meschiari, C. A., Jung, M., & Lindsey, M. L. (2017). Matrix Metalloproteinases in Myocardial Infarction and Heart Failure. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 147, 75.

Dinh, W., Bansemir, L., Füh, R., Nickl, W., Stasch, J.-P., Coll-Barroso, M., Lapp, H., Bufe, A., Wolfertz, J., Scheffold, T., & Lankisch, M. (2009). Increased levels of laminin and collagen type VI may reflect early remodelling in patients with acute myocardial infarction. *Acta Cardiologica*, 64(3), 329-334.

Dobaczewski, M., Bujak, M., Zymek, P., Ren, G., Entman, M. L., & Frangogiannis, N. G. (2006). Extracellular matrix remodeling in canine and mouse myocardial infarcts. *Cell and Tissue Research*, 324(3), 475-488.

Dobaczewski, M., Gonzalez-Quesada, C., & Frangogiannis, N. G. (2010). The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 48(3), 504-511.

Dorn, C., Grunert, M., & Sperling, S. R. (2014). Application of high-throughput sequencing for studying genomic variations in congenital heart disease. *Briefings in Functional Genomics*, 13(1), 51-65.

Eicher, J. D., Wakabayashi, Y., Vitseva, O., Esa, N., Yang, Y., Zhu, J., Freedman, J. E., McManus, D. D., & Johnson, A. D. (2016). Characterization of the platelet transcriptome by RNA sequencing in patients with acute myocardial infarction. *Platelets*, 27(3), 230-239.

Elízaga Corrales, J. (1998). [Primary angioplasty is elective reperfusion therapy in the treatment of acute myocardial infarction. Arguments in favor]. *Revista Espanola De Cardiologia*, 51(12), 939-947.

Etoh, T., Joffs, C., Deschamps, A. M., Davis, J., Dowdy, K., Hendrick, J., Baicu, S., Mukherjee, R., Manhaini, M., & Spinale, F. G. (2001). Myocardial and interstitial matrix metalloproteinase activity after acute myocardial infarction in pigs. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 281(3), H987-994.

Fan, D., Takawale, A., Lee, J., & Kassiri, Z. (2012). Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Fibrogenesis & Tissue Repair*, 5(1), 15.

Ferreira-González, I. (2014). The epidemiology of coronary heart disease. *Revista Espanola De Cardiologia (English Ed.)*, 67(2), 139-144.

Francis Stuart, S. D., De Jesus, N. M., Lindsey, M. L., & Ripplinger, C. M. (2016). The crossroads of inflammation, fibrosis, and arrhythmia following myocardial infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 91, 114-122.

Frangogiannis, N. G. (2012). Matricellular proteins in cardiac adaptation and disease. *Physiological Reviews*, 92(2), 635-688.

Frangogiannis, N. G. (2014). The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. *Nature Reviews. Cardiology*, 11(5), 255-265.

Frangogiannis, N. G. (2015). Pathophysiology of Myocardial Infarction. *Comprehensive Physiology*, 5(4), 1841-1875.

Frangogiannis, N. G. (2017). The extracellular matrix in myocardial injury, repair, and remodeling. *The Journal of Clinical Investigation*, 127(5), 1600-1612.

Frangogiannis, N. G. (2019). The Extracellular Matrix in Ischemic and Nonischemic Heart Failure. *Circulation Research*, 125(1), 117-146.

Frangogiannis, N. G. (2020). Cardiac fibrosis. *Cardiovascular Research*, 117(6), 1450-1488.

Frangogiannis, N. G., Ren, G., Dewald, O., Zymek, P., Haudek, S., Koerting, A., Winkelmann, K., Michael, L. H., Lawler, J., & Entman, M. L. (2005). Critical role of endogenous thrombospondin-1 in preventing expansion of healing myocardial infarcts. *Circulation*, 111(22), 2935-2942.

Gaziano, T., Reddy, K. S., Paccaud, F., Horton, S., & Chaturvedi, V. (2006). Cardiovascular Disease. En *Disease Control Priorities in Developing Countries. 2nd edition*. The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank.

Ge, W.-H., Lin, Y., Li, S., Zong, X., & Ge, Z.-C. (2018). Identification of Biomarkers for Early Diagnosis of Acute Myocardial

Infarction. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(1), 650-658.

Gibson, U. E., Heid, C. A., & Williams, P. M. (1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research*, 6(10), 995-1001.

Goldsborough, E., Osuji, N., & Blaha, M. J. (2022). Assessment of Cardiovascular Disease Risk: A 2022 Update. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 51(3), 483-509.

González, A., Ravassa, S., Beaumont, J., López, B., & Díez, J. (2011). New targets to treat the structural remodeling of the myocardium. *Journal of the American College of Cardiology*, 58(18), 1833-1843.

Gravning, J., Ørn, S., Kaasbøll, O. J., Martinov, V. N., Manhenke, C., Dickstein, K., Edvardsen, T., Attramadal, H., & Ahmed, M. S. (2012). Myocardial Connective Tissue Growth Factor (CCN2/CTGF) Attenuates Left Ventricular Remodeling after Myocardial Infarction. *PLOS ONE*, 7(12), e52120.

Gulati, A., Jabbour, A., Ismail, T. F., Guha, K., Khwaja, J., Raza, S., Morarji, K., Brown, T. D. H., Ismail, N. A., Dweck, M. R., Di Pietro, E., Roughton, M., Wage, R., Daryani, Y., O'Hanlon, R., Sheppard, M. N., Alpendurada, F., Lyon, A. R., Cook, S. A., ... Prasad, S. K. (2013). Association of fibrosis with mortality and sudden cardiac death in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. *JAMA*, 309(9), 896-908.

Hammer-Hansen, S., Ugander, M., Hsu, L.-Y., Taylor, J., Thune, J. J., Køber, L., Kellman, P., & Arai, A. E. (2014). Distinction of salvaged and infarcted myocardium within the ischaemic area-at-risk with T2 mapping. *European Heart Journal Cardiovascular Imaging*, 15(9), 1048-1053.

Hansen, N. U. B., Genovese, F., Leeming, D. J., & Karsdal, M. A. (2015). The importance of extracellular matrix for cell function and in vivo likeness. *Experimental and Molecular Pathology*, 98(2), 286-294.

Hansen, N. U. B., Willumsen, N., Sand, J. M. B., Larsen, L., Karsdal, M. A., & Leeming, D. J. (2016). Type VIII collagen is elevated in diseases associated with angiogenesis and vascular remodeling. *Clinical Biochemistry*, 49(12), 903-908.

Hansson, G. K., Robertson, A.-K. L., & Söderberg-Nauclér, C. (2006). Inflammation and atherosclerosis. *Annual Review of Pathology*, 1, 297-329.

Hausenloy, D. J., Lim, M. X., Chan, M. H. H., Paradies, V., Francis, R., Kotecha, T., Knight, D. S., Fontana, M., Kellman, P., Moon, J. C., & Bulluck, H. (2019). Interrogation of the infarcted and salvaged myocardium using multi-parametric mapping cardiovascular magnetic resonance in reperfused ST-segment elevation myocardial infarction patients. *Scientific Reports*, 9, 9056.

Hausenloy, D. J., & Yellon, D. M. (2013). Myocardial ischemia-reperfusion injury: A neglected therapeutic target. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(1), 92-100.

Henney, A. M., Wakeley, P. R., Davies, M. J., Foster, K., Hembry, R., Murphy, G., & Humphries, S. (1991). Localization of stromelysin gene expression in atherosclerotic plaques by in situ hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(18), 8154-8158.

Hervas, A., Ruiz-Sauri, A., de Dios, E., Forteza, M. J., Minana, G., Nunez, J., Gomez, C., Bonanad, C., Perez-Sole, N., Gavara, J., Chorro, F. J., & Bodi, V. (2016). Inhomogeneity of collagen

organization within the fibrotic scar after myocardial infarction: Results in a swine model and in human samples. *Journal of Anatomy*, 228(1), 47-58.

Hesse, J., Owenier, C., Lautwein, T., Zalfen, R., Weber, J. F., Ding, Z., Alter, C., Lang, A., Grandoch, M., Gerdes, N., Fischer, J. W., Klau, G. W., Dieterich, C., Köhrer, K., & Schrader, J. (2021). Single-cell transcriptomics defines heterogeneity of epicardial cells and fibroblasts within the infarcted murine heart. *eLife*, 10, e65921.

Heusch, G. (2020). Myocardial ischaemia–reperfusion injury and cardioprotection in perspective. *Nature Reviews Cardiology*, 17(12), Article 12.

Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., & Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/Technology (Nature Publishing Company)*, 10(4), 413-417.

Hinz, B. (2007). Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *The Journal of Investigative Dermatology*, 127(3), 526-537.

Hussen, B. M., Abdullah, S. T., Salihi, A., Sabir, D. K., Sidiq, K. R., Rasul, M. F., Hidayat, H. J., Ghafouri-Fard, S., Taheri, M., & Jamali, E. (2022). The emerging roles of NGS in clinical oncology and personalized medicine. *Pathology, Research and Practice*, 230, 153760.

Ibáñez, B., Heusch, G., Ovize, M., & Van de Werf, F. (2015). Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury. *Journal of the American College of Cardiology*, 65(14), 1454-1471.

Isobe, K., Kuba, K., Maejima, Y., Suzuki, J.-I., Kubota, S., & Isobe, M. (2010). Inhibition of endostatin/collagen XVIII deteriorates

left ventricular remodeling and heart failure in rat myocardial infarction model. *Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society*, 74(1), 109-119.

Iyer, R. P., Jung, M., & Lindsey, M. L. (2016). MMP-9 signaling in the left ventricle following myocardial infarction. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 311(1), H190-H198.

Jennings, R. B., Sommers, H. M., Smyth, G. A., Flack, H. A., & Linn, H. (1960). Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Archives of Pathology*, 70, 68-78.

Jeon, Y., Jeon, S., Choi, W.-H., An, K., Choi, H., Kim, B.-C., Kim, W., Lee, S. Y., Bae, J.-W., Hwang, J.-Y., Kang, M. G., Kim, Y., Kang, Y., Kim, Y. J., Kim, B. C., Bhak, J., & Shin, E.-S. (2023). Genome-wide analyses of early-onset acute myocardial infarction identify 29 novel loci by whole genome sequencing. *Human Genetics*, 142(2), 231-243.

Joshi, P. H., & de Lemos, J. A. (2021). Diagnosis and Management of Stable Angina: A Review. *JAMA*, 325(17), 1765-1778.

Jugdutt, B. I. (2003). Remodeling of the myocardium and potential targets in the collagen degradation and synthesis pathways. *Current Drug Targets. Cardiovascular & Haematological Disorders*, 3(1), 1-30.

Kalman, J. M., Kumar, S., & Sanders, P. (2012). Markers of collagen synthesis, atrial fibrosis, and the mechanisms underlying atrial fibrillation. *Journal of the American College of Cardiology*, 60(18), 1807-1808.

Kaminski, A. R., Moore, E. T., Daseke, M. J., Valerio, F. M., Flynn, E. R., & Lindsey, M. L. (2020). The compendium of matrix

metalloproteinase expression in the left ventricle of mice following myocardial infarction. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 318(3), H706-H714.

Kanuri, S. H., Ipe, J., Kassab, K., Gao, H., Liu, Y., Skaar, T. C., & Kreutz, R. P. (2018). Next generation MicroRNA sequencing to identify coronary artery disease patients at risk of recurrent myocardial infarction. *Atherosclerosis*, 278, 232-239.

Karve, A. M., Bossone, E., & Mehta, R. H. (2007). Acute ST-Segment Elevation Myocardial Infarction: Critical Care Perspective. *Critical Care Clinics*, 23(4), 685-707.

Kassiri, Z., & Khokha, R. (2005). Myocardial extra-cellular matrix and its regulation by metalloproteinases and their inhibitors. *Thrombosis and Haemostasis*, 93(2), 212-219.

Keene, D. R., Engvall, E., & Glanville, R. W. (1988). Ultrastructure of type VI collagen in human skin and cartilage suggests an anchoring function for this filamentous network. *The Journal of Cell Biology*, 107(5), 1995-2006.

Khan, R., & Sheppard, R. (2006). Fibrosis in heart disease: Understanding the role of transforming growth factor-beta in cardiomyopathy, valvular disease and arrhythmia. *Immunology*, 118(1), 10-24.

Khawaja, M., Siddiqui, R., Virani, S. S., Amos, C. I., Bandyopadhyay, D., Virk, H. U. H., Alam, M., Jneid, H., & Krittanawong, C. (2023). Integrative Genetic Approach Facilitates Precision Strategies for Acute Myocardial Infarction. *Genes*, 14(7), 1340.

Khera, A. V., Chaffin, M., Zekavat, S. M., Collins, R. L., Roselli,

C., Natarajan, P., Lichtman, J. H., D'Onofrio, G., Mattera, J., Dreyer, R., Spertus, J. A., Taylor, K. D., Psaty, B. M., Rich, S. S., Post, W., Gupta, N., Gabriel, S., Lander, E., Ida Chen, Y.-D., ... Kathiresan, S. (2019). Whole-Genome Sequencing to Characterize Monogenic and Polygenic Contributions in Patients Hospitalized With Early-Onset Myocardial Infarction. *Circulation*, 139(13), 1593-1602.

Kielty, C. M., Sherratt, M. J., & Shuttleworth, C. A. (2002). Elastic fibres. *Journal of Cell Science*, 115(Pt 14), 2817-2828.

Kloner, R. A., & Jennings, R. B. (2001a). Consequences of Brief Ischemia: Stunning, Preconditioning, and Their Clinical Implications. *Circulation*, 104(24), 2981-2989.

Kloner, R. A., & Jennings, R. B. (2001b). Consequences of brief ischemia: Stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 2. *Circulation*, 104(25), 3158-3167.

Knuuti, J., Wijns, W., Saraste, A., Capodanno, D., Barbato, E., Funck-Brentano, C., Prescott, E., Storey, R. F., Deaton, C., Cuisset, T., Agewall, S., Dickstein, K., Edvardsen, T., Escaned, J., Gersh, B. J., Svitil, P., Gilard, M., Hasdai, D., Hatala, R., ... ESC Scientific Document Group. (2020). 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes. *European Heart Journal*, 41(3), 407-477.

Kontou, P., Pavlopoulou, A., Braliou, G., Bogiatzi, S., Dimou, N., Bangalore, S., & Bagos, P. (2018). Identification of gene expression profiles in myocardial infarction: A systematic review and meta-analysis. *BMC Medical Genomics*, 11(1), 109.

Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., & Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain

reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2-3), 95-125.

Lauten, A., Gerhard-Garcia, A., Suhr, F., Fischer, J. H., Figulla, H. R., & Bloch, W. (2014). Impact of Ischemia-Reperfusion on Extracellular Matrix Processing and Structure of the Basement Membrane of the Heart. *PLOS ONE*, 9(3), e92833.

Lauten, A., Majos, E., Mühlich, A., Wahlers, T., Weider, S., Fischer, J. H., Figulla, H. R., & Bloch, W. (2009). Ischemia-reperfusion injury activates early extracellular matrix processing and expression of endostatin in the heart with differential effects of temperature. *Basic Research in Cardiology*, 104(5), 559-569.

Leonard, B. L., Smaill, B. H., & LeGrice, I. J. (2012). Structural remodeling and mechanical function in heart failure. *Microscopy and Microanalysis: The Official Journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada*, 18(1), 50-67.

Li, L., Zhao, Q., & Kong, W. (2018). Extracellular matrix remodeling and cardiac fibrosis. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 68-69, 490-506.

Li, S.-H., Sun, Z., Guo, L., Han, M., Wood, M. F. G., Ghosh, N., Vitkin, I. A., Weisel, R. D., & Li, R.-K. (2012). Elastin overexpression by cell-based gene therapy preserves matrix and prevents cardiac dilation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 16(10), 2429-2439.

Li, Z., Solomonidis, E. G., Meloni, M., Taylor, R. S., Duffin, R., Dobie, R., Magalhaes, M. S., Henderson, B. E. P., Louwe, P. A., D'Amico, G., Hodivala-Dilke, K. M., Shah, A. M., Mills, N. L., Simons, B. D., Gray, G. A., Henderson, N. C., Baker, A. H., & Brittan, M. (2019). Single-cell transcriptome analyses reveal novel targets

modulating cardiac neovascularization by resident endothelial cells following myocardial infarction. *European Heart Journal*, 40(30), 2507-2520.

Libby, P. (1995). Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation*, 91(11), 2844-2850.

Libby, P., Pasterkamp, G., Crea, F., & Jang, I.-K. (2019). Reassessing the Mechanisms of Acute Coronary Syndromes. *Circulation Research*, 124(1), 150-160.

Lindsey, M. L. (2018). Assigning matrix metalloproteinase roles in ischaemic cardiac remodelling. *Nature Reviews. Cardiology*, 15(8), 471-479.

Lindsey, M. L., Yoshioka, J., MacGillivray, C., Muangman, S., Gannon, J., Verghese, A., Aikawa, M., Libby, P., Krane, S. M., & Lee, R. T. (2003). Effect of a Cleavage-Resistant Collagen Mutation on Left Ventricular Remodeling. *Circulation Research*, 93(3), 238-245.

Luther, D. J., Thodeti, C. K., Shamhart, P. E., Adapala, R. K., Hodnichak, C., Weihrauch, D., Bonaldo, P., Chilian, W. M., & Meszaros, J. G. (2012). Absence of type VI collagen paradoxically improves cardiac function, structure, and remodeling after myocardial infarction. *Circulation Research*, 110(6), 851-856.

Ma, Y., de Castro Brás, L. E., Toba, H., Iyer, R. P., Hall, M. E., Winniford, M. D., Lange, R. A., Tyagi, S. C., & Lindsey, M. L. (2014). Myofibroblasts and the extracellular matrix network in post-myocardial infarction cardiac remodeling. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, 466(6), 1113-1127.

Ma, Y., Halade, G. V., Zhang, J., Ramirez, T. A., Levin, D., Voorhees, A., Jin, Y.-F., Han, H.-C., Manicone, A. M., & Lindsey, M. L.

(2013). Matrix Metalloproteinase-28 Deletion Exacerbates Cardiac Dysfunction and Rupture After Myocardial Infarction in Mice by Inhibiting M2 Macrophage Activation. *Circulation Research*, 112(4), 675-688.

Malemud, C. J. (2019). Inhibition of MMPs and ADAM/ADAMTS. *Biochemical Pharmacology*, 165, 33-40.

Mao, Y., & Schwarzbauer, J. E. (2005). Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 24(6), 389-399.

Marro, J., Pfefferli, C., de Preux Charles, A.-S., Bise, T., & Jaźwińska, A. (2016). Collagen XII Contributes to Epicardial and Connective Tissues in the Zebrafish Heart during Ontogenesis and Regeneration. *PLoS ONE*, 11(10), e0165497.

Martino, M. M., Briquez, P. S., Ranga, A., Lutolf, M. P., & Hubbell, J. A. (2013). Heparin-binding domain of fibrin(ogen) binds growth factors and promotes tissue repair when incorporated within a synthetic matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(12), 4563-4568.

Medugorac, I., & Jacob, R. (1983). Characterisation of left ventricular collagen in the rat. *Cardiovascular Research*, 17(1), 15-21.

Melas, M., Beltsios, E. T., Adamou, A., Koumarelas, K., & McBride, K. L. (2022). Molecular Diagnosis of Hypertrophic Cardiomyopathy (HCM): In the Heart of Cardiac Disease. *Journal of Clinical Medicine*, 12(1), 225.

Meng, Q., Sun, Z., Gu, H., Luo, J., Wang, J., Wang, C., & Han, S. (2019). Expression profiles of long noncoding RNAs and

messenger RNAs in the border zone of myocardial infarction in rats. *Cellular & molecular biology letters*, 24, 63.

Mizuno, T., Yau, T. M., Weisel, R. D., Kiani, C. G., & Li, R.-K. (2005). Elastin stabilizes an infarct and preserves ventricular function. *Circulation*, 112(9 Suppl), I81-88.

Mohabeer, A. L., Kroetsch, J. T., McFadden, M., Khosraviani, N., Broekelmann, T. J., Hou, G., Zhang, H., Zhou, Y.-Q., Wang, M., Gramolini, A. O., Mecham, R. P., Heximer, S. P., Bolz, S.-S., & Bendeck, M. P. (2021). Deletion of type VIII collagen reduces blood pressure, increases carotid artery functional distensibility and promotes elastin deposition. *Matrix Biology Plus*, 12, 100085.

Moraes-Silva, I. C., Rodrigues, B., Coelho-Junior, H. J., Feriani, D. J., & Irigoyen, M.-C. (2017). Myocardial Infarction and Exercise Training: Evidence from Basic Science. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 999, 139-153.

Moreno, P. R., Falk, E., Palacios, I. F., Newell, J. B., Fuster, V., & Fallon, J. T. (1994). Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture. *Circulation*, 90(2), 775-778.

Motley, M. P., Madsen, D. H., Jürgensen, H. J., Spencer, D. E., Szabo, R., Holmbeck, K., Flick, M. J., Lawrence, D. A., Castellino, F. J., Weigert, R., & Bugge, T. H. (2016). A CCR2 macrophage endocytic pathway mediates extravascular fibrin clearance in vivo. *Blood*, 127(9), 1085-1096.

Mouton, A. J., Rivera, O. J., & Lindsey, M. L. (2018). Myocardial infarction remodeling that progresses to heart failure: A signaling misunderstanding. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 315(1), H71-H79.

Mujalli, A., Banaganapalli, B., Alrayes, N. M., Shaik, N. A., Elango, R., & Al-Aama, J. Y. (2020). Myocardial infarction biomarker discovery with integrated gene expression, pathways and biological networks analysis. *Genomics*, 112(6), 5072-5085.

Murdock, D. R., Dai, H., Burrage, L. C., Rosenfeld, J. A., Ketkar, S., Müller, M. F., Yépez, V. A., Gagneur, J., Liu, P., Chen, S., Jain, M., Zapata, G., Bacino, C. A., Chao, H.-T., Moretti, P., Craigen, W. J., Hanchard, N. A., Undiagnosed Diseases Network, & Lee, B. (2021). Transcriptome-directed analysis for Mendelian disease diagnosis overcomes limitations of conventional genomic testing. *The Journal of Clinical Investigation*, 131(1), e141500, 141500.

Murphy-Ullrich, J. E. (2001). The de-adhesive activity of matricellular proteins: Is intermediate cell adhesion an adaptive state? *Journal of Clinical Investigation*, 107(7), 785-790.

Murry, C. E., Giachelli, C. M., Schwartz, S. M., & Vracko, R. (1994). Macrophages express osteopontin during repair of myocardial necrosis. *The American Journal of Pathology*, 145(6), 1450-1462.

Naugle, J. E., Olson, E. R., Zhang, X., Mase, S. E., Pilati, C. F., Maron, M. B., Folkesson, H. G., Horne, W. I., Doane, K. J., & Meszaros, J. G. (2006). Type VI collagen induces cardiac myofibroblast differentiation: Implications for postinfarction remodeling. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 290(1), H323-330.

Nepper-Christensen, L., Lønborg, J., Høfsten, D. E., Ahtarovski, K. A., Bang, L. E., Helqvist, S., Kyhl, K., Køber, L., Kelbæk, H., Vejlstrup, N., Holmvang, L., & Engstrøm, T. (2018). Benefit From Reperfusion With Primary Percutaneous Coronary Intervention Beyond 12 Hours of Symptom Duration in Patients With ST-Segment-

Elevation Myocardial Infarction. *Circulation. Cardiovascular Interventions*, 11(9), e006842.

Nichols, M., Townsend, N., Scarborough, P., & Rayner, M. (2014). Cardiovascular disease in Europe 2014: Epidemiological update. *European Heart Journal*, 35(42), 2950-2959.

Nielsen, S. H., Mouton, A. J., DeLeon-Pennell, K. Y., Genovese, F., Karsdal, M., & Lindsey, M. L. (2019). Understanding cardiac extracellular matrix remodeling to develop biomarkers of myocardial infarction outcomes. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 75-76, 43-57.

Nissen, N. I., Kehlet, S., Johansen, A. Z., Chen, I. M., Karsdal, M., Johansen, J. S., Diab, H. M. H., Jørgensen, L. N., Sun, S., Manon-Jensen, T., He, Y., Langholm, L., & Willumsen, N. (2021). Noninvasive prognostic biomarker potential of quantifying the propeptides of Type XI collagen alpha-1 chain (PRO-C11) in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *International Journal of Cancer*, 149(1), 228-238.

Ong, S.-B., Hernández-Reséndiz, S., Crespo-Avilan, G. E., Mukhametshina, R. T., Kwek, X.-Y., Cabrera-Fuentes, H. A., & Hausenloy, D. J. (2018). Inflammation following acute myocardial infarction: Multiple players, dynamic roles, and novel therapeutic opportunities. *Pharmacology & Therapeutics*, 186, 73-87.

Orem, C., Celik, S., Orem, A., Calapoğlu, M., & Erdöl, C. (2002). Increased plasma fibronectin levels in patients with acute myocardial infarction complicated with left ventricular thrombus. *Thrombosis Research*, 105(1), 37-41.

Ortega, M., Ríos-Navarro, C., Gavara, J., de Dios, E., Perez-Solé, N., Marcos-Garcés, V., Ferrández-Izquierdo, A., Bodí, V., &

Ruiz-Saurí, A. (2022). Meta-Analysis of Extracellular Matrix Dynamics after Myocardial Infarction Using RNA-Sequencing Transcriptomic Database. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(24), 15615.

Ortega, M.; Fábrega-García, M.M.; Molina-García, T.; Gavara, J.; de Dios, E.; Pérez-Solé, N.; Marcos-Garcés, V.; Padilla-Esquivel, J.J.; Díaz, A.; Martínez-Dolz, L.; et al (2024). Novel Fibrillar and Non-Fibrillar Collagens Involved in Fibrotic Scar Formation after Myocardial Infarction. *International Journal of Molecular Sciences.*, 25, 6625.

Ouwehand, W. H. & Bloodomics and Cardiogenics Consortia. (2009). The discovery of genes implicated in myocardial infarction. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, 7 Suppl 1, 305-307.

Paik, D. T., Tian, L., Williams, I. M., Rhee, S., Zhang, H., Liu, C., Mishra, R., Wu, S. M., Red-Horse, K., & Wu, J. C. (2020). Single-Cell RNA Sequencing Unveils Unique Transcriptomic Signatures of Organ-Specific Endothelial Cells. *Circulation*, 142(19), 1848-1862.

Pan, H., Xue, C., Auerbach, B. J., Fan, J., Bashore, A. C., Cui, J., Yang, D. Y., Trignano, S. B., Liu, W., Shi, J., Ihuegbu, C. O., Bush, E. C., Worley, J., Vlahos, L., Laise, P., Solomon, R. A., Connolly, E. S., Califano, A., Sims, P. A., Reilly, M. P. (2020). Single-Cell Genomics Reveals a Novel Cell State During Smooth Muscle Cell Phenotypic Switching and Potential Therapeutic Targets for Atherosclerosis in Mouse and Human. *Circulation*, 142(21), 2060-2075.

Panchal, V. R., Rehman, J., Nguyen, A. T., Brown, J. W., Turrentine, M. W., Mahomed, Y., & March, K. L. (2004). Reduced pericardial levels of endostatin correlate with collateral development in patients with ischemic heart disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 43(8), 1383-1387.

Pennell, D. (2006). Myocardial salvage: Retrospection, resolution, and radio waves. *Circulation*, 113(15), 1821-1823.

Pinto, A. R. (2021). Matricellular Proteins As Critical Regulators of Fibrosis. *Circulation Research*, 129(11), 1036-1038.

Pomin, V. H., & Mulloy, B. (2018). Glycosaminoglycans and Proteoglycans. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 11(1), 27.

Ponnusamy, M., Liu, F., Zhang, Y.-H., Li, R.-B., Zhai, M., Liu, F., Zhou, L.-Y., Liu, C.-Y., Yan, K.-W., Dong, Y.-H., Wang, M., Qian, L.-L., Shan, C., Xu, S., Wang, Q., Zhang, Y.-H., Li, P.-F., Zhang, J., & Wang, K. (2019). Long Noncoding RNA CPR (Cardiomyocyte Proliferation Regulator) Regulates Cardiomyocyte Proliferation and Cardiac Repair. *Circulation*, 139(23), 2668-2684.

Pozzi, A., Yurchenco, P. D., & Iozzo, R. V. (2017). The nature and biology of basement membranes. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 57-58, 1-11.

Prabhu, S. D., & Frangogiannis, N. G. (2016). The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circulation Research*, 119(1), 91-112.

Qiao, F., Hu, P., & Xu, Z. (2019). Application of next-generation sequencing for the diagnosis of fetuses with congenital heart defects. *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*, 31(2), 132-138.

Qiu, L., & Liu, X. (2019). Identification of key genes involved in myocardial infarction. *European Journal of Medical Research*, 24(1), 22.

Reed, G. W., Rossi, J. E., & Cannon, C. P. (2017). Acute myocardial infarction. *The Lancet*, 389(10065), 197-210.

Reimer, K. A., Lowe, J. E., Rasmussen, M. M., & Jennings, R. B. (1977). The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation*, 56(5), 786-794.

Ren, G., Michael, L. H., Entman, M. L., & Frangogiannis, N. G. (2002). Morphological characteristics of the microvasculature in healing myocardial infarcts. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 50(1), 71-79.

Rentrop, K. P., & Feit, F. (2015). Reperfusion therapy for acute myocardial infarction: Concepts and controversies from inception to acceptance. *American Heart Journal*, 170(5), 971-980.

Richardson, P. D., Davies, M. J., & Born, G. V. (1989). Influence of plaque configuration and stress distribution on fissuring of coronary atherosclerotic plaques. *Lancet (London, England)*, 2(8669), 941-944.

Rios-Navarro, C., Ortega, M., Marcos-Garcés, V., Gavara, J., de Dios, E., Perez-Sole, N., Chorro, F. J., Bodi, V., & Ruiz-Sauri, A. (2020). Interstitial changes after reperfused myocardial infarction in swine: Morphometric and genetic analysis. *BMC Veterinary Research*, 16(1), 262.

Rivera, L. B., & Brekken, R. A. (2011). SPARC promotes pericyte recruitment via inhibition of endoglin-dependent TGF- β 1 activity. *The Journal of Cell Biology*, 193(7), 1305-1319.

Roth, G. A., Mensah, G. A., Johnson, C. O., Addolorato, G., Ammirati, E., Baddour, L. M., Barengo, N. C., Beaton, A. Z., Benjamin, E. J., Benziger, C. P., Bonny, A., Brauer, M., Brodmann, M., Cahill, T. J., Carapetis, J., Catapano, A. L., Chugh, S. S., Cooper, L. T., Coresh,

J., ... GBD-NHLBI-JACC Global Burden of Cardiovascular Diseases Writing Group. (2020). Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update From the GBD 2019 Study. *Journal of the American College of Cardiology*, 76(25), 2982-3021.

Roubille, F., Bouabdallaoui, N., Kouz, S., Waters, D. D., Diaz, R., Maggioni, A. P., Pinto, F. J., Grégoire, J. C., Gamra, H., Kiwan, G. S., Berry, C., López-Sendón, J., Koenig, W., Delorme, L., Elbaz, M., Coste, P., Provencher, M., Bassevitch, Z., Blondeau, L., ... Tardif, J.-C. (2024). Low-Dose Colchicine in Patients With Type 2 Diabetes and Recent Myocardial Infarction in the Colchicine Cardiovascular Outcomes Trial (COLCOT). *Diabetes Care*, 47(3), 467-470.

Ruff, C. T., & Braunwald, E. (2011). The evolving epidemiology of acute coronary syndromes. *Nature Reviews. Cardiology*, 8(3), 140-147.

Ruiz-Villalba, A., Romero, J. P., Hernández, S. C., Vilas-Zornoza, A., Fortelny, N., Castro-Labrador, L., San Martin-Uriz, P., Lorenzo-Vivas, E., García-Olloqui, P., Palacio, M., Gavira, J. J., Bastarrika, G., Janssens, S., Wu, M., Iglesias, E., Abizanda, G., de Morentin, X. M., Lasaga, M., Planell, N., ... Prósper, F. (2020). Single-Cell RNA Sequencing Analysis Reveals a Crucial Role for CTHRC1 (Collagen Triple Helix Repeat Containing 1) Cardiac Fibroblasts After Myocardial Infarction. *Circulation*, 142(19), 1831-1847.

Sadanandan, S., & Hochman, J. S. (2000). Early reperfusion, late reperfusion, and the open artery hypothesis: An overview. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 42(6), 397-404.

Sager, H. B., Hulsmans, M., Lavine, K. J., Moreira, M. B., Heidt, T., Courties, G., Sun, Y., Iwamoto, Y., Tricot, B., Khan, O. F., Dahlman, J. E., Borodovsky, A., Fitzgerald, K., Anderson, D. G.,

Weissleder, R., Libby, P., Swirski, F. K., & Nahrendorf, M. (2016). Proliferation and Recruitment Contribute to Myocardial Macrophage Expansion in Chronic Heart Failure. *Circulation Research*, 119(7), 853-864.

Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science (New York, N.Y.)*, 230(4732), 1350-1354.

Salari, N., Morddarvanjoghi, F., Abdolmaleki, A., Rasoulpoor, S., Khaleghi, A. A., Hezarkhani, L. A., Shohaimi, S., & Mohammadi, M. (2023). The global prevalence of myocardial infarction: A systematic review and meta-analysis. *BMC Cardiovascular Disorders*, 23(1), 206.

Schäfer, B. M., Maier, K., Eickhoff, U., Todd, R. F., & Kramer, M. D. (1994). Plasminogen activation in healing human wounds. *The American Journal of Pathology*, 144(6), 1269-1280.

Schelbert, E. B., Fonarow, G. C., Bonow, R. O., Butler, J., & Gheorghiade, M. (2014). Therapeutic targets in heart failure: Refocusing on the myocardial interstitium. *Journal of the American College of Cardiology*, 63(21), 2188-2198.

Schönborn, K., Willenborg, S., Schulz, J.-N., Imhof, T., Eming, S. A., Quondamatteo, F., Brinckmann, J., Niehoff, A., Paulsson, M., Koch, M., Eckes, B., & Krieg, T. (2020). Role of collagen XII in skin homeostasis and repair. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 94, 57-76.

Schuster, S. C. (2008). Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nature Methods*, 5(1), 16-18.

Shamhart, P. E., & Meszaros, J. G. (2010). Non-fibrillar collagens: Key mediators of post-infarction cardiac remodeling? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 48(3), 530-537.

Skrbic, B., Engebretsen, K. V. T., Strand, M. E., Lunde, I. G., Herum, K. M., Marstein, H. S., Sjaastad, I., Lunde, P. K., Carlson, C. R., Christensen, G., Bjørnstad, J. L., & Tønnessen, T. (2015). Lack of collagen VIII reduces fibrosis and promotes early mortality and cardiac dilatation in pressure overload in mice. *Cardiovascular Research*, 106(1), 32-42.

Smith-Mungo, L. I., & Kagan, H. M. (1998). Lysyl oxidase: Properties, regulation and multiple functions in biology. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 16(7), 387-398.

Song, Z., Gao, P., Zhong, X., Li, M., Wang, M., & Song, X. (2022). Identification of Five Hub Genes Based on Single-Cell RNA Sequencing Data and Network Pharmacology in Patients With Acute Myocardial Infarction. *Frontiers in Public Health*, 10, 894129.

Stacey, R. B., & Hundley, W. G. (2021). Integrating Measures of Myocardial Fibrosis in the Transition from Hypertensive Heart Disease to Heart Failure. *Current Hypertension Reports*, 23(4), 22.

Stiermaier, T., Eitel, I., de Waha, S., Pöss, J., Fuernau, G., Thiele, H., & Desch, S. (2017). Myocardial salvage after primary percutaneous coronary intervention in patients with ST-elevation myocardial infarction presenting early versus late after symptom onset. *The International Journal of Cardiovascular Imaging*, 33(10), 1571-1579.

Takemura, G., Ohno, M., Hayakawa, Y., Misao, J., Kanoh, M., Ohno, A., Uno, Y., Minatoguchi, S., Fujiwara, T., & Fujiwara, H. (1998). Role of apoptosis in the disappearance of infiltrated and

proliferated interstitial cells after myocardial infarction. *Circulation Research*, 82(11), 1130-1138.

Tallquist, M. D. (2020). Cardiac Fibroblast Diversity. *Annual Review of Physiology*, 82, 63-78.

Talman, V., & Ruskoaho, H. (2016). Cardiac fibrosis in myocardial infarction-from repair and remodeling to regeneration. *Cell and Tissue Research*, 365(3), 563-581.

Taylor, K. R., Trowbridge, J. M., Rudisill, J. A., Termeer, C. C., Simon, J. C., & Gallo, R. L. (2004). Hyaluronan fragments stimulate endothelial recognition of injury through TLR4. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(17), 17079-17084.

Tian, M., Yuan, Y.-C., Li, J.-Y., Gionfriddo, M. R., & Huang, R.-C. (2015). Tumor necrosis factor- α and its role as a mediator in myocardial infarction: A brief review. *Chronic Diseases and Translational Medicine*, 1(1), 18-26.

Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., & Brown, R. A. (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 3(5), 349-363.

Townsend, N., Kazakiewicz, D., Lucy Wright, F., Timmis, A., Huculeci, R., Torbica, A., Gale, C. P., Achenbach, S., Weidinger, F., & Vardas, P. (2022). Epidemiology of cardiovascular disease in Europe. *Nature Reviews. Cardiology*, 19(2), 133-143.

Trial, J., Baughn, R. E., Wygant, J. N., McIntyre, B. W., Birdsall, H. H., Youker, K. A., Evans, A., Entman, M. L., & Rossen, R. D. (1999). Fibronectin fragments modulate monocyte VLA-5 expression and monocyte migration. *Journal of Clinical Investigation*, 104(4), 419-

430.

Tzortzaki, E. G., Tischfield, J. A., Sahota, A., Siafakas, N. M., Gordon, M. K., & Gerecke, D. R. (2003). Expression of FACIT collagens XII and XIV during bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *The Anatomical Record. Part A, Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, 275(2), 1073-1080.

Ulrich, M. M., Janssen, A. M., Daemen, M. J., Rappaport, L., Samuel, J. L., Contard, F., Smits, J. F., & Cleutjens, J. P. (1997). Increased expression of fibronectin isoforms after myocardial infarction in rats. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 29(9), 2533-2543.

Valgimigli, M., & Biscaglia, S. (2014). Stable Angina Pectoris. *Current Atherosclerosis Reports*, 16(7), 422.

Valiente-Alandi, I., Schafer, A. E., & Blaxall, B. C. (2016). Extracellular matrix-mediated cellular communication in the heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 91, 228-237.

van den Berg, N. W. E., Neefs, J., Kawasaki, M., Nariswari, F. A., Wesselink, R., Fabrizi, B., Jongejan, A., Klaver, M. N., Havenaar, H., Hulsman, E. L., Wintgens, L. I. S., Baalman, S. W. E., Meulendijks, E. R., van Boven, W. J., de Jong, J. S. S. G., van Putte, B. P., Driessen, A. H. G., Boersma, L. V. A., de Groot, J. R., & PREDICT-AF Investigators. (2021). Extracellular matrix remodeling precedes atrial fibrillation: Results of the PREDICT-AF trial. *Heart Rhythm*, 18(12), 2115-2125.

van den Borne, S. W. M., Diez, J., Blankesteyn, W. M., Verjans, J., Hofstra, L., & Narula, J. (2010). Myocardial remodeling after infarction: The role of myofibroblasts. *Nature Reviews. Cardiology*, 7(1), 30-37.

van Dijk, E. L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y., & Thermes, C. (2014). Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in Genetics: TIG*, 30(9), 418-426.

Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P., Ballew, R. M., Huson, D. H., Wortman, J. R., Zhang, Q., Kodira, C. D., Zheng, X. H., Chen, L., ... Zhu, X. (2001). The sequence of the human genome. *Science (New York, N.Y.)*, 291(5507), 1304-1351.

Vergallo, R., & Crea, F. (2020). Atherosclerotic Plaque Healing. *New England Journal of Medicine*, 383(9), 846-857.

Verma, S., Fedak, P. W. M., Weisel, R. D., Butany, J., Rao, V., Maitland, A., Li, R.-K., Dhillon, B., & Yau, T. M. (2002). Fundamentals of reperfusion injury for the clinical cardiologist. *Circulation*, 105(20), 2332-2336.

Villarreal, F., Omens, J., Dillmann, W., Risteli, J., Nguyen, J., & Covell, J. (2004). Early degradation and serum appearance of type I collagen fragments after myocardial infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 36(4), 597-601.

Virani, S. S., Alonso, A., Benjamin, E. J., Bittencourt, M. S., Callaway, C. W., Carson, A. P., Chamberlain, A. M., Chang, A. R., Cheng, S., Delling, F. N., Djousse, L., Elkind, M. S. V., Ferguson, J. F., Fornage, M., Khan, S. S., Kissela, B. M., Knutson, K. L., Kwan, T. W., Lackland, D. T., ... American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. (2020). Heart Disease and Stroke Statistics-2020 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, 141(9), e139-e596.

Vogel, B., Claessen, B. E., Arnold, S. V., Chan, D., Cohen, D. J., Giannitsis, E., Gibson, C. M., Goto, S., Katus, H. A., Kerneis, M., Kimura, T., Kunadian, V., Pinto, D. S., Shiomi, H., Spertus, J. A., Steg, P. G., & Mehran, R. (2019). ST-segment elevation myocardial infarction. *Nature Reviews. Disease Primers*, 5(1), 39.

Wang, L., Yuan, W., & Huang, J. (2021). Identification of Myocardial Infarction-Associated Genes Using Integrative microRNA-Gene Expression Network Analysis. *DNA and Cell Biology*, 40(2), 348-358.

Wang, W., Sawicki, G., & Schulz, R. (2002). Peroxynitrite-induced myocardial injury is mediated through matrix metalloproteinase-2. *Cardiovascular Research*, 53(1), 165-174.

Weber, K. T. (1989). Cardiac interstitium in health and disease: The fibrillar collagen network. *Journal of the American College of Cardiology*, 13(7), 1637-1652.

Weber, K. T., Sun, Y., Bhattacharya, S. K., Ahokas, R. A., & Gerling, I. C. (2013). Myofibroblast-mediated mechanisms of pathological remodelling of the heart. *Nature Reviews. Cardiology*, 10(1), 15-26.

Welgus, H. G., Campbell, E. J., Cury, J. D., Eisen, A. Z., Senior, R. M., Wilhelm, S. M., & Goldberg, G. I. (1990). Neutral metalloproteinases produced by human mononuclear phagocytes. Enzyme profile, regulation, and expression during cellular development. *The Journal of Clinical Investigation*, 86(5), 1496-1502.

Wells, J. M., Gaggar, A., & Blalock, J. E. (2015). MMP generated matrikines. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 44-46, 122-129.

Wenstrup, R. J., Florer, J. B., Davidson, J. M., Phillips, C. L., Pfeiffer, B. J., Menezes, D. W., Chervoneva, I., & Birk, D. E. (2006). Murine model of the Ehlers-Danlos syndrome. Col5a1 haploinsufficiency disrupts collagen fibril assembly at multiple stages. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(18), 12888-12895.

White, J. M. (2003). ADAMs: Modulators of cell-cell and cell-matrix interactions. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(5), 598-606.

Whittaker, P., Boughner, D. R., & Kloner, R. A. (1991). Role of collagen in acute myocardial infarct expansion. *Circulation*, 84(5), 2123-2134.

Wilcox, J. E., & Hershberger, R. E. (2018). Genetic cardiomyopathies. *Current Opinion in Cardiology*, 33(3), 354-362.

Willems, I. E., Arends, J. W., & Daemen, M. J. (1996). Tenascin and fibronectin expression in healing human myocardial scars. *The Journal of Pathology*, 179(3), 321-325.

World Health Organization. (2002). *Integrated management of cardiovascular risk: Report of a WHO meeting, Geneva, 9 - 12 July 2002*. Meeting Integrated Management of Cardiovascular Risk, Geneva. World Health Organization.

Yamanishi, A., Kusachi, S., Nakahama, M., Ninomiya, Y., Watanabe, T., Kumashiro, H., Nunoyama, H., Kondo, J., Naito, I., & Tsuji, T. (1998). Sequential changes in the localization of the type IV collagen alpha chain in the infarct zone: Immunohistochemical study of experimental myocardial infarction in the rat. *Pathology, Research and Practice*, 194(6), 413-422.

Yan, X., Anzai, A., Katsumata, Y., Matsushashi, T., Ito, K., Endo, J., Yamamoto, T., Takeshima, A., Shinmura, K., Shen, W., Fukuda,

K., & Sano, M. (2013). Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 62, 24-35.

Yang, E. Y., Khan, M. A., Graviss, E. A., Nguyen, D. T., Bhimaraj, A., Nambi, V., Hoogeveen, R. C., Ballantyne, C. M., Zoghbi, W. A., & Shah, D. J. (2019). Relationship of extracellular volume assessed on cardiac magnetic resonance and serum cardiac troponins and natriuretic peptides with heart failure outcomes. *Scientific Reports*, 9(1), 20168.

Yao, L., He, F., Zhao, Q., Li, D., Fu, S., Zhang, M., Zhang, X., Zhou, B., & Wang, L. (2023). Spatial Multiplexed Protein Profiling of Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury. *Circulation Research*, 133(1), 86-103.

Yegorova, S., Yegorov, O., & Ferreira, L. F. (2021). RNA-sequencing reveals transcriptional signature of pathological remodeling in the diaphragm of rats after myocardial infarction. *Gene*, 770, 145356.

Yeh, R. W., Sidney, S., Chandra, M., Sorel, M., Selby, J. V., & Go, A. S. (2010). Population trends in the incidence and outcomes of acute myocardial infarction. *The New England Journal of Medicine*, 362(23), 2155-2165.

Yellon, D. M., & Hausenloy, D. J. (2007). Myocardial reperfusion injury. *The New England Journal of Medicine*, 357(11), 1121-1135.

Yépez, V. A., Gusic, M., Kopajtich, R., Mertes, C., Smith, N. H., Alston, C. L., Ban, R., Beblo, S., Berutti, R., Blessing, H., Ciara, E., Distelmaier, F., Freisinger, P., Häberle, J., Hayflick, S. J., Hempel, M., Itkis, Y. S., Kishita, Y., Klopstock, T., ... Prokisch, H. (2022). Clinical

implementation of RNA sequencing for Mendelian disease diagnostics. *Genome Medicine*, 14(1), 38.

Yin, L., Tang, Y., & Jiang, M. (2021). Research on the circular RNA bioinformatics in patients with acute myocardial infarction. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 35(2), e23621.

Yokota, T., McCourt, J., Ma, F., Ren, S., Li, S., Kim, T., Kurmangaliyev, Yerbol. Z., Nasiri, R., Ahadian, S., Nguyen, T., Haw, M., Zhou, Y., Wu, R., Rodriguez, A., Cohn, W., Wang, Y., Whitelegge, J., Ryazantsev, S., Khademhosseini, A., ... Deb, A. (2020). Type V collagen in scar tissue regulates the size of scar after heart injury. *Cell*, 182(3), 545-562.e23.

Zeijlon, R., Chamat, J., Enabtawi, I., Jha, S., Mohammed, M. M., Wågerman, J., Le, V., Shekka Espinosa, A., Nyman, E., Omerovic, E., & Redfors, B. (2021). Risk of in-hospital life-threatening ventricular arrhythmia or death after ST-elevation myocardial infarction vs. The Takotsubo syndrome. *ESC Heart Failure*, 8(2), 1314-1323.

Zhang, H., He, L., & Cai, L. (2018). Transcriptome Sequencing: RNA-Seq. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1754, 15-27.

Zhang, X., van Rooij, J. G. J., Wakabayashi, Y., Hwang, S.-J., Yang, Y., Ghanbari, M., Bos, D., BIOS Consortium, Levy, D., Johnson, A. D., van Meurs, J. B. J., Kavousi, M., Zhu, J., & O'Donnell, C. J. (2021). Genome-wide transcriptome study using deep RNA sequencing for myocardial infarction and coronary artery calcification. *BMC Medical Genomics*, 14(1), 45.

Zhao, W., Lu, L., Chen, S. S., & Sun, Y. (2004). Temporal and spatial characteristics of apoptosis in the infarcted rat heart. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 325(2), 605-611.

Zheng, M.-L., Liu, X.-Y., Han, R.-J., Yuan, W., Sun, K., Zhong, J.-C., & Yang, X.-C. (2020). Circulating exosomal long non-coding RNAs in patients with acute myocardial infarction. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 24(16), 9388-9396.

Zhong, Z., Hou, J., Zhang, Q., Li, B., Li, C., Liu, Z., Yang, M., Zhong, W., & Zhao, P. (2018). Differential expression of circulating long non-coding RNAs in patients with acute myocardial infarction. *Medicine*, 97(51), e13066.

Zhou, J., Wen, T., Li, Q., Chen, Z., Peng, X., Wei, C., Wei, Y., Peng, J., & Zhang, W. (2022). Single-Cell Sequencing Revealed Pivotal Genes Related to Prognosis of Myocardial Infarction Patients. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2022, 6534126.

VIII.- ANNEXOS

ANNEX I:

Ríos-Navarro C*, Ortega M*, et al. Interstitial changes after reperfused myocardial infarction in swine: morphometric and genetic analysis. BMC Vet Res. 2020; 16:262.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Interstitial changes after reperfused myocardial infarction in swine: morphometric and genetic analysis

Cesar Ríos-Navarro^{1*}, María Ortega^{2†}, Víctor Marcos-Garcés³, José Gavara¹, Elena de Dios^{1,4}, Nerea Pérez-Sole⁵, Francisco J. Chorro^{1,3,4,5}, Vicente Bodí^{1,3,4,5} and Amparo Ruiz-Sauri^{1,2*}

Abstract

Background: Following myocardial infarction (MI), we aimed to characterize morphometric and genetic changes in extracellular matrix (ECM) components from ischemia onset until late phases after coronary reperfusion in necrotic and salvaged myocardium.

Results: Swine were divided into one control ($n = 3$) and three MI groups: 90-min of ischemia without reperfusion, or followed by 1-week or 1-month reperfusion ($n = 5$ per group). In samples from the necrotic and salvaged areas, ECM components were morphometrically quantified and mRNA levels of factors involved in ECM remodeling were evaluated. After 90-min of ischemia, fibronectin, laminin, and elastic fibers content as well as upregulated mRNA expression of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP1, TIMP2, TIMP3 and connective tissue growth factor) increased in the necrotic and salvaged myocardium. In both reperfused MI groups, collagen-I, collagen-III, elastic fibers, glycosaminoglycans, laminin, and fibronectin levels heightened in the necrotic but not the salvaged myocardium. Moreover, mRNA expression of TIMP1, TIMP2 and TIMP3, as well as metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 heightened in the necrotic but not in the salvaged myocardium.

Conclusions: Matrix remodeling starts after ischemia onset in both necrotic and salvaged myocardium. Even if ECM composition from the salvaged myocardium was altered after severe ischemia, ECM makes a full recovery to normal composition after reperfusion. Therefore, rapid coronary reperfusion is essential not only to save cardiomyocytes but also to preserve matrix, thus avoiding impaired left ventricular remodeling.

Keywords: Extracellular matrix, Myocardial infarction, Swine

Background

The extracellular matrix (ECM) is an imbricated network made up of fibers and ground substance (composed mainly of glycosaminoglycans (GAG), proteoglycans and adhesion glycoproteins). It provides structural support for different cell types, modifies cellular activity and actively participates

in regulating survival, migration, proliferation, apoptosis, and inflammatory responses [1–3].

Myocardial infarction (MI) is caused by the thrombotic occlusion of a coronary artery. Current gold-standard therapy for ST-segment elevation MI patients is prompt coronary revascularization to reestablish nutrient and oxygen supply in the downstream myocardium [4]. Although percutaneous intervention has played a pivotal role in saving viable cardiomyocytes as well as reducing infarct size and cardiac events [5–7], heart failure nonetheless occurs in post-MI patients,

* Correspondence: vicente.bodi@vrii.es; amparo.ruiz@vrii.es

¹Cesar Ríos-Navarro and María Ortega contributed equally to this work.

²INCLIVA Health Research Institute, Valencia, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2020 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

mainly due to adverse ventricular geometry and wall thinning [8, 9], and to prevent this, localized and timely regulated ECM remodeling is mandatory after MI [3, 10, 11].

Despite the role of ECM after MI has been previously reported [2, 12], we aim to comprehensively examine the morphometric and molecular changes in the ECM occurring in the necrotic and salvaged myocardium from ischemia onset until late phase post-reperfusion. In a swine model of reperfused MI, the specific objectives of this study are: 1) to use morphometric analysis to quantify the presence and organization of ECM components throughout the ischemia-reperfusion process following MI; 2) to compare ECM changes between necrotic and salvaged myocardium; and 3) to pinpoint the dynamics of key genes responsible for ECM remodeling in the necrotic and salvaged myocardium.

Results

Experiments were successfully performed in controls ($n = 5$). Ninety-min mid-LAD coronary artery occlusion was conducted in 20 pigs, three of them died during balloon inflation due to refractory ventricular fibrillation and two during the reperfusion period. Experiments were successfully completed in the remaining 15 cases, although electrical ventricular defibrillation was needed during coronary occlusion or immediately after reperfusion in 4 cases. Patency of the LAD was confirmed in all cases before sacrifice. Five controls and 15 MI experiments (without coronary reperfusion or followed by 1-week or 1-month reperfusion; $n = 5$ animals in each experimental group) made up the final study group. A sample size of 5 swine in each experimental was based on previous literature not only from our group [13, 14] and others [15–17].

Morphometric changes in the ECM composition after 90-min of ischemia without coronary reperfusion

Even though left ventricular geometry after 90-min of ischemia was similar to control hearts, some fluctuations in ECM composition were detected (Table 1).

In the no reperfusion group (Fig. 1a), an increased amount of elastic fibers was detected in the necrotic and salvaged myocardium compared to the control

heart group (Fig. 1b), displaying a disorganized disposition among the cardiomyocytes. There was a similar amount (Table 2), disposition, evaluated using Fast Fourier transform analysis (Fig. S1), and mRNA expression (Table 3) of collagen type I and type III in necrotic and salvaged myocardium in comparison to control tissue.

Analyzing the ground substance in both necrotic and salvaged areas, we detected higher levels of laminin and fibronectin (Fig. 1c and d, respectively), mainly present in the basement membrane of the cardiomyocytes (laminin) or surrounding the fascicles of the cardiac muscular cells (fibronectin). Moreover, a tendency to increased laminin (Fig. 3e) and fibronectin (Fig. 3f) mRNA expression was detected in necrotic and salvaged areas isolated from the ischemia group in comparison to healthy hearts (Table 3).

According to these results, ECM remodeling begins soon after ischemia onset and is similar irrespective of whether myocardial tissue becomes necrotic or salvaged.

Dynamics of key genes involved in ECM remodeling in the necrotic and salvaged myocardium after 90-min of ischemia without reperfusion

The mRNA levels of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP1), and TIMP2 (Fig. 2b and Fig. 2c, respectively), but not TIMP4, were upregulated in both regions (necrotic and salvaged) after 90-min of ischemia (without reperfusion) (Table 3). TIMP3 mRNA expression was only elevated in necrotic but not salvaged myocardium after severe ischemia (Fig. 2d). However, expression of metalloproteinases (MMP2), MMP9, MMP15, and MMP16 was not altered in either necrotic or salvaged regions compared to control myocardium, whereas MMP14 were significantly augmented in the salvaged, but not in the necrotic, myocardium (Table 3). Ultimately, when analyzing key transcription factors involved in ECM remodeling, mRNA levels of connective tissue growth factor (CTGF) (Fig. 2a), but not tumor necrosis factor (TNF)- α , histatin (BSG), or transforming growth factor (TGF)- β , were heightened in the necrotic and salvaged areas isolated from no reperfusion group (Table 3).

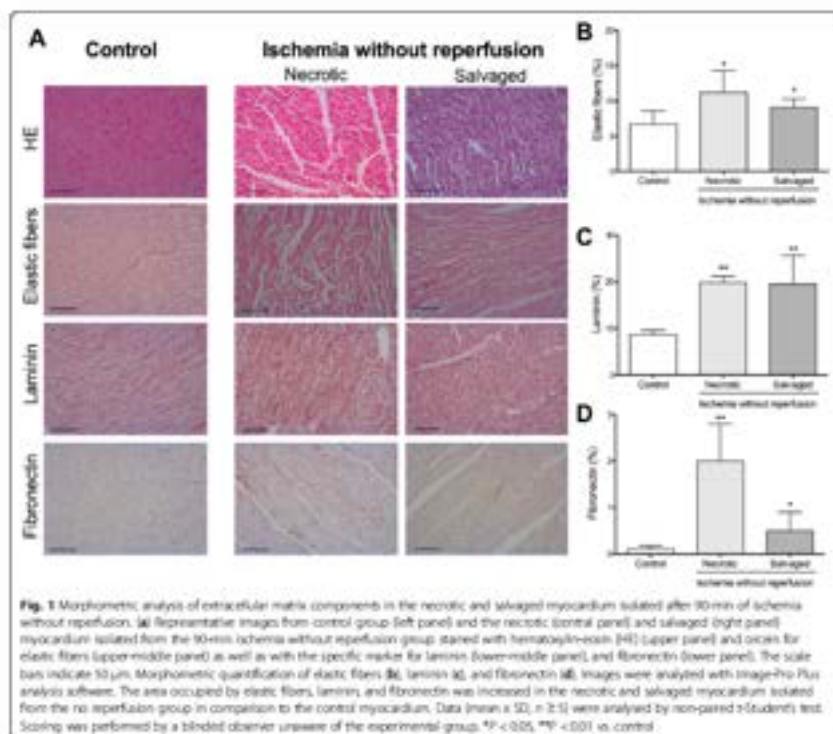
As with the ECM components, expression of gene factors participating in ECM remodeling was comparable in both regions after 90-min of ischemia. Therefore, prior

Table 1 Macroscopic evaluation of LV geometry

	CONTROL	SCHEMIA WITHOUT REPERFUSION	1-WEEK REPERFUSION	1-MONTH REPERFUSION
LAD-perfused area (% of LV)		84 $\pm$ 6	76 $\pm$ 8	66 $\pm$ 13
Infarct area (% LAD perfused area)		0 $\pm$ 0	38 $\pm$ 12**	30 $\pm$ 11**
Myocardial wall thickness, mm				
Necrotic area	10 $\pm$ 2.3	10 $\pm$ 2.0	9 $\pm$ 2.7	8 $\pm$ 2.9 ^{ab}
Salvaged area	10 $\pm$ 2.3	11 $\pm$ 2.1	11 $\pm$ 2.5	11 $\pm$ 3.8

Data were expressed as mean $\pm$ SD ($n = 5$) and were analyzed by unpaired t -Student's test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control; ^a $P < 0.05$ vs. corresponding salvaged area.

Abbreviations: LAD-left anterior descending; LV-left ventricle

**Table 2** Values obtained from morphometric analysis of ECM components

	CONTROL	ISCHEMIA WITHOUT REPERFUSION		1-WEEK REPERFUSION		1-MONTH REPERFUSION	
		NECROTIC	SALVAGED	NECROTIC	SALVAGED	NECROTIC	SALVAGED
Collagen I (%)	20.3 $\pm$ 10.1	24.3 $\pm$ 6.7	18.9 $\pm$ 12.1	53.0 $\pm$ 10.1**	18.1 $\pm$ 12.0	67.1 $\pm$ 3.8**	23.0 $\pm$ 3.1
Collagen III (%)	16.0 $\pm$ 9.3	21.9 $\pm$ 8.5	21.6 $\pm$ 8.4	34.6 $\pm$ 8.5	14.5 $\pm$ 8.5	36.6 $\pm$ 14.6*	17.9 $\pm$ 7.7
Elastic fibers (%)	6.7 $\pm$ 1.9	11.2 $\pm$ 3.1*	9.1 $\pm$ 1.2*	20.3 $\pm$ 6.2**	13.8 $\pm$ 7.5	16.4 $\pm$ 3.0**	12.8 $\pm$ 7.4
GAG (%)	10.9 $\pm$ 7.3	5.9 $\pm$ 1.4	5.1 $\pm$ 1.3	29.2 $\pm$ 5.0**	16.4 $\pm$ 10.0	25.4 $\pm$ 8.3**	14.1 $\pm$ 6.3
SPARC (%)	2.5 $\pm$ 0.6	0.4 $\pm$ 0.4	2.7 $\pm$ 0.5	6.9 $\pm$ 2.0**	1.4 $\pm$ 0.9	6.6 $\pm$ 1.3**	1.2 $\pm$ 0.3
Perlecan (%)	0.7 $\pm$ 0.4	0.7 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.2	0.1 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.7	0.4 $\pm$ 0.4
Laminin (%)	8.7 $\pm$ 0.9	18.8 $\pm$ 1.4**	19.5 $\pm$ 6.2**	14.3 $\pm$ 1.5**	11.5 $\pm$ 1.3*	17.7 $\pm$ 1.1**	5.5 $\pm$ 4.2
Fibronectin (%)	0.1 $\pm$ 0.1	2.9 $\pm$ 0.8**	0.5 $\pm$ 0.4*	13.3 $\pm$ 9.8*	0.6 $\pm$ 0.7	7.2 $\pm$ 4.1**	0.4 $\pm$ 0.6

Data were expressed as mean $\pm$ SD ($n \geq 3$) and were analyzed by unpaired t -Student's test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control. Abbreviations: ECM Extracellular matrix; GAG Glycosaminoglycans; SPARC Secreted protein acidic and rich in cysteine

Table 3 mRNA levels of factors involved in ECM remodeling

	CONTROL	SCHEMA WITHOUT REPERFUSION		1-WEEK REPERFUSION		1-MONTH REPERFUSION	
		NECROTIC	SALVAGED	NECROTIC	SALVAGED	NECROTIC	SALVAGED
TGF- α	1.10 $\pm$ 0.54	6.52 $\pm$ 4.44	6.26 $\pm$ 3.18	20.59 $\pm$ 13.19**	7.34 $\pm$ 6.17	60.98 $\pm$ 21.35**	11.30 $\pm$ 10.35
BIG	1.01 $\pm$ 0.38	1.35 $\pm$ 0.25	1.31 $\pm$ 0.22	0.38 $\pm$ 0.07**	0.27 $\pm$ 0.22*	0.74 $\pm$ 0.47	0.52 $\pm$ 0.50
TGF- β	1.06 $\pm$ 0.42	3.06 $\pm$ 0.24	1.81 $\pm$ 0.32	3.79 $\pm$ 1.49	0.48 $\pm$ 0.22	16.62 $\pm$ 12.04**	0.65 $\pm$ 0.79
CTGF	1.24 $\pm$ 0.77	7.40 $\pm$ 1.27**	3.01 $\pm$ 1.20*	3.59 $\pm$ 2.66	0.28 $\pm$ 0.09	28.25 $\pm$ 13.04**	0.98 $\pm$ 0.32
MMF2	1.05 $\pm$ 0.13	1.98 $\pm$ 0.65	3.26 $\pm$ 1.30	27.08 $\pm$ 7.55**	3.95 $\pm$ 2.28	15.97 $\pm$ 4.24**	4.09 $\pm$ 2.26
MMF9	1.02 $\pm$ 0.22	5.79 $\pm$ 7.54	4.62 $\pm$ 4.08	95.95 $\pm$ 69.45**	7.05 $\pm$ 6.65	272.31 $\pm$ 140.89**	5.95 $\pm$ 6.70
MMF14	1.03 $\pm$ 0.22	2.78 $\pm$ 0.93	2.18 $\pm$ 0.71**	2.95 $\pm$ 2.54	0.28 $\pm$ 0.22*	6.31 $\pm$ 2.79*	0.15 $\pm$ 0.03*
MMF15	1.03 $\pm$ 0.30	2.12 $\pm$ 1.02	1.82 $\pm$ 0.90	1.13 $\pm$ 1.07	0.41 $\pm$ 0.13	1.13 $\pm$ 1.07	0.62 $\pm$ 0.73
MMF16	1.05 $\pm$ 0.35	2.43 $\pm$ 1.14	2.04 $\pm$ 0.58	1.15 $\pm$ 0.68	0.58 $\pm$ 0.32	6.39 $\pm$ 2.70*	1.35 $\pm$ 0.87
TMF1	1.02 $\pm$ 0.23	6.50 $\pm$ 2.92*	5.64 $\pm$ 3.79*	27.14 $\pm$ 17.37**	1.92 $\pm$ 1.32	30.92 $\pm$ 18.14**	1.15 $\pm$ 0.75
TMF2	1.00 $\pm$ 0.08	3.08 $\pm$ 0.98**	2.60 $\pm$ 0.85**	4.79 $\pm$ 1.77*	0.99 $\pm$ 0.86	32.50 $\pm$ 20.47**	0.89 $\pm$ 0.47
TMF3	0.96 $\pm$ 0.75	2.82 $\pm$ 1.40*	1.77 $\pm$ 0.47	1.06 $\pm$ 0.88	0.58 $\pm$ 0.29	4.83 $\pm$ 2.80*	0.81 $\pm$ 0.40
TMF4	1.29 $\pm$ 0.35	1.45 $\pm$ 0.59	1.51 $\pm$ 0.30	1.32 $\pm$ 0.45	0.57 $\pm$ 0.50**	1.14 $\pm$ 0.60	0.36 $\pm$ 0.21**
COL1A1	1.02 $\pm$ 0.25	3.99 $\pm$ 2.30	2.65 $\pm$ 1.54	16.58 $\pm$ 4.81	2.37 $\pm$ 1.07	45.71 $\pm$ 29.03**	2.17 $\pm$ 2.15
COL3A1	1.05 $\pm$ 0.37	2.86 $\pm$ 1.83	1.87 $\pm$ 0.84	4.39 $\pm$ 2.00	1.17 $\pm$ 0.81	16.03 $\pm$ 12.52*	1.14 $\pm$ 0.62
FN1	1.03 $\pm$ 0.52	3.78 $\pm$ 2.35	2.51 $\pm$ 0.75	17.84 $\pm$ 8.55**	1.75 $\pm$ 1.34	106.10 $\pm$ 43.39**	2.20 $\pm$ 2.25
LAMB2	1.08 $\pm$ 0.32	2.07 $\pm$ 0.97	1.97 $\pm$ 0.84	25.84 $\pm$ 8.60**	2.15 $\pm$ 0.51	54.04 $\pm$ 23.06**	2.09 $\pm$ 0.87

Abbreviations: BIG: Biglycan; COL: Collagen; CTGF: Connective tissue growth factor; ECM: Extracellular matrix; FN: Fibronectin; LAMB: Laminin; MMF: Mesenchymal markers; TMF: Tissue inhibitors of metalloproteinases; TGF: Transforming growth factor; TMF: Tumor necrosis factor

Data were expressed as mean $\pm$ SD ($n = 5$) and were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control

to coronary reperfusion, the interstitium of the whole area at risk (comprising the future necrotic and salvaged myocardium) concurrently changes during ischemia.

ECM dynamics in the necrotic and salvaged myocardium isolated one week or one month after coronary reperfusion

At macroscopic level, 1 week after coronary revascularization, no differences in left ventricular wall thickness was detected between necrotic and salvaged regions. However, at chronic (1-month) phase, a significant reduction in myocardial wall thickness was observed in the necrotic area compared to salvaged area (Table 1).

Fibrous component of ECM

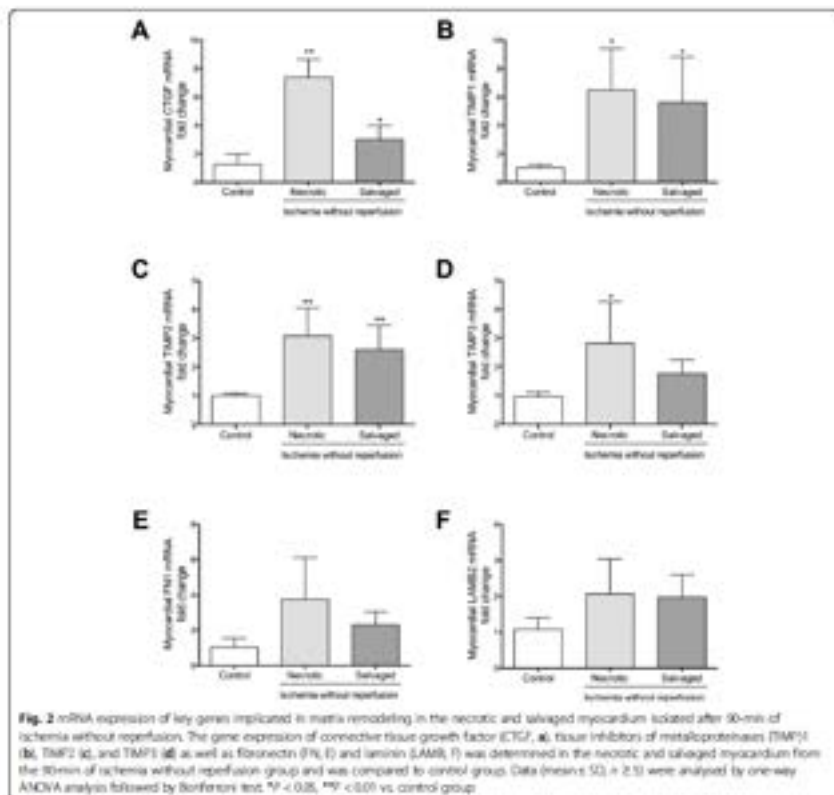
In the 1-week reperfusion group, a larger amount of collagen type I (Fig. 3b) and elastic fibers (Fig. 3d) was detected in the necrotic region, while a tendency to increase was observed in collagen type III (Fig. 3c). In the necrotic myocardium from the 1-month reperfusion group, the collagen type I (Fig. 3b), collagen type III (Fig. 3c), and elastic fibers (Fig. 3d) content was significantly elevated in comparison to control hearts (Table 2). In contrast, salvaged myocardium from both reperfused MI groups was barely increased in these components and their values were similar to a healthy myocardium (Fig. 3, Table 3).

Subsequently, the organization of both types of collagen fibers (Fig. 52A) in the two areas was evaluated using Fast Fourier transform. The diagrams obtained from the necrotic area were elongated, while the rounded diagrams were found in images from salvaged regions of both (1-week and 1-month) reperfusion groups and myocardium isolated from the control group. This indicates that collagen types I and III (Fig. 52B and Fig. 52C, respectively) displayed a more organized pattern in the necrotic tissue than in the salvaged myocardium, the latter organization being comparable to a control heart.

Moreover, compared to the weak gene expression in controls, mRNA expression of the two collagen types increased in the necrotic, but not in the salvaged, myocardium of both reperfused MI groups (Fig. 4a, Fig. 4b and Table 3). Taken together, these results suggest that not only the quantity, but also the organization and mRNA expression of both collagen type fibers differ between necrotic and salvaged myocardium, whose pattern was similar to control tissue.

Ground substance

An augmented content of GAG (Fig. 5a), mainly located in the space left by the necrotic cardiomyocytes, was detected in the necrotic, but not in the salvaged, myocardium isolated from the 1-week and 1-month reperfusion groups (Fig. 5b, Table 2).



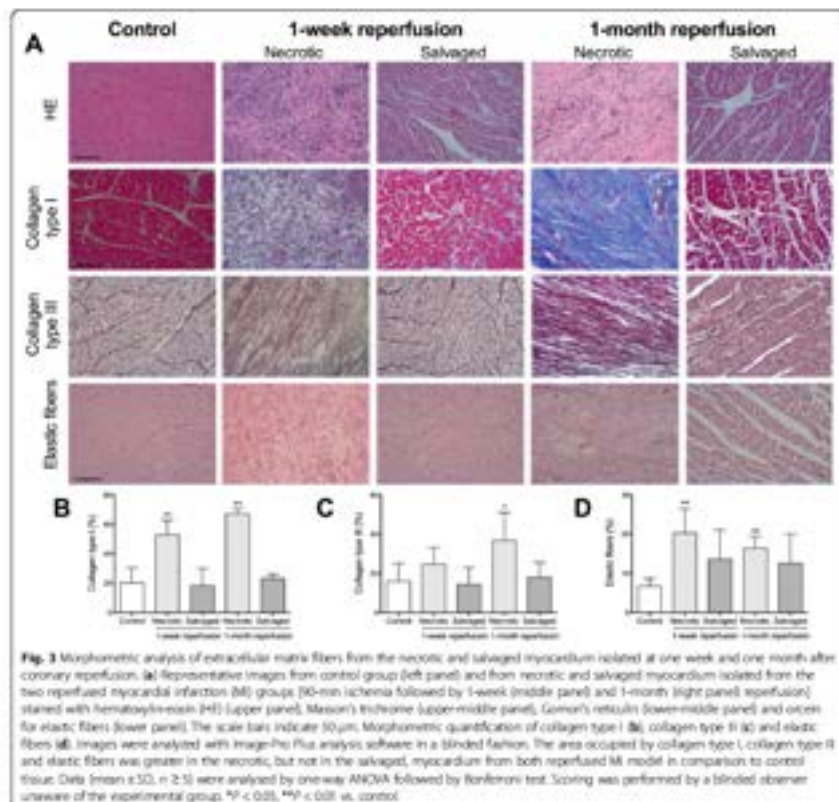
Analyzing adhesion glycoproteins, increased SPARC (Fig. 5c), laminin (Fig. 5d), and fibronectin (Fig. 5e) content was observed in the necrotic but not salvaged myocardium isolated from both reperfusion MI models. The augmented laminin content was detected mainly surrounding the necrotic cardiomyocytes (1-week after reperfusion) or the basement membrane of the blood vessels (1-month after reperfusion), while fibronectin and SPARC were located in the interstitial space left by necrotic cardiomyocytes from the necrotic area.

Furthermore, mRNA expression of laminin (Fig. 4c) and fibronectin (Fig. 4d) was elevated in the necrotic myocardial samples from the 1-week and 1-month reperfusion

groups compared to the corresponding salvaged tissue, whose levels were similar to controls (Table 3).

In summary, these results point to necrotic and salvaged myocardium as having a completely different interstitium after coronary reperfusion, with the salvaged myocardium composition comparable to control hearts.

Dynamics of genes involved in ECM remodeling in necrotic and salvaged areas after coronary reperfusion
mRNA levels of TIMP1 and TIMP2 (Fig. 4e and Fig. 4f, respectively), but not TIMP4, remained higher than controls in the necrotic area of both reperfusion MI groups (Table 3). TIMP3 gene expression was only



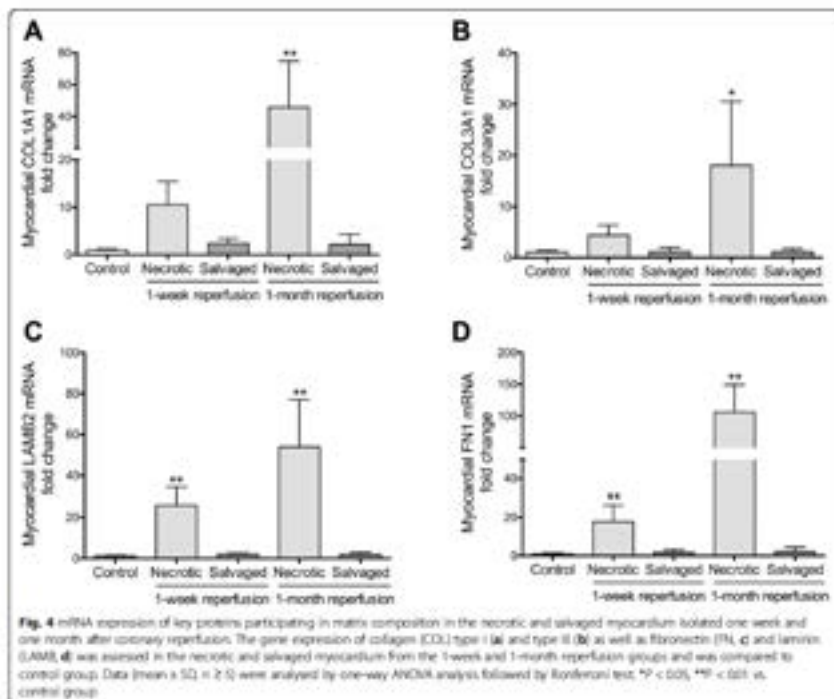
heightened in the 1-month reperfusion group (Fig. 6g). However, even though mRNA expression was increased after 90 min of ischemia in the salvaged myocardium, coronary reperfusion reduced the four evaluated TIMPs to baseline levels or even lower (Table 3).

Although mRNA expression of MMP2 (Fig. 6a) and MMP9 (Fig. 6b) was substantially increased in the necrotic tissue from both reperfusion MI groups, MMP14 (Fig. 6c) and MMP16 (Fig. 6d) levels were only significantly augmented in the 1-month reperfusion group. Conversely, in the salvaged area mRNA expression were normal or even lower than control tissue (Table 3).

Ultimately, in the necrotic myocardium, upregulation of TNF- α (Fig. 6h) and deregulation of BSG were observed 1

week after MI induction, whereas levels of TNF- α , CTGF (Fig. 6i), and TGF- β (Fig. 6j) were elevated after 1 month. Analyzing the salvaged area from both reperfusion MI groups, BSG deregulation was detected in the 1-week reperfusion group, but mRNA levels of the remaining evaluated transcription factors were unaltered (Table 3).

Parallel to the morphometric results, expression of key genes involved in ECM remodeling was different in necrotic and salvaged myocardium after coronary reperfusion. Consequently, despite interstitial changes occurred concomitantly in necrotic and salvaged myocardium during ischemia, the resulting ECM composition after myocardial repair differed between necrotic and salvaged myocardium.



Discussion

After morphometric and molecular analysis, we concluded that necrotic and salvaged myocardium display similar ECM remodeling during ischemia. However, after coronary reperfusion necrotic myocardium develops into fibrotic scar, while different regulatory mechanisms cause matrix from salvaged areas to be restored to healthy tissue. Therefore, coronary reperfusion exerts beneficial effects not only in reducing cardiomyocyte apoptosis but also in maintaining the proper ECM composition.

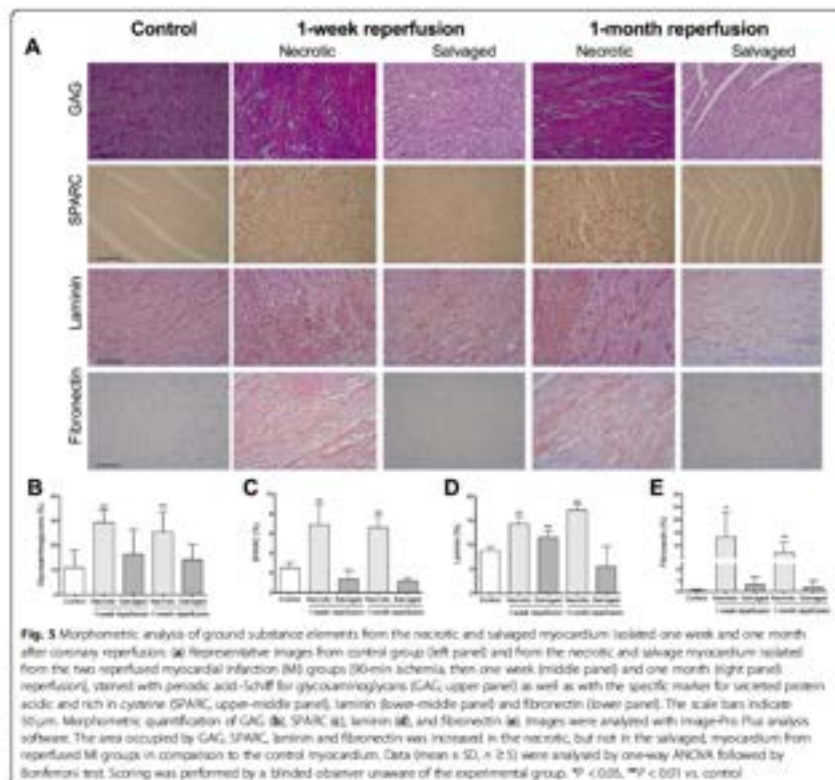
Role of myocardial matrix in pathophysiology after MI

ECM is a non-cellular, three-dimensional network made up of fibers and ground substance, mainly comprising GAG, proteoglycans and adhesion glycoproteins. Matrix components regulate diverse cellular processes such as

survival, migration, proliferation, apoptosis, and inflammatory responses [2, 3, 10] and undergo remodeling in both physiological and pathological conditions.

MI is caused by the thrombotic occlusion of a coronary artery. Current gold-standard therapy for ST-segment elevation MI patients is coronary reperfusion to reestablish nutrient and oxygen supply in the downstream myocardium [4]. Complete and rapid revascularization of the culprit artery, ideally by percutaneous coronary intervention, increases salvaged myocardium, consequently enhancing patient prognosis [5–7].

Even though percutaneous intervention has revolutionised management and outcome in MI patients, heart failure is indisputably a pivotal player in late morbidity and post-MI patient healthcare costs. Incidence of heart failure after MI ranges from 14 to 36% and is a multifactorial phenomenon leading to adverse left ventricular geometry and wall thinning [8, 9]. Since

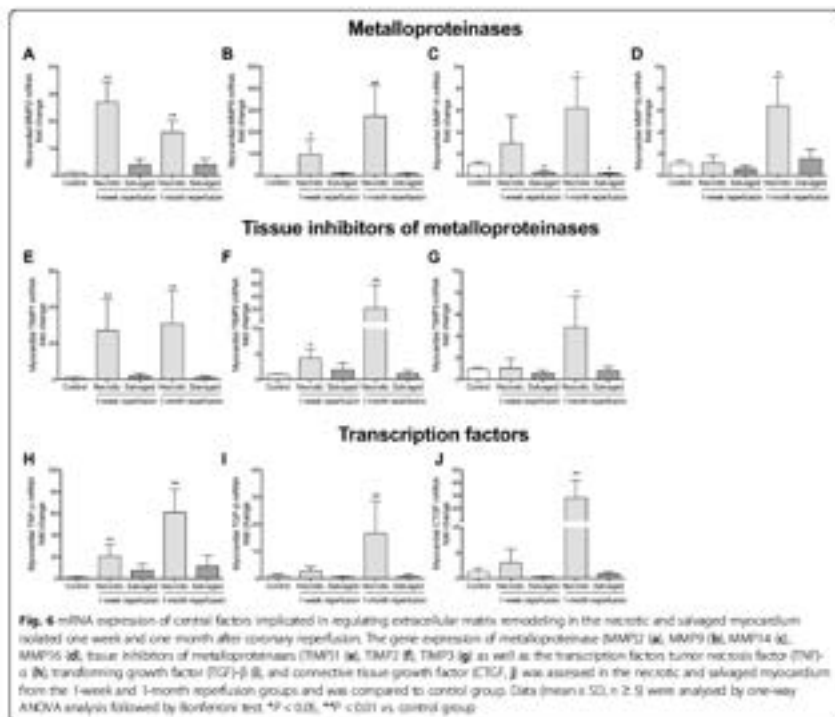


matrix remodelling is essential to preserve cardiac structure, adequate timely and localized myocardial ECM remodelling is mandatory [3, 10–12]. The importance of prompt coronary revascularization in minimizing cardiomyocyte damage has been widely addressed [9], but little attention has been paid to its role in preserving myocardial matrix, which is potentially crucial to prevent adverse ventricular remodeling and heart failure development.

Given all this, we aimed to gain insight into myocardial ECM variations throughout the ischemia and reperfusion process following MI using morphometric and genetic analysis to pinpoint the mechanisms underlying the progression of post-MI adverse ventricular remodeling.

ECM remodeling begins soon after ischemia onset in both necrotic and salvaged myocardium to form a provisional matrix

Rapid modifications in ECM composition need to occur for the infarcted heart to cope with mechanical and metabolic stress due to the ischemic environment. Indeed, impairment of cardiomyocyte physiology and apoptosis activation are reported to begin soon after ischemia onset [18]. Therefore, forming a provisional matrix prior to the definitive fibrotic scar is crucial to ensure adequate cardiac structure and functionality during hypoxia and also to provide a scaffold for reparative cells such as migrating leukocytes, proliferating fibroblasts, and endothelial cells [2, 3].



According to our results, there were more laminin and fibronectin adhesion glycoproteins both in necrotic and salvaged myocardium in the infarct area after 90 min of ischemia (without reperfusion). Increased vascular permeability and edema presence in the infarcted tissue have been extensively described soon after MI induction, hence plasma-derived proteins are proposed to form this provisional interstitium [2]. In fact, acute MI patients displayed increased circulating levels of laminin and fibronectin [1, 19], while myocardial mRNA levels were similar to control tissue, indicating that ischemic hearts were not able to secrete these two proteins. Consequently, the increased circulating levels of both glycoproteins together with the presence of myocardial edema could explain the laminin and fibronectin deposition in the myocardial interstitium during the hypoxic phase.

Laminin is an essential component of the cardiomyocyte basement membrane responsible for anchoring cells to the IECM and binding receptor proteins, whereas fibronectin maintains the tensile strength of the necrotic tissue, and regulates cellular adhesion and migration [2, 3, 20]. In the necrotic and salvaged area from the no reperfusion group, laminin and fibronectin are located surrounding cardiomyocyte cells (endomyocardium) or muscular fascicles (perimysium), respectively. An elevated presence of fibronectin surrounding necrotic cardiomyocytes few hours after ischemia onset has also been confirmed in a rodent non-reperfused MI model [21]. Since both glycoproteins are responsible for cellular adhesion, their rapid presence immediately after ischemia onset might reflect a defense mechanism in the whole jeopardized area of the infarcted heart to preserve the myocardial architecture due to the beginning of cardiomyocyte necrosis.

Molecular analysis revealed an increase in TIMP1, TIMP2, and TIMP3 mRNA expression soon after ischemia onset in the whole area at risk, while no variations in the evaluated MMPs were observed. In line with our hypothesis, ECM degradation could be initially blocked due to rapid upregulation of TIMP with the objective of impeding the effects of endogenous MMP and maintaining the myocardial structure in the hyper-acute phase post-MI. In the MI scenario, TIMPs are suggested to help avoid excessive ECM accumulation, which leads ultimately to adverse systolic dysfunction [20, 22]. However, to our knowledge, this is the first study demonstrating early upregulation of TIMPs soon after ischemia onset, probably as a protective mechanism to block early degradation of myocardial ECM.

In this context, CTGF, matricellular protein secreted by damage cardiomyocytes, could be the major driver due to its heightened gene expression in both necrotic and salvaged myocardium from the no reperfusion group. Although this factor has traditionally participated in fibrosis development in late phases post-MI, its role soon after MI induction was also demonstrated since transgenic mice overexpressing CTGF and submitted to permanent coronary artery ligation displayed reduced infarct area even 1 day after MI induction [23].

In summary, morphometric and genetic changes in the myocardial interstitium occur soon after ischemia onset in the whole area at risk (necrotic and salvaged myocardium). This provisional matrix could play a role in protecting the myocardium from the hypoxic environment, ensuring correct cardiac function despite apoptotic cardiomyocytes, and facilitating cell regeneration.

Interstitium from salvaged myocardium initially changes during ischemia but is restored to control myocardial ECM composition after coronary reperfusion

Salvaged myocardium is defined as the difference between the area at risk during acute coronary occlusion and the final area of necrosis [24]. The greater the area of salvaged myocardium, the more conserved the systolic function and the better the reported prognosis [5, 25]. Since saving cardiomyocytes together with escaping from depressed systolic function due to a proper matrix composition is essential to maintain left ventricular structure, we sought to gain insight into fluctuations in the ECM composition in the salvaged myocardium.

According to our results, in the first minutes of ischemia (prior to coronary reperfusion), ECM composition behaves in a similar way in both the necrotic and salvaged myocardial areas. However, following revascularization,

even though the infarct area develops to form the definitive fibrotic scar mainly comprised by collagen deposition, the ECM composition from the salvaged myocardium is comparable to a control heart.

These dynamics were observed not only in morphometric but also in the genetic analysis of the pivotal factors involved in ECM remodeling. After ischemia, upregulated expression of tissue inhibitors TIMP1, TIMP2, TIMP3 and CTGF was observed in both the necrotic and salvaged myocardium. However, following myocardial reperfusion, mRNA expression of TIMP1, TIMP2, and TIMP3 as well as metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 was enhanced only in the necrotic but not in the salvaged myocardium.

Rapid coronary revascularization has been indisputably linked with a greater area of viable myocardium, thus reducing cardiomyocyte apoptosis, infarct size and adverse cardiovascular events [5–7]. However, in our study, revascularization is shown to exert beneficial effects not only in myocardial salvage but also in maintaining an adequate myocardial matrix composition.

Salvaged myocardium seems to suffer reversible ECM remodeling induced by transient nonlethal ischemia, but eventually reverts to normal status as long as coronary blood flow is restored. As an auto-regulatory mechanism to protect the heart from ischemia, the whole myocardium at risk undergoes the same ECM changes, irrespective of whether it progress further to necrotic or salvaged myocardium. Therefore, currently recommended early epicardial coronary reperfusion can exert a beneficial effect on well-established myocardial salvage but also in preserving matrix composition, thus reducing infarct size and enhancing patient outcomes.

Conclusions

ECM changes start soon after ischemia onset, as reflected by early higher levels of fibronectin, laminin, and elastic fibers. Despite matrix remodeling concomitantly occurs in both necrotic and salvaged myocardium after prolonged ischemia, matrix composition in the salvaged area after coronary reperfusion resembles the control heart. Therefore, rapid coronary reperfusion is essential not only to save cardiomyocytes but also to preserve matrix, thus avoiding impaired left ventricular remodeling.

Methods

Experimental protocol

This study adheres to the ARRIVE guidelines and was approved by the Institutional Animal Care and

Use Committee of the University of Valencia and conforms 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). Juvenile domestic female pigs weighing 25–30 kg were included in the experimental study. Animals were obtained from the local farm “El Pampo” (Registration number: ES46244000003).

After engagement of the proximal left anterior descending (LAD) artery using a trans-femoral 6F Amplatz Left 0.75 catheter, an angioplasty balloon (2.5 × 16 mm) was placed in the mid-LAD and used to induce severe coronary ischemia by transitory (90-min) balloon inflation.

The complete experimental protocol has been previously validated and can be consulted elsewhere [13, 14].

Experimental groups

One control group and three independent MI experimental groups were formed. In the MI groups, after 90-min occlusion of the mid-LAD by the angioplasty balloon, experiments were categorized as: 1) without reperfusion or followed by 2) 1-week or 3) 1-month reperfusion ($n = 5$ each). The control group ($n = 5$) was subjected to the same experimental protocol used in the MI groups, but the angioplasty balloon was not inflated and thus ischemia and infarction were not induced.

Macroscopic analysis of myocardial samples

In order to delimit the area at risk (defined as the myocardium that is jeopardized by the coronary occlusion), 20 ml of 4% thioflavin-S solution (Sigma Aldrich, MO) was infused through the lumen of the inflated over-the-wire balloon immediately before sacrifice. In the no reperfusion group thioflavin-S was administered at the end of the 90-min ischemia period. In the 1-week and 1-month reperfusion groups, prior to sacrifice of the animal, the angioplasty balloon was re-inflated at the same location used to induce the infarction (mid-LAD) and the colorant was injected through the lumen of the inflated balloon. Subsequently, anesthetized animals were euthanized by intravenous administration of potassium chloride (0.9%, 2 ml) and then heart was excised [13, 14].

Once the heart was excised, the left ventricle was sectioned into 5-mm thick short-axis slices. Firstly, each slice was viewed under ultraviolet light and photographed. Light blue represents thioflavin-S myocardial uptake after infusion into the area at

risk, while dark blue indicates lack of perfusion (Fig. 53).

Secondly, to determine the extent of the infarcted area, slices were incubated in 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (Sigma Aldrich, MO) solution at 37 °C for 20 min. Afterwards they were viewed under room light and photographed.

Necrotic and salvaged areas within the left ventricle were defined in all short-axis slices. Necrotic area was regarded as myocardium located in the area at risk that did not stain with triphenyltetrazolium (thioflavin-S+ and triphenyltetrazolium-). Salvaged myocardium was defined as the myocardium located in the area at risk that stained with triphenyltetrazolium (thioflavin-S+ and triphenyltetrazolium+) (Fig. 53).

Microscopic analysis and immunohistochemistry of myocardial samples

All samples were fixed in 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin, sectioned and mounted on double gelatin-coated glass slides. Hematoxylin and eosin stain was utilized for histological analysis. To further characterize myocardial samples, orcein stain for elastic fibers, Masson's trichrome stain for collagen type I, reticulin for collagen type III, and periodic acid-Schiff for glycosaminoglycan were also performed.

Immunohistochemistry

For immunohistochemistry, after peroxidase inactivation (H₂O₂ 0.3%) and blockade with horse serum, sections were incubated overnight (4 °C) with the specific primary antibodies diluted in PBS/BSA 0.1%. Specific labelling was detected with a biotin-conjugated goat anti-mouse or goat anti-rabbit secondary antibody (1:500 dilution, Dako Glostrup, Denmark) [14]. Further information about the primary antibodies, antigen retrieval method, and antibody concentration is detailed in Table 4.

Table 4 Summary of the primary antibodies data (concentration, antigen retrieval method, reference) employed in this study

Marker	Concentration	Antigen retrieval	Reference
Laminin	1:50	Enzymatic	Abcam (ab11175)
Fibronectin	1:100	Enzymatic	Abcam (ab221751)
SPARC	1:100	pH low	Antibodies-online (ABIN1052072)
Perlecan	2 µg/ml	pH low	LSBio (LSB3-C300548)

Abbreviation: SPARC: secreted protein acidic, and rich in cysteine

Morphometric quantification of extracellular matrix components in the infarcted myocardium

For each sample and each stain, eight photographs at 20x magnification were taken in independent fields using an optical microscope Leica DM3000 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Images were morphometrically analysed using Image ProPlus 7.0 software (Media Cybernetics Inc., Rockville, MD) performed in a blinded manner on coded slides [13, 14].

Fourier transformation of cardiac images

Previous information about the protocol for quantifying the organization of collagen fibers can be consulted elsewhere [13] and has been previously validated by [26]. Briefly, collagen fibers orientation index is the ratio of the maximum width (minor axis) and the maximum length (major axis) of the thresholded Fourier 2D power plot. A completely random orientation, suggesting total disorganization, results in an organization index that approximates to 1, whereas a perfect organization results in an organization index close to 0. Therefore, higher values for the orientation index indicate disorganization and lower values a more parallel organization [13, 26].

Quantitative real-time polymerase chain reaction

In order to extract RNA, RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) was employed following the manufacturer's instructions. Gene expression was determined by real time Polymerase Chain Reaction using a 7900HT Fast Real-Time Polymerase Chain Reaction System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). The values of the threshold cycle (Ct) were calculated by triplicate and normalized to the housekeeping gene GAPDH [14].

We used specific primers pre-designed by Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA) for analysis of porcine

samples. Further information about the primers employed in this study is specified in Table 5.

Statistical analysis

Continuous variables were expressed as the mean $\pm$ SD. One-way ANOVA analysis or unpaired t-Students' test was used for comparisons and statistical significance was considered for two-tailed p-value less than 0.05. SPSS 19.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL) was used throughout. All measurements were performed by researchers unaware of the experimental group.

Supplementary information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02465-6>.

Additional file 1: Supplementary Figure 1. Type I and type II collagen fiber organization in the necrotic and salvaged myocardium isolated after 90 min of ischemia. (A) Representative images from control group (left panel) and the necrotic (control panel) and salvaged (right panel) myocardium isolated from the severe ischemia group (90 min ischemia without reperfusion, right panel) stained with Masson's trichrome (upper panels) and Gomori's reticulin (lower panels) and the Fourier transform spectra obtained from these images. Images were analyzed with Image Pro Plus analysis software. The scale bars indicate 50 μ m. No differences existed between the collagen organization index of the salvaged and necrotic tissue from the severe ischemia group and control when compared with the organization of collagen type I (B) and type II (C). Upper and lower lines of the boxes represent the 25th and 75th percentiles. Data were analysed by non-paired t-Student's test. Scoring was performed by a blinded observer unaware of the experimental group.

Additional file 2: Supplementary Figure 2. Type I and type II collagen fiber organization in the necrotic and salvaged myocardium isolated at one week and one month after coronary reperfusion. (A) Representative images from control group (left panel) and from the necrotic and salvaged myocardium isolated from the two reperfusion myocardial infarction (MI) groups (90 min ischemia followed by 1 week (middle panel) or 1 month (right panel) reperfusion), stained with Masson's trichrome (upper panels) and Gomori's reticulin (lower panels) and the Fourier transform spectra obtained from these images. Images were analyzed with Image Pro Plus analysis software. The scale bars indicate 50 μ m. The collagen type I (B) and type II (C) organization index was lower in the necrotic, but not in the salvaged, myocardium from the one-week and one-month reperfusion groups in comparison to the control myocardium. Data were analysed by non-paired t-Student's test. Scoring was performed by a blinded observer unaware of the experimental group. *P < 0.05, **P < 0.01 vs. control.

Additional file 3: Supplementary Figure 3. Macroscopic study of myocardial hearts obtained from the severe model. Samples were stained with thioflavin S (T-S, left) and 2,2'-bis(4-methylphenyl)-5,5'-bibenzothiazole (TTZ, right). Necrotic tissue was defined as the myocardial area stained with TTZ. Salvaged myocardium was defined as the non-infarcted territory within the area at risk clearly outside the infarcted area (both TTZ and T-S staining).

Abbreviations

BSG: Basigin; CTGF: Connective tissue growth factor; ECM: Extracellular matrix; GAG: Glycosaminoglycans; LAD: Left anterior descending artery; Myocardial infarction; MMP: Matrix metalloproteinases; TIMP: Tissue inhibitor of metalloproteinases; TGF- β : Transforming growth factor- β ; TNF- α : Tumor necrosis factor- α .

Acknowledgements

Not applicable.

Table 5 References of the primers utilized in this study

Gene	Reference	Gene	Reference
TNF- α	q5scC00014067	TIMP1	q5scC00019148
BSG	q5scC00014123	TIMP2	q5scC00008300
TGF- β	q5scC00018090	TIMP3	q5scC00010478
CTGF	q5scC00011014	TIMP4	q5scC00004859
MMP9	q5scC000111742	COL1A1	q5scC000020342
MMP9	q5scC00003617	COL3A1	q5scC00003467
MMP14	q5scC00018813	FN1	q5scC00003939
MMP15	q5scC00012438	LAMC2	q5scC00011114
MMP16	q5scC00002889	GAPDH	q5scC00017494

Abbreviations: BSG: Basigin; COL: Collagen; CTGF: Connective tissue growth factor; FN: Fibronectin; LAM: Laminin; MMP: Matrix metalloproteinases; TGF: Transforming growth factor; TIMP: Tissue inhibitor of metalloproteinases; TNF: Tumor necrosis factor.

Authors' contributions

C.R.N.: concept/design, acquisition of data, data analysis/interpretation, critical revision of the manuscript and approval of the article; M.D.: acquisition of data, data analysis/interpretation, critical revision of the manuscript and approval of the article; V.M.G.: acquisition of data, critical revision of the manuscript and approval of the article; I.G.: in vivo experiments; critical revision of the manuscript and approval of the article; E.D.: in vivo experiments; critical revision of the manuscript and approval of the article; N.P.: in vivo experiments; critical revision of the manuscript and approval of the article; F.J.C.: critical revision of the manuscript and approval of the article; V.B.: concept/design, data analysis/interpretation, data analysis/interpretation; critical revision of the manuscript and approval of the article; A.R.S.: concept/design, acquisition of data, data analysis/interpretation; critical revision of the manuscript and approval of the article. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

Funding

This study was funded by Instituto de Salud Carlos III and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) research grants (PI15/00013) to V.B., PI17/01836 to V.B., and CIBERCV/PI16/00486 to F.J.C. and a postgraduate contract (PI16/00033) to C.R.N. All funders had no role in the design of the study and collection, analysis, and interpretation of data and in writing the manuscript.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Ethics approval and consent to participate

This study was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Valencia (Reference: 2016/SC/PSA/00016) and conforms 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 (2016/609/EC) and national regulations (RD53/2001). Animals were obtained from the local farm "El Pampó" (Registration number ES46-04000003). Farm owner has signed an informed consent to use these animals for our research.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹INCLIVA Health Research Institute, Valencia, Spain. ²Pathology Department, School of Medicine, University of Valencia, Av. Blasco Ibañez 15, 46100 Valencia, Spain. ³Cardiology Department, Hospital Clínico Universitario, Av. Blasco Ibañez, 17 46100 Valencia, Spain. ⁴Department of Medicine, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain. ⁵Centro de Investigación Biomédica en Red – Cardiovascular (CIBER-CV), Madrid, Spain.

Received: 25 February 2020 Accepted: 7 July 2020

Published online: 29 July 2020

References

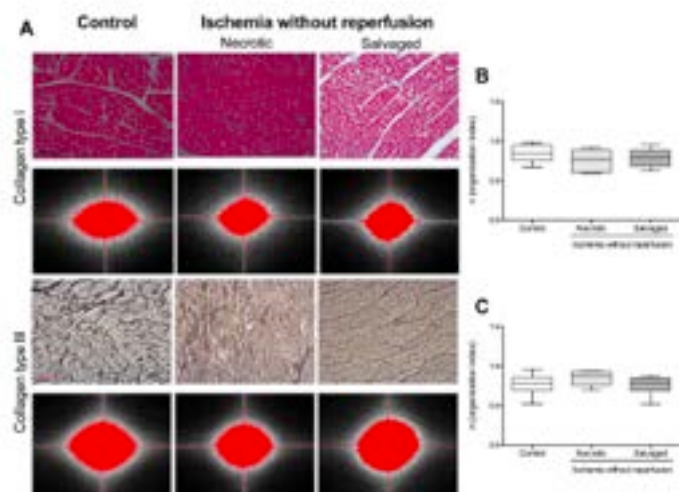
- Chen C, Glick S, Chen A, Calapoglu M, Finkel C. Increased plasma fibronectin levels in patients with acute myocardial infarction complicated with left ventricular thrombus. *Thromb Res*. 2002;106:37–41.
- Panagiotou NG. The extracellular matrix in myocardial injury, repair, and remodeling. *J Clin Invest*. 2017;127:3600–12.
- Li L, Zhou Q, Kong W. Extracellular matrix remodeling and cardiac fibrosis. *Mol Biol*. 2018;48:490–506.
- Barber J, Hauch G, Oster M, van der Vliet T. Evolving therapies for myocardial ischemia/perfusion injury. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65:454–71.
- Steinmetz T, Dietl J, de Witte S, Pous J, Fournier G, Thiele H, et al. Myocardial salvage after primary percutaneous coronary intervention in patients with ST-elevation myocardial infarction presenting early versus late after symptom onset. *Int J Cardiol*. 2017;230:175–8.
- Barneo S, Jansen S, Antonov M, Ruzicewski-Ducet C, Barneo S, Calisto AJP, et al. 2017 ESC guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: the task force

- for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2018;39:1–77.
- Neggen Christensen L, Longqvist J, Holten DE, Andersen AK, Bang LE, Holten L, et al. Benefit from reperfusion with primary percutaneous coronary intervention beyond 12 hours of symptom duration in patients with ST-segment-elevation myocardial infarction. *Circ Cardiovasc Interv*. 2018;11:e006942.
- Cahill TJ, Whalen RL. Heart failure after myocardial infarction in the era of primary percutaneous coronary intervention: mechanisms, incidence and identification of patients at risk. *World J Cardiol*. 2017;9:407–15.
- Bahr MC, Kocher A, Geringer CB. Post-myocardial infarction heart failure. *JACC Heart Fail*. 2018;6:179–88.
- Nelson SH, Weston AJ, DeLeon-Pennell KJ, Genovese T, Kandathil M, Lindsey ML. Understanding cardiac extracellular matrix remodeling to develop biomarkers of myocardial infarction outcomes. *Mol Biol*. 2016;75–79:43–57.
- Wright TH, Vernon RB. Targeting the extracellular matrix promotes healing following myocardial infarction. *Circ Res*. 2011;105:823–4.
- van den Brone SW, Das J, Banieteh MM, Vargiu J, Hoffman L, Nienhuis M. Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts. *Nat Rev Cardiol*. 2010;7:30–7.
- Herve A, Ruiz-Saur A, de Dios E, Portero MC, Mifano G, Nofre J, et al. Heterogeneity of collagen organization within the fibrotic scar after myocardial infarction: results in a rat model and in human samples. *J Anat*. 2016;228:47–58.
- Rico-Navarro C, Huelo J, Mifano G, Nofre J, Ruiz-Saur A, Sans MJ, et al. Coronary venous obtained after myocardial infarction induces angiogenesis and microvascular obstruction repair. Role of hypoxia-inducible factor-1 α . *Rev Esp Cardiol*. 2017;71:440–9.
- Shen JJ, Lee FY, Tsai CM, Chen YL, Huang TH, Chou S, et al. Combined therapy with shock wave and autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells alleviates left ventricular dysfunction and remodeling through inhibiting inflammatory stimuli, oxidative stress and enhancing angiogenesis in a canine myocardial infarction model. *Int J Cardiol*. 2015;193:685.
- Genuis MC, Pennequin JL, Benoit S, Drouot H, Longueville CB, Rabreau S, et al. Induction of localized high-frequency electrical stimulation triggering early myocardial infarction effects on left ventricle function and geometry. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2016;156:568–75.
- Vilhar G, Catari L, Peña E, Crespo J, Juan-Bobot O, Ben-Artzi S, et al. Sildenafil malum provides cardioprotection and limits adverse remodeling post-myocardial infarction by mitigating oxidative stress and reactive fibrosis. *Int J Cardiol*. 2016;205:38–45.
- Burke AP, Vassalli R. Pathophysiology of acute myocardial infarction. *Med Clin N Am*. 2007;91:553–70.
- Derin W, Benamer L, Fath R, Neki W, Saad JF, Coll-Barroso M, et al. Increased levels of laminin and collagen type IV may reflect early remodeling in patients with acute myocardial infarction. *Acta Cardiol*. 2009;64:29–34.
- Ma Y, de Castro Bras LE, Taha H, Iyer RP, Noll ME, Winfield SD, et al. Myofibroblasts and the extracellular matrix network in post-myocardial infarction cardiac remodeling. *PLoS One*. 2014;9:e87113–27.
- Caracciolo M, Minnie H, Sanchez JL, Zy ZL, Peters V. Immunohistochemical study of fibronectin in experimental myocardial infarction. *Am J Pathol*. 1990;136:101–10.
- DeLeon-Pennell KJ, Meschiani CA, Long M, Lindsey ML. Matrix metalloproteinases in myocardial infarction and heart failure. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2017;147:15–100.
- Gunning J, Om S, Ranshoff CH, Mettenleiter MC, Manthey C, Dickstein E, et al. Myocardial connective tissue growth factor (CCNG2/C72F2) attenuates left ventricular remodeling after myocardial infarction. *PLoS One*. 2012;7:e32130.
- Fennell D. Myocardial salvage: Perispectron, resolution, and radio waves. *Circulation*. 2006;113:1821–3.
- Dietl J, Dietl S, Fournier G, Hildebrandt L, Gutberlet M, Schuler G, et al. Prognostic significance and determinants of myocardial salvage assessed by cardiovascular magnetic resonance in acute reperfused myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55:2475–8.
- van Zijl PP, de Vries HJ, Lammé EN, Coppens JJ, van Marle J, Frenk RH, et al. Morphometry of dermal collagen organization by Fourier analysis is superior to multi-observer assessment. *J Pathol*. 2002;196:384–91.

Publisher's Note

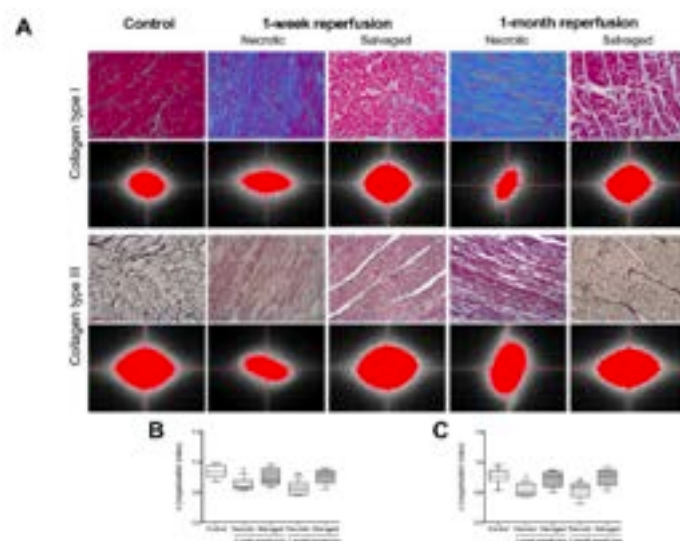
Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Additional file 1: Supplementary Figure 1.



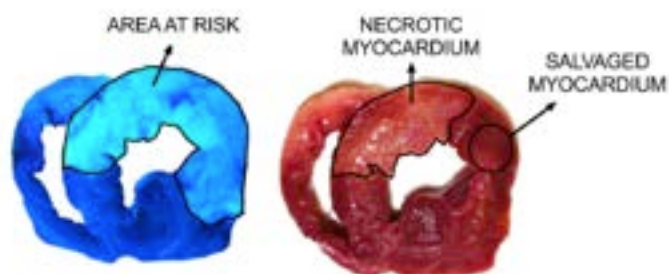
Additional file 1: Supplementary Figure 1. Type I and type III collagen fiber organization in the necrotic and salvaged myocardium isolated after 90-min of ischemia. (A) Representative images from control group (left panel) and the necrotic (central panel) and salvaged (right panel) myocardium isolated from the severe ischemia group (90-min ischemia without reperfusion, right panel) stained with Masson's trichrome (upper panels) and Gomori's reticulin (lower panels) and the Fourier transform spectra obtained from these images. Images were analyzed with Image-Pro Plus analysis software. The scale bars indicate 50 μ m. No differences existed between the collagen organization index of the salvaged and necrotic tissue from the severe ischemia group and control when compared with the organization of collagen type I (B) and type III (C). Upper and lower lines of the boxes represent the 25th and 75th percentiles. Data were analysed by non-paired t-Student's test. Scoring was performed by a blinded observer unaware of the experimental group.

Additional file 2: Supplementary Figure 2.



Additional file 2: Supplementary Figure 2. Type I and type III collagen fiber organization in the necrotic and salvaged myocardium isolated at one week and one month after coronary reperfusion. (A) Representative images from control group (left panel) and from the necrotic and salvaged myocardium isolated from the two reperfusion myocardial infarction (MI) groups [50-min ischemia followed by 1-week (middle panel) or 1-month (right panel) reperfusion] stained with Masson's trichrome (upper panel) and Gomori's reticulin (lower panel) and the Fourier transform spectra obtained from these images. Images were analyzed with Image-Pro Plus analysis software. The scale bars indicate 50 μ m. The collagen type I (B) and type III (C) organization index was lower in the necrotic, but not in the salvaged, myocardium from the one-week and one-month reperfusion groups in comparison to the control myocardium. Data were analysed by non-paired t-Student's test. Scoring was performed by a blinded observer unaware of the experimental group. *P < 0.05, **P < 0.01 vs. control.

Additional file 3: Supplementary Figure 3.



Additional file 3: Supplementary Figure 3. Macroscopic study of myocardial hearts obtained from the swine model. Samples were stained with thioflavin-S (T-S, left) and 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTZ, right). Necrotic tissue was defined as the myocardial area stained with TTZ. Salvaged myocardium was defined as the non-infarcted territory within the area at risk clearly outside the infarcted area (with TTZ and T-S staining).

ANNEX II:

Ortega M*, Ríos-Navarro C*, et al. Meta-Analysis of Extracellular Matrix Dynamics after Myocardial Infarction Using RNA-Sequencing Transcriptomic Database. Int J Mol Sci. 2022;23(24):15615.



Article

Meta-Analysis of Extracellular Matrix Dynamics after Myocardial Infarction Using RNA-Sequencing Transcriptomic Database

Maria Ortega ^{1,†}, César Ríos-Navarro ^{1,†}, José Gavara ^{2,†}, Elena de Dios ^{3,4}, Nerea Pérez-Solís ⁵, Víctor Marcos-Garcés ^{1,6}, Antonio Ferrández-Izquierdo ^{1,6,7}, Vicente Bodí ^{1,3,4,5,6} and Amparo Ruiz-Sauri ^{1,6}

¹ IMCLIVA Health Research Institute, 46100 Valencia, Spain

² Centro de Biomateriales e Ingeniería Textil, Universidad Politécnica de Valencia, 46100 Valencia, Spain

³ Department of Medicine, University of Valencia, 46100 Valencia, Spain

⁴ Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBER) CV, 28029 Madrid, Spain

⁵ Cardiology Department, Hospital Clínico Universitario, 46100 Valencia, Spain

⁶ Department of Pathology, University of Valencia, 46100 Valencia, Spain

⁷ Pathology Department, Hospital Clínico Universitario, 46100 Valencia, Spain

* Correspondence: vicente.bodi@uv.es; Tel.: +34-96-3862578

† These authors contributed equally to this work.



Citation: Ortega, M.; Ríos-Navarro, C.; Gavara, J.; de Dios, E.; Pérez-Solís, N.; Marcos-Garcés, V.; Ferrández-Izquierdo, A.; Bodí, V.; Ruiz-Sauri, A. Meta-Analysis of Extracellular Matrix Dynamics after Myocardial Infarction Using RNA-Sequencing Transcriptomic Database. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 15615. <https://doi.org/10.3390/ijms230415615>

Academic Editors: Jason Poon and Louise E. See-Hee

Received: 24 October 2021

Accepted: 7 December 2021

Published: 9 December 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Extracellular matrix (ECM) changes after myocardial infarction (MI) need precise regulation, and next-generation sequencing technologies provide omics data that can be used in this context. We performed a meta-analysis using RNA-sequencing transcriptomic datasets to identify genes involved in post-MI ECM turnover. Eight studies available in Gene Expression Omnibus were selected following the inclusion criteria. We compare RNA-sequencing data from 92 mice submitted to permanent coronary ligation or sham, identifying differentially expressed genes (p -value < 0.05 and $\text{Log2FoldChange} \geq 2$). Functional enrichment analysis was performed based on Gene Ontology biological processes (BPs). BPs implicated in response to extracellular stimulus, regulation of ECM organization, and ECM disassembly were detected soon after ischemia onset. ECM disassembly occurred between days one to seven post-MI, compared with ECM assembly from day seven onwards. We identified altered mRNA expression of 19 matrix metalloproteinases and four tissue inhibitors of metalloproteinases at post-infarcted ECM remodeling and altered transcriptomic expression of 42 genes encoding 26 collagen subunits at the fibrotic stage. To our knowledge, this is the first meta-analysis using RNA-sequencing datasets to evaluate post-infarcted cardiac interstitium healing, revealing previously unknown mechanisms and molecules actively implicated in ECM remodeling post-MI, which warrant further validation.

Keywords: myocardial infarction; extracellular matrix; RNA-sequencing; meta-analysis

1. Introduction

The extracellular matrix (ECM) is a dynamic non-cellular three-dimensional network of fibers, glycosaminoglycans, proteoglycans, and adhesion glycoproteins. The ECM provides support to tissue and helps regulate diverse cellular functions, including proliferation, survival, differentiation, migration, and inflammation [1–3].

Myocardial infarction (MI) is caused by the thrombotic occlusion of a coronary artery, which requires rapid reperfusion to reestablish nutrient and oxygen supply to the myocardium [4]. After MI, dynamic changes at the cellular level, as well as in ECM composition, are necessary to preserve tissue homeostasis and form a proper fibrotic scar composed mainly of collagen [5,6]. However, these alterations must be perfectly regulated in time and location to avoid adverse left ventricular remodeling and cardiovascular events. In this scenario, matrix metalloproteinases (MMPs), a group of proteases with catalytic function,

and tissue inhibitors of MMP (TIMP) play a key role via the degradation of the damaged ECM components [33,37].

Next-generation sequencing technologies have revolutionized biomedical research by providing a wealth of omics data that can be used to elucidate the molecular mechanisms underlying diseases. Although several studies have been conducted utilizing RNA-sequencing technology on myocardium isolated from experimental models of MI [8–13], few are focused on the dynamic alterations of genes involved in ECM composition and regulation. Furthermore, these studies have been performed at different time points and with a limited number of animals.

Given the importance of a comprehensive understanding of the molecular pathways implicated in ECM remodeling and its composition after MI, as well as the vast amount of transcriptomic data generated in previously published RNA-sequencing studies, our aim in this study is to perform a quantitative meta-analysis using RNA-sequencing transcriptomic datasets focused on scrutinizing the changes in the expression of key genes implicated in ECM composition and regulation after MI induction.

2. Results

2.1. Characteristics of the Selected Studies

Figure 1 illustrates the flow chart used to select the studies in the present meta-analysis [5–13]. Briefly, 15,307 studies were found using the search term “myocardial infarction,” from which only 143 datasets were retrieved from Gene Expression Omnibus (GEO) and reviewed for eligibility. After removing duplicate series ($n = 51$), 84 were excluded for the following reasons: knock-out mice ($n = 24$), single cell or single nuclear ($n = 28$), evaluation of non-infarcted area ($n = 11$), mice submitted to pharmacological treatment ($n = 14$), new-born mice ($n = 3$), insufficient data about the dataset information ($n = 2$), and mice submitted to ischemia followed by four days of ischemia ($n = 2$).

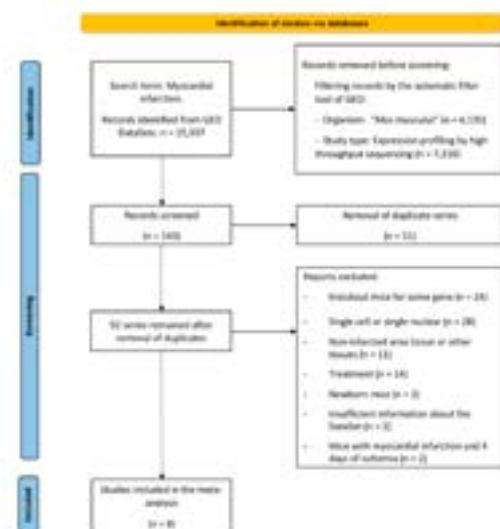


Figure 1. PRISMA meta-analysis flow diagram. Abbreviation: GEO: Gene expression omnibus.

Finally, eight datasets (including 92 animals) were employed in the meta-analysis. Animals were divided into sham mice ($n = 30$, without MI induction), and 62 submitted to different times of coronary ischemia: 6 h ($n = 8$), one day ($n = 16$), three days ($n = 10$), seven days ($n = 7$), 14 days ($n = 10$), and 21 days ($n = 11$). Mice undergoing more than 21 days of ischemia were included in the 21 days group. Table 1 summarizes the selected datasets, the associated publication, and the number of samples for each study group. After performing a principal component analysis, one was discarded from the meta-analysis due to differences in behavior from the other included studies.

Table 1. Summary of GEO datasets for the meta-analysis.

GEO Datasets	Reference	Number of Samples					
		Sham	6 h	1 Day	3 Days	7 Days	21 Days
GSE153494	[9]	3	3	3	3		
GSE153493	N/A	3		3			
GSE151834	[9]				4	4	8
GSE114695	[10]	8		3		3	3
GSE153485	[11]	10	5	5			
GSE154072	N/A						3
GSE104387	[12]	4		2	2		
GSE80350	[13]	1			1		
Total		30	8	16	10	7	11

Abbreviations: GEO: Gene expression omnibus; N/A: not available.

2.2. GO Enrichment Analysis

When compared to sham, the following number of differentially expressed genes (DEGs) was detected in each MI group: 6447 (6 h), 14,246 (1 day), 14,354 (3 days), 13,869 (7 days), 9449 (14 days) and 12,129 (21 days). Afterward, functional enrichment analysis was carried out with the biological process (BPs) terms of gene ontology (GO) (Figure 2A).

At all ischemic times, we observed a clear upregulation (with an adjusted p -value lower than 0.05) of the following ECM-related BPs: (i) Extracellular structure organization (GO:0043062), (ii) ECM organization (GO: 0030198), (iii) Protein localization to the extracellular region (GO: 0071692), and (iv) Establishment of protein localization to the extracellular region (GO: 0035592).

Although BPs involved in response to the extracellular stimulus were upregulated at the initial stages of ischemia (6 h and one day after MI induction), ECM organization started in the 1 day group, as reflected by overexpression of genes implicated in the Regulation of ECM organization (GO:1903053) and Regulation of ECM disassembly (GO: 0010715) BPs. A shift in ECM behavior took place at three days of ischemia, as indicated by the appearance of new BPs, such as ECM disassembly (GO: 0022637), which remained upregulated up to day seven of ischemia. Conversely, the ECM assembly (GO: 0085029) BP showed overrepresentation in the seven days group and remained elevated in the 21 days group (Figure 2B).

To further characterize the process of post-MI matrix turnover, Figure 3 and Table 2 illustrate the name and main functions of the overexpressed genes included in the Extracellular matrix assembly (GO:0085029) and Extracellular matrix disassembly (GO:0022637) BPs. We detected that the mRNA expression genes implicated in ECM disassembly was up-regulated from day one to day seven after MI induction, whereas the mRNA expression of genes involved in ECM assembly were heightened from day seven to day 21 after coronary occlusion. This tendency was also reflected by the 41 genes related to the BP of interest, which remained overexpressed from day seven until day 21 post-MI (Figure 3B). Contrarily, only six new overexpressed genes appeared on day 14, indicating that no substantial changes in the mRNA expression of genes involved in ECM remodeling appeared after seven days of ischemia (Figure 3B).

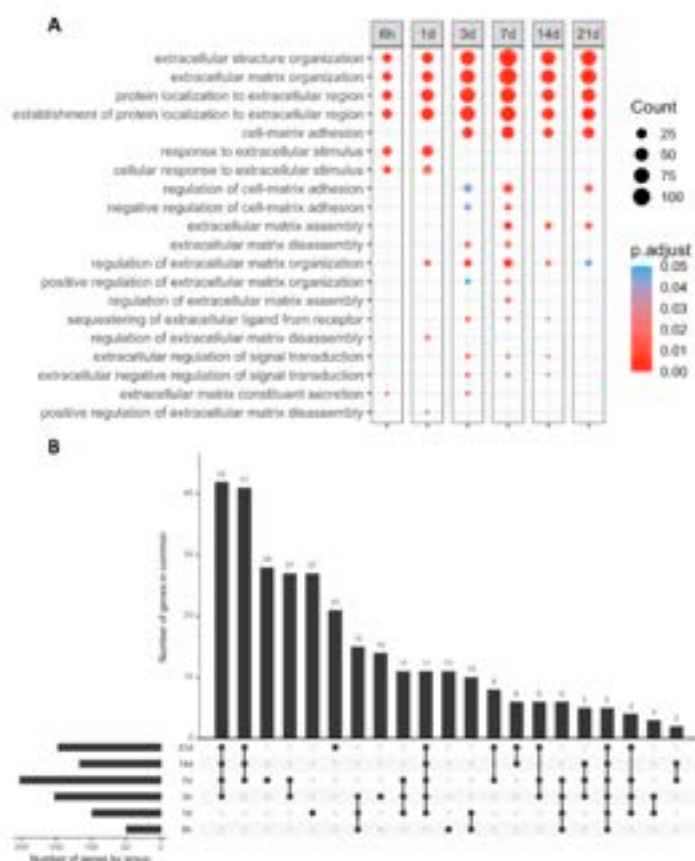


Figure 2. GO BP enrichment analysis filtered by the terms “matrix” or “extracellular.” (A) Extracellular matrix-related BPs overrepresented at each time point after ischemia onset. Myocardial infarction groups are in the columns, and rows represent the different BPs. The size of the circle indicates the number of genes overexpressed, whereas the colors ranging from red to blue represents the *p*-value adjusted as shown in the legend. Red circles in the figure indicate lower *p*-values, while blue represent higher *p*-values. (B) UpSet plot of DEGs. The bottom panel shows the total number of DEGs (*x*-axis) at each time point following coronary occlusion (*y*-axis), while the upper panel shows the intersection of gene sets at multiple time points. Each column corresponds to a time point or set of time points (dots connected by lines below the *x*-axis) containing the same DEGs. The number of genes in each set appears above the column, while the time points shared are indicated in the graphic below the column, with the time points on the left. Abbreviations: BP: Biological process, DEG: Differentially expressed genes, GO: Gene ontology.



Figure 3. BP's enrichment map related to the terms "matrix" or "extracellular" in samples isolated from the seven days group. Hierarchical organization of GO gene-set enrichment results for the seven days group compared to control myocardium. Colors ranging from red to blue represents the *p*-value adjusted as shown in the legend. The red circles in the figure indicate lower *p*-values, while blue represents higher *p*-values. Abbreviations: BP: Biological process, GO: Gene ontology.

Table 2. Full name and function of the genes differentially expressed at different time points of ischemia and implicated in matrix disassembly and assembly (Gene Ontology biological processes).

Gene	Name	6 h	1 Day	3 Days	7 Days	14 Days	21 Days
MATRIX DISASSEMBLY	<i>Egfr</i>		X				
	Tyrosine Kinase Related To Fibroblast Growth Factor Receptor		X				
	<i>Il6</i>		X	X	X		
	Interleukin-6		X	X	X		
	<i>Pdpe</i>		X	X	X		
	Glycoprotein 36		X	X	X		
	<i>Tgfb2</i>		X		X		
	Transforming Growth Factor Beta 2		X		X		
	<i>Lcp1</i>			X	X		
	Lymphocyte Cytosolic Protein 1			X	X		
MATRIX ASSEMBLY	<i>Fscn1</i>			X			
	Fascin Actin-Bundling Protein 1			X			
	<i>Ctsb</i>			X	X		
	Cathepsin 5			X	X		
	<i>Sh3pca2b</i>			X	X		
	Tyrosine Kinase Substrate With Four SH3 Domains			X	X		
	<i>Mmp13</i>			X			
	Matrix Metalloproteinase 13			X			
	<i>Fap</i>				X		
	Fibroblast Activation Protein Alpha				X		
MATRIX ASSEMBLY	<i>Kif9</i>				X		
	Kinesin Family Member 9				X		
	<i>Smc9</i>				X	X	X
	SMY-Box Transcription Factor 9				X	X	X
	<i>Fkbp10</i>				X		
	FKBP Prolyl Isomerase 10				X		
	<i>Fbln5</i>				X	X	X
	Fibulin 5				X	X	X
	<i>Han2</i>				X		
	Hyaluronan Synthase 2				X		
MATRIX ASSEMBLY	<i>Lox</i>				X	X	X
	Lysyl Oxidase				X	X	X
	<i>Efemp2</i>				X		
	EGF Containing Fibulin Extracellular Matrix Protein 2				X		
	<i>Lthp1</i>				X	X	X
	Latent Transforming Growth Factor Beta Binding Protein 3				X	X	X
	<i>Ecm1</i>				X		
	Elastin Microfibril Interactor 1				X		
	<i>Col1a2</i>				X	X	X
	Collagen Type 1 Alpha 2 Chain				X	X	X
MATRIX ASSEMBLY	<i>Plkb2</i>				X		
	Pleckstrin homology Like Domain Family B Member 2				X		
	<i>Antxr1</i>				X	X	X
	ANTXR Cell Adhesion Molecule 1				X	X	X
	<i>Mfap4</i>				X	X	X
	Microfibril Associated Protein 4				X	X	X
	<i>Gpm6b</i>						X
	Glycoprotein M6B						X

2.3. Dynamic Changes in Genes Encoding MMPs and TIMPs in the Infarcted Area Post-MI

Having evaluated the main BP's participating in ECM remodeling, we next sought to pinpoint the dynamic alterations in MMP and TIMP expression detected in the infarcted myocardium (Figures 4 and 5, respectively). According to our data, 19 MMPs and 4 TIMPs had altered mRNA expression due to ischemic insult.

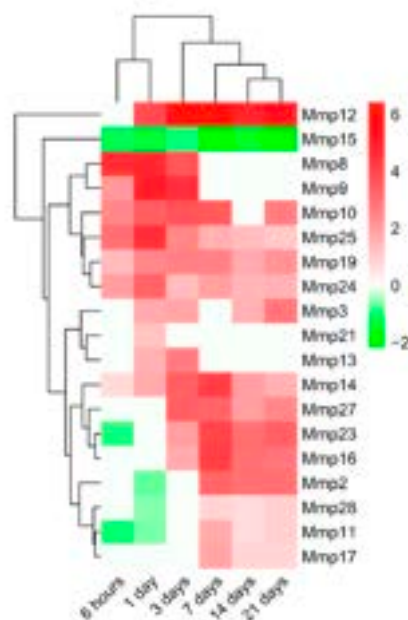


Figure 4. Heatmap of the Log2FoldChange of MMPs genes at different time points after coronary occlusion. Myocardial infarction groups are in the columns, and the genes-encoding MMPs are in the rows. Gene intensities were log2 transformed and are displayed as colors ranging from red to green, as shown in the key. Red squares in the figure represent high-expression genes, while green squares represent low-expression genes. Both rows and columns are clustered using correlation distance and average linkage. Abbreviation: MMP: Matrix metalloproteinase.

Mmp8 and *Mmp9* became overexpressed very soon after coronary occlusion (6 h), peaking at day one of ischemia with a Log2FoldChange around 4 and returning to control levels at day seven of ischemia. The mRNA expression of *Mmp10*, *Mmp19*, *Mmp24*, and *Mmp25* was also elevated in the 6 h group, but overexpression persisted until late phases (21 days) after MI, displaying a Log2FoldChange no higher than 4.

The augmented mRNA expression of the second group of MMPs, including *Mmp16*, *Mmp17*, and *Mmp27*, started at days three to seven after ischemia onset and remained elevated at day 21. In contrast, transcriptomic levels of *Mmp21*, *Mmp23*, and *Mmp28* exhibited a bimodal pattern: their mRNA expression was downregulated in the first 24 h after ischemia, whereas significant upregulation was observed in the infarcted tissue

isolated from day seven to day 21 post-MI. Lastly, *Mmp15* gene expression followed a different pattern, showing a significant decrease in gene expression after the ischemic insult.

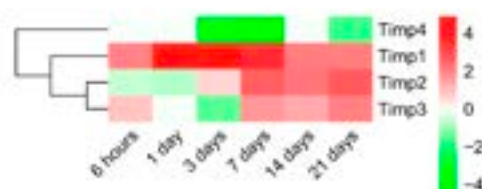


Figure 5. Heatmap of the Log2FoldChange of TIMP's genes at different time points after coronary occlusion. Myocardial infarction groups are in the columns, and the different genes encoding TIMPs are in the rows. Gene intensities were log2 transformed and are displayed as colors ranging from red to green, as shown in the key. Red squares in the figure represent high-expression genes, while green squares represent low-expression genes. Both rows and columns are clustered using correlation distance and average linkage. Abbreviation: TIMP: Tissue inhibitor of metalloproteinases.

Regarding the endogenous inhibitors of MMPs, an altered mRNA expression of 4 different TIMPs were observed. Concretely, a clear upregulation of *Timp1* was detected at all ischemic times, while *Timp2* and *Timp3* mRNA expression only increased from day seven onwards. On the contrary, the *Timp4* gene expression was downregulated after coronary occlusion (Figure 5).

Overall, 19 different MMPs and 4 TIMPs were implicated in post-infarcted ECM healing. Of these, *Mmp8*, *Mmp9*, *Mmp10*, *Mmp13*, *Mmp24*, and *Mmp25* displayed early overrepresentation during ECM disassembly, whereas a second group (*Mmp27*, *Mmp31*, *Mmp16*, *Mmp17*, *Mmp21*, and *Mmp28* and also *Timp2* and *Timp3*) were involved at late stages, when most ECM assembly takes place.

2.4. Dynamic Alterations in Transcriptomic Analysis of Genes Encoding Collagen Subunits

Lastly, we studied the mRNA expression of genes encoding different collagen subunits ultimately implicated in post-MI solid fibrotic scar formation (Figure 6). Based on our results, a total of 42 genes related to 26 different collagen subunits displayed altered mRNA expression within the infarct region compared to control tissue. In genes associated with collagen subunits, behavior overall was bimodal: decreased mRNA expression until the day one post-MI followed by massively increased expression (with Log2FoldChange greater than 2) from day three to chronic phases (21 days).

In total, 15 genes involved in the formation of 12 different collagen molecules displayed downregulated mRNA expression at the acute phase (until day 3) of post-infarcted ECM healing. Afterward, they showed significantly enhanced expression at subacute phases (7–14 days after coronary occlusion) compared to control myocardium. Contrarily, *Col6a6*, *Col3a1*, and *Col25a1* genes showed no augmentation in mRNA expression at chronic phases of ischemia.

The highest transcriptional expression of genes involved in collagen formation was detected on day seven after coronary ligation. Of note, *Col1a1*, *Col1a2*, *Col2a1*, *Col3a1*, *Col8a1*, *Col8a2*, *Col8a3*, *Col8a2*, *Col11a1*, *Col12a1*, *Col14a1*, and *Col24a1* displayed a Log2FoldChange of 5–9 on day seven of ischemia, a tendency that persisted up to day 21. Lastly, in line with previous data, collagen subunits showed similar expression at day 14 to those over-represented at day 21 after ischemia onset, where 34 genes involved in the formation of 22 collagen subunits displayed heightened mRNA expression.



Figure 6. Heatmap of the Log2FoldChange of the collagen genes at different time points after coronary occlusion. Myocardial infarction groups are in the columns, and the genes encoding collagen subunits are in the rows. Gene intensities were log2 transformed and are displayed as colors ranging from red to green, as shown in the key. Red squares in the figure represent high-expression genes, while green squares represent low-expression genes. Both rows and columns are clustered using correlation distance and average linkage.

Altogether, alterations in the transcriptomic expression of up to 26 different collagen subunits were detected along the process of post-infarcted ECM remodeling. The maximum number of upregulated genes occurred in the seven days group, in parallel with onset of ECM assembly. This tendency was sustained at the chronic phase (21 days after coronary occlusion).

3. Discussion

This study aims to provide insight into variations in the cardiac interstitium occurring after MI via designing a quantitative meta-analysis of eight independent RNA-sequencing studies using infarcted tissue isolated at various time points after ischemia onset. Specifically, our results conclude that the augmented mRNA expression of genes implicated in ECM disassembly occurs within the first seven days after MI, while upregulation of ECM assembly occurs from day seven onwards. Using this novel approach, we have identified up to 19 different MMPs and 4 TIMPs participating in post-infarcted ECM turnover and 26 different collagen subunits displaying altered transcriptomic expression during fibrotic scar formation (Figure 7). This new data could be of interest for designing future clinical and experimental approaches to shed light on the pathophysiology of MI, specifically on ECM remodeling post-MI.



Figure 7. Central illustration. ECM disassembly occurred between days one to seven post-MI, compared with ECM assembly from day seven onwards. The altered mRNA expression of 19 matrix metalloproteinases and four TIMPs at post-infarcted ECM remodeling as well as altered transcriptomic expression of 42 genes encoding 26 collagen subunits at the fibrotic stage, were detected. Abbreviations: ECM: Extracellular matrix; MI: myocardial infarction; MMP: Matrix metalloproteinase; TIMP: Tissue inhibitor of metalloproteinases. Figure was produced using Servier Medical Art.

3.1. Role of Cardiac Interstitium Following MI

MI, one of the main causes of morbimortality in western countries, is caused by the thrombotic obstruction of a coronary artery, leading to a lack of oxygen and nutrients in the downstream myocardium [4,14]. Ischemic insult might provoke massive cardiomyocyte necrosis and ECM alterations which must be sequentially resolved in time and location. Firstly, an orchestrated immune reaction is activated to clean the infarcted myocardium from damaged cells and ECM components. Following this, myofibroblast-secreted collagen fibers are decisive to constitute a solid scar [5,15,16]. Cardiac ECM, a three-dimensional network of organized macromolecules responsible for providing biomechanical and bio-

chemical support to cardiomyocytes, also experiences substantial alterations after MI [5,17]. In fact, an exaggerated cardiac ECM remodeling can cause the development of post-MI heart failure, optimal fibrotic scar formation is of utmost importance. Therefore, deeper comprehension of post-infarcted ECM changes and key molecules implicated in this process might provide the key to flawless management of cardiac repair.

3.2. RNA-Sequencing Technology to Further Comprehend Mechanisms Underlying ECM Changes

Omics technologies have revolutionized biomedical research in recent years, with the emergence of a wealth of data regarding different physiological and pathological situations. Although several studies have been conducted utilizing RNA-sequencing technology on infarcted myocardium isolated from experimental models [8–13], there is a lack of publications focused on ECM, a central and sometimes inconspicuous actor in the pathophysiology of MI. For this study, we therefore, designed a meta-analysis of previously published RNA-sequencing studies, focusing on elucidating the alterations in the expression of the principal genes implicated in ECM composition and regulation after MI.

Our meta-analysis included data from eight studies in which infarcted mice hearts were evaluated via RNA-sequencing analysis. The novelty of our study lies in the following: (i) no previous publications have examined the mechanisms underpinning ECM healing after MI; (ii) our substantial sample size ($n = 92$), including tissue isolated at different time points after ischemia onset, allows us to characterize their dynamics, and also strengthens the statistical power of our results.

Based on the results of our analysis of gene expression and functional enrichment on DEGs, communication between damaged cardiac interstitium and heart resident cells has already begun 6 h after coronary occlusion, resulting in overexpression of BP's related to Regulation of ECM disassembly and Regulation of ECM organization 24 h post-MI. Upregulation of genes implicated in ECM disassembly was detected in the three days group. A previous study from Yan et al. demonstrated that neutrophils and M1-like macrophages are predominantly present in the infarcted myocardium at this specific time point [16]. Both leukocyte subtypes exert pro-inflammatory functions and are reported to actively participate in the clearance of injured ECM. At day seven post-MI, overexpression of the BP's implicated in not only ECM disassembly but also ECM assembly takes place, illustrating the intriguing and dynamic behavior of the cardiac interstitium. Finally, ECM protein deposition persists until chronic phases.

Collectively, these results indicate that rapid genetic changes occur soon after coronary occlusion in an orchestrated fashion aimed at activating molecular pathways to clean and repair infarcted cardiac interstitium. Moreover, ECM disassembly occurs within the first seven days after MI induction, whereas ECM assembly occurs from day seven onwards.

3.3. Alterations in MMP and TIMP Expression after MI

In post-infarction healing, MMPs (a group of 25 proteolytic enzymes) are expressed by various cell types and are mainly responsible for ECM turnover, cytokine signaling, and leukocyte cell trafficking. MMP's activity is controlled by specific inhibitors, named TIMPs, which are also involved in angiogenesis, cell proliferation, and apoptosis [19,20]. Scrutinizing the existence of both MMPs per se and peptide fragments generated by MMP cleavage is crucial to advance the understanding of post-MI heart failure development and hasten the discovery of potential predictive biomarkers [21,22]. In the current study, we focused on evaluating the dynamic variations in mRNA expression of genes encoding MMPs in the infarcted myocardium after ischemic insult.

According to our data, the mRNA expression of 19 MMPs was altered post-MI, showing a bimodal pattern. MMP8, MMP9, MMP10, MMP19, MMP24, and MMP25 displayed an early overrepresentation during ECM disassembly, whereas MMP27, MMP11, MMP16, MMP17, MMP23, and MMP28 are involved at late stages (during ECM assembly). Although further experiments are needed, a plausible explanation might be that the first

group of MMPs participates in removing damaged ECM components, while the second is involved in developing a solid fibrotic scar. In fact, this hypothesis is reinforced by the results obtained regarding the transcriptomic expression of TIMPs post-MI. The clear augmentation of three different TIMPs (TIMP1, TIMP2, and TIMP3) from day seven onwards might participate in the inhibition of MMPs, thus reducing ECM disassembly and starting ECM assembly. These data are in line with those previously reported in a swine MI model since mRNA levels of TIMP1, TIMP2, and TIMP3, but not TIMP4, were increased in the necrotic area of hearts submitted to 90 min of ischemia followed by seven days of reperfusion [3].

Regarding the implication and dynamics of MMPs in ECM healing, MMP2, MMP3, MMP8, MMP9, MMP13, MMP14, and MMP28 have been widely described in the current literature, and results are in line with those obtained in this meta-analysis [21,23–27]. In contrast, the role of MMP10, MMP11, MMP15, MMP16, MMP17, MMP18, MMP23, MMP24, MMP25, and MMP27 post-MI has more recently been investigated via immunoblotting and immunohistochemistry [21], showing slight discrepancies with our results. This disagreement is most likely due to variations in study design: Kaminski et al. determined mRNA expression only on macrophages and fibroblasts [21], while our results are based on the transcriptome of the whole cardiac tissue.

Overall, our study breaks new ground by expanding current knowledge on MMPs in this scenario: we have demonstrated the participation and dynamics of up to 19 different MMPs and 4 TIMPs in the turnover and reparation of the infarcted ECM after MI. Additionally, these results could lay the groundwork for designing future experimental approaches to further elucidate the function of new and understudied MMPs in MI scenarios.

3.4. Dynamic Changes in the Expression of Genes Implicated in Collagen Synthesis

Fibrotic scar formation constitutes the end result of the myocardial reparative process after different cardiac insults, including MI. Contrary to the insignificant regenerative capacity of adult cardiomyocytes, replacement fibrosis mediated by myofibroblasts clearly reflects a vigorous biological process aimed at promoting solid scar formation and preventing deleterious left ventricular remodeling [1,6,7,27]. The participation of collagen in fibrotic scar formation following MI has been widely described [1]. Traditionally, research has focused on evaluating type I and type III collagen, considered the main components of the infarcted heart at the fibrotic phase [1,3,6]. Indeed, their amount and spatial orientation is considered crucial to ensure proper mechanical and electrical functions in the repaired myocardium [28,29]. However, little is known about the pathophysiological implications of other subunits of this molecule.

Frangogiannis and colleagues recently published an in-depth review describing fibrillar and nonfibrillar collagens present in cardiac tissue after MI or ischemic heart failure [1]. According to their data, no information was available on the role of 14 collagen subunits in this scenario (i.e., Col VII, VIII, IX, X, XII, XIII, XVI, XVII, XXII, XXIII, XXIV, and XXV) [1]. Nonetheless, developing transcriptomic and proteomic techniques have brought promising results to further comprehend the implications of novel collagen subunits in fibrotic scar formation.

A first study employing next-generation sequencing was performed by Yokota et al. [9] and elucidated the previously unknown role of Col VIII, XII, and XVI post-MI. Briefly, in mice undergoing permanent coronary ligation, upregulated mRNA expression of these three subunits was reported to heighten by day three, peak at day seven, and diminish by six weeks in the infarct area. These data concur with those obtained in our meta-analysis performed in almost 100 MI animals. Furthermore, our study reveals a total of 26 collagen subunits represented after coronary occlusion. Specifically, collagen-related gene transcription is demonstrated to peak at only seven days after coronary occlusion, paralleling the onset of ECM assembly. In fact, even at late-stage phases (21 days post-MI), increased mRNA expression persisted in 34 genes from 22 different collagen subunits. To

our best knowledge, this is the first study illustrating the involvement of such a large quantity of different collagen subunits during post-MI cardiac fibrosis.

Nonetheless, it should be kept in mind that augmented gene expression is not always translated to the protein level. For instance, although heightened mRNA expression of Col XI and Col XXIV was noted in our meta-analysis, no protein modifications in these two subunits were demonstrated in swine and human cardiac interstitium isolated after MI [30]. Although the mRNA upregulation is not always transferred at the protein level, our study could help establish the basis for designing further clinical and experimental studies addressed at broadening the range of potential collagen subunits participating in post-MI replacement fibrosis.

3.5. Limitations of the Study

In our study, we could not detect DEGs among different datasets due to the statistical analysis performed.

Although the cellular component is also part of the ECM, no data is available to properly describe the changes in the cellular components after MI.

4. Materials and Methods

To select the studies for the meta-analysis, a dataset search using the term “myocardial infarction” was carried out in the GEO database [31]. The study search ended in September 2021, and the inclusion criteria were studies performed in *Mus musculus*, animals submitted to MI or sham, and studies with bulk RNA-sequencing analysis from the infarcted myocardium. The exclusion criteria were studies performed by single cell or single nucleus RNA sequencing, mice submitted to any pharmacological or mechanical intervention, studies with newborn mice, analyses carried out in blood or non-infarcted myocardium, and studies not correctly filtered by the GEO filters.

The datasets were evaluated following inclusion and exclusion criteria, as shown in the complete study flow chart detailed in the PRISMA Flow Diagram (Figure 1). Afterward, the SRA Run Selector was used to obtain the accessions and download the sequence data files using SRA Toolkit. The FASTA files were aligned to the reference genome (GRCm38) with Bowtie2 [32]. Read counts for each gene were calculated using HTSeq [33] to obtain expression levels.

All the following computational analyses were performed in the R environment [34]. Read counts for each study were normalized (except for the GSE83350 dataset, which only has one animal per study group), saved, and combined with the normalized counts of all studies in a unique DESeqDataSet. The design was also adjusted for batch effect (the study from which the data have been obtained). Differential expression analysis was performed with the DESeq2 (1.30.1) [35] to compare all the infarcted groups with sham. A *p*-adjusted value < 0.05 and a Log2FoldChange ≥ 2 cutoff were used for determining DEGs.

Functional enrichment analysis of the DEGs was performed with the Cluster Profiler package [36] using GO annotations [37] with the BP category and adjusting the *p*-value with the Benjamini-Hochberg method. BPs with a *p*-value less than 0.05 were selected. As we aimed to evaluate BPs related to the ECM, the descriptions were filtered using the terms “extracellular” and “matrix.” Graphical representations were carried out with the ggplot2 (3.3.5) [38], UpSetR (1.4.0) [39], and phatmap (1.0.1) [40] packages.

5. Conclusions

To our knowledge, this is the first meta-analysis to use RNA-sequencing datasets to gain insight into post-infarcted ECM healing. As derived from this novel approach, genetic upregulation of the molecular mechanisms directed at repairing injured ECM start as early as 6 h after infarction induction. ECM disassembly upregulation takes place within the first seven days post-coronary occlusion, whereas genetic mechanisms addressed at promoting ECM assembly occur from day seven onwards. The mRNA levels of genes encoding 19 different MMPs, four TIMPs, and 26 collagen subunits are substantially altered

within the infarct region. These novel data could lay the groundwork for designing future experimental and clinical approaches to further comprehend ECM healing in the setting of acute MI.

Author Contributions: Conceptualization, M.O. and C.R.-N.; Methodology, M.O.; Formal analysis, M.O., C.R.-N., J.G., E.D.D., N.P.-S. and V.M.-G.; Resources, Writing—original draft preparation, M.O. and C.R.-N.; Writing—review and editing, M.O., C.R.-N., J.G., E.D.D., N.P.-S., A.F.-I., V.M.-G., V.B. and A.R.-S.; Funding acquisition, V.B. and A.R.-S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by grants from “Instituto de Salud Carlos III” and “Fondos Europeos de Desarrollo Regional FEDER” (grant numbers PI20/00637 and CIBERCV16/11/00466 and CM21/00075 to V.M.-G.) and Conselleria de Educació—Generalitat Valenciana (PROMETEO/2021/008). J.G. acknowledges financial support from the “Agencia Estatal de Investigación” (grant PGC2020-043881-I/AEI/10.13039/501100011033).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Frangogiannis, N.G. The extracellular matrix in ischemic and nonischemic heart failure. *Circ. Res.* **2010**, *125*, 117–146. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Theodoridis, A.D.; Marou, D.; Karamanios, N.K. The extracellular matrix as a multitasking player in disease. *FEBS J.* **2019**, *286*, 2830–2869. [\[CrossRef\]](#)
- Rios-Navarro, C.; Ortega, M.; Marcos-Garcés, V.; Gavara, J.; de Dios, E.; Perez-Sole, N.; Chorro, F.J.; Bodi, V.; Ruiz-Suarez, A. Interstitial changes after reperfused myocardial infarction in swine: Morphometric and genetic analysis. *BMC Vit. Res.* **2020**, *16*, 262–266. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Baner, B.; Heusch, G.; O’Neil, M.; Van de Werf, F. Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2015**, *65*, 1454–1471. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Nieben, S.H.; Moxton, A.J.; DeLeon-Pennell, K.Y.; Genovese, F.; Karsdal, M.; Lindsey, M.L. Understanding cardiac extracellular matrix remodeling to develop biomarkers of myocardial infarction outcomes. *Matrix Biol.* **2019**, *75–76*, 43–57. [\[CrossRef\]](#)
- Hervás, A.; Ruiz-Suarez, A.; Gavara, J.; Montanés, J.V.; de Dios, E.; Rios-Navarro, C.; Perez-Sole, N.; Perez, I.; Montón, D.; Morales, J.M.; et al. A Multidisciplinary Assessment of Remote Myocardial Fibrosis After Reperfused Myocardial Infarction in Swine and Patients. *J. Cardiores. Transl. Res.* **2016**, *9*, 321–333. [\[CrossRef\]](#)
- Frangogiannis, N.G. The extracellular matrix in myocardial injury, repair, and remodeling. *J. Clin. Invest.* **2017**, *127*, 1603–1612. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Yokota, T.; McCourt, J.; Ma, F.; Ren, S.; Li, S.; Kim, T.H.; Karmaliyev, Y.Z.; Nasiri, R.; Ahadian, S.; Nguyen, T.; et al. Type V Collagen in Scar Tissue Regulates the Size of Scar after Heart Injury. *Cell* **2020**, *182*, 545–562. [\[CrossRef\]](#)
- Liu, W.; Shen, J.; Li, Y.; Wu, J.; Luo, X.; Yu, Y.; Zhang, Y.; Gu, L.; Zhang, X.; Jiang, C.; et al. Pyroptosis inhibition improves the symptom of acute myocardial infarction. *Cell Death Dis.* **2021**, *12*, 852–853. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Park, T.J.; Park, J.H.; Lee, G.S.; Lee, J.Y.; Shin, J.H.; Kim, M.W.; Kim, Y.S.; Kim, J.Y.; Oh, K.J.; Han, B.S.; et al. Quantitative proteomic analysis reveal that GPX4 downregulation during myocardial infarction contributes to ferroptosis in cardiomyocytes. *Cell Death Dis.* **2019**, *10*, 805–818. [\[CrossRef\]](#)
- Art, M.; Krevetig, M.; Benoit, R.; Doran, S.; Turker, H.; Uhlen, M.; Clausen, M.; Wikström, J.; Eral, D.; Zhang, C.; et al. Integrative transcriptomic analysis of tissue-specific metabolic crosstalk after myocardial infarction. *Elife* **2021**, *10*, e66921. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Williams, A.L.; Walton, C.B.; Pinell, B.; Khadka, V.S.; Dunn, B.; Lee, K.; Anagar, M.C.T.; Avelar, A.; Shih, R.V. Ischemic heart injury leads to HIF1-dependent differential splicing of CaMKγ. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 13116. [\[CrossRef\]](#)
- Olsen, M.B.; Hildebrand, G.A.; Scheller, K.; Vinge, L.E.; Alhane, K.; Palbek, V.; Wang, J.; Nørskov, C.G.; Luna, L.; Johansen, J.; et al. NLR3-Dependent Regulation of Cardiac Fibroblast Proliferation Prevents Myocardial Rupture. *Cell Rep.* **2017**, *18*, 80–92. [\[CrossRef\]](#)
- Niccoli, G.; Montone, R.A.; Baner, B.; Thiele, H.; Crea, F.; Heusch, G.; Bullock, H.; Hausenloy, D.J.; Berry, C.; Steinhilber, T.; et al. Optimized Treatment of ST-Elevation Myocardial Infarction. *Circ. Res.* **2019**, *125*, 245–256. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Crespo-Avilés, G.E.; Mukherjee, R.T.; Kovik, X.Y.; Cabrera-Fuentes, H.A.; Hausenloy, D.J. Inflammation following acute myocardial infarction: Multiple players, dynamic roles, and novel therapeutic opportunities. *Pharmacol. Ther.* **2018**, *186*, 73–87.

16. Prabhu, S.D.; Frangogiannis, N.G. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circ. Res.* **2016**, *119*, 91–112. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Wight, T.N.; Venion, R.B. Targeting the extracellular matrix promotes healing following myocardial infarction. *Circ. Res.* **2019**, *125*, 802–804. [\[CrossRef\]](#)
18. Yan, X.; Anzai, A.; Katsumata, Y.; Matsubashi, T.; Ito, K.; Endo, J.; Yamamoto, T.; Takashima, A.; Shimura, K.; Shen, W.; et al. Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2013**, *62*, 24–35. [\[CrossRef\]](#)
19. Aspino, V.; Boock, M.; Gill, S.E. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. *Matrix Biol.* **2015**, *44–46*, 247–254. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
20. Calat-Pacheco, G.A.; Garza-Velaz, I.; Castro-De la Rosa, C.; Ramirez-Acuña, J.M.; Perez-Romero, B.A.; Guerrero-Rodriguez, J.F.; Martinez-Ariza, N.; Martinez-Fierro, M.L. The roles of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 9739. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
21. Kaminski, A.R.; Moore, E.T.; Dasek, M.J.; Valerio, F.M.; Flynn, E.R.; Lindsey, M.L. The compendium of matrix metalloproteinase expression in the left ventricle of mice following myocardial infarction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2020**, *318*, H706–H714. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. DeLeon-Pennell, K.Y.; Meschieri, C.A.; Jung, M.; Lindsey, M.L. Matrix Metalloproteinases in Myocardial Infarction and Heart Failure. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2017**, *147*, 75–100. [\[PubMed\]](#)
23. Chen, J.; Tang, C.H.; Allport, J.R.; Chen, S.; Weisleder, R.; Huang, P.L. Near-infrared fluorescent imaging of matrix metalloproteinase activity after myocardial infarction. *Circulation* **2005**, *111*, 1800–1805. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Iyer, R.P.; Jung, M.; Lindsey, M.L. MMP-9 signaling in the left ventricle following myocardial infarction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2016**, *311*, 190. [\[CrossRef\]](#)
25. Lindsey, M.L. Assigning matrix metalloproteinase roles in ischemic cardiac remodeling. *Nat. Rev. Cardiol.* **2008**, *15*, 471–479. [\[CrossRef\]](#)
26. Ma, Y.; Halade, G.V.; Zhang, J.; Ramirez, T.A.; Levin, D.; Voorhees, A.; Jin, Y.F.; Han, H.C.; Maricose, A.M.; Lindsey, M.L. Matrix metalloproteinase-28 deletion exacerbates cardiac dysfunction and rupture after myocardial infarction in mice by inhibiting M2 macrophage activation. *Circ. Res.* **2013**, *112*, 675–688. [\[CrossRef\]](#)
27. Talman, V.; Rasko, H. Cardiac fibrosis in myocardial infarction—From repair and remodeling to regeneration. *Cell Tissue Res.* **2016**, *365*, 563–581. [\[CrossRef\]](#)
28. Marcos-Garcia, V.; Rios-Narvaez, C.; Gómez-Torres, F.; Gavara, J.; de Dios, E.; Diaz, A.; Mirana, G.; Choero, F.J.; Rodi, V.; Ruiz-Sauri, A. Fourier analysis of collagen bundle orientation in myocardial infarction scars. *Histochem. Cell Biol.* **2022**, *158*, 471–483. [\[CrossRef\]](#)
29. Hervas, A.; Ruiz-Sauri, A.; de Dios, E.; Forteza, M.J.; Mirana, G.; Nunez, J.; Gomez, C.; Bonanad, C.; Perez-Sole, N.; Gavara, J.; et al. Inhomogeneity of collagen organization within the fibrotic scar after myocardial infarction: Results in a swine model and in human samples. *J. Anat.* **2016**, *228*, 47–58. [\[CrossRef\]](#)
30. Basilobee-Barreiros, J.; Didangelos, A.; Schoendube, F.A.; Doudov, I.; Yin, X.; Fernandez Caggiano, M.; Willett, P.; Pantmann, V.O.; Aldama-Lopez, G.; Shah, A.M.; et al. Proteomics analysis of cardiac extracellular matrix remodeling in a porcine model of ischemia/reperfusion injury. *Circulation* **2012**, *125*, 799–802. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
31. Baevre, T.; Wilhite, S.E.; Ledoux, P.; Evangelista, C.; Kim, I.F.; Tomashevsky, M.; Marshall, K.A.; Philipp, K.H.; Sheehan, P.M.; Holko, M.; et al. NCBI GEO: Archive for functional genomics data sets—Update. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, D991–D995. [\[CrossRef\]](#)
32. Langmead, B.; Salzberg, S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 357–359. [\[CrossRef\]](#)
33. Anders, S.; Pyl, P.T.; Huber, W. HTSeq—A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* **2015**, *31*, 166–169. [\[CrossRef\]](#)
34. RStudio Team. *RStudio: Integrated Development for R*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2019.
35. Love, M.I.; Huber, W.; Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **2014**, *15*, 550–558. [\[CrossRef\]](#)
36. Yu, G.; Wang, L.G.; Han, Y.; He, Q.Y. clusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS J. Integr. Biol.* **2012**, *16*, 284–287. [\[CrossRef\]](#)
37. Mi, H.; Muruganujan, A.; Ebert, D.; Huang, X.; Thomas, P.D. PANTHER version 14: More genomes, a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, D419–D426. [\[CrossRef\]](#)
38. Wickham, H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*; Springer: New York, NY, USA, 2016; Available online: <https://ggplot2.tidyverse.org> (accessed on 11 November 2021).
39. Conway, J.R.; Lex, A.; Gehlenborg, N. UpSetR: An R package for the visualization of intersecting sets and their properties. *Bioinformatics* **2017**, *33*, 2938–2940. [\[CrossRef\]](#)
40. Kolde, R. *Heatmap: Pretty Heatmaps*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2015.

ANNEX III:

Ortega M*, Fábrega-García MM*, et al. Novel fibrillar and non-fibrillar collagens involved in fibrotic scar formation after myocardial infarction. *Int J Mol Sci.* 2024, 25, 6625.



Article

Novel Fibrillar and Non-Fibrillar Collagens Involved in Fibrotic Scar Formation after Myocardial Infarction

Maria Ortega ^{1,†}, María Mar Fábrega-García ^{2,†}, Tamara Molina-García ³, José Gavara ^{3,4,5}, Elena de Dios ⁶,
Nerea Pérez-Solís ^{1,6}, Víctor Marcos-García ^{3,4,5,6}, Jaime José Padilla-Izquierdo ⁶, Ana Díaz ⁷, Luis Martínez-Dolz ^{8,9,†},
Manuel Jiménez-Navarro ^{8,10,11,12}, César Ríos-Navarro ^{1,2,4,5,6}, Vicente Roda ^{3,4,5,13,†} and Amparo Ruiz-Santí ^{1,2,4}

- ¹ ICLIS-A Biomedical Research Institute, 46100 Valencia, Spain; m.ortega@iclis.es (M.O.);
mariafabrega@iclis.es (M.M.F.-G.); v.rosa@iclis.es (V.R.-N.); vic_rod@iclis.es (V.R.);
ampru@iclis.es (A.R.S.)
² Department of Pathology, University of Valencia, 46100 Valencia, Spain; mariafabrega@hivall.com
³ Centro de Biomateriales e Ingeniería Textil, Universidad Politécnica de Valencia, 46100 Valencia, Spain;
jose.gavara@upv.es
⁴ Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBER) CV, 28002 Madrid, Spain; ciberm@iclis.es (J.G.);
luis.martinez@iclis.es (L.M.-D.); mjm@iclis.es (M.J.-N.)
⁵ Cardiology Department, Hospital Clínico Universitario, 46100 Valencia, Spain
⁶ Anatomical Pathology Department, Hospital Clínico Universitario, 46100 Valencia, Spain;
jpaz@iclis.es
⁷ Unidad Central de Investigación Médica, University of Valencia, 46100 Valencia, Spain; ana.diaz@uv.es
⁸ Cardiology Department, Hospital Universitario Politécnico La Fe, 46020 Valencia, Spain
⁹ Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, 46020 Valencia, Spain
¹⁰ Servicio de Cardiología y Cirugía Cardiovascular Área del Corazón, Hospital Universitario Virgen de la
Victoria, 28002 Málaga, Spain
¹¹ Instituto de Investigación Biomédica de Málaga y Plataforma en Nanomedicina (IBIMA Plataforma
BIONANO), 29010 Málaga, Spain
¹² Departamento de Medicina y Dermatología, Facultad de Medicina, Universidad de Málaga,
28002 Málaga, Spain
¹³ Department of Medicine, University of Valencia, 46100 Valencia, Spain
[†] Correspondence: maria.ortega@iclis.es (M.O.); vicente.roda@iclis.es (V.R.)
[‡] These authors contributed equally to this work.



Citation: Ortega, M.; Fábrega-García, M.M.; Molina-García, T.; Gavara, J.; de Dios, E.; Pérez-Solís, N.; Marcos-García, V.; Padilla-Izquierdo, J.J.; Díaz, A.; Martínez-Dolz, L.; et al. Novel Fibrillar and Non-Fibrillar Collagens Involved in Fibrotic Scar Formation after Myocardial Infarction. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 6025. <https://doi.org/10.3390/ijms21266025>

Academic Editor: Eva R. Irujo-Arispe

Received: 18 March 2020

Revised: 30 May 2020

Accepted: 11 June 2020

Published: 16 June 2020



Copyright: © 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Following myocardial infarction (MI), adverse remodeling depends on the proper formation of fibrotic scars, composed of type I and III collagens. Our objective was to pinpoint the participation of previously unreported collagens in post-infarction cardiac fibrosis. Gene (qRT-PCR) and protein (immunohistochemistry followed by morphometric analysis) expression of fibrillar (types II and XI) and non-fibrillar (types VII and XII) collagens were determined in RNA-sequencing data from 92 mice undergoing myocardial ischemia, mice submitted to permanent (non-reperfused MI, n = 8) or transient (reperfused MI, n = 8) coronary occlusion, and eight autopsies from chronic MI patients. In the RNA-sequencing analysis of mice undergoing myocardial ischemia, increased transcriptional expression of collagen types II, VII, XI, and XII was reported within the first week, a tendency that persisted 21 days afterwards. In reperfusion and non-reperfusion experimental MI models, their gene expression was heightened 21 days post-MI induction and positively correlated with infarct size. In chronic MI patients, immunohistochemistry analysis demonstrated their presence in fibrotic scars. Functional analysis indicated that these subunits probably confer tensile strength and ensure the cohesion of interstitial components. Our data reveal that novel collagens are present in the infarcted myocardium. These data could lay the groundwork for unraveling post-MI fibrotic scar composition, which could ultimately influence patient survivorship.

Keywords: myocardial infarction; fibrosis; collagen

1. Introduction

Myocardial infarction (MI) consists of the acute thrombotic occlusion of a coronary artery, leading to an abrupt reduction in oxygen and nutrient supply to the downstream myocardium. Although the timely reopening of the culprit vessel (ideally by percutaneous intervention) is mandatory to limit infarct size, substantial changes in the infarcted myocardium nonetheless occur [1–3]. During post-MI cardiac healing, a sterile and well-orchestrated inflammatory response is rapidly initiated to remove necrotic cell debris from the MI zone. Afterwards, the deposition of myofibroblast-derived collagen fibers results in solid fibrotic scar formation [1,2,4]. This process needs to be precisely controlled in terms of timing and position to avoid excessive left ventricular dilatation.

Experimental and clinical studies indicate that type I and III collagens are the most abundant fibers participating in the post-MI fibrotic scar composition [5,6]. In fact, not only their presence but also their spatial distribution is essential to minimize the appearance of arrhythmias [7]. A recent review observed the involvement of up to eight different collagens (including types I, III, IV, V, VI, XII, XIV, and XVIII) in the fibrotic scar of human samples or experimental models of myocardial ischemia [8].

However, the emergence of next-generation sequencing approaches has revolutionized biomedical research by providing abundant omics data for understanding the molecular mechanisms underlying diseases. In this specific setting, a recent meta-analysis from our group using RNA-sequencing data from 92 mice undergoing permanent occlusion of the coronary artery suggested that up to 26 collagen subunits were probably implicated in the MI context [9]. Given that collagen composition within the fibrotic scar actively influences MI patient prognosis and left ventricular dilation, exploring novel subunits implicated in post-MI pathophysiology is of great interest.

Using previously published data at the gene level as a springboard, our aim was to gain further insight into the composition of post-MI fibrotic scars by assessing the existence of previously unreported collagens, specifically types II, VIII, XI, and XII, in three different scenarios: (i) meta-analysis of transcriptomic data from 92 mice undergoing different times of coronary artery occlusion; (ii) experimental mouse models of reperfused and non-reperfused MI; and (iii) myocardial samples isolated from chronic MI patients.

2. Results

2.1. Transcriptomic Expression of New Collagen Subunits Based on RNA-Sequencing Datasets from Mice Submitted to Non-Reperfused MI

First, the transcriptomic expression of these newly described collagen subunits was evaluated in RNA-sequencing datasets from mice undergoing different ischemia times. Using the search term “myocardial infarction”, a total of 15,337 investigations were found for this purpose; only 143 datasets were deemed eligible. After removing duplicate series ($n = 51$), 84 were excluded for the following reasons: knock-out mice ($n = 24$), single-cell or single-nucleus RNA-sequencing research ($n = 28$), evaluation of non-infarcted area ($n = 11$), mice submitted to pharmacological treatment ($n = 14$), newborn mice ($n = 3$), insufficient dataset information ($n = 2$), and mice submitted to 4 days of ischemia ($n = 2$).

Finally, eight datasets (including 92 animals) were employed in the meta-analysis. Animals were divided into control mice ($n = 30$, without MI induction) and 62 submitted to different times of coronary occlusion: 6 h ($n = 8$), 1 day ($n = 16$), 3 days ($n = 10$), 7 days ($n = 7$), 14 days ($n = 10$), and 21 days ($n = 11$). The datasets, the associated publication, and the number of samples included in each study group are compiled in Table 1 [10–13].

We next sought to pinpoint dynamic alterations in the expression of type II, VIIIa, VIIIb, XI, and XII collagen subunits detected in the infarcted myocardium. In comparison to controls, increased transcriptomic expression of type VIIIa and XII collagen subunits was observed 3 days after ischemia onset, while type II, VIIIb, and XI subunits were overrepresented from day 7 post-MI onwards (Figure 1).

Table 1. Summary of GEO datasets for meta-analysis.

GEO DataSet	Reference	Number of Samples						
		Control	6 h Ischemia	1 Day Ischemia	3 Days Ischemia	7 Days Ischemia	14 Days Ischemia	21 Days Ischemia
GSE153494	[10]	3	3	3	3			
GSE153493	N/A	3		3			3	
GSE151834	[11]				4	4	4	8
GSE154695	[12]	9		3		3		3
GSE153485	[13]	10	5	5				
GSE154072	N/A						3	
GSE104187	[14]	4		2	2			
GSE83350	[15]	1			1			
Total		30	8	16	10	7	10	11

GEO: Gene Expression Omnibus; N/A: not available.

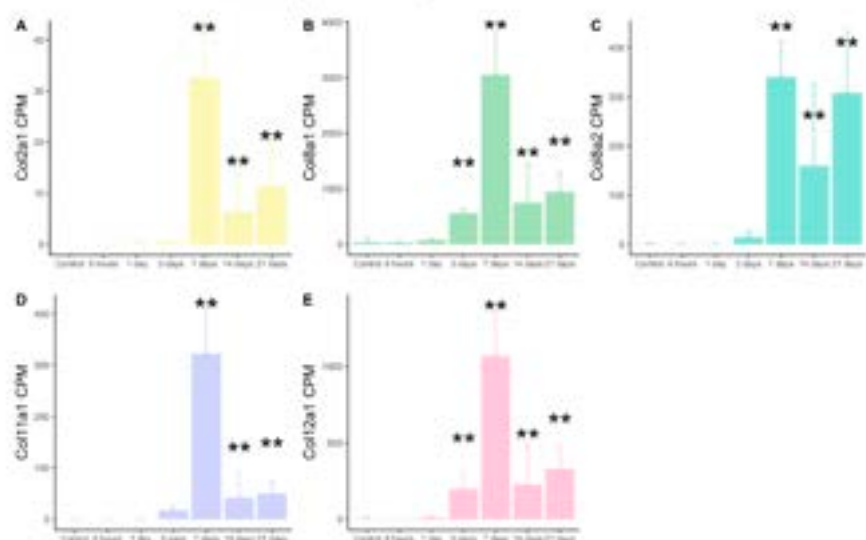


Figure 1. Transcriptomic expression of types II, VIIIa1, VIIIa2, XI, and XII subunits at different time points after ischemia onset. RNA-sequencing datasets were analyzed from 62 animals submitted to 6 h ($n = 8$), 1 day ($n = 16$), 3 days ($n = 10$), 7 days ($n = 7$), 14 days ($n = 10$), and 21 days ($n = 11$) of myocardial ischemia, and 30 controls (without myocardial infarction induction). CPM of type II (A), VIIIa1 (B), VIIIa2 (C), XI (D), and XII (E) collagen subunits are expressed. ** p -value < 0.05 vs. control. CPM: counts per million.

Indeed, transcriptomic changes in important genes encoding type I and III collagens and key regulators of the fibrotic response (e.g., *col2*, *acta2*, and *tgfb1*) were also scrutinized (Table 2). According to our results, the transcriptomic levels of *col2* and *tgfb1* were heightened in the first hours after the onset of coronary ischemia. As for collagen subunits, the transcriptomic expression of *col1a1* and *col1a2* levels were augmented from day 3 onwards (Table 2). Taking all these results together, the transcriptomic expression of these novel

subunits is upregulated within the first week after ischemia onset until chronic phases (21 days).

Table 2. Counts per million of genes encoding type I and II collagens and modulators of myocardial fibrosis at different times after coronary occlusion.

Genes	Control	Counts per Million					
		4 h Ischemia	3 Day Ischemia	3 Days Ischemia	7 Days Ischemia	14 Days Ischemia	21 Days Ischemia
<i>col1a1</i>	44.9 ± 32.0	20.0 ± 3.6	61.5 ± 32.8	2227.2 ± 1568.5 **	799.1 ± 507.1 **	108.4 ± 107.8 *	1147.8 ± 753.5 **
<i>col3a1</i>	144.0 ± 96.2	46.7 ± 16.4	181.0 ± 96.1	3098.8 ± 1365.6 **	11,659.5 ± 675.2 **	3985.5 ± 4050.0 *	42,403.6 ± 14075.6 **
<i>tgfb1</i>	12.4 ± 9.9	22.5 ± 7.8 *	44.2 ± 44.8 *	96.9 ± 61.6 **	89.6 ± 34.5 *	29.3 ± 21.8	29.3 ± 12.2 **
<i>ccn2</i>	95.7 ± 86.9	647.6 ± 487.8 *	962.6 ± 313.8 **	965.5 ± 235.7 **	2243.5 ± 454.7 **	957.9 ± 975.1 *	1655.6 ± 465.7 **
<i>acta2</i>	63.2 ± 20.2	53.1 ± 13.6	86.6 ± 45.0	159.2 ± 112.2 **	758.8 ± 247.9 **	542.7 ± 117.9	565.5 ± 160.0 **

* p -value < 0.05 ** p -value < 0.05 vs. control.

2.2. Involvement of New Collagen Subunits in Non-Reperused and Reperused Models of MI

To confirm these results, the mRNA expression of type II, *Vllla1*, *Vllla2*, *XI*, and *XII* collagens were quantified in murine hearts isolated 21 days after MI induction. Animals submitted to permanent coronary ligation (non-reperused MI) and transient 45 min coronary occlusion followed by reperfusion (reperused MI) were used.

First, the mRNA levels of genes encoding type I and III collagens and key regulators of the fibrotic response (e.g., *ccn2*, *acta2*, and *tgfb1*) were calculated in both experimental models of MI (reperused and non-reperused) and control animals to confirm the presence of myocardial fibrosis. The mRNA levels of *col1a1*, *col3a1*, *tgfb1*, and *acta2* were heightened in both mouse models of MI (Table 3) and displayed a direct correlation with the magnitude of infarct size evaluated by Masson's Trichrome staining (Table 4).

Table 3. mRNA expression of genes encoding type I and III collagens and modulators of myocardial fibrosis in non-reperused and reperused MI models in comparison to control animals.

Genes	Control	Non-Reperused MI	Reperused MI
<i>col1a1</i>	1.10 ± 0.53	27.75 ± 17.70 *	77.62 ± 52.38 *
<i>col3a1</i>	1.18 ± 0.70	24.83 ± 16.25 *	70.88 ± 43.19 *
<i>tgfb1</i>	1.04 ± 0.32	4.29 ± 2.12 **	5.43 ± 2.18 **
<i>ccn2</i>	1.34 ± 1.18	6.04 ± 4.27	14.43 ± 14.15
<i>acta2</i>	1.04 ± 0.34	2.79 ± 0.77 *	3.41 ± 1.12 **

* p -value < 0.05 ** p -value < 0.05 vs. control. MI myocardial infarction.

Table 4. Correlation coefficients between infarct size and the transcriptomic levels of genes encoding type I and II collagens and modulators of myocardial fibrosis.

Genes	Spearman Rank-Order Correlation	p -Value
<i>col1a1</i>	0.89	0.00011
<i>col3a1</i>	0.89	0.00011
<i>tgfb1</i>	0.90	7.7×10^{-5}
<i>ccn2</i>	0.91	3.7×10^{-5}
<i>acta2</i>	0.90	5.4×10^{-5}

Gene expression of type *Vllla1*, *Vllla2*, and *XI* subunits displayed enhanced mRNA expression in the infarcted myocardium derived from both non-reperused and reperused models compared to controls. The transcriptomic levels of type II subunits were only augmented in the non-reperused MI group, while type XII was overrepresented in reperused, but not in non-reperused, animals (Figure 2).

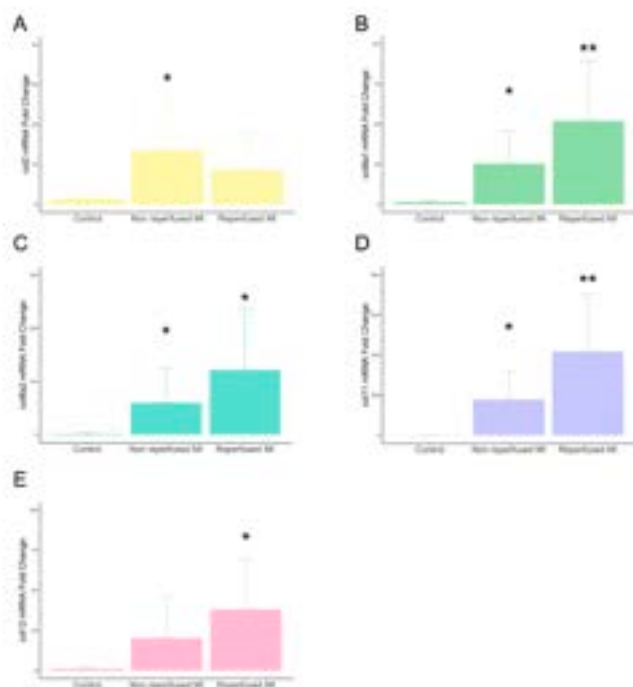


Figure 2. mRNA expression of type II, VIIIa1, VIIIa2, XI, and XII subunits in experimental controlled murine models of MI. Mice submitted to permanent coronary ligation (non-reperfusion MI, $n = 8$) and transient 45 min coronary occlusion followed by reperfusion (reperfusion MI, $n = 8$) and a control group ($n = 6$) were used. Transcriptomic levels of type II (A), VIIIa1 (B), VIIIa2 (C), XI (D), and XII (E) collagen subunits at day 21 after MI induction. Continuous normally distributed data are expressed as mean $\pm$ SD and were analyzed by unpaired Student's *t*-test. * p -value < 0.05 ; ** p -value < 0.01 vs. control. MI: myocardial infarction.

A direct association was detected between the gene expression of these five collagen subunits and histological-derived infarct size. The Spearman rank-order correlations are as follows: type II (0.77; p -value < 0.001), VIIIa1 (0.81; p -value < 0.001), VIIIa2 (0.77; p -value < 0.001), XI (0.80; p -value < 0.001), and XII (0.76; p -value > 0.001) (Figure 3). Collectively, these data demonstrated the implication of these new subunits at the gene level in experimental models of MI, in which mRNA levels were positively correlated with fibrotic scar extension.

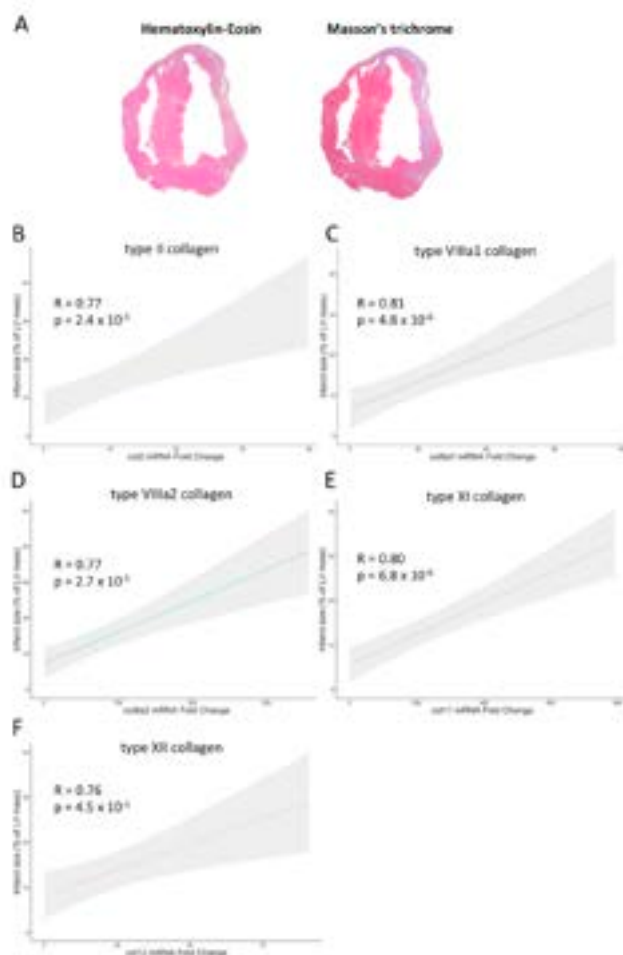


Figure 3. Association of infarct size with the mRNA expression of type II, VIIIa1, VIIIa2, XI, and XII collagen subunits in experimental controlled murine models of myocardial infarction. (A) Representative pictures of hematoxylin-eosin (left panel) and Masson's Trichrome (right panel) staining performed in a heart submitted to permanent coronary ischemia. In mice submitted to permanent (non-reperused) or transient (reperused) coronary ischemia, the extension of infarct size showed a positive association with the transcriptomic levels of type II (B), VIIIa1 (C), VIIIa2 (D), XI (E), and XII (F) collagen subunits. LV: left ventricle.

2.3. Participation of Novel Collagen Subunits in Fibrotic Scar from Patients with Chronic MI

Once the involvement of these new collagen subunits was confirmed in experimental models of MI, we next corroborated these results in human patients. This study examined cardiac samples taken from eight patients who had been diagnosed with chronic MI (more than six months). Table 5 lists their initial features as well as the results of their autopsy. Briefly, the mean age of the eight patients, six of whom were male, was 74 ± 7 years, and all samples showed evidence of fibrosis.

Table 5. Clinical data and autopsy results of myocardial infarction patients.

Patient	Clinical Data	Autopsy Results
#1	78-year-old male Time elapsed since infarction: 5 years Cause of death: pneumonia	Infarct scar area: multiple foci in the lower wall of the left ventricle
#2	72-year-old female Time elapsed since infarction: 17 years Cause of death: aortic valve prosthesis dysfunction	Infarct scar area: 2.5 cm left ventricle
#3	62-year-old male Time elapsed since infarction: 1 year Cause of death: cerebral edema (diffuse large B-cell lymphoma)	Infarct scar area: 0.5 cm interventricular septum
#4	69-year-old male Time elapsed since infarction: 3 years Cause of death: multifocal pneumonia	Infarct scar area: left ventricle
#5	76-year-old male Time elapsed since infarction: 10 years Cause of death: myocardial infarction	Infarct scar area: ill-defined area in interventricular septum and posterior wall
#6	72-year-old male Time elapsed since infarction: 10 years Cause of death: refractory bradycardia and arrest after intervention	Infarct scar area: multiple foci in left ventricle
#7	84-year-old female Time elapsed since infarction: 1 year Cause of death: cardiogenic shock	Infarct scar area: 5 cm in the anterior wall of the left ventricle and interventricular septum
#8	78-year-old female Time elapsed since infarction: 1 year Cause of death: cardiac tamponade after bypass	Infarct scar area: multiple foci in the anterior side of the left ventricle

In patients 4, 5, 6, and 8, infarct size was not quantified but was visually described in the autopsy report.

The presence of type II, VIIIa1, VIIIa2, XI, and XII subunits at the protein level was determined in a total of 200 different areas. Data were expressed as the number of fibers and the percentage per field occupied by positive elements (Figure 4). Immunohistochemistry analysis revealed the presence of type II (21.5 ± 7.8 fibers occupying $0.26 \pm 0.11\%$ of the field), VIIIa1 (36.9 ± 19.4 fibers occupying $0.51 \pm 0.53\%$ of the field), VIIIa2 (29.8 ± 12.4 fibers occupying $0.33 \pm 0.11\%$ of the field), XI (14.7 ± 3.7 fibers occupying $0.15 \pm 0.04\%$ of the field), and XII (21.1 ± 8.2 fibers occupying $0.20 \pm 0.07\%$ of the field) collagen subunits in the post-MI fibrotic myocardium.

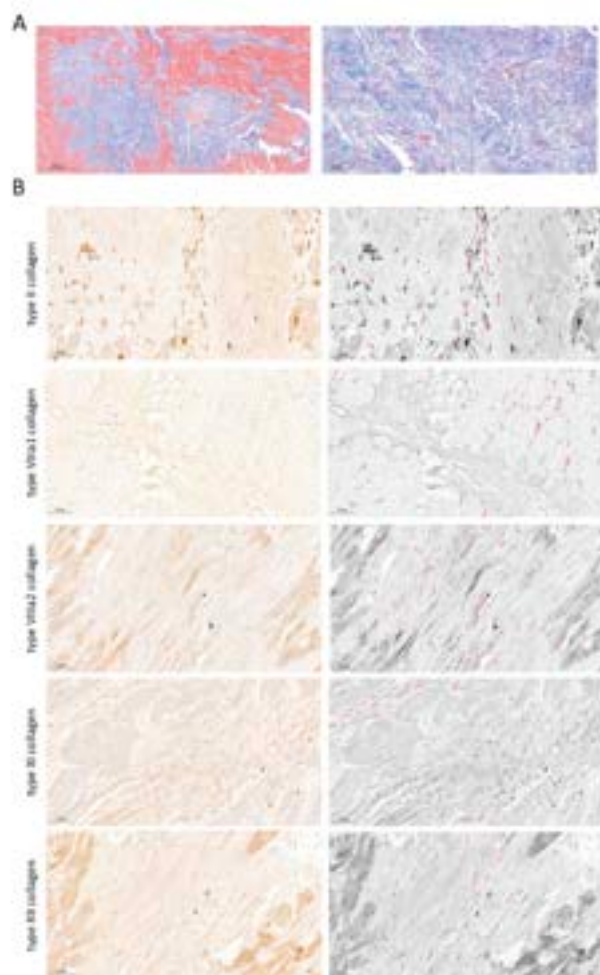


Figure 4. Presence of type II, VIIIa1, VIIIa2, XI, and XII subunits in fibrotic scar of patients with chronic myocardial infarction. (A) Representative pictures of Masson's Trichrome stain at macroscopic (left panel) and 40× (right panel) magnification from infarcted samples isolated from patients at the chronic (more than 6 months) stage following MI. (B) Representative images from human infarcted tissue (left panels) stained with specific markers against type II (upper), VIIIa1 (upper-middle), VIIIa2 (middle), XI (lower-middle), and XII (lower) subunits and their corresponding morphometric analysis using the software Image ProPlus 7.0 software (Media Cybernetics Inc., Rockville, MD, USA) (right panels). Bars indicate 50 µm.

Next, the mRNA levels of these five collagen subunits were evaluated using qRT-PCR, with similar findings to the control myocardium isolated from patients, with no evidence of cardiac fibrosis at either macroscopic or microscopic levels. These results indicated that although the mRNA expression of these newly reported collagen subunits was already upregulated a few hours after ischemia onset, their gene expression was unaltered at the chronic stage (more than 6 months) after MI.

2.4. Gene Ontology Enrichment Analysis to Predict the Function of the Novel Subunits in the Context of MI

After showing the involvement of these novel collagen subunits in MI, we next performed a functional enrichment analysis with the molecular function (MF) terms of Gene Ontology (GO) analysis to hypothesize their function. Briefly, we identified which MFs related to each collagen subunit were overrepresented in our meta-analysis (with an adjusted *p*-value lower than 0.01) (Figure 5).

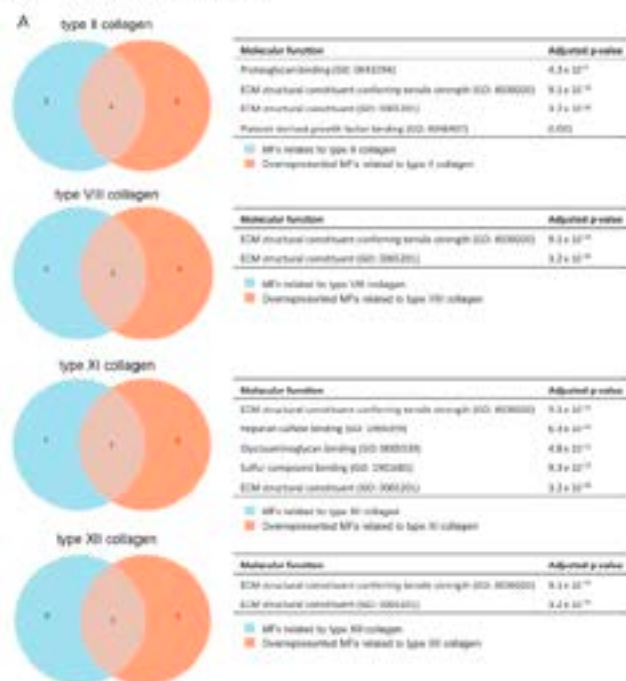


Figure 5. Cont.

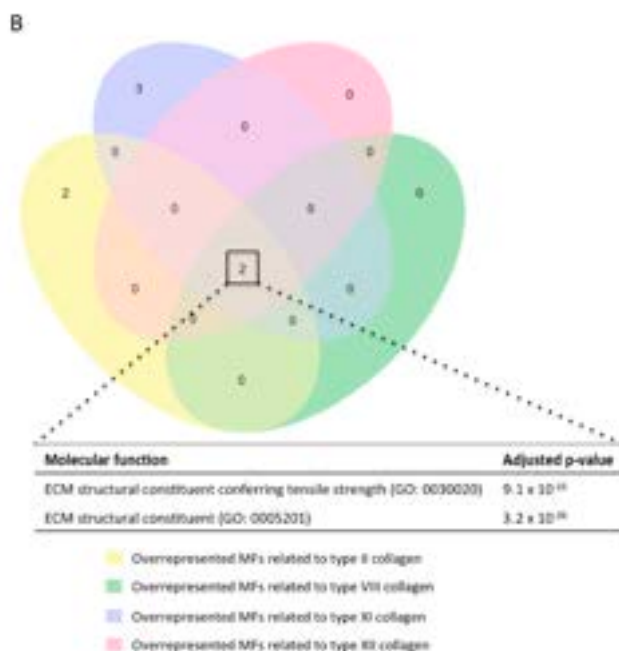


Figure 5. (A) GO enrichment analysis to predict the MF of type II, VIII, XI, and XII collagen in the context of myocardial infarction. The diagrams represent the MF terms of the GO analysis related to type II (upper), VIII (upper-middle), XI (lower-middle), and XII (lower) collagens (blue areas) that are overrepresented in our meta-analysis (orange areas) together with the adjusted p-value. (B) GO enrichment analysis to predict the MF of type II, VIII, XI, and XII collagen in the pathophysiology of myocardial infarction. The Venn diagram shows the MF terms of the GO analysis, which are upregulated in the four evaluated collagens. ECM: extracellular matrix. GO: Gene Ontology. MF: molecular function.

For the type II (fibril-forming collagen) subunit, the following four MFs were overrepresented: proteoglycan binding (GO:0043394), extracellular matrix constituent conferring tensile strength (GO:0030020), extracellular matrix constituent (GO: 0005201), and platelet-derived growth factor binding (GO:0048407) (Figure 5A).

When evaluating MFs related to the fibrillar type XI collagen, a total of five different MFs were detected: extracellular matrix constituent conferring tensile strength (GO:0030020), heparan sulfate binding (GO:1904399), glycosaminoglycan binding (GO:0005539), sulfur compound binding (GO:1901681), and extracellular matrix constituent (GO:0005201).

In terms of non-fibrillar collagen (types VIII and XII), the MFs extracellular matrix constituent conferring tensile strength (GO:0030020) and extracellular matrix constituent (GO:0005201) were upregulated in our meta-analysis (Figure 5A), and these MFs were likewise related to all the new collagen subunits evaluated in our study (Figure 5B).

Overall, four new collagen subunits (types II, VIII, XI, and XII) participate in the pathophysiology of MI by providing tensile strength to the infarcted tissue (Figure 5B), and

fibril-forming collagens also ensure the cohesion of different extracellular matrix (ECM) components (i.e., heparan sulfate, glycosaminoglycans, and proteoglycans).

3. Discussion

3.1. The Role of the Fibrotic Process in MI Pathophysiology

MI consists of acute thrombotic occlusion of a coronary artery, provoking a sudden reduction in nutrient and oxygen supply to the downstream myocardium [56]. Consequently, an inflammatory response is rapidly initiated to remove necrotic cells and damaged ECM components and activate intracellular pathways for quick tissue repair [4,8]. The post-MI wound-healing process consists of a series of events involving complex interactions between various cell types, including myofibroblasts and endothelial cells, leading to the formation of a solid fibrotic scar mainly composed of collagen fibers [6,8].

This process must be perfectly regulated, given that post-MI fibrosis has been reported to exert a dual effect on cardiac structure. While collagen deposition is undoubtedly essential to prevent ventricular dilation and compromised systolic function, massive collagen accumulation nonetheless provokes tissue stiffness, lack of myocardial elasticity, and heightened incidence of arrhythmias. In fact, approximately 30% of MI patients develop adverse cardiac remodeling due to massive collagen accumulation, which correlates with heart failure occurrence [17–19]. Consequently, it is crucial to have a more comprehensive knowledge of the players participating in post-MI fibrosis for heightening patient survival rates.

3.2. Collagen Fibers Participating in Fibrotic Scar Formation following MI

Collagen proteins, active players in post-MI cardiac fibrosis, can be divided into two broad categories. Fibrillar collagens provide mechanical strength and three-dimensional frameworks for cardiac organization [20]. The main fibril-forming collagens are type I and III subunits, which are considered the principal components of the cardiac ECM at the post-infarction fibrotic stage [21]. In fact, its spatial orientation is thought to be essential for proper left ventricular function [7]. Non-fibrillar collagens, meanwhile, play a regulatory role in anchoring and organizing the ECM meshwork via association with type I and III subunits [22]. Specifically, type IV, VI, XIV, and XVIII subunits have already been described to be involved in experimental models of MI and ischemic heart failure [8].

Our group recently conducted a meta-analysis utilizing RNA-sequencing data derived from mice undergoing myocardial ischemia. The results revealed the overrepresentation of 42 genes that encode 26 different collagen subunits within the post-MI fibrotic scar [9]. Of these, up to four collagens, including fibrillar (II and XI) and non-fibrillar types (VIII and XII), are understudied in the context of MI. Therefore, our investigation aims to pinpoint the presence of these four novel collagen subunits in three different scenarios: (i) meta-analysis of transcriptomic data from 92 mice undergoing different times of coronary artery occlusion; (ii) mice undergoing permanent coronary ligation or transient coronary occlusion; (iii) autopsies from chronic MI patients.

3.3. Unraveling the Participation of Novel Collagen Subunits in the MI Scenario

Firstly, the mRNA expression of these subunits at the initial stages of ischemia was evaluated in RNA-sequencing transcriptomic datasets from mice submitted to different times of coronary blockade. According to our results, an upregulation in the gene levels of type II, VIII, and XII subunits is detected in the first week after ischemic insult. However, the transcriptomic levels of all new collagen subunits are augmented from day 3 onwards, peaking 7 days after MI induction. To corroborate these data, we evaluated the mRNA of these previously unreported collagen subunits in infarcted tissue at the subacute stage (21 days) derived from two controlled mouse models of MI (reperfused and non-reperfused). Our data show that the transcriptomic levels of types VIII and XI are heightened in both models. Contrarily, gene levels of type II subunits are augmented in the non-reperfused MI group, while type XII is only upregulated in the reperfused group.

Following on from this, our next goal was to characterize these subunits in human samples isolated from patients with chronic MI. Protein presence in the infarcted myocardium was studied using immunohistochemistry staining followed by morphometric analysis. Based on our data, the involvement of type II, VIII, XI, and XII collagen subunits is detectable in human autopsies, with a greater presence of non-fibrillar collagens than fibril-forming collagens (types II and XII). A proteomics analysis in infarcted myocardium isolated from swine undergoing 120 min of ischemia followed by 15 or 60 days of reperfusion revealed the overrepresentation of type XII, but not type XI, collagen subunits in both MI groups compared to controls. Contrarily, no data were reported regarding the presence of type II or VIII subunits [23]. Our data also showed that the gene expression of these four subunits was unaltered in human infarcted myocardium compared to control hearts. Overall, although these new collagen subunits participate in the infarcted myocardium at the protein level, their transcriptomic levels remain unaltered in an already-established scar. Collectively, these novel collagen subunits participate in the fibrotic scar at chronic phases following MI (Figure 6), but their mRNA expression is already upregulated within a few hours after ischemia onset.

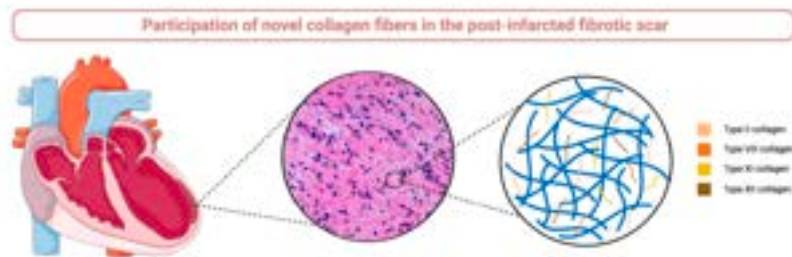


Figure 6. Graphical abstract. The participation of type II, VIII, XI, and XII collagen subunits is implicated in fibrotic scar formation after myocardial infarction as reflected by their mRNA upregulation in infarcted myocardium isolated from experimental models and their protein presence in autopsies isolated from patients diagnosed with chronic infarction.

In a recent review, Frangogiannis and colleagues reported the involvement of up to eight different collagens (including types I, III, IV, V, VI, XII, XIV, and XVIII) in ischemic heart failure [8]. However, although our results provide insight into new players in fibrotic scar formation following infarction, further clinical and translational research is necessary for a thorough comprehension of the impact of these new elements in the pathophysiology of post-MI fibrosis.

3.4. The Role of New Collagen Subunits in the Post-Infarction Fibrosis

According to the Human Protein Atlas, fibroblasts are reported to display an enlarged mRNA expression of *col2a1*, *col8a1*, *col8a2*, and *col12a1*, whereas there are no data on cardiac resident cells capable of secreting *col11a1*. However, studies reporting their implication in MI pathophysiology are scarce.

In terms of fibrillar collagens, type II collagen is the main component of cartilage. Despite its transient expression at cardiac valve morphogenesis, to our knowledge, no expression has been demonstrated in human adult hearts. In cardiovascular diseases, a more elevated presence of type II collagen is suggested around the atherosclerosis-derived calcium deposit. The type XI subunit, a fibril-forming collagen, regulates the fibrillogenesis of type I and type II collagens and is expressed in locations such as articular cartilage, tendons, and trabecular bone. In the cardiac tissue, type XI collagen takes part in developing heart valves and left ventricular trabeculae, and its involvement in pathological

situations has been studied in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma and biliary tract cancer. Specifically in the MI scenario, after performing GO enrichment analysis, types II and XI probably participate in conferring tensile strength to the cardiac interstitium as well as binding different ECM elements including heparan sulfate, glycosaminoglycans, platelet-derived growth factor, and sulfur compounds.

Regarding non-fibrillar collagens, the type VIII subunit (included in the subfamily of network-forming collagens) participates in cardiogenesis, while reduced expression is reported in physiological adult myocardium. In cardiovascular diseases, type VIII collagen has been implicated in cardiac dilatation-derived heart failure following pressure overload [24], carotid artery distensibility [25], and atrial fibrillation [26]. In fact, fibroblasts isolated from *col8*-knock-out mice displayed lower expression of transforming growth factor- β and α -smooth muscle actin, key players in post-MI cardiac fibrosis [24]. Type XII is classified as fibril-associated collagen with interrupted triple helices, forms tendons, and is overrepresented in human hearts as well as in the epicardium of zebrafish [27]. Its participation has also been shown in several pathological conditions, including idiopathic interstitial pneumonia and bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice [28]. In the specific case of cardiovascular diseases, type XII collagen is upregulated in resident cardiac progenitor cells from transgenic heart failure mice and zebrafish hearts submitted to cryoinjury [27], but its role following MI is understudied. According to our analysis, both non-fibrillar collagens (types VIII and XII) may participate in conferring tensile strength to the cardiac ECM. However, further bench and bedside research is necessary for an in-depth elucidation of their role in MI pathophysiology.

4. Materials and Methods

4.1. Meta-Analysis of RNA-Sequencing Data

A dataset search of studies up to September 2021 using the term “myocardial infarction” was carried out in the Gene Expression Omnibus (GEO) database [29] to select studies for meta-analysis.

Studies conducted in *Mus musculus*, animals undergoing non-reperfused MI (permanent coronary artery ligation) or sham, and investigations utilizing bulk RNA-sequencing analysis from the infarcted myocardium were the inclusion criteria. Exclusion criteria included single-cell or single-nucleus RNA-sequencing research, studies involving newborn mice or exploring pharmaceutical or mechanical interventions, analyses conducted in blood or non-infarcted myocardium, and investigations that were not properly filtered by GEO filters.

The PRISMA Flow Diagram (Figure 7) shows that the datasets were assessed in accordance with the inclusion and exclusion criteria. The accessions were then obtained using the SRA Run Selector, and the sequence data files were downloaded using the SRA Toolkit. Using Bowtie2, the FASTA data were aligned to the reference genome (GRCm38) [30]. HTSeq was used to compute read counts for each gene in order to determine expression levels [31].

All the following computational analyses were carried out in the R environment. With the exception of the GSE83350 dataset, which contains a single animal per research group, read counts for each study were normalized, saved, and then pooled with the normalized counts of all other studies to generate a single DESeqDataSet. The design was also adjusted for the batch effect (in the study from which the data were obtained). Differential expression analysis was performed with the DESeq2 (1.30.1) [32] to compare all the infarcted groups with the sham. Genes that were differentially expressed were identified using a $\text{Log}_2\text{FoldChange} \geq 2$ criterion and a p -adjusted value < 0.05 .

To perform functional enrichment analysis, the Cluster Profiler package [33] utilizing GO annotations with the MF category and adjusting the p -value with the Benjamini-Hochberg method was employed. We selected the MFs with involvement of the collagens of interest.

The `ggplot2` (3.3.5) was employed to create the graphical representations [34] and Venn diagrams using the `eulerr` library in R Studio.

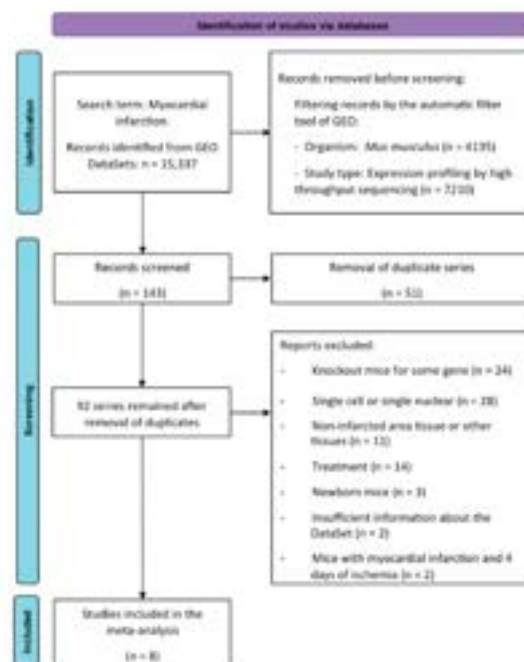


Figure 7. PRISMA meta-analysis flow diagram. GEO: Gene Expression Omnibus.

4.2. Mouse MI Model

The Institutional Review Board authorized the animal protocols, which were carried out in accordance with European Parliament Directive 2010/63/EU (protocol number: GVRTE/2022/2209180).

Charles River Laboratories (Chatil-lon-sur-Chalaronne, France) provided the C57BL/6J mice, which were kept in pathogen-free settings with a constant temperature of 22 ± 2 °C and humidity of 60–65%, a 12 h light/dark cycle, and full access to regular chow and autoclaved water. Animals were 17 ± 2 weeks old and 1:1 female/male.

Briefly, before any surgical procedure, intraperitoneal buprenorphine (0.1 mg/kg) and meloxicam (0.3 mg/kg) were administered, and afterwards, mice were anesthetized by inhalation of 5% isoflurane (Abbott Laboratories, Chicago, IL, USA) delivered in 100% oxygen medical-grade air in an anesthetic chamber. Mice were then placed on the surgical board and subjected to tracheal intubation while connected to a rodent ventilator (Minivent type 845, Parlab Harvard Apparatus, Barcelona, Spain) set at a tidal volume of 200 μ 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. 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, USA). 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 [35].

One control group and two independent MI experimental groups were formed: (1) non-reperfusion MI ($n = 8$, permanent coronary ligation, without reperfusion) and (2) reperfusion MI model ($n = 8$, transient 45 min occlusion of the coronary artery followed by reperfusion). In the non-reperfusion MI model, the knot was tightened with the consequent occlusion of the coronary artery. In the reperfusion 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 MI models, once ischemia onset was confirmed both visually and on the electrocardiogram, the thorax was closed. In the reperfusion MI model, the tube was removed after 45 min of occlusion to allow coronary reperfusion, which was confirmed by the resolution of ST-segment elevation on the electrocardiogram [35]. The control group ($n = 6$) was subjected to the same experimental protocol used in the MI groups, but without ligating the coronary artery.

Intraperitoneal buprenorphine (0.05 mg/kg, twice daily) and meloxicam (0.3 mg/kg, once daily) were administered for 5 days after surgery.

4.3. Human Sample Selection

This study conformed to the principles for the use of human subjects outlined in the Declaration of Helsinki. The study protocol was approved by the local Research Ethics Committee (Exp. 2022/315). The committee approved the exemption from informed consent.

Myocardial samples of eight patients with a reperfusion infarction at chronic phase (more than 6 months after MI) were obtained from autopsies. A group of four patients with no evidence of cardiac fibrosis in the myocardium were also selected. Clinical and autopsy characteristics of the study patients are shown in Tables 5 and 6.

Table 6. Clinical data and autopsy results of control subjects.

Patient	Clinical Data
#1	89-year-old male Cause of death: gastric adenocarcinoma
#2	62-year-old female Cause of death: hemorrhagic peritonitis
#3	93-year-old female Cause of death: pulmonary embolism
#4	66-year-old female Cause of death: acute pancreatitis with necrosis

4.4. Microscopic and Immunohistochemical Analysis

Human and murine myocardium tissue was fixed in 4% paraformaldehyde acid, embedded in paraffin, sectioned, and mounted on double gelatin-coated glass slides. Hematoxylin-eosin and Masson's Trichrome staining was performed to corroborate the presence of infarcted areas [35,36].

For immune staining in human specimens, sections were first subjected to different methods of antigen retrieval (Table 7). For heat-induced epitope retrieval, sections were incubated with Tris/EDTA buffer (pH 9.0) (Dako, Glostrup, Denmark) at 121 °C for 3 min. Regarding proteolytic-induced epitope retrieval, samples were incubated with proteinase K (1 µg/mL, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 10 min at 37 °C. Subsequently, after unmasking and peroxidase blocking (0.3% H₂O₂), sections were incubated overnight (4 °C)

with the specific primary antibody diluted in PBS/0.1% BSA. For immunohistochemistry, specific labeling was detected with a biotin-conjugated goat anti-mouse or goat anti-rabbit secondary antibody (1:500 dilution, Dako, Glostrup, Denmark) [35,36]. Further information about the primary antibodies, antigen retrieval method, and antibody concentration is detailed in Table 7.

Table 7. Experimental conditions for immunohistochemistry analysis depending on the primary antibody.

Marker	Specie	Concentration	Antigen Retrieval	Reference
Col2a1	Human	1:100	Enzymatic	Abcam St. Louis, MO, USA (ab185430)
Col8a1	Human	1:50	pH High	LSBio (Sturley, MA, USA) (aa583-743)
Col8a2	Human	1:100	pH High	ThermoFisher (Waltham, MA, USA) (PA5-51280)
Col11a1	Human	1:100	pH High	ThermoFisher (Waltham, MA, USA) (PA5-68410)
Col12a1	Human	1:50	pH High	ThermoFisher (Waltham, MA, USA) (PA5-52635)

4.5. Morphometric Quantification in the Infected Myocardium

A total of 40 samples were scanned using the Panoramic 250 Flash III Scanner (3DHISTECH, Budapest, Hungary). For each sample and stain, five photographs at 63× magnification were taken using SlideViewer 2.6 Software (3DHISTECH, Budapest, Hungary) in independent fields of the infarct area. Images were morphometrically analyzed using Image ProPlus 7.0 software (Media Cybernetics Inc., Rockville, MD, USA) by a technician who was unaware of the study groups. Collagen presence was quantified as the percentage of area occupied by the selected object and the number of positive fibers [36,37]. The range used for segmentation is indicated in Table 8.

Table 8. Range used for segmentation of the five fibers in morphometric analysis.

Molecule	Area (μm^2)	Diameter (μm)	Major Axis (μm)	Minor Axis (μm)
Col2a1	40–180	1–7	19–40	1.0–8
Col8a1	15–50	2–8	10–21	1.5–5
Col8a2	15–50	2–8	10–21	1.5–5
Col11a1	15–50	2–8	10–21	1.5–5
Col12a1	15–50	2–8	10–21	1.5–5

In mice samples, infarct size was calculated as the percentage of left ventricle occupied by fibrotic scars using samples stained with Masson's Trichrome staining.

4.6. Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction

To extract RNA, the RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) was employed following the manufacturer's instructions. After reverse transcriptase reaction, gene expression was determined by real-time polymerase chain reaction using a 7900HT Fast Real-Time Polymerase Chain Reaction System (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Threshold cycle (Ct) values were calculated in triplicate and normalized to the housekeeping gene 18S [37].

Specific pre-designed primers were used for the analysis of human and mouse samples (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Further information about the primers employed in this study is detailed in Table 9.

Table 9. References of the primers used in this study.

Gene	Species	Reference
col7a1	Human	Hs01060337_g1
col3a1	Human	Hs05426099_s1
col6a2	Human	Hs07287101_m1
col11a1	Human	Hs01097671_g1
col12a1	Human	Hs01054146_m1
col2a1	Mouse	Mm01309565_m1
col6a1	Mouse	Mm01344185_m1
col6a2	Mouse	Mm02344867_g1
col11a1	Mouse	Mm00483387_m1
col12a1	Mouse	Mm01148576_m1
col1a1	Mouse	Mm00801666_g1
col3a1	Mouse	Mm00822300_m1
acta2	Mouse	Mm01546133_m1
act1	Mouse	Mm01192933_g1
tgfb1	Mouse	Mm00441727_g1

4.7. Statistical Analysis

The Kolmogorov–Smirnov normality test was performed for each variable. Variables were expressed as mean $\pm$ SD. Unpaired Students' *t*-test was used for comparisons, and correlations between infarct size and the mRNA expression of each collagen were calculated using a Spearman coefficient. Statistical significance was considered for a two-tailed *p*-value less than 0.05. SPSS 27.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) was used throughout.

5. Conclusions

Our results demonstrate the presence of previously unreported collagen subunits, specifically types II, VIII, XI, and XII, in the infarcted myocardium using three different scenarios: (i) RNA-sequencing datasets from mice submitted to different ischemic times; (ii) experimental controlled mouse models of reperfusion and non-reperfusion MI; and (iii) myocardial samples of patients with chronic MI. These data could lay the groundwork for an enhanced understanding of the post-MI fibrotic scar composition, which will ultimately help unravel left ventricular remodeling following infarction.

Author Contributions: Conceptualization, M.O., C.R.-N., V.B. and A.R.-S.; data curation, M.O., M.M.F.-G., C.R.-N., V.B. and A.R.-S.; investigation and methodology, M.O., M.M.F.-G., T.M.-G., A.D. and C.R.-N.; formal analysis, M.O., M.M.F.-G., T.M.-G., J.G., E.d.D., N.P.-S., V.M.-G., J.J.P.-E., A.D., L.M.-D. and M.J.-N.; funding acquisition, V.B. and A.R.-S.; writing—original draft, M.O., C.R.-N., V.B. and A.R.-S.; writing—review and editing, M.O., M.M.F.-G., T.M.-G., J.G., E.d.D., N.P.-S., V.M.-G., J.J.P.-E., A.D., L.M.-D., M.J.-N., C.R.-N., V.B. and A.R.-S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by grants from “Instituto de Salud Carlos III” and “Fondos Europeos de Desarrollo Regional FEDER” (grant numbers P12h/0067, P12h/01150, CB16/11/00486, CB16/11/00261, and CB16/11/00360) and Generalitat Valenciana—Generalitat Valenciana (grant number PROMETEO/2021/008). J.G. acknowledges financial support from the “Agencia Estatal de Investigación” (grant PGC2020-043985-B).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data is contained within the article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

- Frangogiannis, N.G. The extracellular matrix in myocardial injury, repair, and remodeling. *J. Clin. Invest.* **2007**, *117*, 1600–1612. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Hausenloy, D.J.; Yellon, D.M. Myocardial ischemia-reperfusion injury: A neglected therapeutic target. *J. Clin. Invest.* **2013**, *123*, 92–100. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Rios-Navarro, C.; Ortega, M.; Marcos-Garcos, V.; Gavara, J.; de Dios, E.; Perez-Sole, N.; Chorro, F.J.; Bodí, V.; Ruiz-Sauri, A. Interstitial changes after reperfusion myocardial infarction in mice: Morphometric and genetic analysis. *BMC Vet. Res.* **2020**, *16*, 262. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Ong, S.B.; Hernández-Reséndiz, S.; Crespo-Avilán, G.E.; Mukhametshina, R.T.; Kovak, X.Y.; Cabrera-Fuentes, H.A.; Hausenloy, D.J. Inflammation following acute myocardial infarction: Multiple players, dynamic roles, and novel therapeutic opportunities. *Pharmacol. Ther.* **2018**, *186*, 73–87. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Francis Stuart, S.D.; De Jesus, N.M.; Lindsey, M.L.; Ripplinger, C.M. The crossroads of inflammation, fibrosis, and arrhythmia following myocardial infarction. *J. Mol. Cell Cardiol.* **2016**, *91*, 114–122. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Prabhu, S.D.; Frangogiannis, N.G. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circ. Res.* **2016**, *119*, 91–112. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Hervas, A.; Ruiz-Sauri, A.; de Dios, E.; Forteza, M.J.; Mirana, G.; Nunez, J.; Gomez, C.; Bonanad, C.; Perez-Sole, N.; Gavara, J.; et al. Inhomogeneity of collagen organization within the fibrotic scar after myocardial infarction: Results in a murine model and in human samples. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2018**, *72*, 47–58. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Frangogiannis, N.G. The Extracellular Matrix in Ischemic and Nonischemic Heart Failure. *Circ. Res.* **2019**, *125*, 117–146. [\[CrossRef\]](#)
- Ortega, M.; Rios-Navarro, C.; Gavara, J.; de Dios, E.; Perez-Sole, N.; Marcos-Garcos, V.; Ferrández-Inquiere, A.; Bodí, V.; Ruiz-Sauri, A. Meta-Analysis of Extracellular Matrix Dynamics after Myocardial Infarction Using RNA-Sequencing Transcriptomic Database. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 15615. [\[CrossRef\]](#)
- Liu, W.; Shen, J.; Li, Y.; Wu, J.; Luo, X.; Yu, Y.; Zhang, Y.; Gu, L.; Zhang, X.; Jiang, C.; et al. Pyroptosis inhibition improves the symptoms of acute myocardial infarction. *Cell Death Dis.* **2021**, *12*, 852. [\[CrossRef\]](#)
- Yokota, T.; McCourt, J.; Ma, F.; Ren, S.; Li, S.; Kim, T.-H.; Karmangaliyev, Y.Z.; Nasiri, R.; Abudun, S.; Nguyen, T.; et al. Type V collagen in Scar Tissue Regulates the Size of Scar after Heart Injury. *Cell* **2020**, *182*, 545–562. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Park, T.-J.; Park, J.H.; Lee, G.S.; Lee, J.-Y.; Shin, J.H.; Kim, M.W.; Kim, Y.S.; Kim, J.-Y.; Oh, K.-J.; Han, B.-S.; et al. Quantitative proteomic analyses reveal that GPX4 downregulation during myocardial infarction contributes to ferroptosis in cardiomyocytes. *Cell Death Dis.* **2019**, *10*, 805. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Arlt, M.; Klevering, M.; Benítez, R.; Doran, S.; Turker, H.; Uhlén, M.; Claassen, M.; Wikström, J.; Eitel, D.; Zhang, C.; et al. Integrative transcriptomic analysis of tissue-specific metabolic crosstalk after myocardial infarction. *Diagn.* **2021**, *10*, e66921. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Williams, A.L.; Walton, C.B.; Pinell, B.; Khadka, V.S.; Dunn, B.; Lee, K.; Anagari, M.C.T.; Avelar, A.; Shohet, R.V. Ischemic heart injury leads to HIF1-dependent differential splicing of CaMK2 γ . *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 13116. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Olsen, M.B.; Hildebrandt, G.A.; Scheffler, K.; Vinger, L.E.; Alhonen, K.; Palibrk, V.; Wang, J.; Neuzillet, C.G.; Luna, L.; Johansen, J.; et al. NTHL3-Dependent Regulation of Cardiac Fibroblast Proliferation Prevents Myocardial Rupture. *Cell Rep.* **2017**, *18*, 82–92. [\[CrossRef\]](#)
- Heusch, G. Myocardial ischaemia-reperfusion injury and cardioprotection in perspective. *Nat. Rev. Cardiol.* **2020**, *17*, 773–789. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Cherfuss, J.P.M.; Creemers, E.E.J.M. Integration of concepts: Cardiac extracellular matrix remodeling after myocardial infarction. *J. Card. Fail.* **2002**, *8*, S344–S348. [\[CrossRef\]](#)
- Khan, R.; Sheppard, R. Fibrosis in heart disease: Understanding the role of transforming growth factor-beta in cardiomyopathy, valvular disease and arrhythmia. *Immunology* **2006**, *118*, 10–24. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Talman, V.; Rostkova, H. Cardiac fibrosis in myocardial infarction from repair and remodeling to regeneration. *Cell Tissue Res.* **2016**, *365*, 563–581. [\[CrossRef\]](#)
- Bella, J.; Holmes, D.J.S. Fibrillar Collagens. *Scholl Biochem.* **2017**, *82*, 487–490.
- Yin, X.; Yin, X.; Pan, X.; Zhang, J.; Fan, X.; Li, J.; Zhai, X.; Jiang, L.; Hao, P.; Wang, J.; et al. Post-myocardial infarction fibrosis: Pathophysiology, examination, and intervention. *Front. Pharmacol.* **2023**, *14*, 1079773. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Shumhart, P.E.; Moszura, J.G. Non-fibrillar collagens: Key mediators of post-infarction cardiac remodeling? *J. Mol. Cell Cardiol.* **2010**, *48*, 530–537. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Barallobre-Barreiro, J.; Dilagides, A.; Schindlauer, F.A.; Dresdow, I.; Yin, X.; Ferrández-Caggiano, M.; Willett, P.; Puntmann, V.O.; Aldama-López, G.; Shah, A.M.; et al. Proteomic analysis of cardiac extracellular matrix remodeling in a porcine model of ischemia/reperfusion injury. *Circulation* **2012**, *125*, 789–802. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Schäfer, R.; Engelsen, K.V.; Strand, M.E.; Lunde, I.G.; Herum, K.M.; Marstein, H.S.; Spaastad, E.; Lunde, P.K.; Carlson, C.R.; Christensen, G.; et al. Lack of collagen VIII induces fibrosis and promotes early mortality and cardiac dilatation in pressure overload in mice. *Cardiovasc. Res.* **2015**, *106*, 32–42. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Mahabadi, A.L.; Krawinkel, J.T.; McFadden, M.; Khosravi, N.; Brückelmann, T.J.; Hou, G.; Zhang, H.; Zhou, Y.-Q.; Wang, M.; Giamberini, A.O.; et al. Deletion of type VIII collagen reduces blood pressure, increases carotid artery functional distensibility and promotes elastin deposition. *Matrix Biol.* **2021**, *12*, 100085. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

26. Berg, N.W.; D., Noels, J.; Kawasaki, M.; Nariwari, F.A.; Wesselsink, R.; Fabrice, B.; Jongejan, A.; Klavet, M.N.; Havemaat, H.; Hulsmans, E.L.; et al. Extracellular matrix remodeling precedes atrial fibrillation: Results of the PREDRY-AF trial. *Heart Rhythm* **2021**, *18*, 2115–2125. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Marm, J.; Pfeiffer, C.; de Preux-Charles, A.S.; Biss, T.; Jahnke, A. Collagen XII Contributes to Epicardial and Connective Tissues in the Zebrafish Heart during Ontogenesis and Regeneration. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0165497. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Tzortzi, E.G.; Tischfield, J.A.; Sahota, A.; Stafakas, N.M.; Gordon, M.K.; Gerecke, D.R. Expression of FACIT collagens XII and XIV during bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Anat. Rec. Part A Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* **2003**, *275*, 1073–1080. [\[CrossRef\]](#)
29. Barrett, T.; Wilhite, S.E.; Ledoux, P.; Evangelista, C.; Kim, I.F.; Tamashevsky, M.; Marshall, K.A.; Phillippy, K.H.; Sherman, P.M.; Hollo, M.; et al. NCBI GEO: Archive for functional genomics data sets—Update. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, D991–D995. [\[CrossRef\]](#)
30. Langmead, B.; Salzberg, S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 37–39. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
31. Anders, S.; Pyl, P.T.; Huber, W. HTSeq—A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* **2015**, *31*, 166–169. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Love, M.I.; Huber, W.; Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **2014**, *15*, 550. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Yu, G.; Wang, L.-G.; Han, Y.; He, Q.-Y. clusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters. *Omics J. Integr. Biol.* **2012**, *16*, 284–287. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Wickham, H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis; Published Online: 2016. Available online: <https://ggplot2.tidyverse.org> (accessed on 1 February 2024).
35. Rios-Navarro, C.; Hasso, L.; Díaz, A.; Marcos-García, V.; Borriado, C.; Ruiz-Sauri, A.; Vila, J.M.; Sanz, M.J.; Chorro, F.J.; Piqueras, L.; et al. Role of antiangiogenic VEGF-A365b in angiogenesis and systolic function after reperfused myocardial infarction. *Rev. Exp. Cardiol.* **2021**, *74*, 130–139. [\[CrossRef\]](#)
36. Marcos-García, V.; Rios-Navarro, C.; Gómez-Torres, F.; Gavara, J.; de Dios, E.; Díaz, A.; Miñana, G.; Chorro, F.J.; Bodí, V.; Ruiz-Sauri, A. Fourier analysis of collagen bundle orientation in myocardial infarction scars. *Histochem. Cell Biol.* **2022**, *158*, 471–483. [\[CrossRef\]](#)
37. Rios-Navarro, C.; Gavara, J.; de Dios, E.; Pérez-Solé, N.; Molina-García, T.; Marcos-García, V.; Ruiz-Sauri, A.; Borjés-Genís, A.; Carrión-Valero, F.; Chorro, F.J.; et al. Effect of serum from patients with ST-segment elevation myocardial infarction on endothelial cells. *Rev. Exp. Cardiol.* **2024**, *77*, 254–264. [\[CrossRef\]](#)

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

ANNEX IV:

Altres publicacions derivades del
desenvolupament de la tesi

Publicacions com a primer autor:

1. Blazquez-Bujeda A*, **Ortega M***, de Dios E, Gavara J, Perez-Solé N, Molina-Garcia T, Marcos-Garcés V, Diaz A, Chorro FJ, Rios-Navarro C, Bodí V, Ruíz-Saurí A. Changes in the extracellular matrix at microvascular obstruction area after reperfused myocardial infarction: A morphometric study. *Ann Anat.* 2023 Oct;250:152138.

2. **Ortega M**, Molina-Garcia T, Gavara J, de Dios E, Perez-Solé N, Marcos-Garcés V, Chorro FJ, Rios-Navarro C, Ruíz-Saurí A, Bodí V. Novel Targets Regulating the Role of Endothelial Cells and Angiogenesis after Infarction: A RNA Sequencing Analysis. *Int J Mol Sci.* 2023 Oct 28;24(21):15698.

Altres publicacions:

3. Arnal-Forné M, Molina-Garcia T, **Ortega M**, Marcos-Garcés V, Molina P, Ferrández-Izquierdo A, Sepúlveda P, Bodí V, Ríos-Navarro C, Ruiz-Saurí A. Changes in human skin composition due to intrinsic aging: a histological and morfometric study. *Histochem Cell Biol.* 2024, en prensa.

4. Seco-Cervera M, Ortiz-Masiá D, Macias-Ceja DC, Coll S, Gisbert-Ferrándiz L, Cosín-Roger J, Bauset C, **Ortega M**, Heras-Morán B, Navarro-Vicente F, Millán M, Esplugues JV, Calatayud S, Barrachina MD. Resistance to apoptosis in complicated Crohn's disease: Relevance in ileal fibrosis. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2024 Feb;1870(2):166966.

5. Macias-Ceja DC, Mendoza-Ballesteros MT, **Ortega-Albiach M**, Barrachina MD, Ortiz-Masià D. Role of the epithelial barrier in intestinal fibrosis associated with inflammatory bowel disease: relevance of the epithelial-to mesenchymal transition. *Front Cell Dev Biol.* 2023 Sep 26;11:1258843.

6. Almenar S, Rios-Navarro C, **Ortega M**, Molina P, Ferrandez-Izquierdo A, Ruiz-Sauri A. Anatomy, immunohistochemistry, and numerical distribution of human splenic microvessels. *Ann Anat.* 2019 Jul; 224:161-171.

ANNEX V:

Fonts de financiació

La present Tesi Doctoral ha estat realitzada sota els següents projectes d'investigació públics:

1. Projecte 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_{165b}". Finançat per l'Institut de Salut Carlos III i cofinançat pels fons FEDER. IP: Vicente Bodí Peris. 2018-2020.
2. Projecte 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". Finançat per l'Institut de Salut Carlos III i cofinançat pels fons FEDER. IPs: Vicente Bodí Peris i Clara Bonanad Lozano. 2021-2023.
3. Projecte PROMETEU per a Grups d'Excel·lència de la Comunitat Valenciana PROMETEU/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". Finançat per la Conselleria d'Educació, Generalitat Valenciana. IPs: Vicente Bodí Peris i Amparo Ruiz Saurí. 2021-2024.
4. Projecte PI23/01150 "Obstrucción microvascular tras un infarto de miocardio. Avances hacia una cuantificación automatizada, biomarcadores basados en técnicas ómicas y una estratificación de riesgo a largo plazo personalizada". Finançat per l'Institut de Salut Carlos III i cofinançat pels fons FEDER. IPs: Vicente Bodí Peris i César Ríos Navarro. 2024-2026.

ANNEX VI:

Comités d'ética



Hospital Clínic Universitari



DEPARTAMENT CLÍNIC MALLA ROSA

INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DEL HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARI DE VALENCIA

Dña. Cristina Gomis Gosalbo, 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 aplicación 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 Gosalbo
Secretaria del Comité Ético de Investigación Clínica



AUTORIZACION PROCEDIMIENTO 2017/VSC/PEA/00106

Vista la solicitud realizada en fecha 25/05/17 con nº reg. entrada 23564 por D/Dª. Pilar Campins Falcó, Viceirectora 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

firmat per Rogelio Illanes Ribas el
14/06/2017 14:10:24



INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS DEL HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE VALENCIA

Prof. Don Esteban Morcillo Sánchez, Vicepresidente del Comité Ético de Investigación con Medicamentos del Hospital Clínic Universitario de Valencia

CERTIFICA

Que en este Comité, en su reunión ordinaria, de fecha 12 de enero de 2023 (Acta nº 390), se han analizado los aspectos éticos y científicos relacionados al proyecto de investigación:

Nº DE ORDEN: 2022/315

TÍTULO: Estudio morfométrico e inmunohistoquímico de las estructuras neurales según su distribución anatómica en el corazón sano.

PROTOCOLO: Versión 2 15/12/2022

HIP/CI: CI 19/12/2022

PETICIÓN DE AYUDA A LA INVESTIGACIÓN: INTERNO

Emite un **DICTAMEN FAVORABLE** para la realización de dicho proyecto este centro.

Este Comité acepta que dicho estudio sea realizado por la Dra. Amparo Ruiz Sauri en el Servicio de Anatomía Patológica, como investigadora principal, acordando que reúne las características adecuadas referentes a información a los pacientes y cumplimiento de los criterios éticos para la investigación biomédica.

El CEIm del Hospital Clínic Universitario de Valencia, tanto en su composición como en sus procedimientos, cumple con:

- las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95),
- la norma UNE-EN ISO 9001:2015, y
- con los aspectos relativos al funcionamiento del comité ético de la normativa aplicable.

Lo que certifico a efectos oportunos.

Valencia, 13 de enero de 2023

Fdo. : Prof. Don Esteban Morcillo Sánchez