

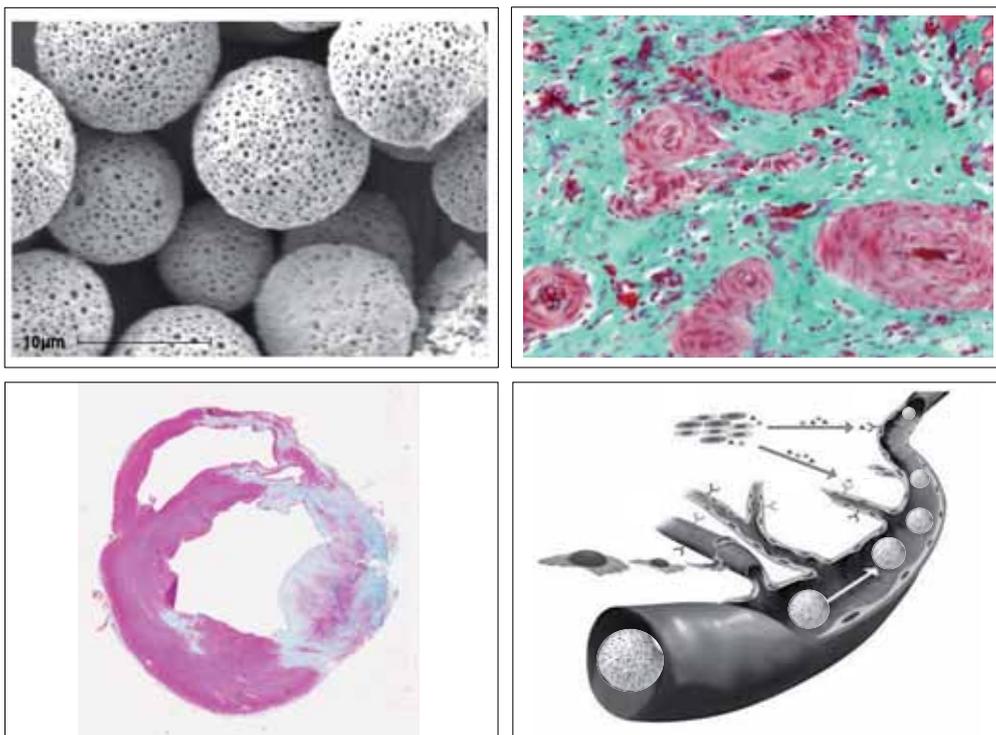


TESIS DOCTORAL

**EFFECTO DE LA INFUSIÓN INTRACORONARIA DE
ANTAGOMIR-92A ENCAPSULADO EN MICROESFERAS
SOBRE LA VASCULOGÉNESIS Y REMODELADO
VENTRICULAR EN UN MODELO PORCINO DE INFARTO
AGUDO DE MIOCARDIO**

NEUS BELLERA GOTARDA

2013





TESIS DOCTORAL

**EFFECTO DE LA INFUSIÓN INTRACORONARIA DE
ANTAGOMIR-92A ENCAPSULADO EN MICROESFERAS
SOBRE LA VASCULOGÉNESIS Y REMODELADO
VENTRICULAR EN UN MODELO PORCINO DE INFARTO
AGUDO DE MIOCARDIO**

Tesis doctoral presentada por

Neus Bellera Gotarda

para optar al grado académico de

DOCTORA EN MEDICINA

Trabajo experimental realizado en el Laboratorio de Patología Cardiocirculatoria del Servicio de Cardiología del Hospital Universitario Vall d'Hebron e Institut de Recerca bajo la dirección del

Dr. David García-Dorado García

Tesis adscrita al Departamento de Medicina, Programa "DAÑO MIOCÁRDICO Y CARDIOPROTECCIÓN. FISIOPATOLOGÍA, BIOLOGÍA MOLECULAR Y DE SISTEMAS, INFLUENCIA DE LA DIABETES Y EL ENVEJECIMIENTO, DIAGNÓSTICO Y BIOMARCADORES, DESARROLLO Y VALORACIÓN CLÍNICA DE NUEVOS TRATAMIENTOS" de la **Universitat Autònoma de Barcelona**.

Neus Bellera Gotarda

Dr. David García-Dorado

Barcelona, Septiembre del 2013

A mis padres José y Nieves, a mi hermano

Sergio y a mi marido Jordi

*“La ciencia es el fundamento de todo progreso, que mejora
la vida humana y alivia el sufrimiento”*

Irène Joliot-Curie

AGRADECIMIENTOS

Hay vivencias en la vida, sin las cuales, el camino que seguimos hubiera sido seguramente otro. La primera, decisiva en mi caso, fue entrar en contacto con la enfermedad desde pequeña. Vivir de cerca el sufrimiento que genera la disnea y percibir el dolor de mis padres por mi hermano, creo que encendieron la llama de mi vocación. Un escenario, a priori triste, abrió las puertas a una profesión que me ha aportado una felicidad enorme, por lo que dedico mis primeras palabras de agradecimiento a mi hermano Sergio y a mi abuela Rafaela. Pero sin duda, el momento en que sentí esa llama en mi interior es cuando mi padre, hablando un día conmigo en la cocina, me transmitió la felicidad que sentiría si llegara a ser médico algún día. La ilusión y anhelo que vi en sus ojos fue tan grande, que lo recuerdo con gran claridad y fue sin duda determinante. Mi ilusión crecía con cada sonda, con cada jeringa, con cada suero que mi madre me traía del hospital y con cada paciente que me explicaba. A la ilusión, se le sumó la vivencia en casa de una capacidad de lucha, superación y trabajo difícilmente igualable, de una felicidad transmitida inmensa a pesar de lo amargo de la vida y de una compañía vital cada fin de semana de estudio. Por todo ello, el agradecimiento a mis padres es enorme y sincero.

A parte de lo decisivo de mi familia, las personas que me han rodeado han sido también importantes. En este capítulo quiero empezar con la madre Esperanza, de mi colegio Ntra. Sra. De Los Ángeles, que con sus reconocimientos diarios, tras recitar de memoria la lección en clase, despertó en mí el valor del trabajo bien hecho y la aspiración al siempre más y mejor. A mi profesora de biología de BUP y COU, Matilde Camps, que despertó en mí la curiosidad por la complejidad biológica que nos gobierna. A mi facultad y a mis profesores por transmitirme sus conocimientos, el más preciado de los tesoros, en especial al Dr. Vilardell por la positividad transmitida, calidad de sus clases y sensibilidad de sus discursos. Igualmente me cautivó la profesionalidad de la Dra. Pilar Tornos, de quien tuve la suerte de aprender al aceptarme los veranos para enseñarme. Sin duda ello, junto a la pasión de sus clases magistrales, fueron contribuciones importantes para hacer que la llama no se apagara, y por ello le dirijo mi reconocimiento más sincero.

Pero sin duda no solo ilusión, trabajo y admiración son suficientes. Se necesita del apoyo de personas que confíen en ti y te tiendan una mano en el camino. A mi tía Cecilia, por recordarme siempre los valores importantes de la vida y darme la seguridad de que no caminamos solos. A mi compañero de residencia Ramon, quien

me enseñó muchas cosas de la cardiología, de la muerte digna y me dio buenos consejos. Recuerdo uno siendo R3: “ante los pacientes hay que tomar decisiones y ahora, ya ha llegado el momento de que tu lo hagas”; a la Dra. Magda Heras, que me impulsó y ayudó a salir fuera y a madurar profesionalmente, y porque su calidad humana, responsabilidad y actitud ante la profesión ha sido ejemplar; al Dr. García-Dorado, a quien admiro por su dedicación, inteligencia, capacidad de esfuerzo y entusiasmo, y por no anteponer la búsqueda del éxito sobre la búsqueda fiel y estricta de las bases científicas que subyacen a nuestro día a día. Él hizo posible que se cumpliera mi sueño de trabajar en el hospital Vall d’Hebron, dirigió esta tesis con confianza y dedicación, y sigue dándome oportunidades para que pueda crecer profesionalmente; a todos los compañeros del laboratorio de cardiología experimental del Institut de recerca por su permanente predisposición a ayudar, especialmente a Ignasi Barba y Antonio Rodríguez-Sinovas, que han contribuido con sus ideas, trabajo y dedicación a que esta tesis fuera posible; al equipo del estabulario, muy especialmente a Marielle y Carla, por el cuidado exquisito de los animales y por su apoyo y amistad; a todo el equipo de Pierre-Fabre, por la exquisita colaboración e implicación en el proyecto; a la Dra. Toran, del servicio de anatomía patológica, quien refleja cualidades que admiro como el amor por el trabajo y su espíritu luchador sobre una calidez humana que deja huella; a los compañeros del hospital que se implicaron en el estudio. Agradecimientos también a todas aquellas organizaciones que han contribuido en la financiación del proyecto, al grupo CTO por el premio Ulysses 2011, a la SEC por la beca de insuficiencia cardíaca 2012 y a la red RECAVA.

Finalmente, y no menos importante, agradezco a mi marido Jordi el amor que me transmite. La estimación es sin duda el ingrediente indispensable que da sentido a mi vida y a mi trabajo diario, que me sensibiliza ante la enfermedad y ante el sufrimiento de pacientes y familias. Esos pacientes y esas familias, a su vez, como la de Antonio Sánchez Rueda, a quien atendí siendo residente, y seguimos viéndonos año tras año, Juana Romero, Conchita Rueda... entre otros, me han transmitido tantas emociones y gratitud que a pesar del momento en el que vivimos y las adversidades, no hay nada que pueda superar las recompensas de nuestra profesión. Esos pacientes fueron algún día mis familiares, y con mi tesis, he intentado aliviar aquellos síntomas que un día, hace muchos años, encendieron la llama y me abocaron al camino de la felicidad.

Mis agradecimientos más sinceros a todos.

ÍNDICE

Índice de figuras y tablas.....	vii
Listado de abreviaturas.....	xi
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
1. Remodelado ventricular adverso postinfarto.....	5
2. Remodelado ventricular adverso y angiogénesis.....	9
3. Angiogénesis y microRNAs. MicroRNA-92a.....	13
4. Modulación de la angiogénesis con antagomires.....	25
5. Sistemas y vías de liberación de antagomires.....	31
6. Antagomir-92a y remodelado adverso postinfarto.....	37
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	39
FASES DEL ESTUDIO.....	43
1. FASE 1.....	47
FASE 1. A. TAREA EXPERIMENTAL DE LA FASE 1.....	49
FASE 1. B. MATERIAL.....	49
f1B.1. <i>Animales</i>	49
f1B.2. <i>Instrumentos y aparatos</i>	49
f1B.2.1. Anestesia, intubación y monitorización.....	49
f1B.2.2. Inducción percutánea de un IAM reperfundido.....	49
f1B.2.3. Disección femoral, toracotomía y pericardiectomía.....	50
f1B.2.4. Cálculo del área en riesgo y del área de necrosis.....	50
f1B.3. <i>Fármacos</i>	50
f1B.3.1. Sedación e inducción anestésica.....	50
f1B.3.2. Inducción percutánea de un IAM reperfundido.....	51
f1B.3.3. Cálculo del área en riesgo y del área de necrosis.....	51
f1B.3.4. Sacrificio.....	51
FASE 1. C. MÉTODOS.....	51
f1C.1. Inducción percutánea de un IAM reperfundido.....	51
f1C.2. Cálculo del área en riesgo y del área de necrosis.....	53
FASE 1. D. RESULTADOS.....	54
f1D.1. Puesta a punto del modelo porcino de IAM percutáneo y reperfundido..	54
2. FASE 2.....	55
FASE 2. A. TAREA EXPERIMENTAL DE LA FASE 2.....	57
FASE 2. B. MATERIAL.....	57
f2B.1. <i>Instrumentos y aparatos</i>	57
f2B.1.1. Preparación de las microesferas vacías.....	57
f2B.2. <i>Reactivos</i>	57
f2B.2.1. Preparación de las microesferas vacías.....	57
FASE 2. C. MÉTODOS.....	57
f2C.1. Preparación de las microesferas vacías.....	58
FASE 2. D. RESULTADOS.....	59
f2D.1. Obtención de las microesferas vacías apropiadas.....	59

3. FASE 3	61
FASE 3. A. TAREA EXPERIMENTAL DE LA FASE 3	63
FASE 3. B. MATERIAL	63
<i>f3B.1. Animales</i>	63
<i>f3B.2. Instrumentos y aparatos</i>	63
<i>f3B.2.1. Preparación de las microesferas marcadas con albúmina de suero bovino marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC-BSA)</i>	63
<i>f3B.2.2. Anestesia, intubación y monitorización</i>	63
<i>f3B.2.3. Inducción percutánea de un IAM reperfundido</i>	63
<i>f3B.2.4. Disección femoral, toracotomía y esternotomía</i>	63
<i>f3B.2.5. Obtención y conservación de muestras</i>	63
<i>f3B.2.6. Visualización de muestras</i>	63
<i>f3B.2.7. Experimentos con cristales piezoeléctricos</i>	63
<i>f3B.3. Fármacos</i>	64
<i>f3B.3.1. Preparación de las microesferas marcadas con FITC-BSA</i>	64
<i>f3B.3.2. Sedación e inducción anestésica</i>	64
<i>f3B.3.3. Inducción percutánea de un IAM reperfundido</i>	64
<i>f3B.3.4. Disolución de las microesferas para su administración</i>	64
<i>f3B.3.5. Sacrificio</i>	64
FASE 3. C. MÉTODOS	64
<i>f3C.1. Preparación de las microesferas marcadas con FITC-BSA</i>	64
<i>f3C.2. Inducción percutánea de un IAM reperfundido y administración intracoronaria de microesferas marcadas con FITC-BSA</i>	65
<i>f3C.3. Detección de microesferas marcadas con FITC-BSA en el tejido cardíaco y extracardíaco</i>	65
<i>f3C.4. Detección de toxicidad cardíaca por isquemia: experimentos con cristales piezoeléctricos</i>	65
FASE 3. D. RESULTADOS	68
<i>f3D.1. Las microesferas pueden ser liberadas selectivamente en el miocardio reperfundido donde quedan retenidas</i>	68
<i>f3D.2. Las microesferas pueden ser liberadas selectivamente en el miocardio reperfundido sin ser detectadas en otros órganos a distancia</i>	68
<i>f3D.3. Las microesferas pueden ser liberadas con seguridad en el tejido miocárdico reperfundido sin producir efectos adversos locales</i>	70
4. FASE 4	75
FASE 4.A. TAREA EXPERIMENTAL DE LA FASE 4	77
FASE 4.B. MATERIAL	77
<i>f4B.1. Animales</i>	77
<i>f4B.2. Instrumentos y aparatos</i>	77
<i>f4B.2.1. Preparación de las microesferas cargadas de antagomir-92</i>	77
<i>f4B.2.2. Determinación del RNA encapsulado</i>	77
<i>f4B.2.3. Anestesia, intubación y monitorización</i>	77
<i>f4B.2.4. Inducción percutánea de un IAM reperfundido</i>	77
<i>f4B.2.5. Toracotomía, pericardiectomía, obtención y conservación de muestras</i>	78

f4B.2.6. Aislamiento del RNA total de las muestras cardíacas.....	78
f4B.2.7. Cuantificación y control de calidad del RNA aislado.....	78
f4B.2.8. Síntesis de cDNA a partir del RNA aislado.....	78
f4B.2.9. RT-PCR con la técnica de SYBR Green.....	78
f4B.3. <i>Fármacos</i>	79
f4B.3.1. Antagomir-92a.....	79
f4B.3.2. Determinación del RNA encapsulado.....	80
f4B.3.3. Sedación e inducción anestésica.....	80
f4B.3.4. Inducción percutánea de un IAM reperfundido.....	80
f4B.3.5. Estabulación de los animales.....	80
f4B.3.6. Sacrificio	80
FASE 4.C. MÉTODOS.....	81
f4C.1. Síntesis del antagomir-92a.....	81
f4C.2. Preparación de las microesferas cargadas de antagomir-92a.....	82
f4C.3. Determinación del RNA encapsulado.....	82
f4C.4. Inducción percutánea de un IAM reperfundido.....	83
f4C.5. Administración intracoronaria del antagomir-92a encapsulado.....	83
f4C.6. Estabulación de los animales.....	83
f4C.7. Toratocomía, obtención de muestras y sacrificio de los animales.....	83
f4C.8. Extracción del RNA total de las muestras.....	84
f4C.9. Análisis de la calidad y cuantificación de la concentración del RNA aislado de cada muestra.....	84
f4C.10. Síntesis de cDNA a partir del RNA aislado.....	84
f4C.11. Amplificación del cDNA mediante RT-PCR utilizando la técnica de SYBR Green.....	85
f4C.12. Análisis estadístico.....	85
FASE 4.D. RESULTADOS.....	85
f4D.1. El antagomir-92a puede ser encapsulado preservando su integridad.....	85
f4D.2. El antagomir-92a encapsulado puede ser administrado por vía intracoronaria siendo bien tolerado.....	86
f4D.3. El ARN total de las muestras miocárdicas fue aislado demostrando buena calidad de su componente constituido por los microRNAs.....	86
f4D.4. La expresión de miR-92a fue inhibida de forma rápida y sostenida en el tejido infartado respecto al tejido control.....	87
5. FASE 5.....	89
FASE 5.A. TAREA EXPERIMENTAL DE LA FASE 5.....	91
FASE 5.B. MATERIAL.....	91
f5B.1. <i>Animales</i>	91
f5B.2. <i>Instrumentos y aparatos</i>	92
f5B.2.1. Preparación de las microesferas placebo y microesferas cargadas de antagomir-92a	92
f5B.2.2. Anestesia, intubación, monitorización e inducción de un IAM percutáneo reperfundido.....	92
f5B.2.3. Determinación de los enzimas de lesión miocárdica.....	92
f5B.2.4. Ecocardiografía intravascular.....	92

f5B.2.5. Implantación de un holter subcutáneo.....	92
f5B.2.6. Evaluación de la permeabilidad de la arteria descendente anterior al mes postIAM.....	92
f5B.2.7. Estudio de la microcirculación al mes postinfarto.....	92
f5B.2.8. Suspensión de los corazones.....	93
f5B.2.9. Necropsia y obtención de muestras.....	93
f5B.2.10. Resonancia magnética nuclear <i>ex vivo</i> del corazón	93
f5B.2.11. Estudio histológico de la densidad vascular.....	93
f5B.2.12. Programas informáticos.....	93
f5B.3. <i>Fármacos</i>	93
f5B.3.1. Grupos de tratamiento.....	93
f5B.3.2. Sedación e inducción anestésica.....	94
f5B.3.3. Inducción percutánea de un IAM reperfundido.....	95
f5B.3.4. Implantación de un holter subcutáneo.....	95
f5B.3.5. Fase de estabulación de los animales.....	95
f5B.3.6. Evaluación de la permeabilidad de la arteria descendente anterior al mes postinfarto.....	95
f5B.3.7. Estudio de la microcirculación al mes postinfarto.....	95
f5B.3.8. Estudio de la densidad vascular.....	95
f5B.3.9. Sacrificio.....	95
FASE 5.C. MÉTODOS.....	95
f5C.1. Ecocardiografía intravascular.....	95
f5C.2. Inducción percutánea de un IAM reperfundido.....	96
f5C.3. Demostración de la inducción del IAM.....	97
f5C.4. Administración del fármaco: grupos de tratamiento y vía de administración.....	98
f5C.5. Implantación de un holter implantable subcutáneo.....	99
f5C.6. Extubación, traslado del animal a la corralina y seguimiento.....	100
f5C.7. Evaluación de la permeabilidad de la LAD al mes postinfarto.....	101
f5C.8. Estudio de la microcirculación al mes postinfarto.....	101
f5C.9. Extracción del holter subcutáneo.....	102
f5C.10. Necropsia y evaluación macroscópica de los órganos.....	103
f5C.11. Resonancia magnética nuclear del corazón <i>ex vivo</i>	104
f5C.12. Análisis histológico de las muestras cardíacas.....	106
f5C.13. Análisis estadístico.....	107
FASE 5.D. RESULTADOS.....	108
f5D.1. Diagrama de flujo.....	108
f5D.2. Mortalidad del estudio.....	109
f5D.3. Características basales de los animales.....	110
f5D.4. Inducción de un infarto comparable en los tres grupos de tratamiento....	111
f5D.5. Permeabilidad de la LAD.....	112
f5D.6. Variables hemodinámicas y analíticas al mes postIAM.....	112
f5D.7. El tratamiento con antagomir-92a encapsulado induce neoangiogénesis.....	113
f5D.8. El tratamiento con antagomir-92a encapsulado reduce las resistencias	

microvasculares.....	116
f5D.9. El tratamiento con antagomir-92a encapsulado previene la aparición de discinesia septoapical.....	118
f5D.10. El tratamiento con antagomir-92a encapsulado previene el desarrollo de remodelado adverso postIAM.....	119
f5D.11. El tratamiento con antagomir-92a encapsulado no se asoció a efectos adversos.....	121
f5D.11.1. Arritmogenicidad.....	121
f5D.11.2. Carcinogénesis.....	122
f5D.12. El tratamiento con antagomir-92a encapsulado se asoció a una marcada tendencia a mejorar la contractilidad del ventrículo izquierdo.....	122
DISCUSIÓN	125
1. Inhibición del mir-92a: una nueva diana terapéutica para inducir neoangiogénesis postIAM.....	127
2. Las microesferas constituyen un vehículo apropiado para liberar antagomir-92a.....	130
3. Las microesferas cargadas de antagomir-92a pueden administrarse por vía intracoronaria quedando retenidas en el miocardio infartado.....	133
4. La administración intracoronaria de antagomir-92a encapsulado no produce toxicidad local ni a distancia.....	135
5. La administración intracoronaria de antagomir-92a encapsulado constituye una nueva estrategia terapéutica para prevenir el remodelado adverso postIAM.....	136
6. Translación del estudio: de nuestro modelo a los pacientes con IAM.....	140
7. Limitaciones del estudio.....	141
RESUMEN DE LOS RESULTADOS	145
CONCLUSIONES	149
BIBLIOGRAFÍA	153
ANEXOS	203
ANEXO 1. Minipigs: curva de crecimiento.....	205
ANEXO 2. Dieta SMP para minipigs: composición.....	206
ANEXO 3. Metodología: esquema de los procedimientos de la fase 5.....	207

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

INTRODUCCIÓN

FIGURA 1	Remodelado ventricular adverso.....	5
FIGURA 2	Neoangiogénesis.....	11
FIGURA 3	Biogénesis y función de los microRNAs.....	13
FIGURA 4	Mecanismo de acción de los microRNAs.....	14
FIGURA 5	Función de los microRNAs en la patología cardíaca.....	15
FIGURA 6	Los microRNAs regulan la angiogénesis.....	16
FIGURA 7	MicroRNAs y regulación postranscripcional de dianas implicadas en la angiogénesis.....	17
FIGURA 8	Cluster miR-17-92.....	21
FIGURA 9	Funciones del cluster miR-17-92.....	22
FIGURA 10	Antagomir: definición y función.....	25
FIGURA 11	Angiogénesis y terapia con antagomires.....	26
FIGURA 12	Efectos biológicos del antagomir-92a.....	29
FIGURA 13	La inhibición del miR-92a mejora la recuperación contráctil tras un IAM en ratones.....	30
FIGURA 14	Partículas poliméricas.....	31
FIGURA 15	Liposomas.....	33

FASES DEL ESTUDIO

-FASE 1

FIGURA 16	Inducción percutánea de un IAM reperfundido.....	52
FIGURA 17	Visualización del área en riesgo y del área de necrosis.....	53
FIGURA 18	Determinación de la duración de la fase de isquemia.....	54

-FASE 2

FIGURA 19	Flujo para la obtención de las ME por el método de emulsión múltiple w/o/w..	58
FIGURA 20	Microesferas.....	59
FIGURA 21	Distribución del tamaño de las microesferas.....	60

-FASE 3

FIGURA 22	Sensor de flujo, catéter Millar y cristales piezoeléctricos implantados en el corazón <i>in vivo</i>	66
FIGURA 23	Experimentos para estudiar la seguridad local y el margen de seguridad terapéutico.....	67

FIGURA 24	Detección de las microesferas de PLGA marcadas con FITC-BSA en las muestras de miocardio.....	68
FIGURA 25	Detección de las microesferas de PLGA marcadas con FITC-BSA en las muestras de miocardio de los animales 101025 y 101026.....	69
FIGURA 26	Detección de las microesferas de PLGA marcadas con FITC-BSA en el corazón y tejidos extracardíacos.....	69
FIGURA 27	Primera inyección intracoronaria de 15 mg de microesferas marcadas FITC-BSA: efectos sobre la contractilidad, flujo coronario y parámetros hemodinámicos.....	70
FIGURA 28	Segunda inyección intracoronaria de 15 mg de microesferas marcadas FITC-BSA: efectos sobre la contractilidad, flujo coronario y parámetros hemodinámicos.....	71
FIGURA 29	Evaluación del margen de seguridad terapéutico.....	72
FIGURA 30	Evaluación del margen de seguridad terapéutico.....	73
-FASE 4		
FIGURA 31	Estructura del LNA™.....	79
FIGURA 32	Síntesis de un oligonucleótido.....	81
FIGURA 33	Electroferogramas representativos del RNA de dos muestras miocárdicas.....	86
FIGURA 34	Expresión del miR-92a en las muestras cardíacas.....	87
-FASE 5		
FIGURA 35	Ecocardiografía intravascular.....	96
FIGURA 36	Alere Triage® MeterPro.....	97
FIGURA 37	Análisis de la contractilidad del ventrículo izquierdo.....	97
FIGURA 38	Administración del fármaco asignado.....	98
FIGURA 39	Implantación de un Holter implantable subcutáneo.....	99
FIGURA 40	Permeabilidad de la LAD al mes.....	101
FIGURA 41	Estudio de la microcirculación coronaria.....	102
FIGURA 42	Necropsia de los animales.....	103
FIGURA 43	Corazón <i>ex vivo</i> suspendido en formol.....	104
FIGURA 44	Parámetros medidos en la RMN cardíaca <i>ex vivo</i>	105
FIGURA 45	Fotografía del corazón <i>ex vivo</i>	106
FIGURA 46	Lonchas del corazón.....	106
FIGURA 47	Densidad vascular.....	107
FIGURA 48	Diagrama de flujo del estudio.....	108
FIGURA 49	Mortalidad y causas.....	110
FIGURA 50	Secciones histológicas de corazón teñidas con tricrómico de Masson.....	113
FIGURA 51	La inhibición del miR-92a mediante el antagonir-92a encapsulado induce neoangiogénesis en la zona del IAM.....	114
FIGURA 52	Campos histológicos de secciones de corazón teñidas con tricrómico de Masson.....	115
FIGURA 53	Estructura de los vasos neoformados.....	115
FIGURA 54	Resistencia de la microcirculación de la región infartada.....	116
FIGURA 55	Correlación entre la resistencia microvascular basal y la densidad vascular...	117

FIGURA 56	Correlación entre la mínima resistencia microvascular y la densidad vascular.....	117
FIGURA 57	Análisis de la motilidad regional mediante ecocardiografía intravascular.....	118
FIGURA 58	Porcentaje de animales con discinesia septoapical.....	119
FIGURA 59	Parámetros morfológicos de remodelado ventricular adverso analizados mediante RMN.....	120
FIGURA 60	Lectura de los registros obtenidos de un Reveal [®] explantado al mes postIAM.....	122
FIGURA 61	Contractilidad del VI y tratamiento administrado.....	123
FIGURA 62	Gasto cardíaco y tratamiento administrado.....	123

TABLAS

INTRODUCCIÓN

TABLA 1	MicroRNAs proangiogénicos.....	17
TABLA 2	MicroRNAs antiangiogénicos.....	19
TABLA 3	Terapia con antagonires <i>in vivo</i>	27

FASES DEL ESTUDIO

-FASE 5

TABLA 4	Microesferas cargadas con antagomir-92a.....	93
TABLA 5	Microesferas placebo.....	94
TABLA 6	Salino.....	94
TABLA 7	Parámetros de programación del holter subcutáneo.....	100
TABLA 8	Umbrales de detección de arritmias.....	100
TABLA 9	Causas de mortalidad del estudio.....	109
TABLA 10	Características basales de los animales.....	110
TABLA 11	Enzimas cardíacos.....	111
TABLA 12	Contractilidad del ventrículo izquierdo.....	111
TABLA 13	Flujo TIMI en la arteria descendente anterior.....	112
TABLA 14	Parámetros hemodinámicos y analíticos al mes postIAM.....	112
TABLA 15	Porcentaje de animales con discinesia septoapical en el grupo de animales control versus en el grupo tratado con antagomir-92a encapsulado.....	119
TABLA 16	Parámetros morfológicos y estructurales ventriculares medidos en la RMN del corazón <i>ex vivo</i>	119
TABLA 17	Arritmias registradas durante el estudio.....	121

LISTADO DE ABREVIATURAS

ACE-2	enzima convertidora de la angiotensina 2	eNOS	endothelial nitric oxide synthase
A4C	plano ecocardiográfico de 4 cámaras	ERK	extracellular regulated kinases
ADMA	asymmetrical dimethylarginine (nitric oxide synthase inhibitor)	ESL	longitud telesistólica
AGO 1	argonaute RISC catalytic component 1	EZH2	enhancer of zeste homolog 2
AI	área de necrosis	F	french
AKT	Akt serine/threonine protein kinase	FC	frecuencia cardíaca
AMI	arteria mamaria interna	FE	fracción de eyección del ventrículo izquierdo
ANG	angiogenin	FGF2	fibroblast growth factor 2
Ao	presión de aorta	FITC	isotiocianato de fluoresceína
pressure			
AR	área en riesgo	FITC-BSA	albúmina de suero bovino marcada con isotiocianato de fluoresceína
atm	atmósferas	Fig	figura
Bcl-2	B-cell lymphoma 2	Fli1	friend leukemia virus integration 1
BMW	guía balance middleweight	Flk-1	fetal liver kinase-1
C	par de cristales implantados en la zona control	Fus-1	fused in sarcoma
°C	grados centígrados	FV	fibrilación ventricular
CCNE-1	ciclin E1	G	gauges
cdc25A	cell division cycle 25A	GATA2	GATA binding protein 2
cm, mm,	centímetros, milímetros, micrometros	GAX	growth arrest-specific homeobox
µm			
cDNA	DNA complementario	G-CSF	granulocyte colony stimulating factor
CO	gasto cardíaco	GE	general electric
CO₂	dióxido de carbono	HBP1	HMG-box transcription factor 1
CTGF	connective tissue growth factor	HDGF	hepatoma-derived growth factor
Ct	ciclo umbral	HGS	hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate
CUL2	cullin 2	HIF-1α	hypoxial inducible factor 1α
d	día	HOXA5	homeobox A5
DN	diámetro ventricular máximo entre paredes normales	HR	frecuencia cardíaca
DNA	ácido desoxirribonucleico	I	par de cristales implantados en la zona isquémica
DNAsa	enzima desoxirribonucleasa	I	inyección
dP/dt	integral de presión en función del tiempo	IAM	infarto agudo de miocardio
DR	diámetro ventricular máximo entre la pared infartada y la contralateral normal	IC	insuficiencia cardíaca
DVD	digital versatil disc	IGF-1	insulin-like growth factor-1
ECG	electrocardiograma	IGF-2	insulin-like growth factor-2
EDL	longitud telediastólica	IGF-1R	insulin-like growth factor 1 receptor
EESS	extrasístoles supraventriculares	IRS1	insulin receptor substrate 1
EEVV	extrasístoles ventriculares	ITGA5	Integrina subunidad α5
E2F3a	E2F transcription factor 3	JAK	janus kinase
Efna 3	ephrin-A3	Kg, g, mg	kilogramos, gramos, miligramos
EIV	ecocardiografía intravascular	L	loncha

LAD	<i>descendente anterior</i>	RIVA	<i>ritmo idioventricular acelerado</i>
LATS2	<i>large tumor suppressor kinase 2</i>	RMN	<i>resonancia magnética nuclear</i>
LNA	<i>locked nucleic acid</i>	RNA	<i>ácido ribonucleico</i>
LPM	<i>latidos por minuto</i>	RNA_m	<i>ácido ribonucleico mensajero</i>
LV	<i>ventrículo izquierdo</i>	RNasa	<i>ribonucleasa</i>
LVEDP	<i>presión telediastólica del VI</i>	RNA Pol II	<i>RNA polimerasa II</i>
LVEF	<i>fracción de eyección del VI</i>	rpm	<i>revoluciones por minuto</i>
LVESP	<i>presión telesistólica del VI</i>	Rx	<i>rayos X</i>
M	<i>molar</i>	S.A.	<i>sociedad anónima</i>
MAZ	<i>myc-associated zinc finger protein</i>	SatO₂	<i>saturación de oxígeno</i>
Max L	<i>máxima longitud</i>	SDF-1	<i>stromal cell-derived factor 1</i>
MCSF	<i>macrophage colony stimulating factor</i>	seg	<i>segundos</i>
ME	<i>microesferas</i>	Sema6A	<i>semaphorin 6A</i>
MEK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>	S.L.	<i>sociedad limitada</i>
min	<i>minutos</i>	SMAD2	<i>SMAD family member 2</i>
Min L	<i>mínima longitud</i>	SF	<i>siero fisiológico</i>
miRNA,	<i>microRNA maduro</i>	Sirt1	<i>sirtuin 1</i>
miR			
MKK4	<i>mitogen-activated kinase kinase 4</i>	SMAD7	<i>SMAD family member 7</i>
ml	<i>mililitros</i>	SOCS	<i>suppressor of cytokine signaling</i>
mmHg	<i>milímetros de mercurio</i>	S1P1	<i>receptor sphingosine-1-phosphate receptor 1</i>
		SRF	<i>serum response factor</i>
MMP-2	<i>matrix metalloproteinase 2</i>	SS	<i>acortamiento sistólico</i>
MMP-3	<i>matrix metalloproteinase 3</i>	STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
MMP-14	<i>matrix metalloproteinase 14</i>		
		STAT5A	<i>signal transducer and activator of transcription 5A</i>
MOD	<i>método de discos</i>	Sufu	<i>suppressor of fused homolog</i>
		T^a	<i>temperatura</i>
MP	<i>minipig</i>	TF	<i>factor de transcripción</i>
MP1	<i>melanization protease 1</i>	TGF-β	<i>transforming growth factor β</i>
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i>		
N-RAS	<i>neuroblastoma RAS viral oncogen homolog</i>	TIMP2	<i>metallopeptidase inhibitor 2</i>
NRP-2	<i>neuropilin-2</i>	Tmax	<i>espesor máximo de la pared infartada</i>
O₂	<i>oxígeno</i>	Tmin	<i>espesor mínimo de la pared infartada</i>
		Tpost	<i>espesor normal de la pared miocárdica posterior</i>
PAK4	<i>p21protein-activated kinase 4</i>	TPS-1	<i>trombospondina 1</i>
		Trop I	<i>troponina I</i>
PBS	<i>tampón fosfato salino</i>	Trop T	<i>troponina T</i>
		T. Sinusal	<i>taquicardia sinusal</i>
PCR	<i>reacción en cadena de la polimerasa</i>	Tto	<i>tratamiento</i>
PDGFRα	<i>platelet-derived growth factor receptor α polypeptide</i>	TVNS	<i>taquicardia ventricular no sostenida</i>
PDGFRβ	<i>platelet-derived growth factor receptor β polypeptide</i>	UI	<i>unidades internacionales</i>
PIGF	<i>placenta growth factor</i>	UK	<i>United Kingdom</i>
PIK3R2	<i>phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 2</i>	USA	<i>United States of America</i>
PLGA	<i>ácido poliláctico-co-glicólico</i>	VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
p120Ras GAP	<i>p120 RAS GTPase activating protein</i>	VEGFA	<i>vascular endothelial grow factor A</i>
Pre-miRNA	<i>microRNA precursor</i>	VEGFR2	<i>vascular endothelial grow factor 2</i>
Pri-miRNA	<i>microRNA primario</i>	VE-	<i>vascular endothelial-cadherin</i>
P70S6K1	<i>ribosomal S6 Kinase p 70</i>	VI	<i>ventrículo izquierdo</i>
Ptp1b	<i>protein tyrosine phosphatase non-receptor type 1b</i>	ΔFE	<i>variación de la FE</i>
Qc	<i>flujo coronario</i>	“	<i>pulgadas</i>
Rap1	<i>small guanosine triphosphate-binding protein</i>		
RT-PCR	<i>PCR en tiempo real</i>		
RhoB	<i>Ras homolog family member B</i>		
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>		

RESUMEN

Después de un infarto agudo de miocardio (IAM) puede aparecer un fenómeno denominado remodelado ventricular adverso consistente en un adelgazamiento y dilatación ventricular progresiva que aboca a la aparición de síntomas de insuficiencia cardíaca (IC). Aunque los tratamientos farmacológicos, la terapia de reperfusión coronaria y la resincronización han atenuado la progresión de este fenómeno, su prevención sigue siendo un reto para la cardiología. En la última década, la terapia celular proporcionó resultados prometedores en modelos animales de remodelado postIAM que no se han confirmado, en gran medida, al trasladarlos a la clínica, por lo que era necesaria la búsqueda de nuevas estrategias. Teniendo en cuenta que el tamaño del infarto es el principal predictor de remodelado adverso y que el fenómeno de cicatrización requiere de oxígeno y nutrientes, intentar mejorar la red microvascular para salvar células y reparar correctamente el área dañada parece una terapia plausible. Sin embargo, los ensayos clínicos administrando factores proangiogénicos aislados para formar nuevos vasos no han obtenido los resultados esperados. La angiogénesis depende del equilibrio entre múltiples factores pro y antiangiogénicos, por lo que la administración de un solo factor puede verse contrarrestada por cambios en otros. La capacidad de los microRNAs para modular múltiples proteínas de vías funcionalmente relacionadas los ha convertido en una nueva diana terapéutica. Los microRNAs son pequeños oligonucleótidos que reprimen la síntesis de proteínas regulando procesos fisiológicos y fisiopatológicos. Algunos de ellos regulan la angiogénesis controlando la proliferación, diferenciación y migración de las células endoteliales. Además, el descubrimiento de que se puede modificar la expresión de dichos microRNAs, sobreexpresándolos o bien silenciándolos mediante antagomires, significó el nacimiento de una nueva terapéutica. Estudios experimentales han demostrado que podemos regular los genes vasculares *in vitro* e *in vivo*. Uno de dichos estudios reveló que el miR-92a juega un rol crítico en la neovascularización postnatal y en un modelo de IAM en ratón la administración de su antagomir específico, el antagomir-92a, en inyecciones repetidas por vía intravenosa, indujo crecimiento de nuevos vasos en la cicatriz, mejorando la recuperación contráctil postinfarto. Sin embargo, el cluster 17-92a, donde se encuentra el miR-92a es ubicuo y se ha relacionado con la aparición y progresión de algunos tumores, lo que genera preocupación sobre la seguridad de la vía intravenosa. La penetración no selectiva en células normales a distancia puede generar efectos adversos. Además, diferencias

farmacocinéticas como el volumen de distribución entre los animales pequeños y el ser humano representan obstáculos en la translación de la terapia con antagomires a situaciones clínicas. El propósito de nuestro trabajo fue desarrollar un nuevo método para liberar antagomir-92a directamente en el tejido enfermo por vía intracoronaria, así como demostrar su efecto biológico sobre los cambios inherentes al remodelado ventricular. Ello nos pareció de gran interés porque sus conclusiones podrían condicionar la futura translación a pacientes, así como la posibilidad de extenderlo a otros antagomires y a otras afecciones patológicas. Desarrollamos microesferas (ME) biodegradables de ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) que quedan retenidas en los microvasos de la región infartada, evitando la biodistribución sistémica y siendo seguras localmente. Utilizamos un modelo porcino adulto, superando las limitaciones asociadas a diferencias de tamaño entre especies, y crónico, para observar los efectos sobre el remodelado, que acontece semanas después de un infarto. Esta es la primera vez que se demuestra que la administración intracoronaria de antagomir-92a encapsulado en microesferas genera vasos de forma significativa, lo que conduce a la prevención de la aparición de remodelado adverso al mes postIAM. Por tanto, aportamos las primeras evidencias de que la terapia intracoronaria con antagomir-92a encapsulado en microesferas es una terapéutica prometedora para aquellos pacientes que sufren un infarto grande y se encuentran en riesgo de desarrollar remodelado ventricular adverso.

INTRODUCCIÓN

1

REMODELADO VENTRICULAR ADVERSO POSTIAM

El remodelado ventricular adverso es un proceso fisiopatológico que ocurre hasta en el 30% de pacientes que sufren un IAM (Savoie et al., 2006; Parodi et al., 2007; Lombardo et al., 2012). Consiste en un adelgazamiento y expansión de la pared infartada que se inicia inmediatamente tras la lesión y se prolonga durante meses, causando dilatación y pérdida progresiva y global de las propiedades contráctiles del ventrículo izquierdo (VI) (**Fig.1**) (McKay et al.,1986; Pfeffer and Braunwald,1990). La forma elíptica normal del VI se convierte en una forma esférica que perjudica a su función, conduciendo a la aparición de síntomas y signos de IC (Mitchell et al.,1992; Wong et al., 2004; Buckberg et al., 2012). A día de hoy, el remodelado ventricular adverso constituye la principal causa de IC postIAM (Kirkpatrick and St John Sutton, 2012).

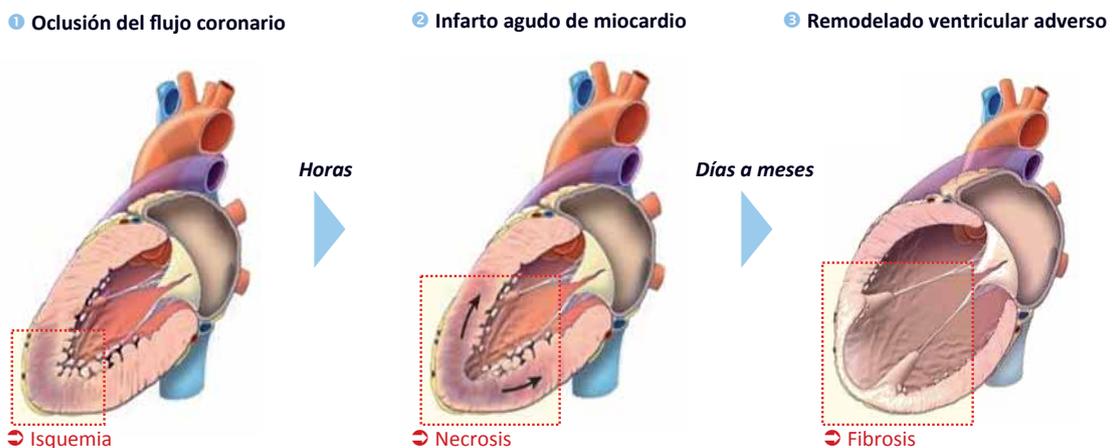


Figura 1 Remodelado ventricular adverso. El remodelado ventricular adverso consiste en un adelgazamiento y expansión de la región infartada que conduce a una dilatación y disfunción ventricular progresiva y subsecuentemente al desarrollo de insuficiencia cardíaca. La aparición de este fenómeno se asocia a una mayor morbimortalidad postinfarto.

Con la finalidad de atenuar la elevada morbimortalidad asociada a este proceso, se iniciaron, ya hace más de 5 décadas, estudios para intentar encontrar los mecanismos que subyacen en su desarrollo y progresión (Braunwald and Chidsey, 1965; Pfeffer and Pfeffer, 1988). Del conocimiento de los factores neurohormonales, como la activación sostenida y deletérea del sistema simpático y del sistema renina-angiotensina-aldosterona, surgieron los primeros tratamientos efectivos (Hokimoto et

al., 1996; Adams, 2004). Los betabloqueantes, utilizados desde los años 60 y los inhibidores del enzima convertidor de la angiotensina, desde principios de los 80, demostraron poder reducir el tamaño del infarto y la arritmogénesis con un mejor pronóstico de los pacientes (Hjalmarson et al., 1981; ISIS-1 collaborative group., 1986; Pfeffer et al., 1992). Posteriormente, nuevos fármacos como los bloqueadores del receptor de la angiotensina, inhibidores directos de la renina y los antagonistas de la aldosterona conseguirían, a través de un mecanismo antifibrótico, atenuar el remodelado adverso y enlentecer la progresión de la IC (Pfeffer et al., 2003; Pitt et al., 2003; Zannad et al., 2012).

A pesar de los avances farmacológicos, la verdadera revolución la constituyó el advenimiento de la terapia de reperfusión, a principios de los 80, capaz de salvar miocardio y cambiar la historia natural del infarto (Popović et al., 1994; Lamas et al., 1995; Brodie et al., 1996). Puso en evidencia que la extensión de la necrosis es el más fuerte predictor de desarrollo de remodelado adverso tras un IAM (Loboz-Grudzień et al., 2007; Wu et al., 2008; Protti et al., 2012). La progresión del infarto, desde la oclusión a la necrosis, ocurre rápido y usualmente se completa dentro de las primeras pocas horas del inicio de los síntomas (Connelly et al., 1982; Garcia-Dorado et al., 1989). Cualquier intervención que pretenda limitar el tamaño del infarto y prevenir eventos adversos debe iniciarse muy precozmente. A pesar de establecer sistemas asistenciales y planes estratégicos de actuación precoz, son frecuentes todavía, largos retrasos hasta la revascularización percutánea (Rodríguez-Leor et al., 2011). Los tiempos medios, desde el inicio de los síntomas hasta la atención médica y aplicación del tratamiento, no se acortan más allá de los 160 min (Andersen et al., 2003; Post et al., 2012; Fröbert et al., 2013) impidiendo limitar la necrosis y prevenir una cicatrización deletérea postIAM. Además, en algunos pacientes, a pesar de restaurar precozmente y eficazmente el flujo coronario epicárdico, los microvasos, probablemente ya basalmente comprometidos, sufren un daño adicional severo (White et al., 2012). Esta falta de perfusión microvascular denominada no reflow, puede aparecer entre un 5 y un 50% de casos, y tiene consecuencias funcionales desfavorables (Reffelmann et al., 2003; Niccoli et al., 2009; Harrison et al., 2013). Es obvio, que un fallo de la microcirculación lleva a una deplección de oxígeno y nutrientes en la cicatriz, necesarios para salvar células viables y para reparar correctamente el miocardio (Reffelmann and Kloner, 2006). Potentes antiagregantes, como el abciximab, y dispositivos de aspiración de trombo han logrado reducir la embolización distal y mejorar significativamente la función microvascular pero con

pequeños beneficios sobre el tamaño del infarto (Rakowski et al., 2007; Vlaar et al., 2008; Eitel et al., 2013).

Sabiendo que es difícil limitar la fase de isquemia, otras estrategias para reducir el tamaño del infarto se centran en la fase de reperfusión coronaria. Dichas terapias intentan reducir la muerte adicional de cardiomiocitos, que han sobrevivido al periodo isquémico (Rodríguez-Sinovas et al., 2007). Una amplia investigación por nuestro grupo intenta desentrañar los mecanismos que subyacen al daño por reperfusión, en busca de dianas terapéuticas (García-Dorado and Oliveras, 1993; Rodríguez-Sinovas et al., 2006; Inserte et al., 2009; Hernando et al., 2010; Ruiz-Meana et al., 2011). Aunque tras cortos periodos de isquemia, y en condiciones experimentales, se logra reducir muy significativamente el tamaño del infarto (Inserte et al., 2000; Inserte et al., 2002; García-Dorado et al., 2009), su translación a la especie humana globalmente fracasa (Fokkema et al., 2009; Desmet et al., 2011; Kloner, 2013). Ello se atribuye principalmente a la ventana terapéutica en la que se presentan los pacientes, en la que la gran mayoría de cardiomiocitos no han logrado sobrevivir al insulto isquémico, sin sustrato para salvar.

Finalmente, del conocimiento de los factores mecánicos, como una mayor tensión de pared y un mayor grado de disincronía ventricular, que acentúan la dilatación de un miocardio ya mal cicatrizado, surgió la terapia de resincronización ventricular (Choi et al., 2011; Abd-Elmoniem et al., 2012). Repetidos estudios han demostrado un impacto muy significativo sobre la reducción de la morbimortalidad y sobre el enlentecimiento en la progresión de dicho fenómeno (Ghio et al., 2009; Linde et al., 2013).

Sin embargo, a pesar de aplicar un tratamiento médico óptimo, una estrategia de reperfusión coronaria con dispositivos de última generación y resincronización ventricular seguimos visitando pacientes que desarrollan remodelado ventricular adverso, fruto de una necrosis miocárdica extensa (Parodi and Antoniucci, 2010; Carluccio et al., 2011). Además, la mayor supervivencia global de dichos pacientes junto al progresivo envejecimiento de la población han convertido a su consecuencia, la IC postIAM, en una epidemia emergente (Yancy et al., 2013).

Seguir investigando y explorar nuevas estrategias terapéuticas capaces de abolir el fenómeno de remodelado adverso y sus consecuencias continua siendo un reto para la cardiología.

Tras aceptar que los máximos esfuerzos por salvar miocardio no pueden aplicarse a un porcentaje considerable de pacientes, por la rapidez en la que ocurre la muerte celular, se iniciaron en la última década investigaciones sobre la posibilidad de regenerar miocardio (Taylor et al., 1998; Orlic et al., 2001; Anversa and Nadal-Ginard, 2002). Los primeros estudios demostraron que el corazón tiene una capacidad regenerativa intrínseca a partir de células madre residentes, que se transdiferencian en cardiomiocitos (Beltrami et al., 2001; Bergmann et al., 2009). También se observó que tras un IAM y tras un trasplante cardíaco se produce una movilización de progenitores extracardíacos hacia el corazón, que se transforman en células cardíacas (Laflamme et al., 2002; Müller et al., 2002; Quaini et al., 2002). La capacidad de regeneración de estos mecanismos intrínsecos es insuficiente para suplir el miocardio destruido de una forma funcionalmente adecuada. Sin embargo, estos hallazgos llevaron a postular que la administración de progenitores celulares pluripotenciales conseguiría, a través de la transdiferenciación y mecanismos paracrinos, regenerar el tejido dañado y mejorar su función contráctil (Kamihata et al., 2001; Kawamoto et al., 2001; Orlic et al., 2001; Tomita et al., 2002). Un número exponencialmente mayor de investigadores se apresuraron en busca de la mejor célula y la más idónea vía de administración (Fernández-Avilés et al., 2004; Wollert et al., 2004; Janssens et al., 2006; Lunde et al., 2006; Menasché et al., 2008). Los resultados experimentales iniciales fueron alentadores pero de nuevo, estudios posteriores, mostraron que la terapia celular tiene escasa capacidad para generar nuevos cardiomiocitos (Tongers et al., 2011). Consistentemente, los ensayos clínicos randomizados fallaron en demostrar mejorías clínicamente relevantes de la función miocárdica y evidenciaron incompetencia para prevenir, de manera significativa, la dilatación progresiva del ventrículo izquierdo (Meyer et al., 2009; Delewi et al., 2013).

Si por el momento la génesis de nuevo miocardio no parece una estrategia realista para prevenir el remodelado adverso, quizás el intentar salvar cardiomiocitos y células intersticiales que han permanecido viables, pueda suponer una estrategia adecuada. Dichos fibroblastos salvados podrían desarrollar propiedades miofibrilares y

generar tejido conectivo suficiente y de calidad para lograr una fibrosis reparativa y prevenir el adelgazamiento y expansión ventricular progresiva (Sun and Weber, 2000; van den Borne et al., 2010; Nong et al., 2011; Chen H et al., 2013; Turner and Porter, 2013). Asimismo, las células involucradas en vías de señalización encargadas de atenuar respuestas inflamatorias excesivas, estrés oxidativo y evitar la degradación de la matriz intersticial podrían funcionar correctamente (Hori and Nishida, 2009; Panizzi et al., 2010; Chen et al., 2012; Weir et al., 2012). Es obvio, que tanto la supervivencia celular como el proceso de cicatrización requieren del aporte de sangre oxigenada y nutrientes (Nakagawa et al., 2008; Davis et al., 2012).

Sin embargo, el área dañada está desprovista de vasos, algunos necrosados, otros ocluidos por embolización de la microcirculación, y otros funcionalmente inhabilitados, como ocurre frecuentemente en el seno de un infarto (Ramaraj and Movahed, 2008; White et al., 2012). La asociación entre un peor estado de la microcirculación y la aparición de remodelado adverso ha sido observado de forma repetida en diferentes estudios (Galiuto et al., 2008; Ørn et al., 2009; Weir et al., 2010).

Además de un peor estado anatómico, una peor situación funcional de los vasos, ha sido también relacionado con este fenómeno. Estudios experimentales han evidenciado una relación directa entre los niveles de angiotensina-(1-7), un péptido con propiedades vasodilatadoras que incrementa la perfusión coronaria, con una atenuación de la disfunción ventricular postIAM (Crackower et al., 2002; Loot et al., 2002). La administración de la enzima convertidora de la angiotensina 2 (ACE-2) recombinante humana, el enzima que fragmenta la angiotensina-II en angiotensina-(1-7), ha logrado atenuar el desarrollo de remodelado adverso en un modelo murino (Zhong et al., 2004). Asimismo, unos peores niveles de reserva de flujo coronario (Qc) en la parte más distal de la arteria descendente anterior (LAD), a las 24 horas postangioplastia primaria por un IAM anterior, se asocian, de forma independiente, a remodelado ventricular adverso (Meimoun et al., 2010).

Aunque la angiogénesis es un mecanismo natural, que se estimula por la isquemia para restaurar la perfusión miocárdica en el miocardio afectado, la rapidez e intensidad en la que se necesita tras un IAM permiten entender que los mecanismos intrínsecos sean funcionalmente insuficientes. Consecuentemente, intentar generar nuevos vasos en la zona de lesión mediante la estimulación de la neoangiogénesis podría representar una estrategia potencialmente útil y ha sido propuesta para prevenir el fenómeno de remodelado (**Fig.2**) (Kocher et al., 2001; Ohtsuka et al., 2004).

Desde hace años se intenta formar vasos y mejorar la funcionalidad de la microcirculación en el seno de un infarto (Cochain et al., 2013). Diferentes estudios han demostrado que se puede inducir neoangiogénesis administrando directamente citoquinas y factores proangiogénicos aislados, como el vascular endothelial growth factor (VEGF), o incrementando su producción inyectando sus secuencias génicas (Hiasa et al., 2004; Ohtsuka et al., 2004; Payne et al., 2007; Yu et al., 2009). Sin embargo, los ensayos clínicos realizados han mostrado que la neoangiogénesis inducida por factores aislados no es suficiente para acompañarse de un efecto biológico significativo (Stewart et al., 2009).

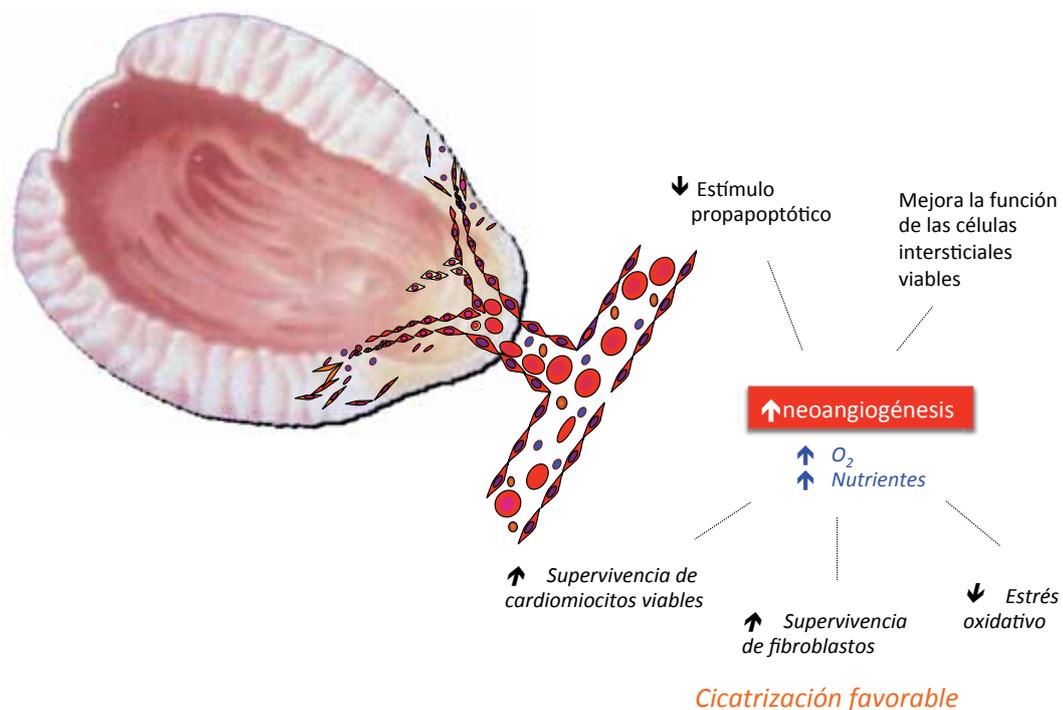


Figura 2 Neoangiogénesis. Restaurar el flujo regional mediante la formación de nuevos vasos ha sido propuesto como una modalidad terapéutica para mejorar la reparación miocárdica tras sufrir un infarto agudo de miocardio.

También se ha investigado el potencial de factores estimuladores de colonias, como el granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) y el macrophage colony stimulating factor (M-CSF), para incrementar el lecho microvascular tras un IAM, sin embargo, las mejorías en la fracción de eyección (FE) del VI y en los volúmenes ventriculares no han sido significativamente mejor que el grupo control a los 2 años de seguimiento postIAM (Engelmann et al., 2006; Ripa et al., 2006; Kang et al., 2007; Karimabad et al., 2011). Considerando la gran complejidad de las vías moleculares que gobiernan la neovascularización, parece plausible entender el porqué un factor

aislado administrado de forma puntual puede no ser un estímulo suficiente para formar vasos de una forma sostenida y en un número funcionalmente suficiente.

Administrar o movilizar células progenitoras endoteliales ha sido otra alternativa explorada para formar vasos (Jujo et al., 2008; Dong et al., 2011). A día de hoy, el número de células que logran anidar y proliferar o bien, por mecanismos paracrinós, estimular el crecimiento de los vasos existentes, no ha sido suficiente para prevenir el desarrollo de remodelado adverso en pacientes (Pearson, 2009).

Paralelamente a los resultados neutros mencionados, Lagos Quintana descubría que los microRNAs, descritos en el desarrollo de *Caenorhabditis elegans*, existen en humanos (Lagos-Quintana et al., 2001). En este nemátodo rhabdítico dos microRNAs, el lin-4 y let-7 ejercen un papel regulador postranscripcional, con consecuencias en el proceso de desarrollo (Lee et al., 1993). Ambos están presentes en la especie humana con elevado grado de conservación (Pasquinelli et al., 2000). Ello sugirió que el mecanismo de regulación postranscripcional, mediado por microRNAs, podría ser más general de lo que inicialmente se había creído (Carrington and Ambros, 2003; Good, 2003; Lai et al., 2003). Su capacidad de regular procesos biológicos, como la proliferación celular (Bueno et al., 2008), la apoptosis (Xu et al., 2004; Cimmino et al., 2005), la fibrosis (Jiang et al., 2010) o la vasculogénesis (Suárez and Sessa, 2009; Santoro and Nicoli, 2013), entre otros, modulando una extensa red de dianas de un mismo proceso, podría sobreponerse a las limitaciones encontradas hasta el momento. Nació así, una vía de investigación donde los microRNAs constituyen la base molecular de una nueva estrategia terapéutica para inducir neoangiogénesis.

3

ANGIOGÉNESIS Y MICRORNAS. *MicroRNA-92a*

Los microRNAs son pequeños oligonucleótidos de ARN monocatenario que regulan la expresión génica a nivel postranscripcional, reprimiendo la formación de proteínas (Bartel, 2004). Se transcriben en el núcleo y tras un procesamiento por los enzimas Drosha y Dicer se convierten en miRs maduros de 20-22 nucleótidos (**Fig.3**) (Kuehbacher et al., 2007).

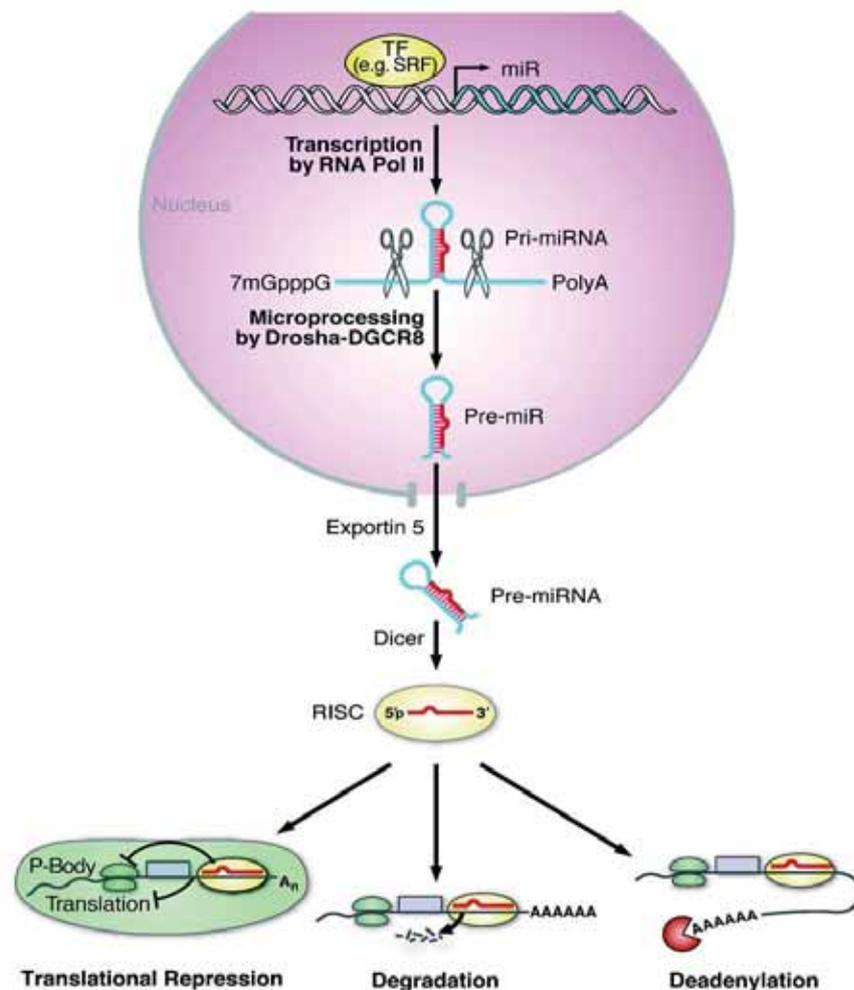


Figura 3 Biogénesis y función de los miRNAs. La transcripción de los genes que codifican para microRNAs está mediada por la RNA polimerasa II (RNA Pol II). El microRNA inicial transcrito, llamado microRNA primario (pri-miRNA), puede oscilar entre unos pocos cientos de nucleótidos a muchas kilobases. Dentro del núcleo, el pri-miRNA tiene una estructura característica de stem-loop que puede ser reconocida y seccionada por una ribonucleasa III (RNasa III), la endonucleasa Drosha. El producto seccionado, un stem-loop pre-miRNA de 70 nucleótidos, es exportado desde el núcleo al citoplasma por la Exportina 5. En el citoplasma, otra RNasa III, Dicer, vuelve a seccionar el microRNA precursor (pre-miRNA) en un miRNA maduro de 22 nucleótidos de doble cadena, el cual es incorporado en el RNA-induced silencing complex (RISC) conduciendo a la separación de sus 2 cadenas convirtiéndose en el miR monocatenario maduro que actuará reprimiendo la traducción de su RNA mensajero (RNAm) diana. TF: indica factor de transcripción. (Extraído y modificado de Cordes and Srivastava, 2009).

Los miR maduros se unen al ácido ribonucleico mensajero (RNAm) diana con el que comparten parcial o completamente su secuencia, inhibiendo la traducción y/o produciendo una degradación del RNAm transcrito (**Fig.4**) (Bartel, 2004). Reprimen no una proteína aislada, sino toda una red de proteínas funcionalmente relacionadas (Bartel, 2004; Watanabe et al., 2006).

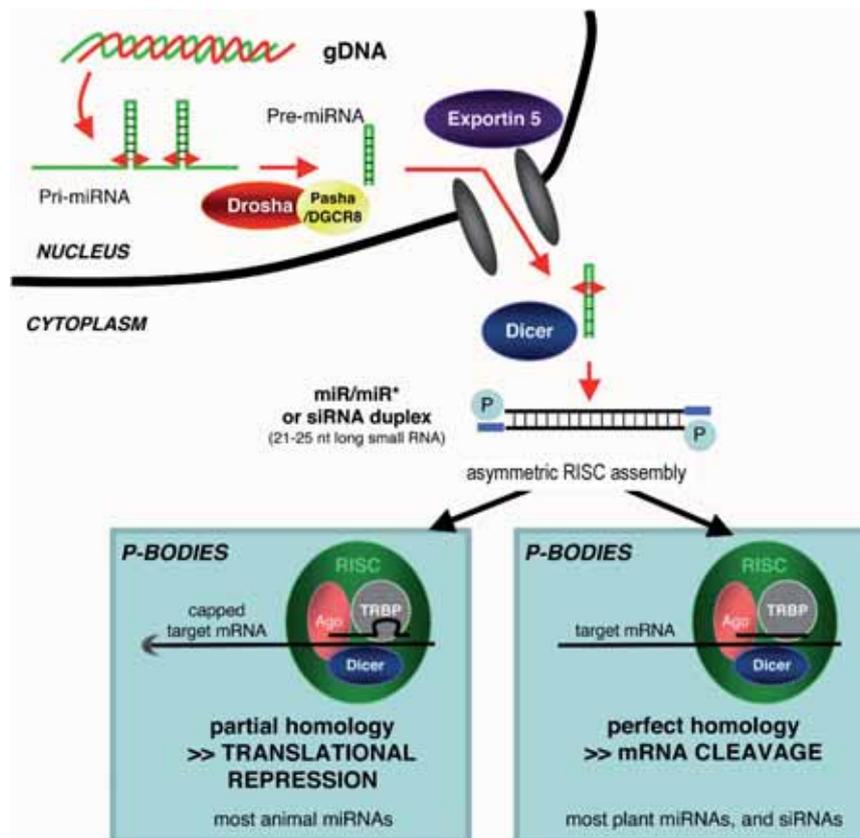


Figura 4 Mecanismo de acción de los microRNAs. El gen del microRNA se transcribe para dar lugar al pri-miRNA. El pri-miRNA es cortado mediante la RNasa III Drosha dando lugar al pre-miRNA. El pre-miRNA se transporta al citoplasma mediante la Exportina-5. La RNasa III Dicer corta el pre-miRNA formando un microRNA de doble cadena. Este microRNA de doble cadena inmaduro se separa en un miR maduro de cadena simple. Mediante el complejo RISC se une a los RNAm diana. Dependiendo de la complementariedad entre el RNAm y el miR, el RNAm será inhibido en su traducción o será seccionado en fragmentos y destruido. (Extraído y modificado de Saumet and Lecellier, 2006).

Fueron descubiertos en 1993 por Lee, Feinbaum y Ambros (Lee et al., 1993) durante un estudio del desarrollo del nemátodo *Caenorhabditis elegans*. Desde entonces se han descrito en mamíferos más de 1000 microRNAs y se considera que podrían representar el 3% del genoma humano (Bentwich et al., 2005). Su conservación entre especies y su detección incluso en Archaea y eubacterias revela que su origen es muy antiguo (Bartel, 2004).

Debido a que la mayoría de los procesos celulares, homeostáticos y de desarrollo dependen de un nivel preciso de proteínas, la biogénesis de los miRNAs juega un rol esencial en la regulación de los procesos fisiológicos y fisiopatológicos (Ambros, 2004; Catalucci et al., 2008; Thum et al., 2008; Williams et al., 2009). Se ha observado su papel en procesos fisiológicos como la morfogénesis y el desarrollo embrionario (Zhao et al., 2007; Zhao and Srivastava, 2007) o en la respuesta de las células inmunitarias (Lodish et al., 2008), entre otros. A nivel fisiopatológico, se ha descrito que los miRNAs pueden funcionar como supresores de tumores o como oncogenes (Ma and Weinberg, 2008); se ha estudiado su función en la infección viral (Jopling et al., 2005); a nivel cardiovascular se ha observado que determinados microRNAs, altamente expresados en el corazón, desempeñan un papel crucial en la patogenia de diferentes procesos (Montgomery and van Rooij, 2010) (**Fig.5**).

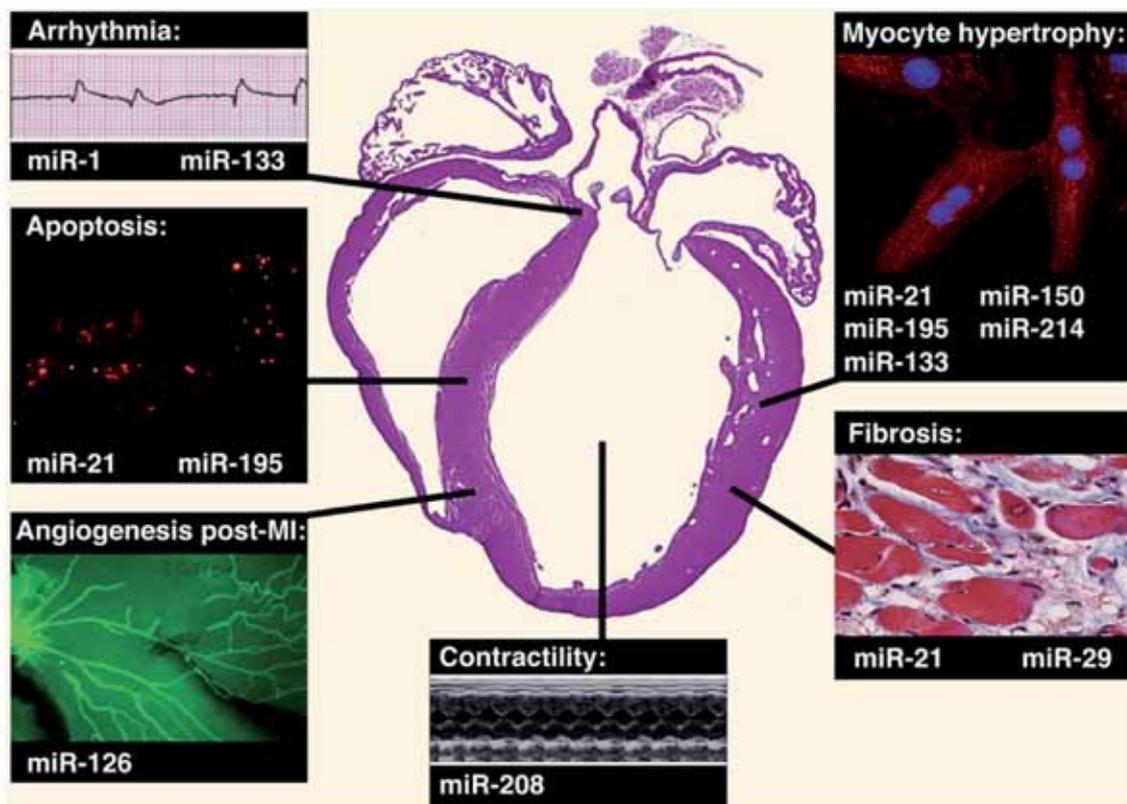


Figura 5 Función de los microRNAs en la patología cardíaca. Tanto el estrés agudo como el crónico, de cualquier causa, activan en el corazón respuestas celulares y moleculares comunes, como la hipertrofia de cardiomiocitos, la fibrosis, la degeneración y apoptosis de miocitos, que culminan en la aparición de IC. Cada vez, se tiene más evidencia, de que en la regulación de cada una de estas respuestas participan miRs específicos. Los miR-21 (Thum et al., 2008), -133 (Carè et al., 2007), -150 (Duan et al., 2013), -195 (van Rooij et al., 2006) y -214 (Yang et al., 2013) regulan la hipertrofia de los cardiomiocitos; los miR-1 y -133 se han implicado en la arritmogénesis cardíaca (Yang et al., 2007; Belevych et al., 2011); el miR-195 parece controlar la apoptosis regulando la formación de radicales libres a través de la regulación de la sirtuin 1 (Sirt1) y B-cell lymphoma 2(Bcl-2) (Zhu et al., 2011); el miR-208 controla la contractión cardíaca regulando el contenido de miosina (Callis et al., 2009). El proceso de fibrosis cardíaca está regulado por el miR-21 y -29, ambos altamente expresados en los fibroblastos cardíacos (Thum et al., 2008; van Rooij et al., 2008). La neoangiogénesis postIAM depende del miR-126 (Wang et al., 2008) (Extraído y modificado de van Rooij et al., 2008).

Estudios experimentales, especialmente en el campo oncológico, han puesto de manifiesto que algunas de estas pequeñas moléculas de RNA regulan la vasculogénesis (Urbich et al., 2008; Fish and Srivastava, 2009; Suárez and Sessa, 2009; Anand and Cheresh, 2011; Caporali and Emanuelli, 2011; Plummer et al., 2013). Los microRNAs reguladores de la vasculogénesis se denominan endomiRs o angiomiRs y pueden exhibir una actividad proangiogénica, aumentando la proliferación y migración de células endoteliales, o bien una actividad antiangiogénica (**Fig.6**) (Wang and Olson, 2009; Santoro and Nicoli, 2013).

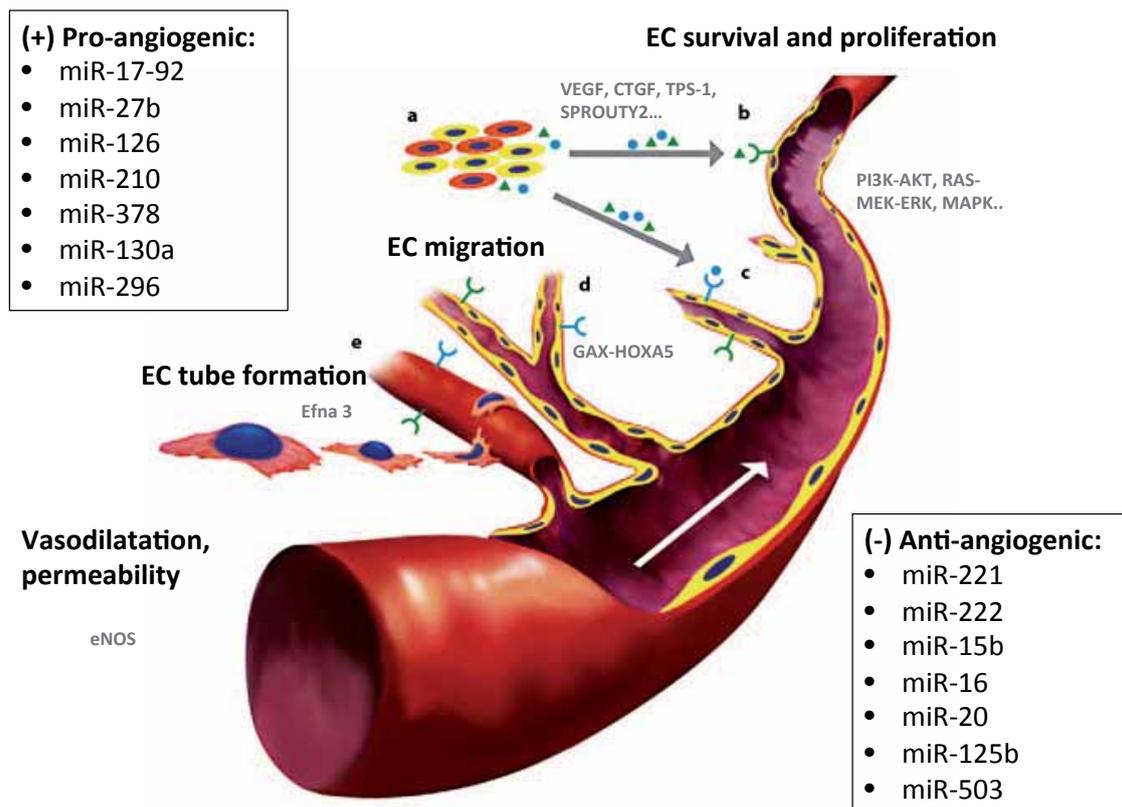


Figura 6 Los microRNAs regulan la angiogénesis. La angiogénesis es un proceso que consiste en la formación de vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. Es un proceso fisiológico normal durante el desarrollo y crecimiento sin embargo también ocurre en situaciones patológicas como el crecimiento tumoral e invasión local. Determinados microRNAs regulan la expresión de diferentes factores angiogénicos, receptores y vías de señalización implicados en la formación de nuevos vasos. Algunos microRNAs estimulan la proliferación, diferenciación y migración de las células endoteliales y son considerados pro-angiogénicos mientras que otros bloquean la respuesta angiogénica.

Hasta el momento, múltiples endomiRs así como las vías específicas y proteínas diana sobre las que actúan, han sido descritos (Fig.7) (Tablas 1 y 2).

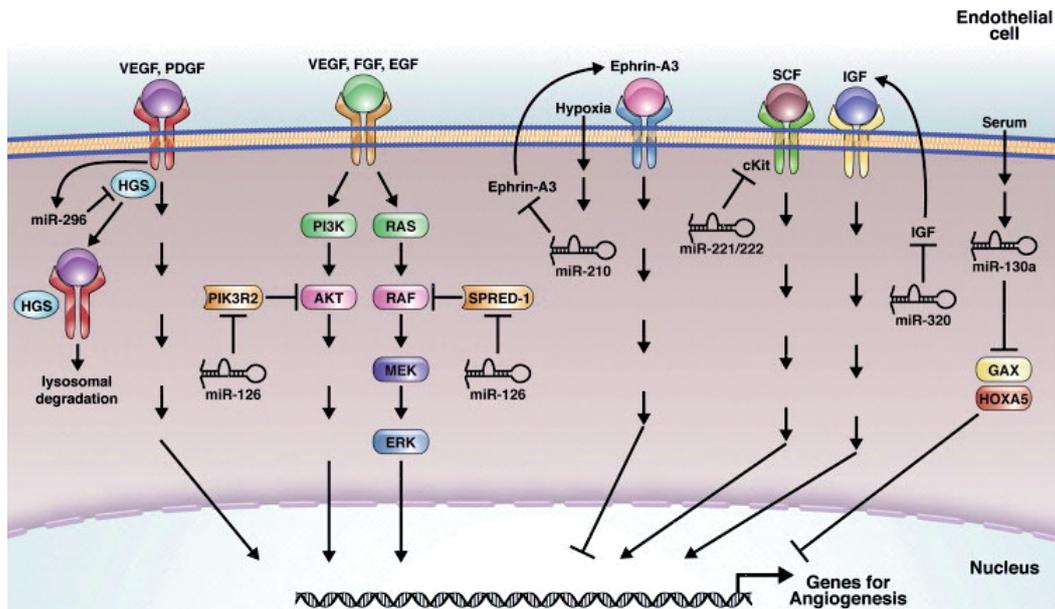


Figura 7 MicroRNAs y regulación posttranscripcional de dianas implicadas en la angiogénesis. Sucesivos estudios van demostrando la contribución de microRNAs específicos en la homeostasis vascular. La identificación de dichos microRNAs y de sus dianas respectivas ofrecerá nuevas estrategias terapéuticas para tratar enfermedades como la arteriosclerosis, para mejorar la neovascularización tras la isquemia o prevenir la progresión tumoral. (Extraído y modificado de Wang and Olson, 2009).

Tabla 1.- MicroRNAs proangiogénicos:

<i>miR</i>	<i>Diana</i>	<i>Efectos</i>
Let-7	Trombospondina-1 (TPS-1) Argonaute RISC catalytic component 1 (AGO 1) VEGF	Incrementa la migración de células endoteliales humanas (Kuehbacher et al., 2007). Control de la angiogénesis tumoral (Jusufović et al., 2012; Chen Z et al., 2013).
miR-9	Janus Kinase(JAK)-signal transducer and activator of transcription(STAT)-suppressor of cytokine signaling 5 (SOCS5)	Promueve la migración de células endoteliales y la angiogénesis tumoral (Zhuang et al., 2012).
miR-21	Akt serine/threonine protein kinase (AKT)- extracellular regulated kinases (ERK)1/2 - hypoxial inducible factor 1 alfa (HIF-1 α) y VEGF	Induce angiogénesis tumoral (Liu et al., 2011).
miR-23 miR-27a miR-27b	Sprouty homolog 2 y Sema6A (semaphorin 6A)	Inducen neovascularización coroidal patológica in vivo (Zhou et al., 2011). El miR-27a promueve la angiogénesis y la metástasis tumoral actuando en la diferenciación de las células cancerosas stem cells-like (Tang et al., 2013)
miR-93 (cluster miR-106b-25)	Integrina- β 8 Large tumor suppressor kinase 2 (LATS2)	Promueve la angiogénesis tumoral lo que facilita la supervivencia celular y el crecimiento tumoral (Fang L et al., 2011). Estimula la angiogénesis conduciendo a una mayor supervivencia celular e invasión tumoral en el cáncer de mama (línea celular MT-1) (Fang et al., 2012).

miR-99b miR-181a miR-181b		<i>Estimula la diferenciación de células madre embrionarias en células endoteliales (Kane et al., 2012).</i>
miR-126	<i>Suprime la síntesis de phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 2 (PIK3R2), Stromal cell-derived factor 1(SDF-1), vascular endothelial grow factor A (VEGFA) (Nikolic et al., 2010; van Solingen et al., 2011)</i>	<i>Se encuentra altamente expresado en las células endoteliales humanas. Mejora la angiogénesis in vitro e in vivo en la placenta y en el seno del IAM (Huang et al., 2013; Yan et al., 2013). Rol en la vasculogénesis tumoral: se encuentra downregulado en tumores donde la vía VEGF/PI3K/AKT se encuentra activada (Zhu N et al., 2011). Estimula la progresión tumoral, densidad vascular y metástasis en carcinoma escamoso oral (Sasahira et al., 2012).</i>
	<i>VEGF, insulin-like growth factor 2 (IGF-2) and HIF-1α</i>	<i>Controla la neovascularización de la retina inducida por la isquemia (Bai et al., 2011).</i>
miR-130a	<i>Growth arrest-specific homeobox (GAX) y homeobox A5 (HOXA5)</i>	<i>Regula la angiogénesis tumoral (Chen and Gorski, 2008).</i>
miR-132	<i>P120 RAS GTPase activating protein (p120RasGAP)</i>	<i>Suprime la expresión endotelial de p120RasGAP llevando a una activación de la Ras induciendo neovascularización. Se encuentra altamente expresado en el endotelio de tumores humanos y hemangiomas (Anand et al., 2010).</i>
miR-146	<i>Platelet-derived growth factor receptor alpha polypeptide (PDGFRα)</i>	<i>Estimula la actividad de las células endoteliales en el hepatocarcinoma (Zhu et al., 2013).</i>
miR-155		<i>Promueve la invasión microvascular del hepatocarcinoma (Han et al., 2012).</i>
	<i>SMAD family member 2 (SMAD2)- transforming growth factor beta (TGF-beta)</i>	<i>Implicado en la inflamación, fibrosis y angiogénesis (Louafi et al., 2010).</i>
miR-194	<i>TPS-1</i>	<i>Se ha visto incrementada su expresión en el cáncer de colon llevando a un incremento de la densidad microvascular y del tamaño vascular (Sundaram et al., 2011).</i>
miR-210	<i>Ephrin-A3 (Efna 3) y protein tyrosine phosphatase non-receptor type 1b (Ptp1b)</i>	<i>Inhibe la apoptosis celular e incrementa la neovascularización mejorando la función cardíaca en un modelo murino de IAM (Hu et al., 2010). Es liberado por células cancerosas metastásicas induciendo neoangiogénesis tumoral (Kosaka et al., 2013).</i>
	<i>Notch1</i>	<i>Estimula la angiogénesis en respuesta a la isquemia cerebral (Lou et al., 2012).</i>
	<i>VEGF y vascular endothelial grow factor 2 (VEGFR2)</i>	<i>Promueve la angiogénesis renal tras el daño por isquemia-reperfusión (Liu F et al., 2012).</i>
miR-211	<i>LacZ</i>	<i>Se asocia en el carcinoma oral a una mayor invasión vascular, metástasis y a un peor pronóstico (Chang et al., 2008).</i>
miR-296	<i>Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate (HGS)-VEGFR2 y platelet-derived growth factor receptor beta polypeptide (PDGFRbeta)</i>	<i>Se encuentra elevado en las células endoteliales de gliomas estimulando la angiogénesis (Würdinger et al., 2008).</i>
miR-378	<i>Suppressor of fused homolog (Sufu) and fused in sarcoma (Fus-1)(Lee et al., 2007)</i>	<i>Promueve la angiogénesis tumoral, la migración y la invasión celular en el cáncer de pulmón de células no-pequeñas (Chen LT et al., 2012).</i>

Tabla 2.- MicroRNAs antiangiogénicos:

miR	Diana	Efectos
miR-9	(matrix metalloproteinase 14) MMP-14	Inhíbe la invasión, metástasis y angiogénesis del neuroblastoma (Zhang et al., 2012).
miR-15a y miR16 (familia miR-16)	VEGFA and AKT-3	Controlan, in vitro, la actividad de las células circulantes proangiogénicas involucradas en la neovascularización postisquémica (Spinetti et al., 2013). Inhiben la angiogénesis y el crecimiento tumoral en el mieloma múltiple (Sun et al., 2013).
miR-15a (familia miR-16)	Fibroblast growth factor 2 (FGF2) y VEGF	Inhíbe la angiogénesis en la isquemia periférica en ratones (Yin KJ et al., 2012).
miR-15b (familia miR-16)	Mitogen-activated protein kinase (MEK)-ERK-neuropilin-2 (NRP-2)	Reduce la angiogénesis y la invasión celular en los gliomas (Zheng et al., 2013). Actividad antiangiogénica en el IAM (Liu Z et al., 2012).
miR-15a/b, miR-16, miR-424, miR-503 (familia miR-16)		Controlan, in vitro, las células circulantes proangiogénicas involucradas en la neovascularización postisquémica (Caporali and Emanuelli, 2011).
miR-16 (familia miR-16)	VEGF	Su downregulación induce la expresión de VEGF y angiogénesis en el linfoma anaplásico de células grandes (ALK-positivo) (Dejean et al., 2011).
Cluster miR-19-92	TPS-1 y connective tissue growth factor (CTGF)	Regulan la angiogénesis tumoral en los adenocarcinomas K-Ras and Myc+ (Dews et al., 2006).
miR-17-3p (cluster-17-92)	VEGF receptor-1	Es un regulador negativo del fenotipo angiogénico de las células endoteliales humanas (Yin R et al., 2013).
miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20 (cluster-17-92a)	JAK 1 (miR-17)	Disminuyen la formación de vasos in vitro (Doebele et al., 2010).
miR-19b-1 (cluster 17-92a)	Platelet-derived growth factor receptor a polypeptide 2	Bloquea el paso de la fase S a la fase G(2)/M en el ciclo celular a nivel de las células endoteliales (Yin R et al., 2012).
miR-21	Ras homolog family member B (RhoB) Nitric oxide synthase inhibitor asymmetrical dimethylarginine (ADMA)	Inhíbe la migración de células endoteliales y la angiogénesis en un modelo murino de neovascularización coroidal (Sabatel et al., 2011). Se eleva en pacientes con enfermedad coronaria empeorando la capacidad migratoria de las células progenitoras angiogénicas (Fleissner et al., 2010).
miR-24	GATA binding protein 2 (GATA2) y p21protein-activated kinase 4 (PAK4)	Induce apoptosis de células endoteliales e inhibe la proliferación vascular (Fiedler et al., 2011).
miR-29a	HMG-box transcription factor 1 (HBP1)	Regula el ciclo celular y el fenotipo angiogénico de las células endoteliales (Yang et al., 2013).
miR-29b	Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2)	Suprime la formación de capilares. Su disregulación in vivo contribuye a la angiogénesis, invasión local y metástasis en el hepatocarcinoma (Fang et al., 2011).
miR-34a	TIMP2 metalloproteinase inhibitor 2 (TIMP2) E2F transcription factor 3 (E2F3a)- VEGF	Proapoptótico e inductor de vascularización en el neuroblastoma (Tivnan et al., 2012). Inhíbe la función de las células endoteliales en el tumor escamoso de cuello disminuyendo la angiogénesis y el crecimiento tumoral en ratones (Kumar et al., 2012).
miR-100	Mechanistic target of rapamycin (mTOR)	Inhíbe la proliferación de células endoteliales y la formación vascular así como la migración de células musculares de los vasos (Grundmann et al., 2011).
miR-101	Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2)	Se encuentra downregulado en el glioblastoma induciendo proliferación, migración y angiogénesis tumoral (Smits et al., 2010).
miR-107	HIF-1 beta	Inhíbe la angiogénesis tumoral y el crecimiento de células malignas en el cáncer de colon (Yamakuchi

		<i>et al., 2010).</i>
miR-125b	<i>Myc-associated zinc finger protein (MAZ)-VEGF</i>	<i>Se encuentra downregulado en el glioblastoma resultando en mayor síntesis de VEGF y mayor angiogénesis (Smits et al., 2012).</i>
	<i>Vascular endothelial-cadherin (VE-cadherin)</i>	<i>Inhibe la formación vascular y el crecimiento tumoral in vitro (Muramatsu et al., 2013).</i>
	<i>Placenta growth factor (PIGF)</i>	<i>Inhibe la angiogénesis, migración e invasión celular en el cáncer hepatocelular (Alpini et al., 2011).</i>
miR-128	<i>ribosomal S6 Kinase p 70 (P70S6K1), HIF-1 y VEGF</i>	<i>Inhibe la angiogénesis y el crecimiento tumoral en el glioma (Shi et al., 2012).</i>
miR-145	<i>Friend leukemia virus integration 1 (FlI1)</i>	<i>Bloquea la migración celular en respuesta a factores de crecimiento (Larsson et al., 2009).</i>
	<i>Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog (N-RAS) y insulin receptor substrate 1 (IRS1)- AKT y ERK 1/2-p70S6K1 (expresión de VEGF y HIF-1)</i>	<i>Regula la angiogénesis tumoral (Fan et al., 2012; Xu et al., 2012; Zou et al., 2012; Yin Y et al., 2013).</i>
miR-150	<i>E-box-binding homeobox 1</i>	<i>Crucial en la diferenciación de las células endoteliales (Luo et al., 2013).</i>
miR-152	<i>MEK-ERK-matrix metalloproteinase 3 (MMP-3)</i>	<i>Reducen la angiogénesis y la invasión celular en los gliomas (Zheng et al., 2013)</i>
mir-181a mir-181b		<i>Potencian la diferenciación de las células madre embrionarias en células endoteliales (Seeger et al., 2013).</i>
miR-200a	<i>TPS-1</i>	<i>Regula la viabilidad celular y la migración (Li et al., 2011).</i>
miR-200b	<i>ETS-1 and KDR kinase insert domain receptor (Flk1), melanization protease 1 (MP1) y VEGF</i>	<i>Controla la migración y polaridad celular. Controla la vasculogénesis tanto en el desarrollo embrionario como en el cáncer (Choi YC et al., 2011; Gill et al., 2012).</i>
miR-200c	<i>ZEB1</i>	<i>Crucial en la diferenciación de las células endoteliales (Luo et al., 2013).</i>
miR-214	<i>Endothelial nitric oxide synthase (eNOS)</i>	<i>Reduce la expresión de la eNOS, la migración celular y la formación tubular (Chan et al., 2009).</i>
	<i>Hepatoma-derived growth factor (HDGF)</i>	<i>Su downregulación en el hepatocarcinoma se asocia a mayor microvascularización y mayor recurrencia del tumor (Shih et al., 2012).</i>
miR-221 miR-222	<i>c-Kit.</i>	<i>Modula la migración de las células vasculares (Poliseno et al., 2006).</i>
miR-222	<i>Signal transducer and activator of transcription 5A (STAT5A)</i>	<i>Envuelto en el remodelado vascular que ocurre en las lesiones arterioscleróticas (Dentelli et al., 2010).</i>
miR-320	<i>Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) e insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1R)</i>	<i>Se expresa en las células endoteliales de la red microvascular cardíaca. Inhibe la angiogénesis en ratas diabéticas (Wang XH et al., 2009).</i>
miR-361	<i>VEGF</i>	<i>Rol antiangiogénico en las células endoteliales humanas (Dal Monte et al., 2013).</i>
miR-409-3p	<i>Angiogenin (ANG)</i>	<i>Inhibe la vascularización, proliferación tumoral y metástasis en el fibrosarcoma (Weng et al., 2012).</i>
mir-424 (mu- miR-322 homólogo del mir-424 humano)	<i>Cullin 2 (CUL2)-HIFα</i>	<i>Juega un importante rol en el remodelado vascular postinfarto y angiogénesis (Ghosh et al., 2010).</i>
	<i>MEK1 y Ciclin E1 (CCNE-1)</i>	<i>Su downregulación induce una angiogénesis anormal en el hemangioma senil (Nakashima et al., 2010).</i>
miR-483-5p	<i>Serum response factor (SRF)</i>	<i>La vía miR-483-5p-SRF podría ofrecer beneficios en el tratamiento de la cardiopatía isquémica (Qiao et al., 2011).</i>
miR-503	<i>CCNE-1 y cell division cycle 25A (cdc25A)</i>	<i>Inhibe la proliferación y migración de células endoteliales. Contribuye a la disfunción endotelial asociada a la diabetes mellitus. Su expresión aumenta en la ratas diabéticas con vasculopatía periférica (Caporali et al., 2011).</i>
miR-519c	<i>HIF-1α</i>	<i>Reduce la angiogénesis tumoral (Cha et al., 2010).</i>

En concreto, investigaciones previas por el grupo de la profesora Dimmeler han revelado que existe un cluster policistrónico de microRNAs, el miR-17-92a, compuesto por 7 microRNAs maduros, el miR-17 y miR-17-5p, miR-18a, miR-19a y b, miR-20a y miR-92a, que se expresa en alto grado en las células endoteliales (**Fig.8**) (Bonauer and Dimmeler, 2009).

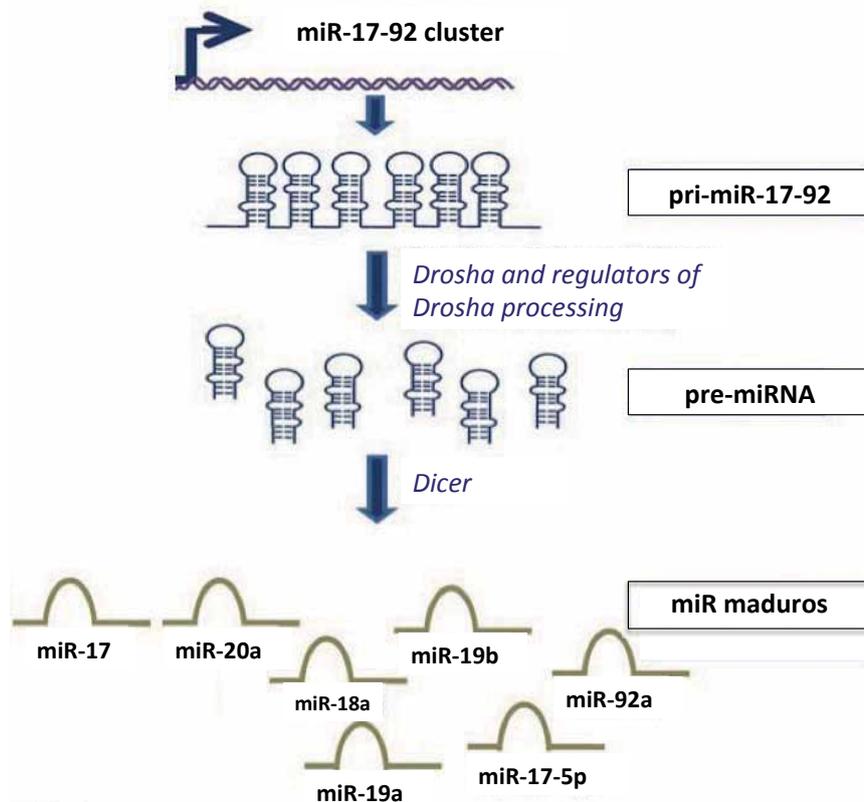


Figura 8 Cluster miR-17-92. El cluster policistrónico miR-17-92 reside en el intron 3 del gen *C13orf25*, localizado en el cromosoma humano 13. Codifica para 7 miR maduros, el miR-17, miR-17-5p, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20 y miR-92a, los cuales son transcritos como una transcripción primaria común. (Extraído y modificado de Bonauer and Dimmeler, 2009).

Dicho cluster despertó inicialmente gran interés por su participación en la patogénesis del cáncer (He et al., 2005; Mendell, 2008). Su expresión se encontró aumentada en neoplasias hematológicas, como la leucemia mieloide crónica (Venturini et al., 2007) y el linfoma B, y en diversos tumores sólidos favoreciendo la progresión de la enfermedad (**Fig.9**) (Ota et al., 2004; Volinia et al., 2006). Además, de acuerdo a su actividad carcinogénica, la propia transcripción del cluster se observó estimulada por los proto-oncogenes c-myc y Ras (O'Donnell et al., 2005; Dews et al., 2006).

Paralelamente, otras funciones adicionales, como la regulación de la hematopoyesis y del sistema inmunológico, fueron también descritas (Fontana et al., 2007; Xiao et al., 2008).

Más recientemente, dicho cluster se ha implicado en el desarrollo del sistema cardiopulmonar. Un estudio de Ventura puso de manifiesto que los embriones de ratón sin miR-17-92 mostraban unos pulmones severamente hipoplásicos, incompatibles con la vida (Ventura et al., 2008). Ello ha permitido conocer más datos sobre los fenómenos de diferenciación celular y de vasculogénesis postnatal.

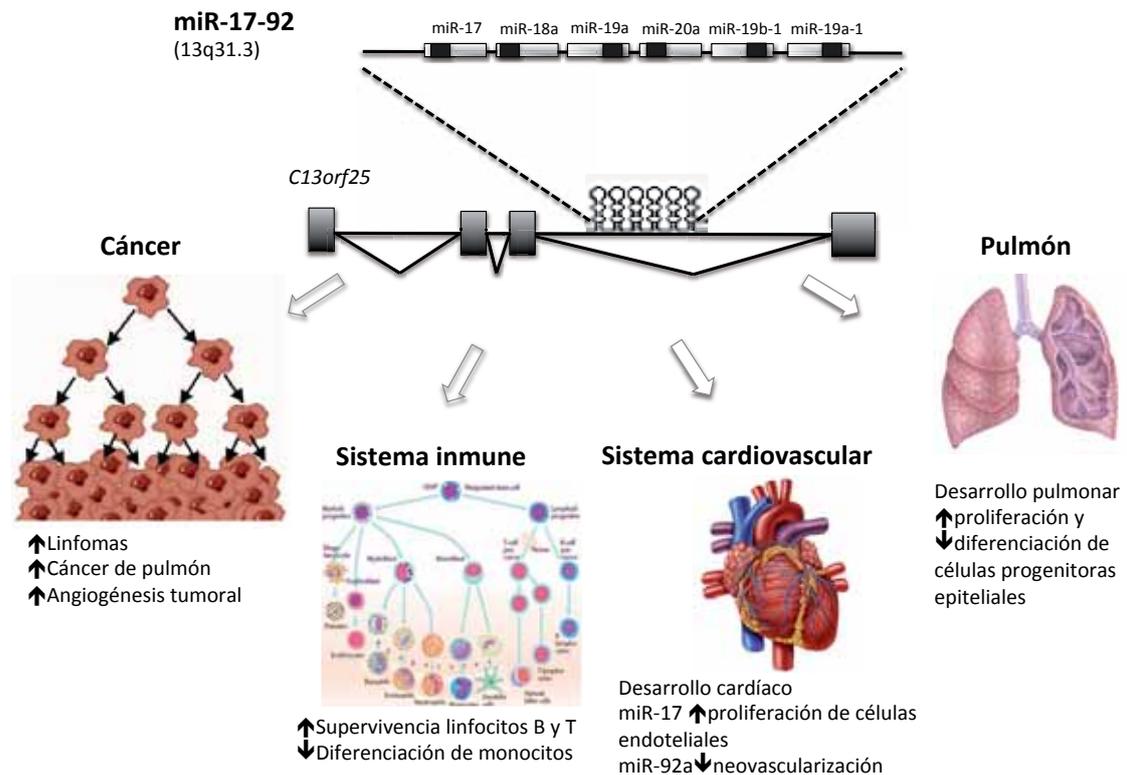


Figura 9 Funciones del cluster miR-17-92. El cluster miR-17-92 fue inicialmente asociado al cáncer y su función oncogénica fue confirmada en estudios experimentales que demostraron que su sobreexpresión acelera el inicio y la progresión de determinados linfomas. También se observó sobreexpresión de dicho cluster en tumores sólidos, como el cáncer de pulmón. Posteriormente se le han asignado otras funciones como la regulación del sistema inmune, controlando la proliferación de los linfocitos B y T, y la regulación del desarrollo del corazón y del pulmón. Embriones de ratón deficientes para miR-17-92 exhibían unos defectos de desarrollo de pulmón y corazón severos que causaban la muerte precoz tras el nacimiento. Recientemente se han conocido funciones específicas de algunos de sus miembros, como el miR-17 y el miR-92a que controlan la neovascularización postnatal.

Por otra parte, cada vez es mayor la evidencia de que los miembros individuales del cluster exhiben funciones específicas. Particularmente su último miembro, el miR-92a, ha sido foco de interés en los últimos años. Su expresión se ha

visto incrementada en diferentes tipos de tumores pero hasta el momento, no hay evidencia directa de que el miR-92a incremente la proliferación o supervivencia celular en el contexto del cáncer (Matsubara et al., 2007; Northcott et al., 2009). Algunos estudios sugieren que controla la proliferación y supervivencia de linfocitos y monocitos, actuando directamente sobre la vía Bim (Ventura et al., 2008). Recientemente, el mismo grupo de la Universidad de Frankfurt, descubrieron el rol del miR-92a en el sistema cardiovascular. Demostraron que el miR-92a se encuentra altamente expresado en las células endoteliales, regulando las funciones angiogénicas de dichas células. La sobreexpresión de miR-92a no sólo empeora la angiogénesis *in vitro*, reduciendo la migración de células endoteliales y su adhesión a la fibronectina, sino que también bloquea el crecimiento vascular intersomítico *in vivo*, en el pez zebra (Bonauer et al., 2009). Mecanísticamente, identificaron que tanto la integrina alfa5 (ITGA5), un regulador crucial endotelial, como factores señalizadores antiapoptóticos y proteínas involucradas en la migración celular, eran dianas específicas del miR-92a (Yang et al., 1993; Francis et al., 2002; Urbich et al., 2002). Adicionalmente observaron una regulación miR-92a-dependiente de la endothelial nitric oxide synthase (eNOS), quien controla el tono vascular y es esencial para la neovascularización postnatal (Palmer et al., 1987; Murohara et al., 1998).

MODULACIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS CON ANTAGOMIRES

Habiendo conocido que el miR-92a, y en general los microRNAs, pueden reprimir diferentes mRNA diana funcionalmente relacionados, puede anticiparse que su modulación podría impactar sobre las vías moleculares complejas que orquestan la neovascularización (Anand and Cheresch, 2011; Caporali and Emanuelli, 2011). En el 2005, Krützfeldt descubrió que podemos modular la acción de los microRNAs. Fabricó sintéticamente en el laboratorio una secuencia de ARN monocatenario complementaria a un microRNA, bautizándola con el nombre de antagomir (**Fig.10**) (Krützfeldt et al., 2005).

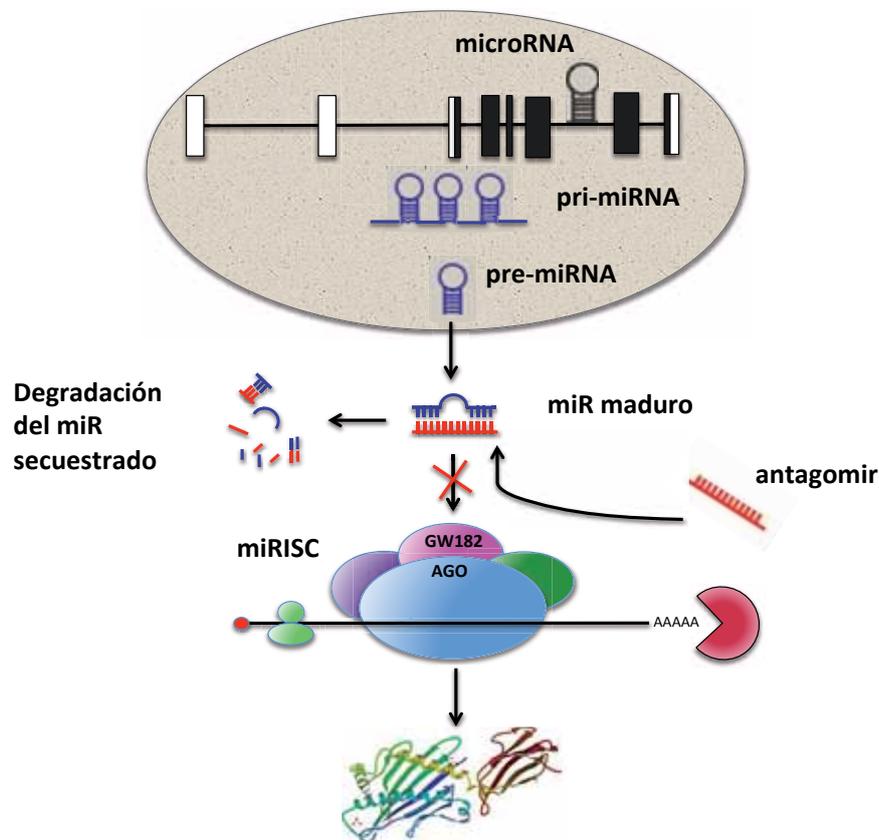


Figura 10 Antagomir: definición y función. Un antagomir es una secuencia de nucleótidos químicamente sintetizada para silenciar la actividad de los miRs endógenos. Se une al miR específico para el cuál ha sido diseñado y con el que tiene una complementariedad perfecta e impide que éste actúe sobre su RNAm diana. De esta manera, deja de ejercer su actividad represora y aumenta la traducción de los RNAm diana y secundariamente la síntesis de proteínas. Krützfeldt demostró, en ratones, que la administración intravenosa de antagomires contra el miR-16, miR-122, miR-192 y el miR194 resultaba en una reducción marcada de los niveles del miR en el hígado, pulmón, riñón, corazón, intestino, grasa, piel, médula ósea, músculo, ovarios y glándulas adrenales (Krützfeldt et al., 2005). La inhibición fue específica y eficiente, por lo que los antagomires representan una nueva estrategia para silenciar aquellos miRs implicados en la fisiopatogenia de enfermedades.

Demostró, *in vivo*, que el antagomir se une a su miR específico, que deja de ejercer su acción sobre sus proteínas diana, silenciando por tanto su actividad (Krützfeldt et al., 2005).

Esta capacidad de manipular la expresión de los microRNAs significó el nacimiento de una nueva herramienta terapéutica de gran valor (van Rooij et al., 2008). Desde entonces, diversas publicaciones se han ido sucediendo demostrando que la terapia con antagomires es capaz de controlar procesos patológicos (Stenvang and Kauppinen, 2008; Zhang and Farwell, 2008) (**Tabla 3**). La administración de dichos oligonucleótidos, generalmente por vía intravenosa y en inyecciones repetidas, ha logrado efectos favorables en distintos tejidos con distintas afecciones fisiopatológicas. En concreto, en aquellas patologías en las que se genera una vasculogénesis desadaptativa, como la tumoral, como en aquellas en las que son necesarios nuevos vasos, como la cardiopatía isquémica, la terapia con antagomires está obteniendo beneficios experimentales prometedores (**Fig.11**) (Würdinger et al., 2008; Bonauer et al., 2009; Wang et al., 2009; Anand et al., 2010; Caporalli et al., 2011; Collison et al., 2011; Fiedler et al., 2011; Grundmann et al., 2011; van Solingen et al., 2011; Zhou et al., 2011; Lin et al., 2012; Wang et al., 2012; Zhuang et al., 2012; Guessous et al., 2013). La capacidad de estimular o inhibir la diferenciación, proliferación, migración y apoptosis de las células endoteliales constituyen las bases celulares y moleculares a través de los cuales ejercen su acción y logran sus beneficios.

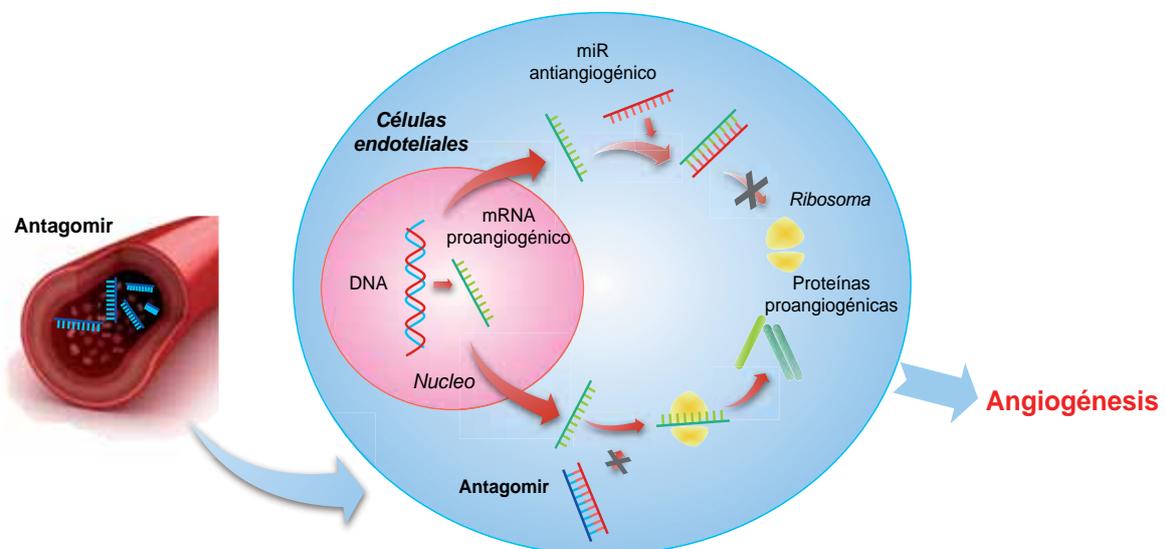


Figura 11 Angiogénesis y terapia con antagomires. La administración intravenosa de antagomires diseñados específicamente para silenciar miRs implicados en la vasculogénesis está logrando efectos biológicos relevantes en la formación de nuevos vasos. Ello se traduce en beneficios clínicos en diversos modelos experimentales representativos de una amplia variedad de patologías.

Tabla 3.- Terapia con antagomires in vivo:

MicroRNA	Patología	Efecto
Antagomir-Let7f	Accidente vascular cerebral	Reduce significativamente el volumen de infarto cortical y estriado en un modelo de infarto cerebral en ratas hembra preservando la función sensitivo-motora y la integración interhemisférica (Selvamani et al., 2012).
Antagomir-1	Accidente vascular cerebral	Reduce significativamente el volumen de infarto cortical en un modelo de infarto cerebral en ratas (Selvamani et al., 2012).
Antagomir-9	Cáncer	Reduce la carga tumoral, inhibiendo la migración de células endoteliales y la angiogénesis (Zhuang et al., 2011).
Antagomir-10b	Glioblastoma multiforme	Reduce la angiogénesis, invasión y crecimiento tumoral en ratones (Lin et al., 2012; Guessous et al., 2013).
	Cáncer de mama	Suprime marcadamente la aparición de metástasis pulmonares en un modelo de ratón de cáncer de mama (Ma et al., 2010).
Antagomir-16-2	Policitemia vera	Reduce la eritropoyesis en respuesta a eritropoyetina exógena en ratones (Guglielmelli et al., 2011).
Antagomir-17	Hipertensión pulmonar	Evita la muscularización y remodelado arterial pulmonar, reduciendo las resistencias vasculares pulmonares y el tiempo de aceleración de la arteria pulmonar. Secundariamente, previene la hipertrofia del ventrículo derecho y normaliza el gasto cardíaco (Pullamsetti et al., 2012).
Antagomir-17-5p	Neuroblastoma	Abole el crecimiento tumoral especialmente en neuroblastomas resistentes al tratamiento (Fontana et al., 2008).
Antagomir-20a	Carcinoma de vesícula biliar	La inhibición del miR-20a restaura la expresión de <i>SMAD family member 7</i> (SMAD7) y atenúa las metástasis inducidas por TGF-beta (Chang et al., 2013).
	Hipertensión pulmonar	El tto con antagomir-20a reduce el grosor de la pared y evita la oclusión luminal de las arterias pulmonares de pequeño tamaño reduciendo, secundariamente, la hipertrofia del ventrículo derecho en un modelo de ratón de hipertensión pulmonar (Brock et al., 2012).
Antagomir-21	Melanoma	Reduce las metástasis y mejora la supervivencia de ratones con melanoma (Yang et al., 2011).
	Cáncer de próstata	El tratamiento con antagomir-21 reprime el crecimiento del tumor en ratones (Li et al., 2012).
	Nefropatía diabética	Atenúa la fibrosis renal que ocurre en la nefropatía diabética (Wang et al., 2013).
	Fibrilación auricular	El tto con antagomir-21 previene la fibrosis de la aurícula (Adam et al., 2012).
Antagomir-22	Hipertensión arterial	Reducciones significativas de las cifras de presión arterial (Friese et al., 2013).
Antagomir-23 Antagomir-27	Retinopatía diabética	Reprimen la angiogénesis postnatal patológica a nivel de la retina pudiendo tener un papel en el tto de la degeneración macular y otros desórdenes vasculares oculares (Zhou et al., 2011).
Antagomir-24	IAM	Reduce el tamaño del infarto en ratones previniendo la apoptosis endotelial y mejorando la vascularización conduciendo a una mejor función ventricular y supervivencia (Fiedler et al., 2011).
	Hipertrofia ventricular	Previene la transición de la hipertrofia ventricular compensatoria a una hipertrofia desadaptativa y desarrollo de insuficiencia cardíaca en un modelo de ratón de sobrecarga mediante constricción aórtica (Li et al., 2013).
Antagomir-27a (FOXO3a)	Glioblastoma	Suprime la capacidad invasiva y la proliferación de las células del glioblastoma inhibiendo el crecimiento tumoral (Ge et al., 2013).
Antagomir-27b	IC	Atenúa la hipertrofia cardíaca y la disfunción contráctil en un modelo de ratón de sobrecarga de presión (Wang et al., 2012).

Antagomir-34	Remodelado postIAM y remodelado secundario a sobrecarga de presión	Atenúa el remodelado cardíaco y la dilatación auricular estimulando la angiogénesis, reduciendo la fibrosis a partir del aumento de la actividad de la AKT, reduciendo la expresión del péptido natriurético atrial y manteniendo la expresión génica de la ATPasa Ca ²⁺ del retículo sacroplásmico (Bernardo et al., 2012).
	Epilepsia	Inhibe la expresión de caspasa-3 contribuyendo a un incremento de la supervivencia neuronal, reduciendo su muerte y su apoptosis (Hu et al., 2012).
Antagomir-92a	IAM	Induce angiogénesis y mejora la función contráctil postIAM (Bonauer et al., 2009).
	Vasculopatía periférica	Induce angiogénesis en un modelo de ratón de isquemia en extremidades inferiores (Bonauer et al., 2009).
	Daño vascular y restenosis	Mejora la reendotelización evitando la hiperplasia intimal en ratones con lesión en las arterias carótidas (Iaconetti et al., 2012).
Antagomir-100	Vasculopatía periférica	Mejora la perfusión distal y la recuperación funcional tras oclusión de la arteria femoral en ratones (Grundmann et al., 2011).
Antagomir-122	Hepatitis por virus C	Inhibe la replicación del virus C en primates (Lanford et al., 2010).
Antagomir-126	Isquemia periférica	Mobilización de células progenitoras Sca-1(+)/Lin(-) hacia la circulación periférica en el seno de la isquemia periférica en un modelo de ratón (van Solingen et al., 2011).
	Asma bronquial	Reduce el reclutamiento de eosinófilos a nivel del epitelio en un modelo de ratón de asma bronquial crónica (Collison et al., 2011).
Antagomir-132	Cáncer de mama	Suprime la angiogénesis tumoral y reduce la carga tumoral en un modelo de ratón de cáncer de mama (Anand et al., 2010).
	Infección ocular por herpes simple	Es upregulado tras la infección ocular por herpes virus simple. Su inhibición, mediante antagomir-132 administrado a ratones con infección ocular por herpes virus simple, reduce la neoangiogénesis corneal y la queratitis estromal (Mulik et al., 2012).
	IC	Evita la hipertrofia ventricular y la IC en ratones sometidos a sobrecarga de presión (Ucar et al., 2012).
	Status epiléptico	Induce neuroprotección reduciendo la muerte neuronal secundaria a status epiléptico en ratones (Jimenez-Mateos et al., 2011).
Antagomir-148	Osteoporosis	Inhibe la reabsorción ósea e incrementa la masa ósea en ratones ovariectomizados (Cheng et al., 2013).
Antagomir-155	Carcinoma escamoso oral	Reduce la viabilidad celular, incrementa la apoptosis lo que lleva a una marcada regresión del tumor en ratones (Rather et al., 2013).
	Glioma y tumores del sistema nervioso central	Suprime el miR-155, un miR con funciones oncogénicas que promueve el crecimiento de células malignas y su resistencia a la quimioterapia (Poltronieri et al., 2013).
Antagomir-181	Isquemia cerebral	Reduce el daño cerebral inducido por la isquemia y protege el cerebro de accidentes vasculares cerebrales (Ouyang et al., 2012).
Antagomir-199b	IC	Inhibe, e incluso revierte, la hipertrofia y fibrosis en un modelo de ratón de IC (da Costa Martins et al., 2010).
Antagomir-203	Heridas cutáneas	Favorece la reepitelización y la cicatrización tras una herida cutánea (Viticchiè et al., 2012).
Antagomir-206	Alzheimer	Mejora la función de memoria en un modelo de alzheimer en ratones (Lee et al., 2012).
Antagomir-214	Osteoporosis	Induce la actividad de los osteoblastos induciendo la formación de hueso y la mineralización de la matriz (Wang et al., 2013).
Antagomir-215	Nefropatía diabética	Inhibe significativamente la transición fenotípica a células mesangiales inducida por TGF-beta1 lo que es crucial para evitar la progresión de la nefropatía diabética (Mu et al., 2013).

Antagomir-221 y 222	Melanoma	Evitan la progresión del melanoma humano (Felicetti et al., 2008).
	Cáncer de próstata	Impiden el crecimiento tumoral en un modelo de ratón de cáncer de próstata (Mercatelli et al., 2008).
Antagomir-296	Gliomas	Reducción de la angiogénesis tumoral (Würdinger et al., 2008).
Antagomir-320	Diabetes mellitus	Tratamiento de la vasculopatía diabética (Wang et al., 2009).
Antagomir-328	Fibrilación auricular	Reduce la vulnerabilidad a presentar fibrilación auricular (Lu et al., 2010).
Antagomir-342-5p	Arteriosclerosis	Reduce la progresión de la arteriosclerosis en la aorta en ratones Apoe(-/-) (Wei et al., 2013).
Antagomir-350	Hipertrofia miocárdica	Reduce el tamaño de los cardiomiocitos y la apoptosis en ratas (Ge et al., 2013).
Antagomir-365	Carcinoma escamoso cutáneo	Inhibe la formación tumoral in vivo, induciendo apoptosis de las células cancerosas y deteniendo su ciclo celular en la fase G1 (Zhou et al., 2013).
Antagomir-503	Vasculopatía periférica en pacientes diabéticos	Mejora la capacidad funcional de las células endoteliales (Caporali et al., 2011).

Un estudio experimental previo demostró que la administración de antagomir-92a, diseñado específicamente para silenciar el miR-92a, en inyecciones repetidas por vía intravenosa en un modelo murino de IAM, induce crecimiento de nuevos vasos y mejora y la recuperación contráctil postIAM (**Fig.12 y 13**) (Bonauer et al., 2009).

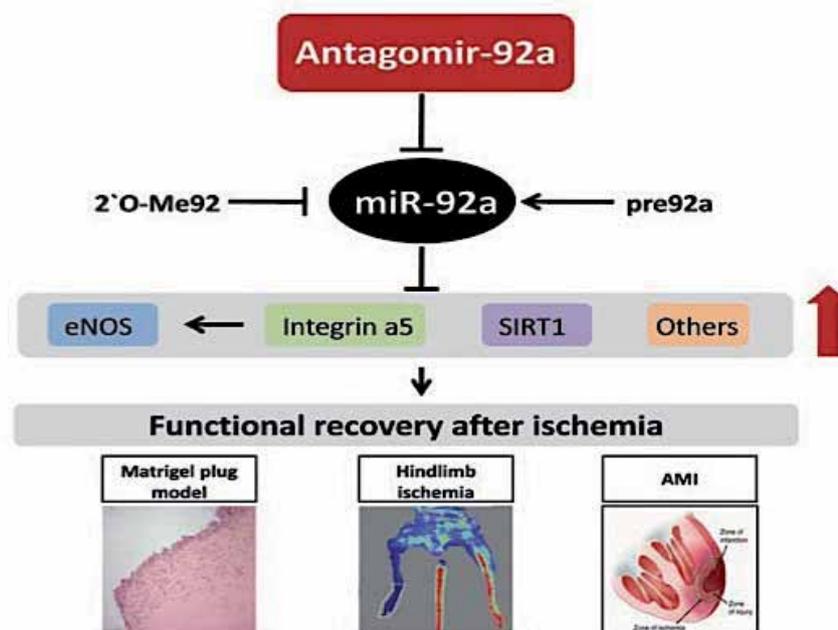


Figura 12 Efectos biológicos del antagomir-92a. La inhibición del miR-92a en células endoteliales humanas con su antagomir-92a específico llevó a la formación de nuevos vasos in vitro. In vivo, la administración intravenosa de dicho antagomir-92a aumentó la invasión celular y el número de vasos en un soporte de Matrigel implantado en ratones. Para caracterizar mejor el rol del miR-92a in vivo se utilizaron un modelo murino de isquemia periférica y de IAM. En ambos casos se observó una reducción de la necrosis debida a una mayor neovascularización con una mayor recuperación funcional. (Extraído y modificado de Bonauer and Dimmeler, 2009).

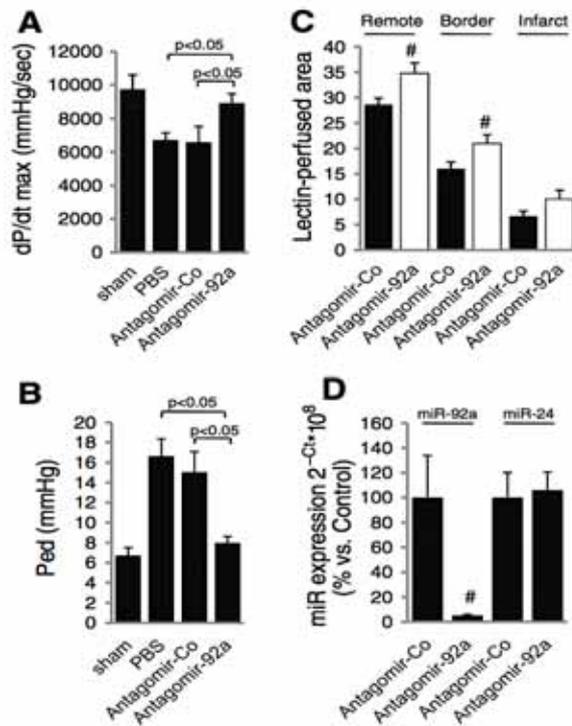


Figura 13 La inhibición del miR-92a mejora la recuperación tras un IAM en ratones. (A y B) n=8 ratones recibieron inyecciones intravenosas de 8 mg/Kg de antagomir-92a los días 0,2,4,7 y 9 tras la inducción del IAM. n=6 recibieron un antagomir control (antagomir-Co) y n=7 tampón fosfato salino (PBS). A los 14 días postIAM se realizó un cateterismo cardíaco y se midió el valor máximo de la integral de presión/tiempo (dp/dT max) y la presión telediastólica (Ped). n=5 ratones fueron controles sham. (U de Mann-Whitney). (C) Se cuantificó automáticamente la densidad capilar mediante la infusión de lectina conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) en la cicatriz, en los bordes del infarto y en zonas remotas (píxeles lectina-positivos x 10⁴). Se cuantificaron n=6 campos por región por grupo. # p< 0.05 versus antagomir-Co (T-test). (D) se midió la expresión de miR-92a en corazones a los 6 días después del tratamiento con antagomir-92a (n=8) y se comparó con aquellos tratados con antagomir-Co (n=3). La expresión de miR-24 fue evaluada como control. # P< 0.05 versus antagomir-Co (U de Mann-Whitney). (Extraído y modificado de Bonauer et al., 2009).

Sin embargo, el cluster 17-92a donde se encuentra el miR-92a es ubicuo y se ha relacionado con la aparición y progresión de algunos tumores, lo que genera preocupación y dudas sobre la seguridad de la vía intravenosa (Hong, 2010). Además, los microRNAs tienen baja organoespecificidad por lo que la penetración de antagomires no selectiva, en células normales a distancia, puede generar efectos adversos no deseados. Por otro lado, diferencias farmacocinéticas como el volumen de distribución entre los animales pequeños y el humano implican administrar mayores dosis para alcanzar concentraciones funcionalmente adecuadas, así como inyecciones repetidas para obtener un efecto molecular sostenido (Munroe and Zhu, 2006).

Consecuentemente, sería deseable que los antagomires pudieran actuar únicamente en el tejido diana. Por tanto, aunque estos descubrimientos son de vital importancia, la translación a situaciones clínicas de una terapia que implica modificar la expresión del material genético humano pasa necesariamente por el desarrollo de un sistema de liberación local, eficiente y seguro que evite su biodistribución sistémica. El conseguir liberar el antagomir exclusiva y sostenidamente en las células enfermas es todavía una misión pendiente.

SISTEMAS Y VÍAS DE LIBERACIÓN DE ANTAGOMIRES

Para solventar los obstáculos mencionados, la tecnología farmacéutica ha centrado su interés en desarrollar vehículos que permitan una liberación selectiva en el tejido diana, de una forma altamente específica y con una actividad controlada en el lugar de aplicación. Existen diversos tipos de vehículos para administrar moléculas con actividad biológica de una forma controlada, agrupándose principalmente en vectores no virales y virales.

Los vectores no virales se dividen, a su vez, en sistemas no lipídicos, como las partículas poliméricas, y en sistemas lipídicos, entre los que se encuentran las emulsiones, micelas, arqueosomas y liposomas, siendo éstos últimos los más ampliamente utilizados (Allen and Cullis, 2013).

Las partículas poliméricas pueden ser, según su tamaño, micro o nanopartículas (Marty et al., 1978). Las micropartículas son partículas poliméricas esféricas con tamaños que oscilan entre 1 y 250 μm . Dentro de este grupo se incluyen las microcápsulas, que son sistemas vesiculares en los que el fármaco está confinado en una cavidad rodeada de una única membrana polimérica (Ogawa, 1997); y las microesferas, que son sistemas matrices en los que el fármaco está disperso en la partícula, sin una distinción entre cubierta y núcleo (Freiberg and Zhu, 2004). Las nanopartículas son sistemas poliméricos submicrónicos ($< 1 \mu\text{m}$) y también pueden ser nanocápsulas o nanoesferas, con las mismas características descritas (Lu et al., 2011; Mishra et al., 2013) (**Fig.14**).

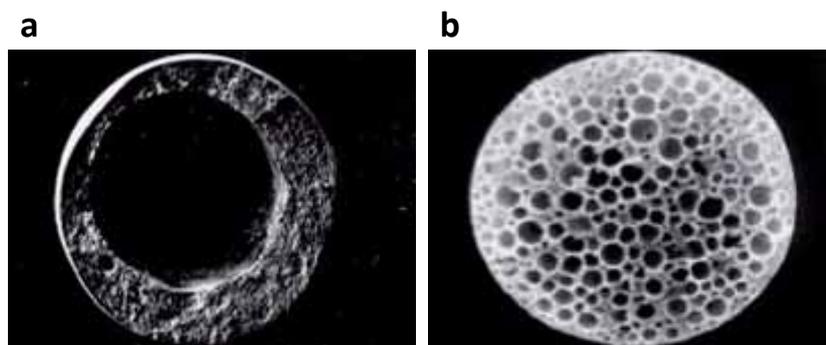


Figura 14 Partículas poliméricas. (a) Microcápsula. (b) Microesfera. La única diferencia entre micro y nanopartículas es el tamaño, manteniendo nanocápsulas y nanoesferas la misma estructura mostrada. (Extraído y modificado de la página web www.monografias.com/trabajos94/inyectables-liberacion-controlada/inyectables-liberacion-controlada2.shtml).

Los procesos para obtener micro y nanopartículas son diversos y entre ellos se encuentran la evaporación del disolvente, separación de fases, polimerización interfacial, polimerización en emulsión y secado por spray (Sato et al., 1988). Para su fabricación se han utilizado materiales biocompatibles, naturales o sintéticos, con un gran espectro de velocidades de cesión y propiedades degradativas (Park et al., 2005; Nair and Laurencin, 2006). Los polímeros naturales ofrecen ventajas como su bajo coste, su biocompatibilidad y su buena solubilidad en medios acuosos. Sin embargo, su baja reproducibilidad con respecto a la relación de monómero y peso molecular impide predecir las cinéticas de degradación de los polímeros (Muzykantov, 2013). Ello ha sido solventado por los polímeros sintéticos, como el PLGA o el poli ϵ -caprolactona, que a parte de su biocompatibilidad y su biodegradación en componentes no tóxicos, tanto química como físicamente, presentan elevada reproducibilidad y alto grado de control de sus propiedades fisicoquímicas (Singh and O'Hagan, 1998; Muzykantov, 2013). La liberación del fármaco tiene lugar a través de varias rutas entre las que se encuentran la erosión de la superficie de la partícula, difusión, su desintegración y degradación. Fruto de estos mecanismos, las partículas se transforman en productos de degradación biocompatibles que se transforman en CO_2 y H_2O por las vías metabólicas usuales. Variables fisicoquímicas de las partículas, como su tamaño y masa molecular, tipo y cantidad de polímero, porosidad de la matriz, así como del fármaco encapsulado, determinarán el perfil y velocidad de liberación.

Los liposomas y nanoliposomas fueron descritos por primera vez por Bangham en 1961 (Bangham, 1961; Bangham, 1972). Son vesículas esféricas con una membrana compuesta de una o más bicapas lipídicas y un núcleo de solución acuosa (Johnson and Bangham, 1971). Su tamaño puede oscilar entre pocos nanómetros y varias decenas de μm (Puri et al., 2009). Para su elaboración se utilizan fosfolípidos, de origen natural o sintético, con o sin colesterol, que se recubren con polímeros biodegradables, con segmentos hidrofílicos e hidrofóbicos, que los protegen del reconocimiento y destrucción por el sistema inmune. Diversos tipos de polímeros han sido utilizados para recubrir liposomas, y de ellos, y de los propios fosfolípidos, depende el tamaño, rigidez de la membrana, permeabilidad, estabilidad y grado de agregación de dichas vesículas (Diakowski et al., 2006). La técnica para producir liposomas incluye: hidratación, dispersión en medios no polares, eliminación del detergente, infusión en éter y la evaporación e inversión de fase (Szoka and Papahadjopoulos, 1980; Jones, 1995). Pueden transportar moléculas de formas

diferentes en función de su carácter hidro, liposoluble o anfifílico, unidas a su membrana, intercaladas o disueltas en la bicapa, encapsuladas en su interior (**Fig.15**).

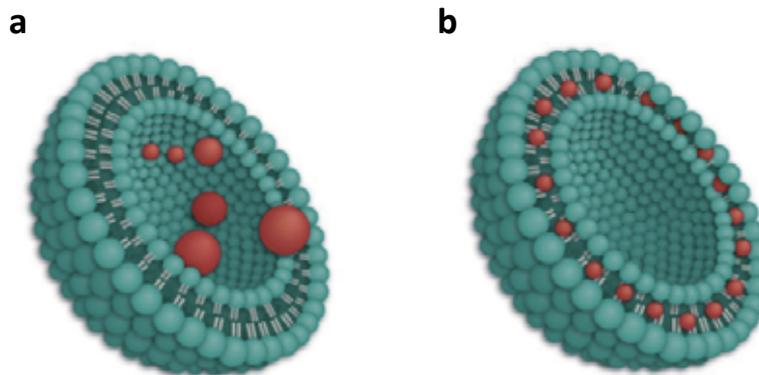


Figura 15 Liposomas. Los liposomas son esferas huecas donde la pared que separa el medio interno es una bicapa lipídica. Al estar compuestos tanto por una fracción lipídica como por una fracción acuosa, los liposomas pueden alojar sustancias hidrofílicas (**a**) y/o lipofílicas (**b**). (Extraído y modificado de la página web www.lipomize.com/es/liposomas-que-son).

Existen diversos métodos para cargar el fármaco en liposomas. Uno de ellos consiste en añadir el fármaco y el copolímero en un disolvente miscible con el agua y dializar la disolución con agua. Otro consiste en introducir el fármaco en el polímero por un método de emulsión aceite en agua, siendo éste el más eficiente. Los liposomas liberan el fármaco principalmente por difusión o por endocitosis. Algunas de las ventajas de determinadas formulaciones de este vehículo son su elevada solubilidad en agua y estabilidad, pudiendo permanecer intactas durante un periodo muy prolongado en sangre, después de una única inyección (Papahadjopoulos et al., 1991). Además, su núcleo hidrófobo permite proteger al fármaco de su desactivación por parte de enzimas u otras especies bioactivas del medio acuoso, así como también reducir su velocidad de liberación (Hood et al., 2011). Ello las hace útiles para el tratamiento de tumores sólidos donde pueden conservar su estructura y acumularse. Sin embargo, el incremento en estabilidad se acompaña de un aumento de la rigidez y una disminución de la permeabilidad lo que puede dificultar la llegada a los tejidos diana (Decker et al., 2012).

Aunque inicialmente estos vehículos no virales se aplicaron a un grupo restringido de moléculas, el desarrollo de nuevos derivados poliméricos y nuevas metodologías para su elaboración ha extendido su aplicación a una gran diversidad de principios activos, entre ellos los compuestos de ácidos nucleicos (Fenske and Cullis,

2005; Shim and Kwon, 2010; Gupta et al., 2012). El uso de nanopartículas poliméricas para administrar un antagomir ha permitido que el antagomir alcance unos niveles elevados y duraderos en el tejido diana, potenciando su efecto tras su inyección intravenosa, pero no evitan el paso al sistema circulatorio (Liu et al., 2013). Los liposomas han sido utilizados para transferir DNA (Fenske and Cullis, 2008) pero su gran tamaño y su escasa habilidad de alcanzar los tejidos diana no han permitido extender su aplicación (Pedroso de Lima et al., 2001). Las microesferas no han sido aplicadas a la terapia con antagomires.

Por otro lado, la falta de especificidad está siendo corregida por la incorporación de epítopos o pequeños polipéptidos en el revestimiento de las partículas, que permitan fusionarse sólo con las células diana que presenten receptores para estos polipéptidos (Voinea and Simionescu, 2002). Avances biotecnológicos han permitido desarrollar nuevas técnicas basadas en transportadores lipídicos y nanopartículas acoplados a péptidos diseñados específicamente para ser reconocidos por receptores tumorales, resultando útiles para aumentar el grado de internalización del antagomir dentro de las células malignas (Chang et al., 2008; Anand et al., 2010; Sawant and Torchilin, 2012). Con ello, se ha logrado minimizar los efectos adversos no deseados sobre células normales o tejidos no deseados, pero con ninguno de los transportadores mencionados se evita la biodistribución sistémica y la potencial acción a distancia.

Los virus constituyen también excelentes “transportadores” de información genética, permitiendo reemplazar genes anómalos por genes correctos (Walther and Stein, 2000). Dentro de los transportadores virales, adenovirus, lentivirus o retrovirus, han sido utilizados para transferir antagomires en el ámbito oncológico y cardiovascular, demostrando gran eficacia (Scherr et al., 2007; Yang et al., 2010). Sin embargo, aunque su afinidad por tejidos específicos, como el miocardio, puede ser alta, es incompleta, lo que obliga a utilizar dosis significativamente más elevadas y no impide su potencial acción a distancia. Además, aunque se trata de virus modificados no patógenos diseñados exclusivamente para entregar genes terapéuticos, los riesgos inherentes a un agente infeccioso siempre subyacen a este tipo de vehículo. Éstos pueden activarse y multiplicarse dentro de las células. Por otra parte, la potencial recombinación viral y la inmunogenicidad inducida por los antígenos virales son otros de los riesgos potenciales.

Por tanto, el sistema de liberación ideal para administrar antagomires no ha sido desarrollado.

Respecto a la vía de administración, la intravenosa ha sido la más extensamente utilizada en los trabajos realizados. En terapias para el sistema nervioso central, la punción directa del tercer ventrículo para liberar antagomir-206 y prevenir la neurodegeneración es un método invasivo que se ha utilizado en roedores pero es difícilmente trasladable a la clínica (Lee et al., 2012). Su alternativa, la vía intranasal, ya utilizada con otros fármacos para tratar el Alzheimer, logra una difusión rápida hacia el cerebro, a través del nervio olfatorio, pero no evita la biodistribución sistémica (Lee et al., 2012). En patologías oculares, las vías subconjuntival e intraocular han sido utilizadas para administrar nanopartículas conteniendo antagomir-132, útil para el tratamiento de la infección ocular por herpes virus simple (Mulik et al., 2012). En el ámbito cardiovascular, la vía intramiocárdica se ha utilizado con éxito para aplicar la terapia con antagomires en experimentación animal (Iekushi et al., 2012). Sin embargo, esta vía requiere minitoracotomías o técnicas endovasculares complejas y costosas, asumibles en modelos experimentales controlados, pero difícilmente trasladables a situaciones clínicas. Hasta el momento, no se ha demostrado la eficacia y seguridad de la vía percutánea intracoronaria para aplicar la terapia con antagomires. Revisando literatura de la terapia de transferencia génica, a finales de los años 90, observamos como las vías intracoronaria, intracavitaria e intraaórtica fueron utilizadas en el ámbito experimental (Agah et al., 1997; Christensen et al., 2000). Experiencias previas con la vía intraaórtica para administrar adenovirus portadores del gen LacZ, a través de un catéter posicionado justo en el plano valvular, observaron que a pesar de clampar la aorta y la pulmonar, se produjo expresión génica en el hígado por perfusión hepática retrógrada, secundaria al incremento de la presión venosa durante el clamplaje (Iwatate et al., 2003). La vía intracoronaria, utilizada para administrar adenovirus en un modelo de conejo, detectó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ácido desoxirribonucleico (DNA) de los adenovirus en el hígado, riñones, pulmón, cerebro y testes hasta cinco días después de la infusión intracoronaria (Barr et al., 1994).

Por tanto, ninguna buena combinación de vía y sistema de liberación ha eludido los potenciales inconvenientes asociados a la administración sistémica de antagomires.

ANTAGOMIR-92a Y REMODELADO ADVERSO POSTIAM

Considerando que dos de los más importantes predictores de remodelado adverso son el tamaño del infarto y la disfunción de la microcirculación, parece plausible que la terapia con antagomir-92a sea potencialmente útil en este fenómeno. Por un lado, su capacidad para reducir el tamaño del infarto, y por otro, la repoblación vascular a nivel de la cicatriz, han sido demostradas *in vivo* e *in vitro*. Sin embargo, hasta el momento la capacidad del antagomir-92a para prevenir el desarrollo de remodelado adverso postIAM no ha sido investigada. Tampoco otros antagomires han sido explorados en este contexto. La implicación de determinados miRs en el remodelado ventricular de otras causas, como el dependiente de estrés por sobrecarga, junto a experiencias positivas previas cuando éstos son modulados, como la inhibición del miR-21 (Patrick et al., 2010) o del miR-22 (Huang ZP et al., 2013), dan aliento para esperar resultados favorables de la terapia con antagomir-92a aplicada al remodelado de origen isquémico. Su control global sobre múltiples dianas parece solventar los obstáculos encontrados hasta el momento con otras terapias antiremodelado.

No obstante, la translación de esta nueva terapia a situaciones clínicas hace necesario que su administración pueda ser fácil y segura. La encapsulación de antagomir-92a en ME diseñadas específicamente para quedar retenidas en el tejido miocárdico, tras su administración intracoronaria, podría cumplir las premisas mencionadas. Además, la difusión sostenida del antagomir-92a a medida que se degrada el polímero hasta su desaparición completa y la capacidad de adaptar sus características a las necesidades temporales de liberación, las hace atractivas para una terapia que implica modular el material genético. Este sistema de liberación para antagomires no ha sido investigado hasta el momento.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El objetivo general del estudio fue investigar si en un modelo porcino de IAM reperfundido la administración intracoronaria de antagomir-92a encapsulado induce la formación de nuevos vasos en la cicatriz, y si ello previene la aparición de remodelado ventricular adverso un mes después del IAM.

Hipótesis:

En un modelo porcino adulto de IAM la administración de antagomir-92a encapsulado por vía intracoronaria en la arteria responsable del infarto induce neovascularización, lo que conduce a una mejor cicatrización del tejido dañado y previene la aparición de remodelado adverso al mes postIAM.

Objetivos principales:

Valorar el efecto de la administración intracoronaria y postreperusión de antagomir-92a encapsulado sobre:

- La densidad vascular en el área infartada.
- La discinesia septoapical en la ecocardiografía intravascular (EIV).
- Los parámetros de remodelado: índice de deformidad ventricular y adelgazamiento miocárdico del área infartada medido en la resonancia magnética cardíaca (RMN).

Objetivos secundarios:

- Analizar si el tratamiento con antagomir-92a reduce las resistencias microvasculares.
- Analizar si el tratamiento con antagomir-92a se asocia a eventos arrítmicos durante la administración del tratamiento o en el mes de seguimiento.
- Determinar si el tratamiento aplicado se asocia a la aparición de tumores vasculares o neoformaciones mediante necropsia.
- Analizar la contractilidad del ventrículo izquierdo mediante cuantificación de la FE del VI.

Para alcanzar el objetivo principal del estudio, la investigación se dividió en 5 fases, cada una de ellas con una tarea experimental concreta:

FASE 1.- Puesta a punto del modelo porcino de IAM percutáneo reperfundido.

- En esta fase se definió la metodología para inducir, de forma percutánea, un IAM reperfundido que reproduzca, con la máxima aproximación posible, el escenario clínico.

FASE 2.- Desarrollo *in vitro* del sistema de liberación del antagomir-92a: microesferas.

- La tarea de esta fase fue definir, *in vitro*, las características y propiedades del vehículo que será utilizado para liberar antagomir-92a localmente, a nivel de la región del IAM.

FASE 3.- Estudio *in vivo* de la eficacia y seguridad de las microesferas

- Una vez diseñadas y fabricadas las microesferas *in vitro*, estudiamos si dichas micropartículas cumplen, *in vivo*, las premisas requeridas: poder ser administradas por vía intracoronaria y quedar retenidas en el corazón, sin producir toxicidad miocárdica.

FASE 4.- Estudio del efecto molecular del antagomir-92a encapsulado *in vivo*

- La tarea de esta fase fue investigar si una administración intracoronaria aislada de antagomir-92a encapsulado en microesferas, retenidas en la región del IAM, inhibe el miR-92a de una forma selectiva y sostenida.

FASE 5.- Estudio del efecto biológico del antagomir-92a encapsulado sobre el remodelado ventricular adverso.

- En esta fase comprobamos si la inhibición sostenida del miR-92a induce crecimiento de nuevos vasos a nivel de la cicatriz conduciendo a una reparación postIAM favorable y previniendo el desarrollo de remodelado adverso postIAM.

FASES DEL ESTUDIO

FASES DEL ESTUDIO

FASE 1.- PUESTA A PUNTO DEL MODELO PORCINO DE IAM PERCUTÁNEO REPERFUNDIDO.

FASE 2.- DESARROLLO *IN VITRO* DEL SISTEMA DE LIBERACIÓN DEL ANTAGOMIR-92a: MICROESFERAS.

FASE 3.- ESTUDIO *IN VIVO* DE LA EFICACIA Y SEGURIDAD DE LAS MICROESFERAS.

FASE 4.- ESTUDIO DEL EFECTO MOLECULAR DEL ANTAGOMIR-92a ENCAPSULADO *IN VIVO*.

FASE 5.- ESTUDIO DEL EFECTO BIOLÓGICO DEL ANTAGOMIR-92a ENCAPSULADO SOBRE EL REMODELADO VENTRICULAR ADVERSO.

f1

**FASE 1.- PUESTA A PUNTO DEL MODELO PORCINO DE
IAM PERCUTÁNEO REPERFUNDIDO.**

FASE 1. A.- TAREA EXPERIMENTAL DE LA FASE 1

Puesta a punto de un modelo porcino de IAM reperfundido inducido percutáneamente.

FASE 1. B.- MATERIAL

f1B.1. Animales

- *Adquirimos 3 cerdos (100518, 100519, 100608) Large-White de 3-4 meses de edad, hembras y de 30-35 Kg de peso de la granja Aulinas de la Garrotxa, Cataluña. Los animales pasaron un periodo de 7 días de cuarentena en el estabulario del Institut de Recerca hasta el inicio de los experimentos. Se realizaron los controles sanitarios habituales y fueron alimentados con el pienso común (Porcs Engreix Murri, Pienso Viñas de Llagostera, S.L.).*

f1B.2. Instrumentos y aparatos

f1B.2.1. Anestesia, intubación y monitorización

- *Aguja intramuscular 21 gauges (G) BD Microlance™ 3 (Becton Dickinson S.A., Fraga, España).*
- *Abboath 20G Venisystems (Abbott, Sligo, Ireland).*
- *Jeringas 5, 10 y 20 ml BD Plastipak™ (Drogheda, Irlanda).*
- *Alargaderas macho-macho y macho-hembra (Sendal, Cáceres, España).*
- *Bombas de perfusión Lifecare® Micro Macro (Abbott vascular, Santa Clara, USA).*
- *Laringoscopio Truphatek® (Netanya, Israel).*
- *Tubo endotraqueal de 7.5 mm (Mallinckrodt pharmaceuticals, St.Louis, Missouri).*
- *Respirador Bennett 7200 Series (Mallinckrodt pharmaceuticals, St.Louis, Missouri).*
- *Electrodos Ambu Blue Sensor VL (Ambu, Denmark).*
- *AP-Transducer Coupler Type A (Strain Gage bridge) S72-25 (Coulbourn instruments, Whitehall, Pennsylvania).*
- *Carrier amplifier AP-601G.*
- *Powerlab/16 sp (ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Australia).*

f1B.2.2. Inducción percutánea de un IAM reperfundido

- *Abboath 24G Venisystems (Abbott, Sligo, Ireland).*

- *Radifocus Introducer II: introductor 7 French (F) 10cm, mini guide wire 0.035” de 45 cm recta (Terumo® corporation, Tokyo, Japan).*
- *Percutaneous sheath introducer set: introductor 5F 7.5 cm, spring-wire guide 0.021” de 45 cm curva Arrow® (Teleflex medial iberia S.A., Madrid, España).*
- *Starter guidewire, “J” curved fixed core 0.035”/0.89mm de 150 cm (Boston Scientific International S.A., Nanterre Cedex, France).*
- *Catéter guía de arteria mamaria interna (AMI) 6F (Medtronic, Inc. Minneapolis, USA).*
- *Basix Compak™: indeflator, válvula hemostática MBA y torque (Meritmedical Galway, Ireland).*
- *Guía Balance Middleweight Universal II (BMW) 0.014” (Abbott vascular, Santa Clara, USA).*
- *Balón coaxial Sprinter® de 2.5/12 mm (Medtronic, Medtronic Ireland, Galway, Ireland).*
- *Kit manifold: sistema de inyección de contraste (Meritmedical, Galway, Ireland).*
- *Arco de rayos X (Rx) en C Arco si (IRE Rayos X, S.A. Madrid, España).*
- *Desfibrilador CodemasterI (Hewlett Packard, Palo Alto, California).*

f1B.2.3. Disección femoral, toracotomía y pericardiectomía

- *Bisturí carbon steel 24 (Swann-Morton Penn works sheffield S6 2BJ, England).*
- *Electrobisturí Kls Martin ME 102 (KLS Martin Group, Alemania).*
- *Sierra eléctrica.*
- *Separador esternal.*
- *Tijeras, mosquitos, suturas de seda 2/0.*

f1B.2.4. Cálculo del área en riesgo (AR) y del área de necrosis (AI)

- *Báscula Precisa 180A (Precisa Gravimetrics AG, Suiza).*
- *Stainless steel surgical skin graft knife blade (Swann-Morton®, Penn works sheffield S6 2BJ, England).*
- *Cámara fotográfica Olympus Digital Camara C-1400L.*
- *Software Image Pro Plus 4.5.0.29 (Media Cybernetics, Estados Unidos).*

f1B.3. Fármacos

f1B.3.1. Sedación e inducción anestésica

- *Tiletamina-zolazepam 4 mg/Kg (Zoletil® 100, Virbac).*
- *Xilacina 2 mg/Kg (Xilagesic® 20%, Laboratorios Calier).*
- *Fentanilo 0.15 mg/3ml (Fentanest®, Kern Pharma) (5 µg/Kg bolus + infusión a 3-6 µg/Kg/h).*

- Propofol 10 mg/ml (Propofol Lipuro 1%[®], BBraun) (1.5-2.5 mg/Kg bolus + infusión a 11 mg/Kg/h).

f1B.3.2. Inducción percutánea de un IAM reperfundido

- Povidona yodada (Betadine[®], MEDA, Spain).
- Heparina sódica (Heparina[®] sódica Chiesi 1000 UI/ml, Chiesi España S.A.).
- Acetilsalicilato de lisina (Inyesprín[®] 0.9 g, Grünenthal Pharma S.A.).
- Contraste iomerol 370, 0.755 g/ml (Iopamiro[®], Bracco).
- Suero fisiológico 0,9% 500 ml (Grifols International S.A.).
- Suero glucosado 5% 500 ml (Grifols International S.A.).

f1B.3.3. Cálculo del AR y del AI

- Fluoresceína sódica 10%, 500 mg/5 ml (Fluoresceína Oculos[®], Laboratorios Théa S.A.).
- 2,3,5-Cloruro de trifeniltetrazolio 1% (Sigma Life Science, Germany).
- Suero fisiológico frío 4°C (Solución salina 0,9%, Fresenius Kabi España S.A.).

f1B.3.4. Sacrificio

- Tiopental sódico (Tiobarbital Braun 1g, Braun Medical S.A., Barcelona).

FASE 1. C.- MÉTODOS

Todos los experimentos del estudio se llevaron a cabo siguiendo los protocolos aprobados por el Comité de Cuidado animal del Institut de Recerca (N. Registro: 19/10 CEEA- Departament de Medi Ambient i Habitatge: B9900062) y según las guías para el cuidado y uso de animales de laboratorio publicados en la Directiva 2010/63/EU del Parlamento Europeo y por el Consejo de la protección de animales usados para propósitos científicos del 22 de Septiembre del 2010.

f1C.1. Inducción percutánea de un IAM reperfundido

Tras sedación intramuscular con tiletamina-zolazepam y xilacina, y anestesia intravenosa con bolus de propofol-lipuro y fentanest administrados a través de una vena auricular, los animales fueron intubados y monitorizados. Se registraron todos los parámetros hemodinámicos basales y temperatura. La inducción del infarto se llevó a cabo de forma percutánea según la técnica de Seldinger, a través de un acceso femoral arterial obtenido por disección inguinal por planos. Tras exponer los vasos femorales, la arteria fue canulada con un abbocath 24G, a través del cual avanzamos una guía de 0.021" y posicionamos un introductor 7F y siguiendo la misma metodología uno 5F en la vena femoral. Las perfusiones de propofol y fentanilo y un

suero glucosado de mantenimiento se infundieron a través de dicho introductor venoso. Administramos 150UI/Kg de heparina y 450 mg de acetilsalicilato de lisina por vía intravenosa, antes de iniciar el procedimiento. Bajo control radiológico avanzamos un catéter guía AMI 6F sobre una guía de teflón 0.035" desde la arteria femoral hasta el tronco común, canulándolo selectivamente. Obtuvimos un registro del árbol coronario en la proyección anteroposterior (0°0°) utilizando contraste iomerol. Tomando dicha proyección como referencia, avanzamos una guía BMW 0.014" hasta la parte más distal de la arteria descendente anterior (LAD). Sobre dicha guía posicionamos un balón coaxial de 2,5/12 mm en el segmento medio de la LAD, justo tras la emergencia de la primera diagonal. En aquellos casos en que la primera diagonal era muy precoz situamos el balón justo en la mitad del recorrido de la LAD. El balón se infló hasta confirmar angiográficamente la oclusión de la arteria, que se logró generalmente a bajas atmósferas (4-6 atm).

Cada uno de los 3 animales de esta fase fue sometido a un tiempo diferente de isquemia: 49, 60 y 90 minutos (min). Se corroboró la presencia de un ascenso del segmento ST sostenido durante la oclusión coronaria, mediante monitorización continua. Tras completar la fase de isquemia, se reperfundió la arteria desinflando el balón (**Fig.16**).

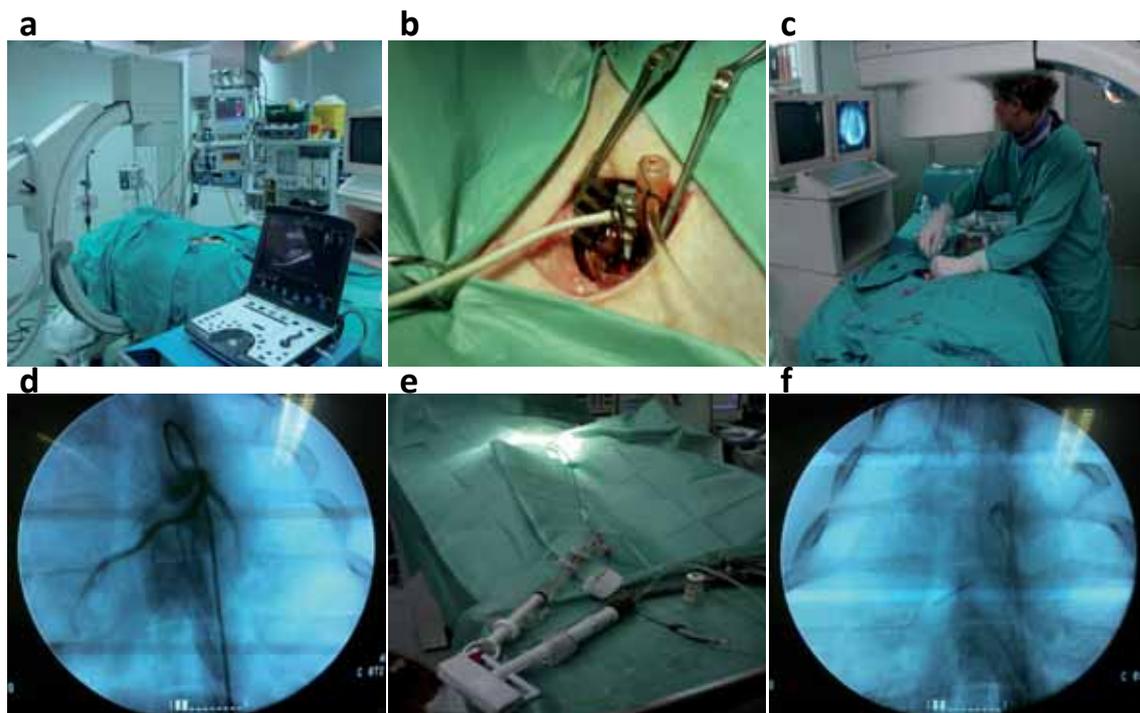


Figura 16 Inducción percutánea de un IAM reperfundido. (a) Quirófano experimental donde se llevaron a cabo los procedimientos bajo condiciones de asepsia. (b) Introdutores 5 y 7F en vena y arteria femorales respectivamente tras disección inguinal por planos. (c) Realización de la coronariografía guiada por Rx. (d) Angiografía del sistema izquierdo. Proyección 0° 0°. (e) Catéter guía AMI 6F conectado al sistema de inyección de contraste y al indeflator. (f) Balón coaxial 2.5/12mm inflado en la LAD media, justo tras la emergencia de la primera diagonal.

f1C.2. Cálculo del área en riesgo y del área de necrosis

Una vez completada la inducción del infarto y reperfundida la LAD, se efectuó la toracotomía media y pericardiectomía en los 3 animales para obtener el corazón. Justo antes del sacrificio administramos, por vía intravenosa, 10 ml de fluoresceína sódica a la vez que se reocluyó el balón coaxial para evitar la llegada de fluoresceína al territorio irrigado por la LAD y así poder calcular el AR. Tras el sacrificio, el corazón fue seccionado, enfriado con suero frío a 4°C y cortado en lonchas de 5-7 mm sagitales y paralelas al surco auriculoventricular, desde el ápex hasta la base del corazón. Cada una de estas lonchas fue pesada en la báscula y sumando dichos pesos calculamos la masa ventricular total. A continuación, cada loncha fue fotografiada bajo luz ultravioleta lo que permitió delimitar el AR, que se diferencia claramente de los territorios dependientes del flujo de otras coronarias. Dichas lonchas se incubaron a 37°C, durante 10 min, en 2,3,5-cloruro de trifeniltetrazolio y de nuevo fotografiadas bajo luz blanca junto a una escala de referencia (control del grado de magnificación 1:1 de la cámara) para definir el AI (**Fig.17**).

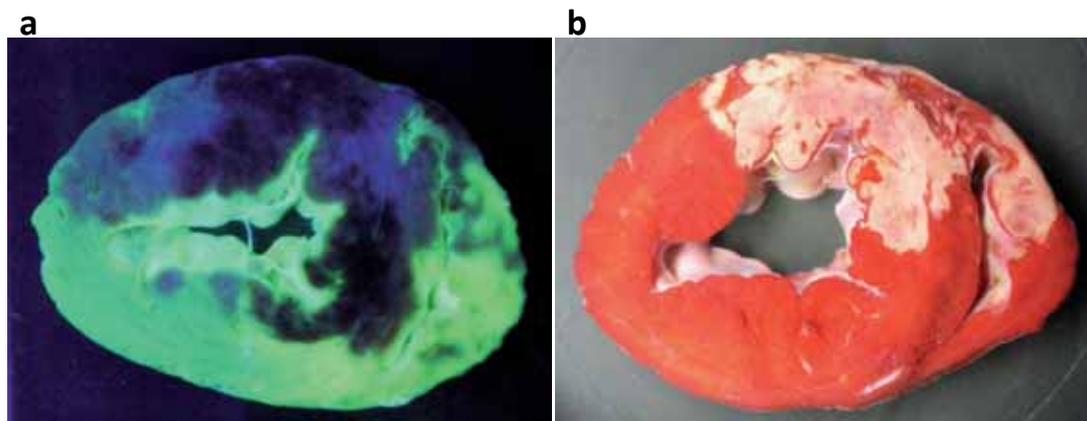


Figura 17 Visualización del área en riesgo y del área de necrosis. (a) Imagen representativa de una loncha (L2) del cerdo 100608 visualizada con luz ultravioleta. El área en riesgo se visualiza de color lila que se diferencia bien del área miocárdica bien perfundida que aparece de color verde. (b) Imagen representativa de una loncha (L3) del cerdo 100519 visualizada con luz blanca. El área de necrosis corresponde a la zona de color blanco mientras que el área miocárdica viva aparece de color rojo.

Tanto las imágenes del AR como del AI de cada loncha fueron digitalizadas y cuantificadas utilizando el programa Image Pro Plus. La masa total de miocardio necrótico y de miocardio en riesgo fueron calculadas a partir de las medidas individuales de cada loncha y expresadas respecto al porcentaje total de la masa ventricular (García-Dorado et al., 1992; García-Dorado et al., 1997).

FASE 1. D.- RESULTADOS

f1D.1. Puesta a punto del modelo porcino de IAM percutáneo y reperfundido

La primera fase del estudio, que iniciamos en Mayo del 2010, constó de 3 experimentos que permitieron poner a punto el modelo porcino de IAM percutáneo y reperfundido. En esta fase determinamos el tiempo de ischemia necesario para obtener un infarto del tamaño deseado. Los 3 tiempos diferentes de oclusión coronaria aplicados, 90, 60 y 49 min, generaron un AI respecto al AR del 63.6, 48.9 y 40% respectivamente (**Fig.18**). Elegimos el tiempo de ischemia de 49 minutos por reproducir la extensión media de los infartos que vemos habitualmente en la práctica clínica.

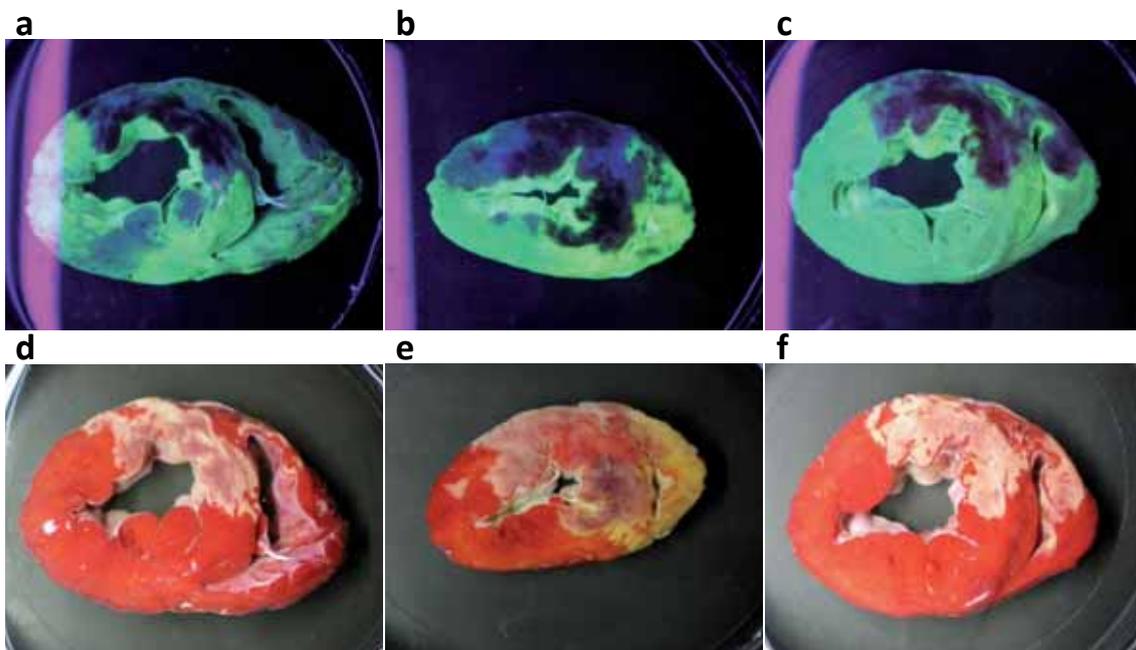


Figura 18 Determinación de la duración de la fase de ischemia. La imagen muestra lonchas de corazón de los 3 animales a partir de los cuales se precisó el tiempo apropiado de ischemia para obtener un IAM del tamaño deseado. (**a y d**) loncha representativa del corazón sometido a 90 min de ischemia observada bajo luz ultravioleta (AR: área lila) y bajo luz blanca (AI: área blanca) respectivamente. La relación AI/AR fue de 63.61% (**b y e**) loncha representativa del animal sometido a 60 min de ischemia mostrando respectivamente el AR y el AI. La relación AI/AR fue de 48.9%. (**c y f**) AR y AI en una loncha representativa del animal sometido a 49 min de ischemia con una relación AI/AR del 40%.

f2

FASE 2.- DESARROLLO *IN VITRO* DEL SISTEMA DE LIBERACIÓN DEL ANTAGOMIR-92a: MICROESFERAS.

FASE 2. A.- TAREA EXPERIMENTAL DE LA FASE 2

Definir, *in vitro*, las características y propiedades de las microesferas como vehículo para liberar antagomir-92a.

FASE 2. B.- MATERIAL

f2B.1. Instrumentos y aparatos

f2B.1.1. Preparación de las microesferas (ME) vacías

- *Dispensor Ultra-Turrax T-25 (IKA®-Werke GmbH and Co. KG, Germany).*
- *Sonificador 250 (Branson® ICT S.L, España).*
- *Magnetic stirrer MR2002 (Heildoph Instruments GmbH and Co. KG, Germany).*
- *Centrífuga Labofuge Ae (Heraeus S.A., España).*
- *Liofilizador Lioalfa-6 (Telstar S.L., Terrassa, España).*
- *Congelador -80°C.*

f2B.2. Reactivos

f2B.2.1. Preparación de las ME vacías

- *Poli-d-l-láctico-coglicólico (PLGA) (Evonik industries, Essen, Germany).*
- *Cloruro de metileno.*
- *Alcohol polivinílico 1%.*
- *Cloruro de sodio 1%.*
- *Agua purificada.*

FASE 2. C.- MÉTODOS

Esta fase fue llevada a cabo en los laboratorios de I+D de Pierre-Fabre, empresa con la que contactamos por estar especializada en el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos. Todos los procedimientos para manufacturar las ME se llevaron a cabo cumpliendo las normas de buenas prácticas de laboratorio.

Era necesario preparar unas ME de un material adecuado para poder ser administradas por vía intracoronaria y con una granulometría apropiada para permitir su distribución y retención en la red microvascular cardíaca. Idealmente, además, deberían liberar el agente terapéutico de una forma controlada, durante 2-3 semanas, periodo en el que ocurre principalmente la reparación miocárdica postIAM.

f2C.1. Preparación de las ME vacías

Las ME fueron preparadas en condiciones asépticas, siguiendo el método de emulsión y evaporación del solvente w/o/w (método de la emulsión múltiple) usando un copolímero de PLGA en una relación 50:50 con grupos terminales carboxilo (Wu, 2004; Li et al., 2008). Por cada 0.2 g de PLGA se añadió 1 ml de cloruro de metileno. A la solución orgánica de PLGA obtenida, se le añadieron 0.3 ml de agua purificada y la mezcla fue emulsificada por sonicación durante 20 segundos (seg).

La emulsión primaria fue añadida a una fase externa, que consistía en una solución acuosa (w/v) de alcohol polivinílico al 1% y de cloruro de sodio al 1%, y todo ello homogeneizado durante 60 seg a 10.300 revoluciones por minuto (rpm).

La emulsión secundaria (w/o/w) obtenida fue añadida a un volumen de agua purificada y se dejó evaporar el cloruro de metileno por agitación. Las microesferas obtenidas se recogieron por centrifugación, fueron lavadas dos veces con agua purificada y a continuación, congeladas en seco (**Fig.19**).

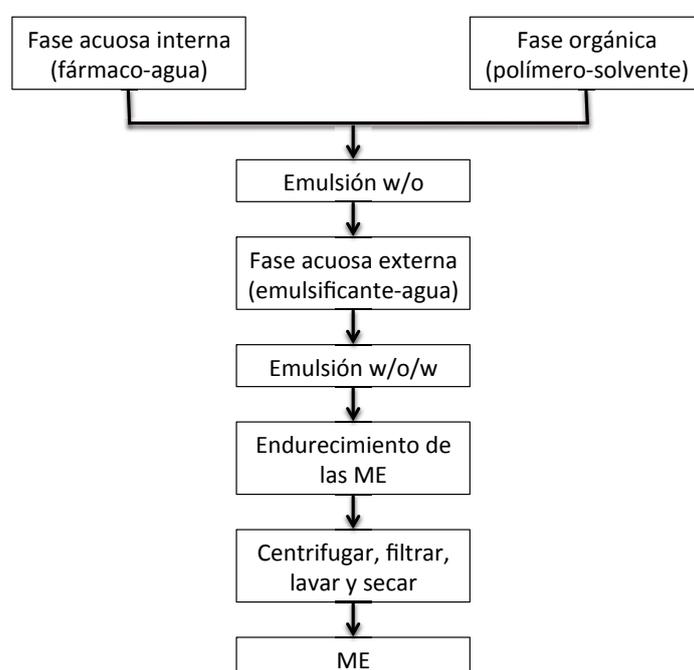


Figura 19 Flujo para la obtención de las ME por el método de emulsión múltiple w/o/w. Se utiliza para encapsular principios activos solubles en agua. En este método el principio activo se disuelve en agua (fase acuosa) y el polímero se disuelve en un solvente orgánico (fase orgánica). Ambas fases se mezclan obteniéndose la emulsión w/o, la cual se adiciona lentamente sobre un medio acuoso que contiene un emulsificante como el alcohol polivinílico. Después el solvente orgánico es eliminado y se obtienen las ME.

FASE 2. D.- RESULTADOS

f2D.1. Obtención de las ME vacías apropiadas

En esta segunda fase definimos la composición apropiada, morfología y características granulométricas del sistema de liberación. Mediante el método de emulsión y evaporación del solvente obtuvimos unas micropartículas esféricas de PLGA. (**Fig. 20**). La viscosidad inherente del polímero osciló entre 0.16 y 0.24. Por microscopía electrónica se observó una porosidad adecuada de las partículas.

Se eligió como polímero el PLGA teniendo en cuenta su disponibilidad y biocompatibilidad. Además su masa molecular y su biodegradabilidad intrínseca, que determina en gran medida la velocidad de liberación del principio activo, lo hacía adecuado y adaptado a las necesidades de nuestro estudio.

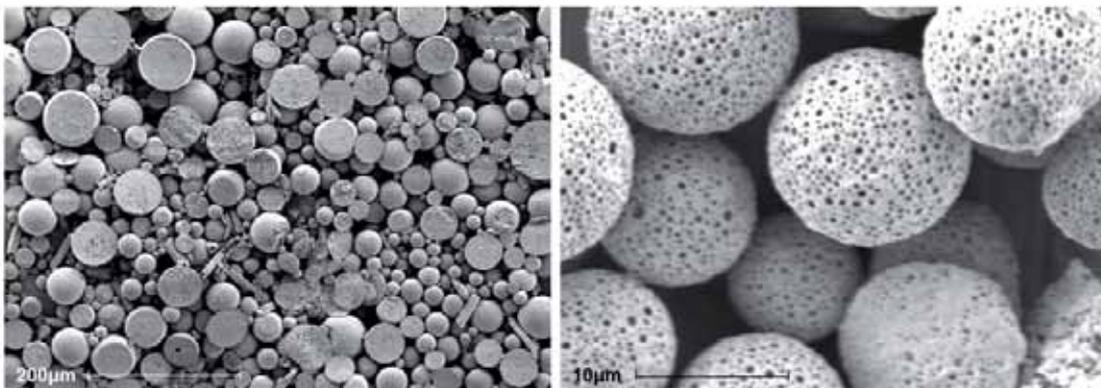


Figura 20 Microesferas. La figura muestra ME in vitro observadas mediante microscopía electrónica. Las microesferas tienen una superficie porosa. Escala de la barra: 200 µm y 10 µm respectivamente.

Teniendo en cuenta el diámetro de la red microvascular cardíaca consideramos que 10 µm sería un tamaño de partícula apropiado para asegurar la retención de las ME en los capilares del área infartada, minimizando el riesgo de obstrucción de las arteriolas. Mediante el método de microencapsulación antes descrito obtuvimos una distribución de tamaños de partículas adecuado, con un tamaño medio de 9.04 µm, 82.13% de ellas entre 5 y 25 µm, sin partículas de un tamaño superior a 25 µm (**Fig.21**).

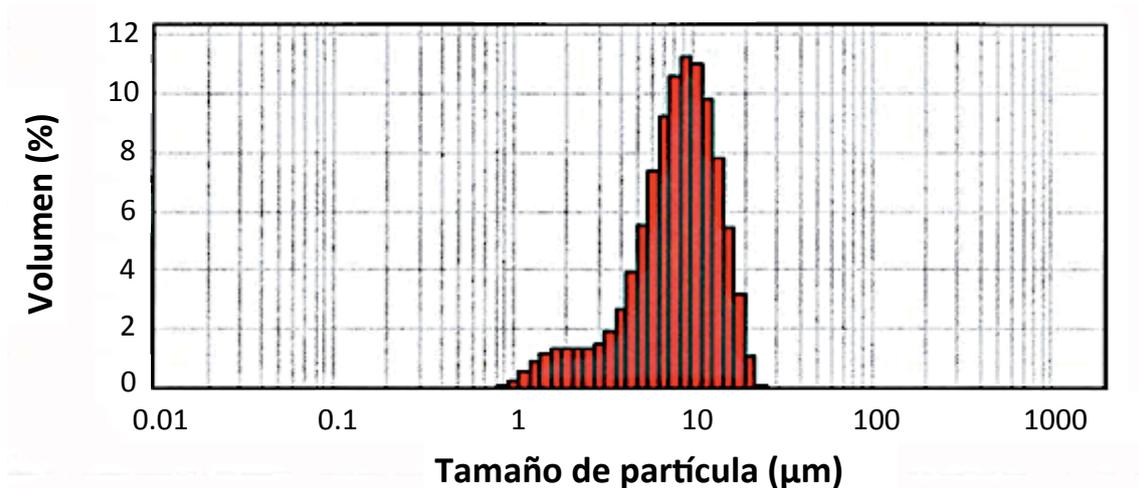


Figura 21 Distribución del tamaño de las microesferas. Mediante el método de emulsión y evaporación del solvente obtuvimos ME con un tamaño medio de 9.04 μm , sin partículas de un tamaño superior a 25 μm . El volumen representa el porcentaje de ME de cada tamaño.

Los estudios del perfil de liberación *in vitro* y en condiciones estáticas demostraron la liberación bifásica típica de las ME. La liberación inicial durante las primeras 24 horas, conocida como efecto burst, es inmediata y rápida y se debe a la erosión de la superficie de la micropartícula que permite un rápido inicio del efecto molecular. Después de este efecto inicial, se observa una liberación sostenida y a una velocidad más lenta secundaria a un mecanismo de difusión y de degradación progresiva de la micropartícula. Este perfil de liberación se consideró adecuado en nuestro estudio teniendo en cuenta que las reacciones de reparación miocárdica empiezan muy rápido tras el insulto isquémico y se prolongan durante al menos 3-4 semanas postIAM. Se realizaron experimentos *in vitro* ajustando el tamaño de la partícula, la cantidad de polímero y de alcohol polivinílico, así como su masa molecular, obteniendo una formulación adecuada capaz de liberar el principio activo durante un periodo de 3 semanas, que consideramos apropiado para poder modular dichas reacciones de reparación y observar un efecto biológico.

f3

FASE 3.- ESTUDIO *IN VIVO* DE LA EFICACIA Y SEGURIDAD DE LAS MICROESFERAS.

FASE 3. A.- TAREA EXPERIMENTAL DE LA FASE 3

Estudiar si las ME fabricadas pueden ser administradas por vía intracoronaria y si quedan retenidas en el corazón, sin producir daño miocárdico *in vivo*.

FASE 3. B.- MATERIAL

f3B.1. Animales:

- 6 cerdos (100921, 100923, 101025, 101026, 110125, 110131) Large-White de 3-4 meses de edad, hembras y 30-35 Kg de peso de la granja Aulinas de la Garrotxa, Cataluña. Los animales pasaron un periodo de 7 días de cuarentena en el estabulario del Institut de Recerca hasta el inicio de los experimentos. Fueron alimentados con el pienso común (Porcs Engreix Murri, Pienso Viñas de Llagostera, SL)

f3B.2. Instrumentos y aparatos:

f3B.2.1. Preparación de las ME marcadas con albúmina de suero bovino marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC-BSA)

- Ver material descrito en la fase 2 (f2B.1.1.).

f3B.2.2. Anestesia, intubación y monitorización

- Material descrito en la fase 1 (f1B.2.1.).

f3B.2.3. Inducción de un IAM percutáneo reperfundido

- Material descrito en la fase 1 (f1B.2.2.).

f3B.2.4. Disección femoral, toracotomía y esternotomía

- Material descrito en la fase 1 (f1B.2.3.).

f3B.2.5. Obtención y conservación de muestras

- Punch (Kai, Japan).
- Eppendorfs.
- Congelador a -80°C .

f3B.2.6. Visualización de muestras

- Microscopio óptico de fluorescencia (Olympus IX 71, Tokyo, Japan).

f3B.2.7. Experimentos con cristales piezoeléctricos

- AP-Transducer coupler Type A (Strain Gage bridge) S72.25 (Coulbourn instruments, Whitehall, Pennsylvania).
- 2 pares de cristales piezoeléctricos (System 6, Triton Technology, San Diego, California).
- Osciloscopio Hameg HM 205-3 (Hameg instruments S.L., Barcelona, España).

- *Carrier Amplifier AP-601G.*
- *Flowmeter T206 (Transonic systems Inc.).*
- *Lazos de goma Neo-LAC (Davis + Geck).*
- *Powerlab/16 sp (ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Australia).*
- *Catéter Millar SPC-350 1.4F (Millar Instruments Inc, Houston, TX).*
- *Software SigmaPlot (Systat Software Inc., UK).*
- *Software Chart 5 for Windows ((ADInstruments, Colorado Springs, CO, USA).*

f3B.3. Fármacos:

f3B.3.1. Preparación de las ME marcadas con FITC-BSA

- *FITC-BSA al 1% además de los componentes descritos en el punto f2B.2.1.*

f3B.3.2. Sedación e inducción anestésica

- *Fármacos descritos en la fase 1 (f1B.3.1.).*

f3B.3.3. Inducción percutánea de un IAM reperfundido

- *Fármacos descritos en la fase 1 (f1B.3.2.).*

f3B.3.4. Disolución de las microesferas para su administración

- *Tampón fosfato salino (PBS) 0.15 molar (M) y polisorbato-80 0.01%.*

f3B.3.5. Sacrificio

- *Tiopental sódico (Tiobarbital Braun 1g, Braun Medical S.A., Barcelona).*

FASE 3. C.- MÉTODOS

Para estudiar la eficacia y seguridad de las ME era preciso poderlas visualizar *in vivo*. Para ello fueron marcadas con una proteína fluorescente, la FITC-BSA (Wischke and Borchert, 2006).

f3C.1. Preparación de las ME marcadas con FITC-BSA

Las ME marcadas con FITC-BSA fueron preparadas siguiendo el método de emulsión y evaporación del solvente w/o/w, usando un copolímero 50:50 de PLGA conteniendo grupos terminales carboxilo. Por cada 0.2 g de PLGA, se añadió 1 ml de cloruro de metileno. A continuación, 0.1 ml de solución acuosa de FITC-BSA (20 mg/ml) fue añadida a la solución orgánica de PLGA y emulsificado por sonificación durante 15 seg. Esta emulsión primaria fue añadida a una fase externa consistente en una solución acuosa de alcohol polivinilo al 1% (w/v) y de cloruro de sodio al 1% (w/v) y todo ello homogeneizado durante 60 seg a 10.300 rpm. La emulsión secundaria (w/o/w) obtenida fue añadida a un volumen de agua purificada y cloruro de metileno y se dejó evaporar por agitación. Las ME obtenidas se recogieron por centrifugación, fueron lavadas dos veces con agua purificada y después congeladas en seco.

f3C.2. Inducción percutánea de un IAM reperfundido y administración intracoronaria de ME marcadas con FITC-BSA

Para estudiar la biodistribución de las ME FITC-BSA *in vivo* indujimos un IAM a 4 animales (100921, 100923, 101025, 101026) siguiendo la metodología descrita en la fase 1. A los 5 minutos tras la reperfusión de la LAD, se administraron por vía intracoronaria 30 mg de ME marcadas con FITC-BSA. Las ME fueron resuspendidas *in situ* en PBS 0.15M y polisorbato-80 0.01% justo antes de su administración, que se realizó a través del balón coaxial desinflado situado en la misma posición en la LAD. La aparición de arritmias, alteraciones de las constantes hemodinámicas o cambios en el electrocardiograma (ECG) fueron registrados durante las inyecciones. Quince minutos después, realizamos una toracotomía media y pericardiectomía exponiendo el corazón. Finalmente, los animales fueron sacrificados, mediante sobredosis de tiopental por vía intravenosa y tras ello, se obtuvieron 5 muestras de tejido miocárdico infartado, 5 muestras de tejido control posterolateral y 5 muestras de pulmón. Mediante laparotomía se obtuvieron otras muestras de tejido extracardíaco (5 de bazo y 5 de hígado). Todas las muestras fueron colocadas en eppendorfs y congeladas a -80°C hasta su análisis.

f3C.3. Detección de ME marcadas con FITC-BSA en el tejido cardíaco y extracardíaco

Las muestras obtenidas fueron descongeladas y mediante un microtomo obtuvimos, de cada una, 5 secciones de 5 µm que se colocaron individualmente en portaobjetos. Todas las muestras fueron visualizadas mediante microscopía óptica de fluorescencia, con longitud de onda de luz B, que permite detectar fluorescencia.

f3C.4. Detección de toxicidad cardíaca por isquemia: experimentos con cristales piezoeléctricos

Para investigar la posible toxicidad miocárdica desencadenada por las ME, así como también el margen de seguridad terapéutico, se realizaron 2 experimentos con los 2 cerdos sanos restantes (110125, 110131). Se utilizó el sistema de cristales piezoeléctricos, altamente sensible para la detección de isquemia, junto a la medición simultánea del Qc.

Se empezó sedando y anestesiando a los animales siguiendo la misma pauta descrita. A continuación, los animales fueron intubados y monitorizados. Se efectuó la toracotomía y pericardiectomía. Los márgenes libres del pericardio fueron suturados a los bordes esternales suspendiendo ligeramente el corazón.

Con un bisturí se efectuaron 4 microcortes, 2 en la región anterior, donde se colocó un par de microcristales (I: par de cristales de la zona IAM) y 2 en la pared posterolateral para el par de microcristales control (C: par de controles en la zona control) (**Fig. 22**). La distancia entre los 2 cristales de cada par fue de aproximadamente 1.5 cm.

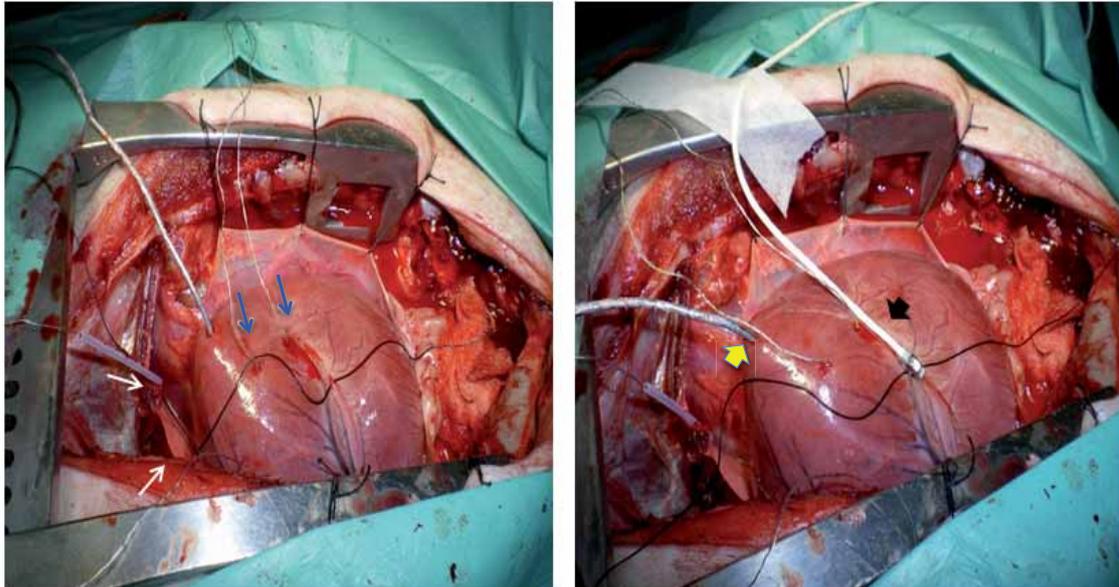


Figura 22 Sensor de flujo, catéter Millar y cristales piezoeléctricos implantados en el corazón *in vivo*. Se muestra una imagen representativa del corazón de un animal tras toracotomía y pericardiectomía. Cuatro microcristales fueron insertados en el miocardio, un par en la zona anterior irrigada por la LAD (flechas azules) y otro par en la zona control posterolateral (flechas blancas). A continuación, un sensor de flujo (flecha negra) fue implantado en el segmento medio de la LAD tras una disección focal a dicho nivel. Tanto las señales mecánicas producidas por cada par de microcristales como las oscilaciones del flujo coronario durante la infusión intracoronaria de ME fueron registradas de forma continua y analizadas. Un catéter Millar (flecha amarilla) en la cavidad ventricular izquierda midió las presiones intraventriculares.

La señal mecánica de la contracción miocárdica es captada por los cristales y transformada en una señal eléctrica, que es recogida por un oscilómetro y transmitida de forma continua a un computador. Ello nos permite realizar mediciones de la distancia máxima (**Max L**), mínima (**Min L**), telediastólica (**EDL**) y telesistólica (**ESL**) entre los dos cristales de cada par. A la diferencia entre la EDL y la ESL se le llama acortamiento sistólico (**SS**) y se calcula con la fórmula $(EDL - ESL) / EDL$. Es el parámetro que mejor refleja la contracción miocárdica de la región donde se encuentran implantados los microcristales. Los valores normales de SS oscilan entre 0.2 ± 0.1 (Rodríguez-Sinovas et al., 2003). Cuando el músculo cardíaco se afecta por un estímulo isquémico la contracción rápidamente se pierde, por lo que la distancia ESL se iguala a la EDL y el SS se iguala a 0. Además, ambas distancias, ESL y EDL, aumentan tanto por el abombamiento por discinesia del tejido afectado como por el arrastre del tejido sano colindante hipercontráctil. El sistema de cristales piezoeléctricos detecta, con elevada sensibilidad, la presencia de isquemia miocárdica.

El **Qc** se analizó mediante un sistema electromagnético. Para ello, se colocó un sensor de flujo en la porción media de la LAD, donde se efectuó una pequeña disección de 5-10 mm (Cinca et al., 1996) (**Fig.20**). Se efectuaron también medidas de la presión intraventricular telediastólica (**LVEDP**) y telesistólica del VI (**LVESP**) con un catéter Millar colocado en la cavidad ventricular izquierda, a través de una microperforación miocárdica por punción directa (**Fig.20**) A partir de ella, se calcularon los cambios de presión en el tiempo (el pico + y – de la integral presión-tiempo (**dP/dT**)).

Todos estos parámetros fueron simultáneamente registrados y grabados mediante el software Chart 5 program for Windows.

Una vez obtenido un buen registro de todas las señales a través del polígrafo, donde quedaron digitalmente almacenadas para su posterior análisis, se realizó la coronariografía. En este caso se siguió la misma metodología que la usada para inducir el IAM, sólo que en este caso el balón coaxial no fue inflado. La administración de ME FITC-BSA se realizó a través del balón coaxial mediante inyecciones repetidas sucesivas hasta alcanzar 120 y 240 mg en cada animal, respectivamente (**Fig.23**).

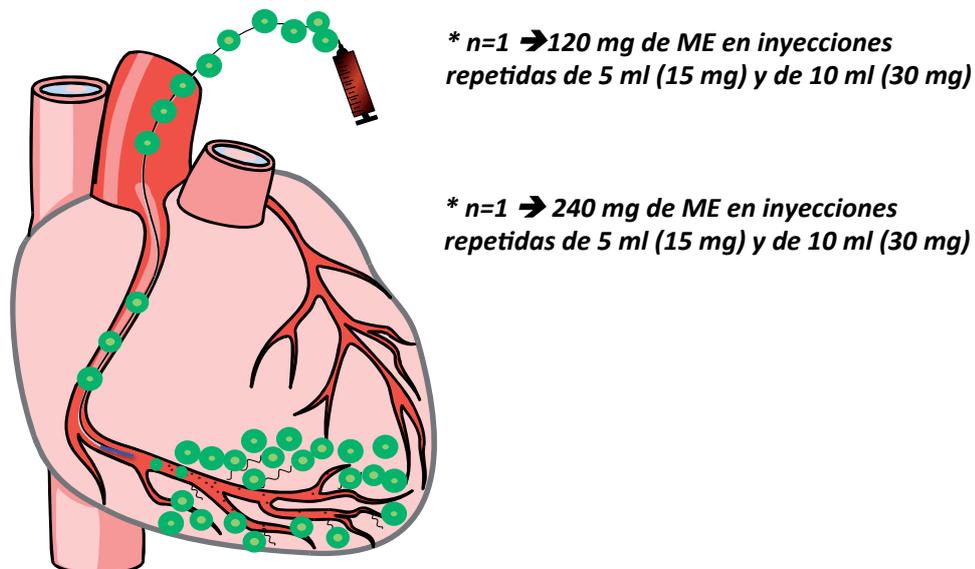


Figura 23 Experimentos para estudiar la seguridad local y el margen de seguridad terapéutica. A dos animales se les administró respectivamente 120 y 240 mg de ME disueltas en PBS mediante inyecciones sucesivas de 5 o 10 ml conteniendo 15 y 30 mg de ME respectivamente. La administración se realizó a través del balón coaxial desinflado en la LAD media.

FASE 3. D.- RESULTADOS

f3D.1. Las ME pueden ser liberadas seletivamente en el miocardio reperfundido donde quedan retenidas

Con nuestros experimentos demostramos que las ME marcadas con FITC-BSA quedan retenidas en los capilares del área dañada después de ser administradas por vía intracoronaria, a través de la arteria responsable del IAM, a los 5 min postreperusión (**Fig.24**).

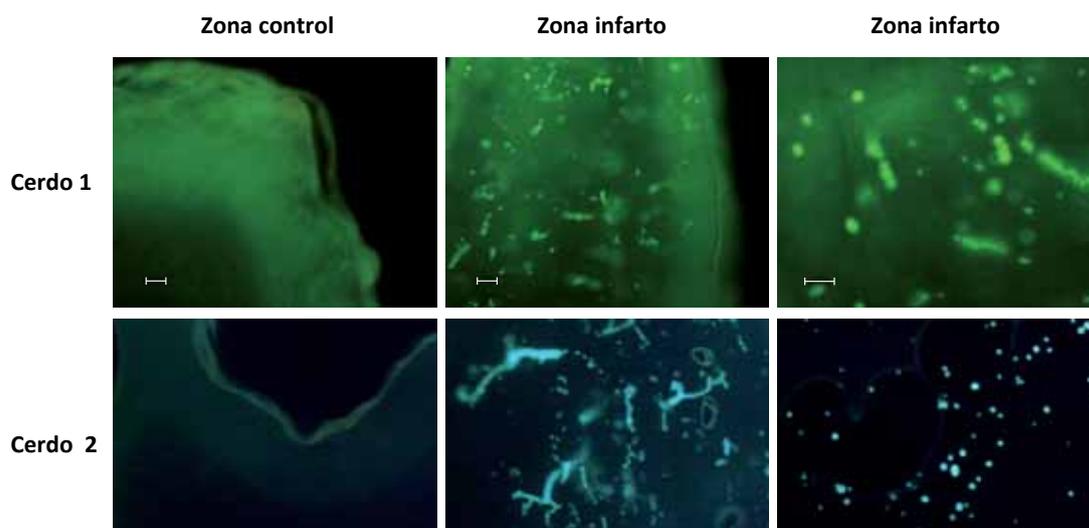


Figura 24 Detección de las ME de PLGA marcadas con FITC-BSA en las muestras de miocardio. La figura muestra imágenes representativas de secciones de tejido control y tejido infartado visualizadas mediante microscopio óptico de fluorescencia. Las muestras fueron obtenidas de 2 cerdos sometidos a 49 min de isquemia y tratados, a los 5 min postreperusión, con 2 inyecciones conteniendo 30 mg de ME marcadas. Las ME estuvieron exclusivamente presentes en la zona infartada en ambos animales. Escala de la barra: 50 μ m.

f3D.2. Las ME pueden ser liberadas seletivamente en el miocardio reperfundido sin ser detectadas en otros órganos a distancia

Para descartar biodistribución sistémica de las ME, examinamos su posible presencia a distancia, en tejidos extracardíacos. En los 2 animales estudiados (101025,101026), a parte de confirmar retención de ME FITC-BSA en el tejido infartado anterior, se descartó presencia de fluorescencia en el tejido cardíaco control y también a distancia, en otros órganos como el hígado, pulmón y bazo (**Fig.25 y Fig.26**).

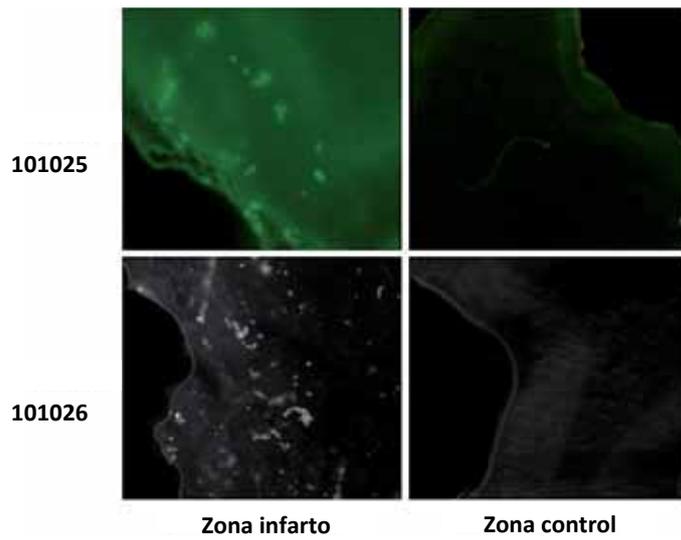


Figura 25 Detección de las ME de PLGA marcadas con FITC-BSA en las muestras de miocardio de los animales 101025 y 101026. La figura muestra imágenes representativas de secciones de tejido infartado y tejido control visualizadas mediante microscopio óptico de fluorescencia. Tras una fase de ischemia de 49 min la LAD fue reperfundida y a los 5 min postreperusión se administraron por vía intracoronaria 2 inyecciones que contenían 30 mg de ME fluorescentes. Se visualizó fluorescencia en el tejido infartado pero no en el miocardio control.

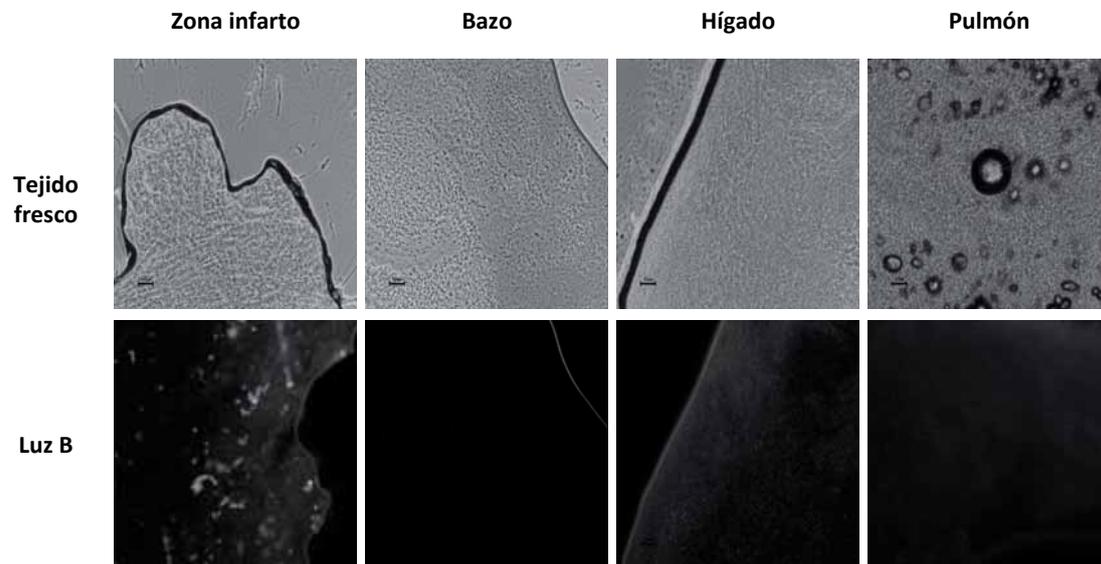


Figura 26 Detección de las ME de PLGA marcadas con FITC-BSA en el corazón y tejidos extracardíacos. Se obtuvieron 5 µg de tejido pulmonar, hepático y esplénico de los animales 101025 y 101026 tratados con 30 mg de ME administradas por vía intracoronaria mediante 2 inyecciones. Las muestras fueron analizadas con microscopía óptica de fluorescencia con luz B. Se detectó fluorescencia exclusivamente en los capilares del miocardio infartado. Escala de la barra: 50 µm.

Por tanto demostramos que las ME quedan retenidas en el corazón por lo que podrán evitar la biodistribución sistémica del antagomir-92a.

f3D.3. Las ME pueden ser liberadas con seguridad en el tejido miocárdico reperfundido sin producir efectos adversos locales

En ambos animales (110125, 110131) se confirmó de nuevo, por microscopía óptica de fluorescencia, que las ME habían quedado retenidas en el tejido miocárdico. A pesar de la retención de ME en los capilares miocárdicos, los cristales piezoeléctricos mostraron únicamente oscilaciones menores y de corta duración. Las distancias ESL y EDL del par I aumentaron con las inyecciones intracoronarias de ME, volviendo a su situación basal en pocos segundos. El SS, que no varió durante la primera inyección, descendió hasta 0.1 tras la segunda. En menos de un minuto el valor del SS se normalizó. Todo ello globalmente reflejó que la inyección intracoronaria de ME produce un estímulo isquémico transitorio y rápidamente reversible. (Fig.27 y Fig.28). El Qc no sufrió cambios durante los experimentos. No se produjeron arritmias, cambios ECG ni alteraciones de los parámetros hemodinámicos durante las inyecciones.

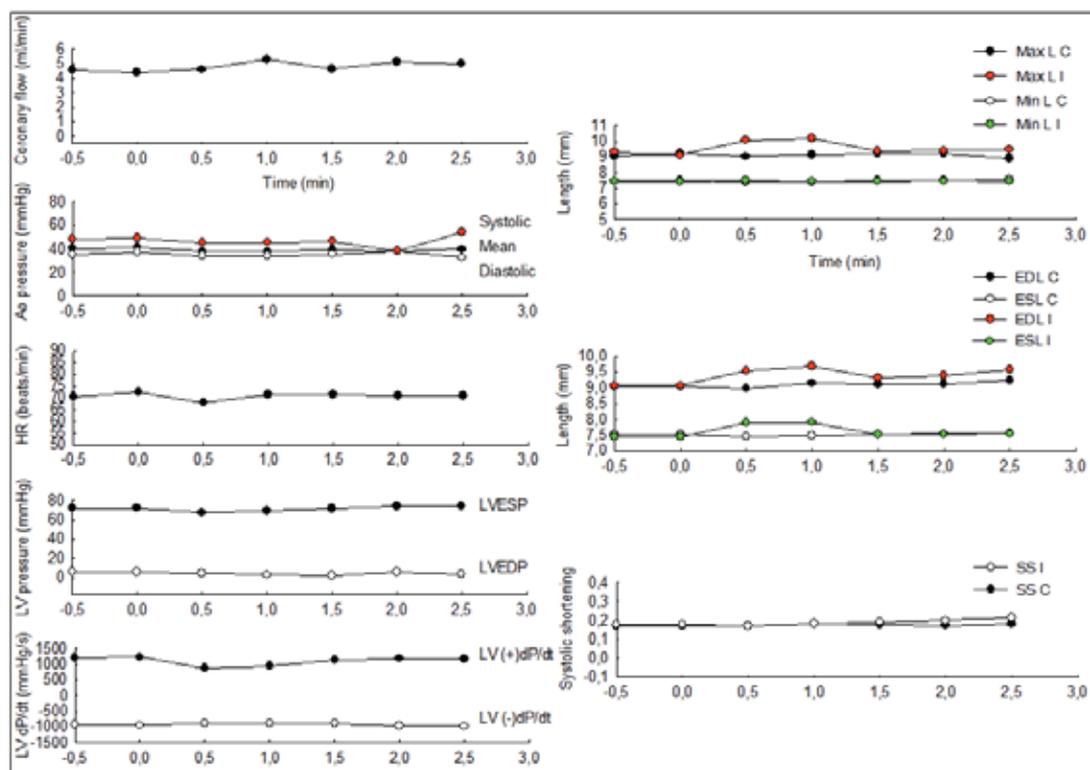


Figura 27 Primera inyección intracoronaria de 15 mg de ME marcadas con FITC-BSA en el animal 110131: efectos sobre la contractilidad, flujo coronario y parámetros hemodinámicos. La gráfica muestra un aumento en la distancia EDL y ESL entre el par de cristales de la zona infartada en relación a la inyección intracoronaria de ME. Este cambio dura segundos revirtiendo de nuevo al valor basal lo que refleja que el estímulo isquémico fue transitorio y rápidamente reversible. El Qc en la LAD y los parámetros hemodinámicos no sufrieron cambios (Max L, Min L, EDL y ESL: distancia máxima, mínima, telediastólica y telesistólica respectivamente entre cada par de cristales a lo largo del ciclo cardiaco; I: par de cristales implantado en el area infartada; C: par de cristales en la zona control; SS: acortamiento sistólico; Qc: flujo coronario; Ao pressure: presión aórtica; HR: frecuencia cardíaca; LV pressure: presión del VI y su derivada LV dP/dT del VI; LVESP: presión telesistólica del VI; LVEDP: presión telediastólica del VI).

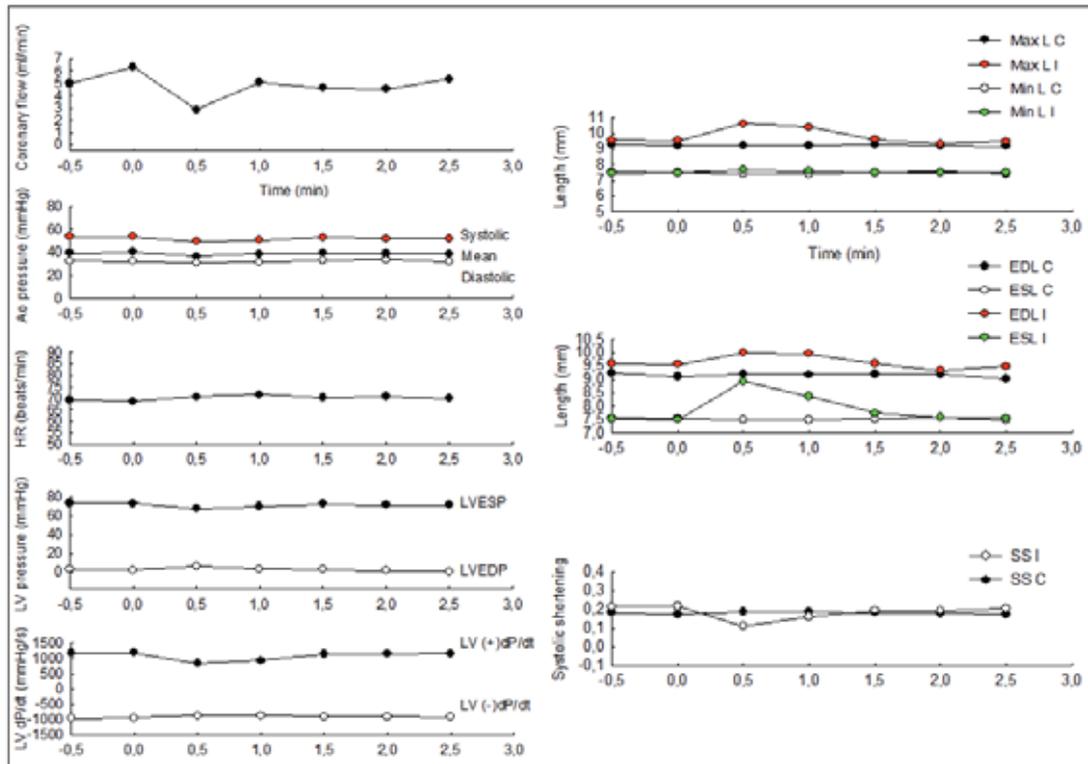


Figura 28 Segunda inyección intracoronaria de 15 mg de ME marcadas con FITC-BSA en el animal 100131: efectos sobre la contractilidad, flujo coronario y parámetros hemodinámicos. Los mismos parámetros descritos en la figura previa fueron analizados durante la segunda inyección de 15 mg de ME. La gráfica muestra de nuevo incrementos de la ESL y EDL, ahora de intensidad más marcada pero de una duración similar a la observada durante la primera inyección. El SS desciende pero sin llegar a 0 y se normaliza en un minuto, indicando que la contracción no se abole por completo y se restaura por completo rápidamente. Por tanto, el estímulo isquémico generado por las 2 inyecciones es rápidamente reversible. No aparecieron arritmias. La oscilación del flujo se produce durante los 30 segundos en que se está efectuando la inyección, sin oscilaciones posteriores y con valores similares al basal. (**Max L**, **Min L**, **EDL** y **ESL**: distancia máxima, mínima, telediastólica y telesistólica respectivamente entre cada par de cristales a lo largo del ciclo cardíaco; **I**: par de cristales implantado en el área infartada; **C**: par de cristales en la zona control; **SS**: acortamiento sistólico; **Qc**: flujo coronario; **Ao pressure**: presión aórtica; **HR**: frecuencia cardíaca; **LV pressure**: presión del VI y su derivada **LV dp/dt** del VI); **LVESP**: presión telesistólica del VI, **LVEDP**: presión telediastólica del VI).

En cuanto al margen terapéutico, se comprobó que éste era amplio, sin detectar una dosis a partir de la cual el daño isquémico era irreversible (**Fig.29** y **Fig.30**). Se observó también, que las inyecciones de 30 mg producían oscilaciones isquémicas que, aunque también eran transitorias, eran más intensas y algo más duraderas. Por este motivo se decidió que en el estudio biológico final (fase 5) se realizaría una administración en 2 inyecciones de 5 ml por separado y no una única de 10 ml.

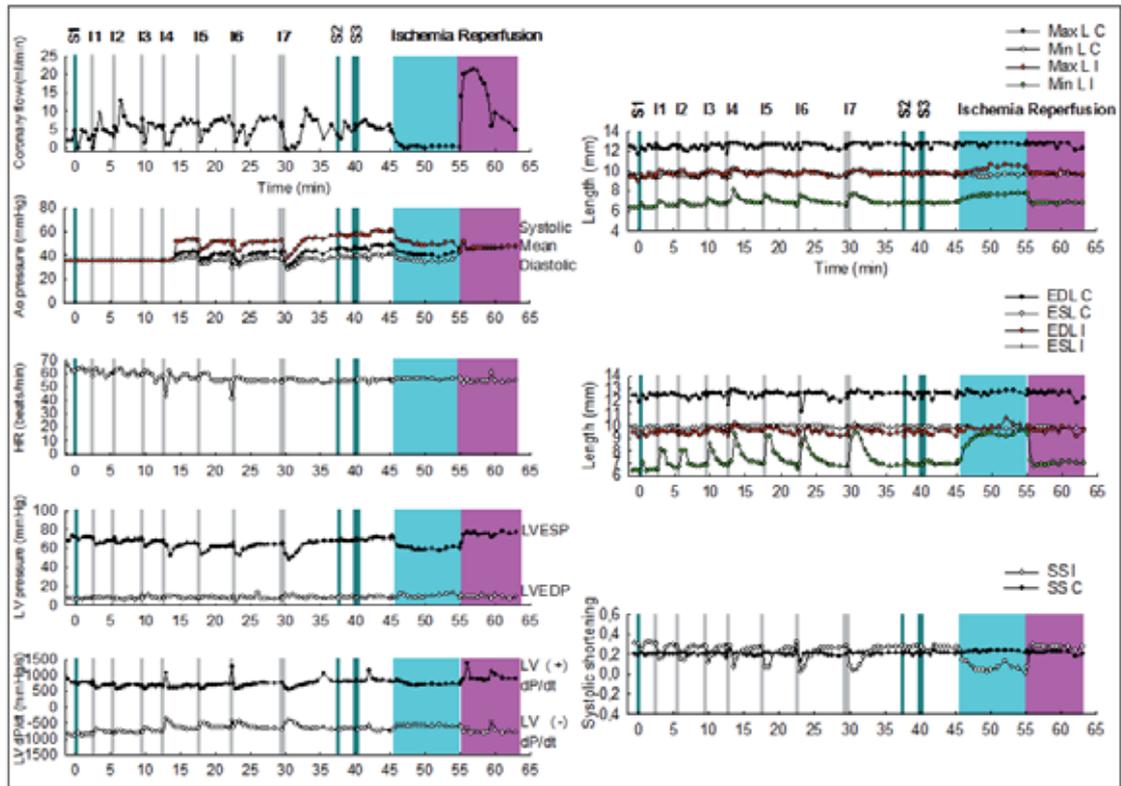


Figura 29 Evaluación del margen de seguridad terapéutico. Otro experimento (100125) fue llevado a cabo para reevaluar el potencial daño isquémico local de las ME sobre el propio miocardio o sobre el flujo coronario. En este caso la siguiente pauta de inyecciones (I) intracoronarias de 15 mg (barras grises estrechas) o de 30 mg (barras grises anchas) fue administrada: 10 ml de suero fisiológico(SF) + 6 I x 15 mg ME + 1 I x 30 mg ME + 10 ml de SF +20 ml de SF + 10 min de isquemia + 8 min de reperusión. Administramos una dosis total de 120 mg. No se observó una dosis a partir de la cual los efectos isquémicos se tornan irreversibles, reflejando un amplio margen de seguridad. Algunos extrasístoles ventriculares fueron observados durante las inyecciones y ellos explican la reducción momentánea y brusca de la frecuencia cardíaca con oscilaciones simultáneas de las presiones en el ventrículo izquierdo, aórtica y flujo coronario. Se decidió ocluir el balón durante 10 minutos para comparar los cambios inducidos por las ME con los cambios inducidos por la oclusión del flujo epicárdico. 10 minutos de isquemia por oclusión de un vaso epicárdico no generan necrosis lo que conlucuerda con la recuperación de los cambios en el acortamiento sistólico hasta normalizarse. (**Max L, Min L, EDL y ESL**: distancia máxima, mínima, telediastólica y telesistólica respectivamente entre cada par de cristales a lo largo del ciclo cardíaco; **I**: par de cristales implantado en el area infartada; **C**: par de cristales en la zona control; **SS**: acortamiento sistólico; **Qc**: flujo coronario; **Ao pressure**: presión aórtica; **HR**: frecuencia cardíaca; **LV pressure**: presión del VI y su derivada **LV dP/dT** del VI; **LVESP**: presión telesistólica del VI; **LVEDP**: presión telediastólica del VI).

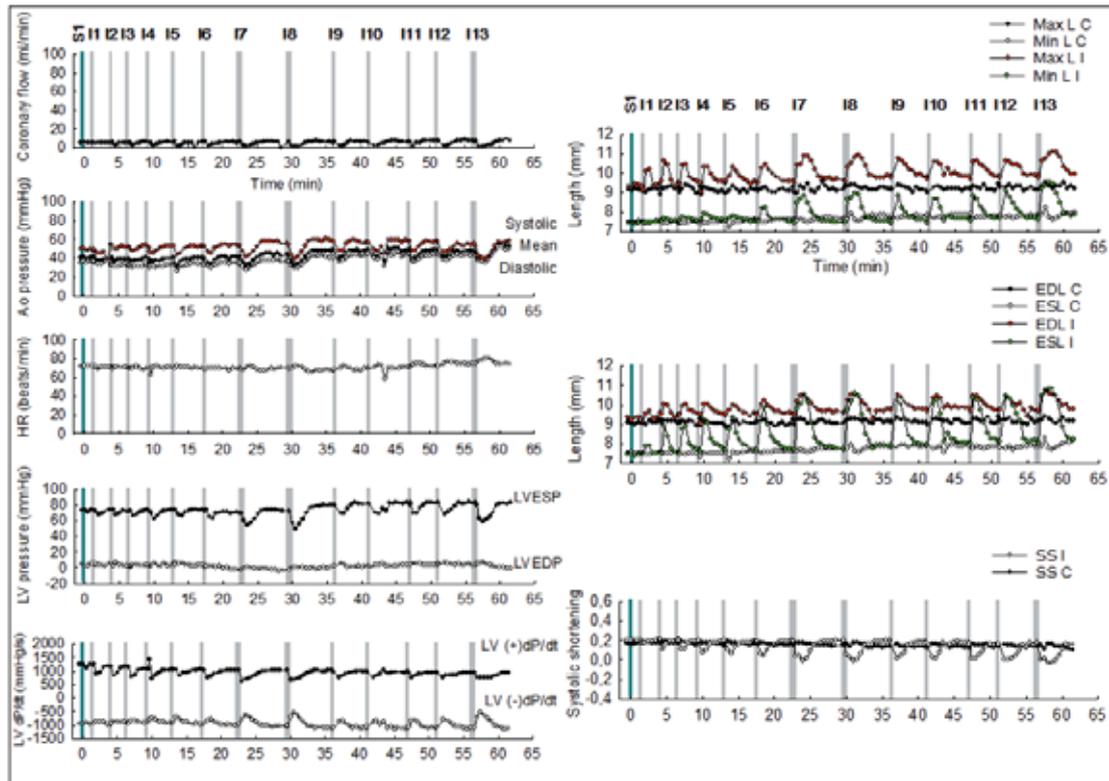


Figura 30 Evaluación del margen de seguridad terapéutico. Para evaluar el margen de seguridad se administraron de forma sucesiva inyecciones intracoronarias de ME (I1,I2, I3...) de 15 mg (barras grises estrechas) o de 30 mg (barras grises anchas). Concretamente la pauta de administración que se siguió en el animal 110131 fue la siguiente: 10 ml de suero fisiológico (S1) + 6 I x 15 mg de ME + 2 I x 30 mg ME+ 4 I x 15 mg de ME + 1I x 30 mg de ME. La separación entre el par de cristales situado en el miocardio que recibe las ME es progresivamente mayor y más prolongada pero retorna al estado basal después de unos pocos minutos. El acortamiento sistólico llegó al valor nulo en la séptima inyección, indicando pérdida de contracción miocárdica pero con recuperación completa en pocos minutos. No se objetivó daño isquémico irreversible con una dosis total de 240 mg de ME administrada a través del balón coaxial desinflado y situado en el segmento medio de la DA. El flujo coronario osciló coincidiendo con cada inyección pero rápidamente volvía al valor basal sin quedar reducido al finalizar todas las I. Algunos extrasístoles ventriculares fueron observados durante las inyecciones y ellos explican la reducción momentánea y brusca de la frecuencia cardíaca y las caídas simultáneas de las presiones en el ventrículo izquierdo y aórtica. (**Max L, Min L, EDL y ESL**: distancia máxima, mínima, telediastólica y telesistólica respectivamente entre cada par de cristales a lo largo del ciclo cardíaco; **I**: par de cristales implantado en el area infartada; **C**: par de cristales en la zona control; **SS**: acortamiento sistólico; **Qc**: flujo coronario; **Ao pressure**: presión aórtica; **HR**: frecuencia cardíaca; **LV pressure**: presión del VI y su derivada **LV dP/dT** del VI; **LVESP**: presión telesistólica del VI; **LVEDP**: presión telediastólica del VI).

Los análisis histológicos no mostraron áreas de necrosis miocárdica descartando daño irreversible con una dosis de microsferas 8 veces superior a la prevista para administrar en nuestro estudio.

f4

**FASE 4.- ESTUDIO DEL EFECTO MOLECULAR DEL
ANTAGOMIR-92a ENCAPSULADO *IN VIVO*.**

FASE 4. A.- TAREA EXPERIMENTAL DE LA FASE 4

Estudiar si el miR-92a es inhibido de forma selectiva y sostenida, tras una única administración de antagomir-92a encapsulado por vía intracoronaria.

FASE 4. B.- MATERIAL

f4B.1. Animales:

- 3 cerdos (110530, 110606, 110607) Large-White de 3-4 meses de edad, hembras y 30-35 Kg de peso de la granja Aulinas de la Garrotxa, Cataluña. Los animales pasaron un periodo de 7 días de cuarentena en el estabulario del Institut de Recerca hasta el inicio de los experimentos. Se realizaron los controles sanitarios habituales y exámenes diarios por parte de un veterinario. Fueron alimentados con el pienso común (Porcs Engreix Murri, Pienso Viñas de Llagostera, SL).

f4B.2. Instrumentos y aparatos:

f4B.2.1. Preparación de las ME cargadas de antagomir-92a

- Las ME cargadas de antagomir-92a fueron fabricadas por Pierre-Fabre utilizando el material descrito en la fase 2 (f2B.1.1.).

f4B.2.2. Determinación del RNA encapsulado

- Espectrofotómetro.

f4B.2.3. Anestesia, intubación y monitorización

Al tratarse de unos experimentos donde el animal sobrevive unos días después del procedimiento, las intervenciones fueron llevadas a cabo en el quirófano del estabulario con los siguientes equipos:

- Respirador Aespire (Datex-Ohmeda).
- Monitor Cardiacap/5 (Datex-Ohmeda).
- Ordenador portátil con Software Collect 5S (GE®) conectado al monitor Cardiacap/5 (Datex-Ohmeda).
- Las alargaderas, bombas de perfusión, tubo endotraqueal y laringoscopio fueron idénticos a los descritos en la fase 1 (f1B.2.1).

f4B.2.4. Inducción percutánea de un IAM reperfundido

- Se utilizó el mismo material descrito en la fase 1 (f1B.2.2) con la excepción de que los accesos vasculares se obtuvieron por punción directa con aguja de punción femoral 24G (Argon Medical Devices, Oxfordshire, UK) en lugar de disección y uso de abboath.

f4B2.5. Toracotomía, pericardiectomía, obtención y conservación de muestras

- Se utilizó el mismo material descrito en la fase 1 (f1B.2.3).

f4B2.6. Aislamiento del ácido ribonucleico (RNA) total de las muestras cardíacas

- Gradilla, mortero, pinzas, vórtex, 3 pipetas sin enzimas desoxirribonucleasas (RNAsa free) (P20, P200 y P1000), pote de precipitado, parafilm, rotulador, microcentrífuga, horno, eppendorfs, betamercaptoetanol, nitrógeno líquido, etanol 95-100%, etanol 70%, incubadora, hielo.
- Espacio RNAsa free, guantes, mascarilla, gorro y polainas.
- Disponible en el Kit de Exiqon: solución de lisis (40ml), agua RNAsa free (40ml), proteinasa K (2 viales), solución de lavado (22ml), elution Buffer (6ml), mini spin columns (50), collection tubes (100), elution tubes 1.7 ml (50).

f4B2.7. Cuantificación y control de calidad del RNA aislado

- 2100 Bioanalyzer Instrument (Agilent Technologies, Santa Clara, USA).
- Placa de 96 pocillos (7000 SDS).

f4B2.8. Síntesis de ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA) a partir del RNA aislado

- Agua RNAsa free, hielo seco a -20 grados, vórtex, centrífuga, elution tubes 1.7 ml, incubadora, congelador -80°C.
- Disponible en el Kit de Exiqon product nº 203300: 5x reaction buffer, nuclease free water, enzyme mix, RNA-spine-in (no lo usamos en nuestros experimentos sustituyéndolo por un volumen equivalente de agua RNAsa free).

f4B2.9. PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR) con la técnica de SYBR Green

- Hielo seco a -20 grados, papel de plata, vórtex, agua RNAsa free, centrífuga, elution tubes 1.7 ml, incubadora.
- Disponible en el kit de Exiqon product nº 203450: nuclease free water, SYBR mix master mix, control primer set.
- Disponible en el kit de Exiqon LNA™: Fwd primer (dried down) y LNA™ Rev Primer (dried down) de los siguientes primers:

-Target gene primer set:

- ❖ Referencia 204258: hsa-miR-92a, LNA™ PCR primer set, UniRT, miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR, reference gene primer set, 100 rxns.

-Reference genes primers sets recomendados por Exiqon específicamente para nuestro experimento:

- ❖ Referencia 204102: hsa-miR-499-5p, LNA™ PCR primer set, UniRT, miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR, reference gene primer set, 100 rxns.

- ❖ Referencia 205501: *hsa-miR-133a*, LNA™ PCR primer set, UniRT, miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR, reference gene primer set, 100 rxns.
 - ❖ Referencia 204063: *hsa-miR-103*, LNA™ PCR primer set, UniRT, miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR, reference gene primer set, 100 rxns.
 - ❖ Referencia 204227: *hsa-miR-126*, LNA™ PCR primer set, UniRT, miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR, reference gene primer set, 100 rxns.
- Como control negativo se utilizó el SnoU6 y se realizó el control RT negative (no RT control: para descartar la contaminación por DNA genómico)
 - Software Applied Biosystems (ABI) 7900 HT Version 2.4.1. Applied biosystems.
 - Placa de 384 pocillos con tapa.

f4B.3. Fármacos:

f4B.3.1. Antagomir-92a

- El antagomir-92a consiste en una cadena de 16 oligonucleótidos de 5366 g/mol de masa molecular diseñada y fabricada por Exiqon específicamente para inhibir el miR-92a (Código 00220-Inhibitor-Ssc-miR-92a). Su secuencia, CCGGGACAAGTGCAAT, contiene 9 bases DNA y 7 bases locked nucleic acid (LNA) y su fórmula molecular es $C_{164}H_{197}O_{83}N_{66}P_{15}S_{15}$. Los LNA son análogos de RNA sintetizados químicamente en los que se modifican algunos nucleótidos de RNA (Fig.31).

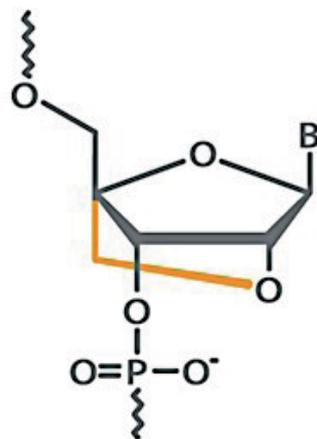


Figura 31 Estructura del LNA™. El anillo de ribosa es conectado mediante un puente metileno (naranja) entre los átomos 2'-O y 4'-C. Ello bloquea el anillo de ribosa en la conformación ideal de las uniones de Watson—Crick. Cuando los LNAs™ son incorporados en una cadena de oligonucleótidos de DNA o RNA hacen que el emparejamiento con una cadena de nucleótidos complementaria sea más rápida y más estable.

En concreto, el anillo de ribosa está bloqueado en la conformación ideal para Watson-Crick. Como resultado, los LNA presentan una mayor estabilidad térmica cuando se hibridan con un RNA de cadena complementaria.

f4B.3.2. Determinación del RNA encapsulado

- Cloroformo.

f4B.3.3. Sedación e inducción anestésica

- Fármacos descritos en la fase 1 (f1B.3.1).

f4B.3.4. Inducción percutánea de un IAM reperfundido

- Fármacos descritos en la fase 1 (f1B.3.2).

f4B.3.5. Estabilización de los animales

- Manta térmica Warmtouch® (Mallinckrodt medical).
- Oxígeno (O₂).
- Acido acetilsalicílico 100 mg (Adiro® ,Bayer S.A., Bayer Bitterfeld GmbH).
- Fentanilo transdérmico 75 microg/h (Matrifen®, Nycomed).

f4B.3.6. Sacrificio

- Tiopental sódico (Tiobarbital Braun 1 g, Braun Medical S.A., Barcelona).

FASE 4. C.- MÉTODOS

f4C.1. Síntesis del antagomir-92a

La síntesis del antagomir-92a fue llevada a cabo por Exiqon, siguiendo la metodología descrita en su web (Exiqon.com). Brevemente, la síntesis de antagomir-92a se realiza en soportes sólidos basándose en la química 3'- 5' de la fosoramidita, que consiste en una adición secuencial de monómeros de amidita (**Fig.32**). La adición secuencial de dichos monómeros se produce mediante reacciones de acoplamiento espontáneas entre el grupo 3'-fosforamidita de los monómeros en solución con el grupo 5'-hidroxilo del monómero unido al soporte sólido.

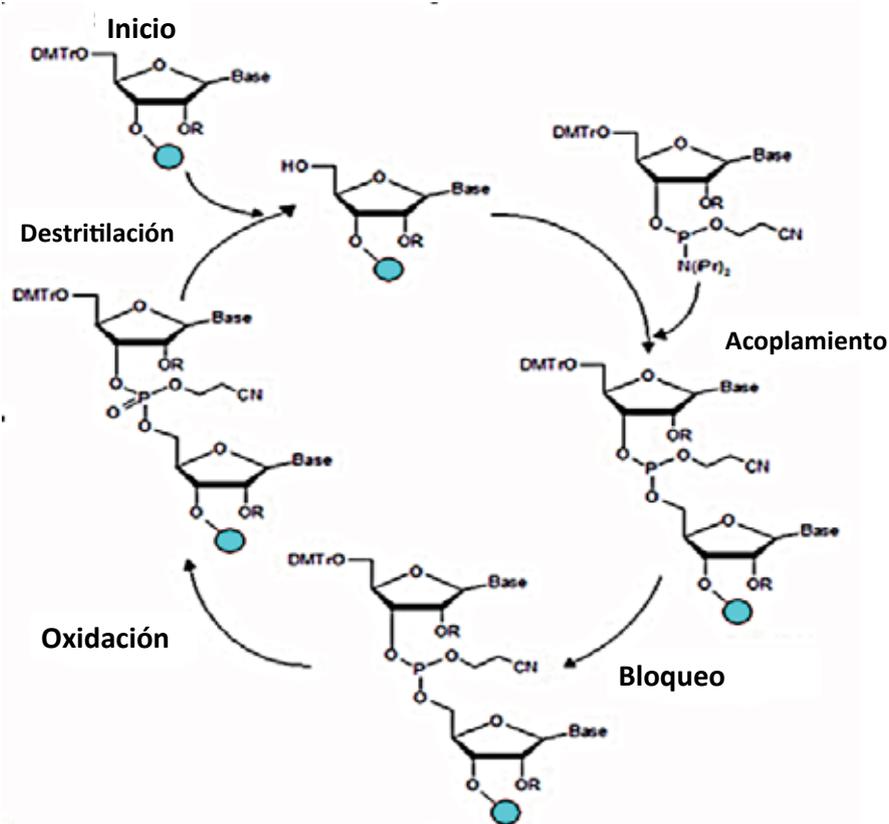


Figura 32 Síntesis de un oligonucleótido. La síntesis de un oligonucleótido se completa mediante un ciclo de reacciones que se repiten hasta que se alcanza la longitud deseada del oligo. Este ciclo consta de cuatro reacciones principales: 1- *Destrilitación* que consiste en eliminar mediante un tratamiento ligeramente ácido al grupo dimetoxitritilo. Este grupo protege al hidroxilo 5' terminal de la base (nucleótido) correspondiente. 2- *Acoplamiento*: una vez libre el grupo hidroxilo se adiciona el siguiente nucleótido correspondiente a la secuencia deseada en forma de beta-cianoetilfosoramidita. 3- *Bloqueo*: concluido el paso de acoplamiento, se bloquean todos los hidroxilos que no reaccionaron (<2% del total) con la nueva base mediante una reacción de acetilación. 4- *Oxidación*: finalmente el grupo fosfito internucleotídico se oxida a un grupo fosfato estable.

Cada ciclo de síntesis requerido para la adición de una nueva base a la cadena de oligonucleótidos consiste en 4 pasos: 1 destritilación, 2 acoplamiento de forforamidita, 3 bloqueo y 4 tiolación/oxidación. Al completarse la síntesis, los grupos protectores betacianoetilo son eliminados mediante lavado de la columna de síntesis con reactivos dedicados. Después de esto, el soporte sólido debe ser secado hacia abajo e incubado en baño de agua, con el fin de lograr la escisión del oligonucleótido crudo de dicho soporte, así como también, para lograr la escisión de los grupos protectores de la nucleobase. A continuación, los oligonucleótidos son purificados empleando buffers de sodio y finalmente los tampones residuales son eliminados por desalinización. Por último, se evalúa la pureza del material final midiendo la densidad óptica mediante un espectrofotómetro de luz ultravioleta a una longitud de onda de 260 nm. El antagomir-92a es liofilizado y congelado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

f4C.2. Preparación de las ME cargadas de antagomir-92a

Las ME cargadas de antagomir-92a fueron preparadas en condiciones asépticas siguiendo el método de emulsión y evaporación del solvente w/o/w usando un copolímero 50:50 de PLGA conteniendo grupos terminales carboxilo. Por cada 0,6 g de PLGA se añadieron 3 ml de cloruro de metileno. A continuación, 0.3 ml de una solución concentrada (222 mg/dL) de antagomir-92a en agua purificada fue añadida a la solución de PLGA orgánico y emulsionado por sonicación durante 20 seg.

Esta emulsión primaria fue añadida a una fase externa consistente en una solución acuosa de alcohol polivinílico al 1% (w/v) y de cloruro de sodio al 1% (w/v) y todo ello homogeneizado durante 60 seg a 10.300 rpm.

La emulsión secundaria (w/o/w) obtenida fue añadida a un volumen de agua purificada y cloruro de metileno y se dejó evaporar por agitación. Las ME obtenidas se recogieron por centrifugación, lavadas dos veces con agua purificada y después congeladas en seco.

f4C.3. Determinación del RNA encapsulado

La concentración del RNA encapsulado se estimó por espectrofotometría de luz ultravioleta a una longitud de onda de 260 nm. La determinación de la pureza del RNA se establece mediante la relación de las lecturas de las absorbancias a 260 y 280, que debe encontrarse entre 1.8-2.0. Para determinar el RNA encapsulado fue necesario disolver las ME con cloroformo.

f4C.4. Inducción percutánea de un IAM reperfundido

La anestesia e inducción del IAM se realizó siguiendo la misma metodología que la descrita en las fases 1 y 3, con la única diferencia que en este caso se efectuó punción percutánea de los vasos femorales, para refinar el modelo y evitar las complicaciones posibles derivadas de la disección, en una fase que requiere la supervivencia del animal.

f4C.5. Administración intracoronaria del antagomir-92a encapsulado

Para estudiar el efecto molecular del antagomir-92a encapsulado en ME *in vivo*, se administraron por vía intracoronaria 2 inyecciones de ME, cinco minutos después de haber reperfundido la LAD. La administración se realizó a través del balón coaxial desinflado, situado en la misma posición en la LAD. Cada inyección contenía un total de 3 mg de antagomir-92a. La dosis de 3 mg de antagomir fue calculada aplicando la relación de 8 mg/Kg de peso utilizada en el trabajo de Bonauer (Bonauer et al., 2009), considerando el peso estimado del área en riesgo (20g) y multiplicando x5 inyecciones realizadas en dicho estudio y x3 como margen de seguridad. Cada inyección fue arrastrada por 5 ml de suero fisiológico.

La aparición de arritmias, alteraciones de las constantes hemodinámicas o cambios en el ECG fueron registrados durante las inyecciones.

Al finalizar el tratamiento, se evaluó el flujo con la escala TIMI en la LAD mediante una inyección de contraste (Hackworthy et al., 1988). Tras ello, retiramos los introductores sellando las punciones con compresión manual y suspendimos la anestesia.

f4C.6. Establación de los animales

Los animales fueron trasladados a la corralina, una vez despiertos y tras confirmarse su estabilidad clínica y hemodinámica. Se mantuvieron con una temperatura de 20-22°C, una humedad relativa del 40-70%. Ciclo luz-oscuridad: 12 horas. El primer día tras el IAM se les proporcionó O₂ y un parche de fentanilo, y fueron examinados por 2 veterinarias anotando la frecuencia cardíaca (FC), saturación de oxígeno (SatO₂) y temperatura (T^a).

f4C.7. Toracotomía, obtención de muestras y sacrificio de los animales

Con la finalidad de evaluar si el antagomir-92a encapsulado consigue un efecto molecular y si éste es sostenido, los animales fueron programados para ser sacrificados de forma escalonada, a las 24 horas (110530), 3 días (110607) y 10 días postIAM y tratamiento (110607).

Antes de su sacrificio, los animales fueron nuevamente anestesiados, intubados y monitorizados. Se efectuó una toracotomía media y pericardiectomía suturando los márgenes libres del pericardio a los bordes esternales. Se pudo delimitar macroscópicamente la zona infartada y diferenciarla del tejido sano. Se obtuvieron 5 muestras de tejido infartado y 5 de tejido control, que se congelaron a -80°C hasta su posterior análisis.

f4C.8. Extracción del RNA total de las muestras

Para poder cuantificar el miR-92a en las muestras fue necesario aislar el RNA total. Se seleccionaron, una muestra de tejido infartado y una de tejido control de cada animal, y de cada una de ellas se obtuvo una porción de un peso como máximo de 4g. Para verificar la calidad de la RT-PCR y realizar el control negativo RT sin enzima para descartar la contaminación por DNA genómico, obtuvimos también una muestra de una animal control que no había recibido tratamiento con antagomir-92a. También se analizó una muestra de tejido infartado de una animal no tratado con antagomir-92a.

El aislamiento del RNA se realizó adquiriendo el Kit miRCURY™ RNA Isolation Kit-Tissue y siguiendo las instrucciones del fabricante (Version 1.1-March 2011 for product #300111. Exiqon).

f4C.9. Análisis de la calidad y cuantificación de la concentración del RNA aislado de cada muestra

Para verificar la calidad del RNA aislado y conocer su concentración en cada una de las 6 muestras, se realizó un análisis por electroforesis obteniendo un electroferograma para cada muestra (Fleige and Pfaffl, 2006). El análisis se realizó en la unidad científico-técnica de soporte del Institut de recerca donde se utilizó un sistema de electroforesis capilar automatizado Bioanalyzer 2100 y se siguieron las instrucciones del fabricante.

Aquellas muestras con una calidad insuficiente fueron repetidas hasta obtener una buena calidad de todas las muestras. Conociendo la concentración de RNA en cada muestra añadimos después, la cantidad de agua RNAsa free necesaria para tener el volumen que se requiere (mínimo 4 μl) para poder aislar el cDNA y realizar la RT-PCR.

f4C.10. Síntesis de cDNA a partir del RNA aislado

De cada muestra de RNA obtuvimos 4 μl para llevar a cabo la transcripción reversa a cDNA. Para asegurar la calidad de las mediciones, se obtuvieron de cada muestra de RNA otros 4 μl y se realizaron las reacciones por duplicado.

Para obtener el cDNA a partir del RNA aislado utilizamos el Kit Universal cDNA Synthesis Kit, 16-32 rxns (product nº 203300) de Exiqon y seguimos las instrucciones del fabricante. Congelamos las muestras de cDNA a -80 grados.

f4C.11. Amplificación del cDNA mediante RT-PCR utilizando la técnica de SYBR Green

Al día siguiente de haber sintetizado el cDNA, continuamos con la amplificación de la primera cadena de cDNA mediante RT-PCR (Nolan et al., 2006) con la técnica de SYBR green (Zipper et al. 2004) utilizando el Kit SyBR Green master mix, Universal RT 2,5 ml (product # 230450) de Exiqon. Para la reacción, seguimos las instrucciones del manual miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR Version 4.1 #203300 (August 2011) de Exiqon. Los primers específicos para la amplificación fueron el miR diana, miR-92a, y otros utilizados como genes de referencia recomendados por Exiqon, específicamente para nuestro experimento: miR-103, miR-133, miR-203, miR-126 y miR-499. Como control negativo se utilizó el SnoU6. Para la RT-PCT se aplicó la siguiente pauta: un ciclo: 3 min a 95 °C, 20 ciclos; 15 seg a 95°C, 30 seg a 60°C.

f4C.12. Análisis estadístico

Los datos están expresados como media \pm s.e.m. Las comparaciones entre los múltiples grupos se realizaron utilizando el estadístico ANOVA. Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos cuando la $p < 0.05$.

FASE 4. D.- RESULTADOS

f4.D.1. El antagomir-92a puede ser encapsulado preservando su integridad

Se alcanzaron cargas de antagomir-92a del 7.3%, determinadas por espectrofotometría, con una eficiencia de encapsulación del 74% y con preservación de la integridad del antagomir. Considerando cargas de antagomir-92a del 7% fueron necesarias 49 mg de microesferas para administrar 3 mg de antagomir-92a. Dichas microesferas fueron diluidas en 2 inyecciones de 5.5 y 6 ml.

f4.D.2. El antagomir-92a encapsulado puede ser administrado por vía intracoronaria siendo bien tolerado

Los 3 animales toleraron bien el tratamiento, sin detectarse cambios eléctricos, arritmias o alteraciones hemodinámicas durante la administración. Se constató flujo TIMI 3 en la LAD en los 3 casos, una vez finalizado el infarto y completado el tratamiento con el antagomir-92a encapsulado por vía intracoronaria.

f4.D.3. El ARN total pudo ser aislado de las muestras miocárdicas demostrando buena calidad de su componente constituido por los microRNAs

Antes de sintetizar cDNA a partir del RNA se estudió la calidad del RNA aislado. Para cada muestra, se efectuó una cuantificación y valoración de la calidad del RNA pudiendo conocer la concentración de RNA en cada muestra (**Fig.33**)

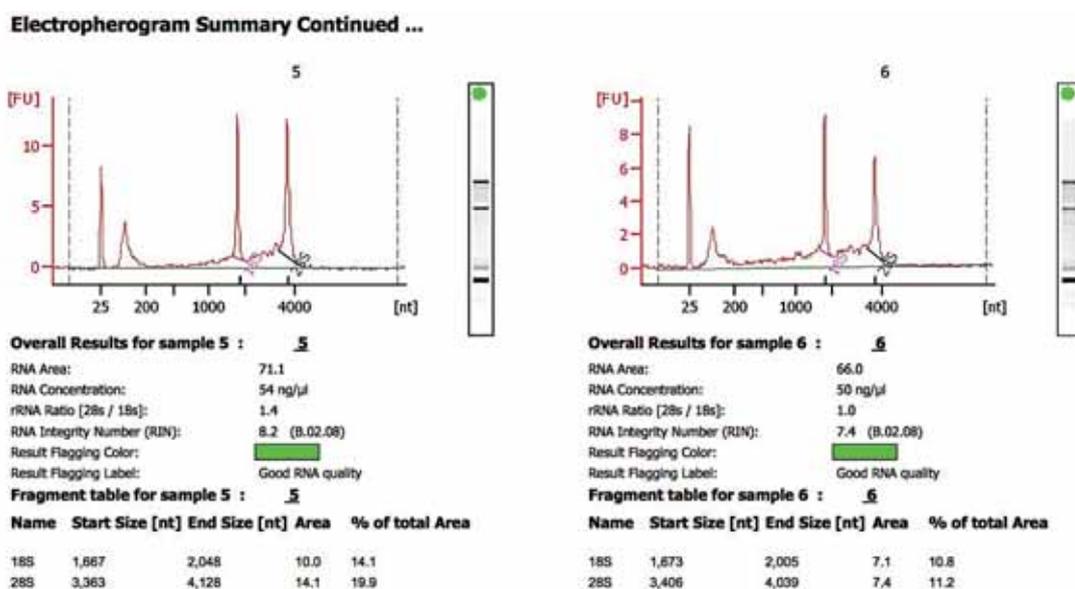


Figura 33 Electroferogramas representativos del RNA de 2 muestras miocárdicas. Se analizó la calidad del RNA aislado así como también su concentración en cada muestra. Los diferentes picos representados en la gráfica corresponden a los distintos tipos de RNA. El segundo pico de la gráfica con morfología triangular corresponde a los microRNAs.

Las concentraciones obtenidas para cada muestra fueron:

- 110530 (sacrificio 24h) tejido control: 27 ng/μl / tejido isquémico: 33 ng/μl
- 110606 (sacrificio 10d) tejido control: 33 ng/μl / tejido isquémico: 102ng/μl
- 110607 (sacrificio 3d) tejido control: 50 ng/μl / tejido isquémico: 54 ng/μl
- Muestra de animal control (para control RT-): 82 ng/μl.
- Muestra de animal con IAM pero no tratado con antagomir: tejido isquémico: 8 ng/μl.

f4.D.4. La expresión de miR-92a fue inhibida de forma rápida y sostenida en el tejido infartado respecto al tejido control.

En el tejido infartado, la expresión de miR-92a fue down-regulada x8 veces en comparación con el tejido control (**Fig.34**). La expresión de los microRNAs endógenos no se afectó por el tratamiento. La inhibición ocurrió desde el primer día y permaneció presente 10 días después, con un nivel de expresión 5 veces menor que en el área control. Estos resultados demostraron que se consigue una difusión sostenida del antagomir-92a, a medida que se biodegrada el polímero, y como consecuencia se consigue una inhibición sostenida del miR-92a con una administración intracoronaria única.

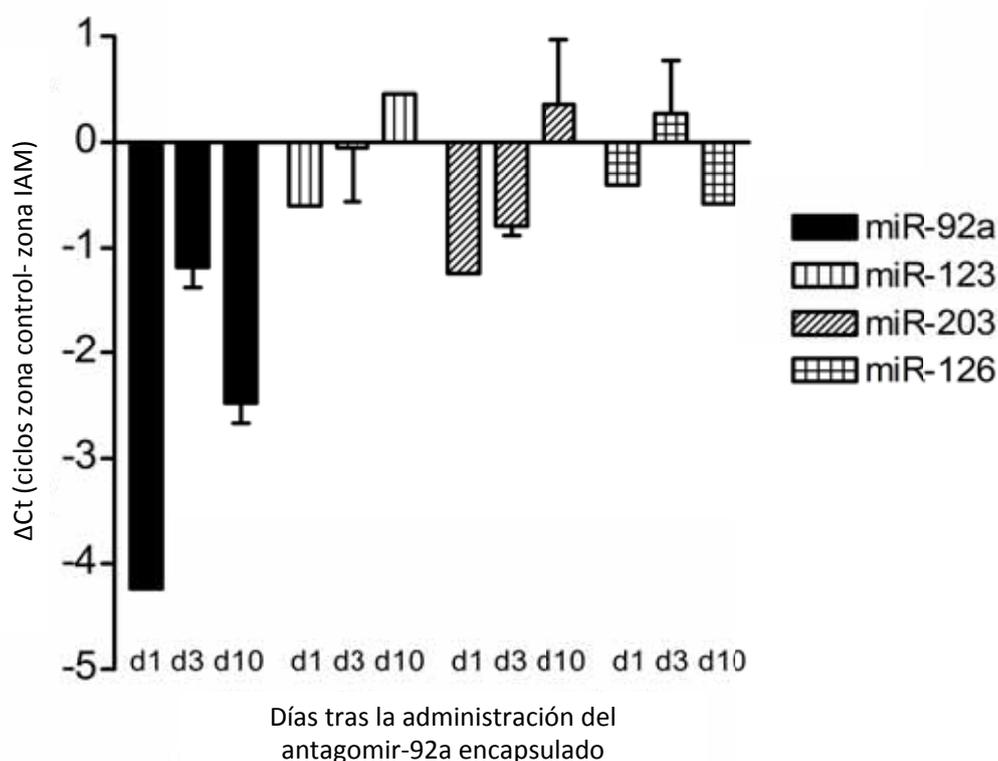


Figura 34 Expresión del miR-92a en las muestras cardíacas. Análisis de la expresión cuantitativa del miR-92a y de miRs endógenos en muestras de miocardio infartado y control obtenidas 1,3 y 10 días(d) después del IAM (49 min de isquemia) y de la administración intracoronaria del antagomir-92a encapsulado en ME. La expresión de los miRs cuantificada mediante RT-PCR está representada como la diferencia de sus ciclos umbral (Ct) en el tejido control respecto al tejido infartado. El Ct se define como el número de ciclos requeridos para que la señal fluorescente asociada al incremento del producto de la PCR cruce el umbral y empiece a detectarse. El Ct es inversamente proporcional a la cantidad de ácido nucleico en la muestra (cuanto mayor es el valor de Ct menor es la cantidad de ácido nucleico diana en la muestra). Los datos están expresados como media \pm s.e.m. (n=3)

f5

**FASE 5.- ESTUDIO DEL EFECTO BIOLÓGICO DEL
ANTAGOMIR-92a ENCAPSULADO SOBRE EL
REMODELADO VENTRICULAR ADVERSO.**

FASE 5.- A.- TAREA EXPERIMENTAL DE LA FASE 5

Comprobación de que el antagomir-92a encapsulado, administrado por vía intracoronaria, previene el desarrollo de remodelado adverso postIAM.

FASE 5.- B.- MATERIAL

f5B.1. Animales:

- *Adquirimos 30 animales Ellegaard Göttingen Minipigs[®], machos, de 12 meses de edad y de un peso medio entre 25 y 30 Kg del proveedor Ellegaard Göttingen Minipigs A/S, Soroe Landevei 302, DK-4261, Dalmoose (**Anexo 1**). Todos los animales llegaron de Dinamarca con un identificador azul con un número colocado en la oreja que mantuvimos, colocando en la oreja contralateral un identificador naranja con el número asignado en nuestro estabulario. Considerando el largo transporte y las recomendaciones de Ellegaard, el periodo de aclimatación y cuarentena fue de un mes, en esta fase del estudio.*
- ❖ **Corralinas:** *los animales fueron alojados, de dos en dos, en corralinas de 2 m² excepto el primer y segundo día postIAM, en que se dispusieron individualmente. Las características de las corralinas cumplieron con lo establecido en las directrices europeas y con las recomendaciones del productor de minipigs.*
- ❖ **Condiciones ambientales: ciclo de luz:** *12 horas de luz natural/12 horas de oscuridad; T^a entre 20-22°C; humedad relativa de 40-70%. Tanto la T^a como la humedad se monitorizaron de forma continua.*
- ❖ **Dieta:** *los minipigs fueron alimentados con la dieta específica SMP (Minipigs expanded–Código 801586) recomendada por la empresa Ellegaard Göttingen Minipigs A/S y suministrada por la empresa: Géralde FERDEL. DIETEX France, 7 rue Charles Michels, Argenteuil 95100 (**Anexo 2**). Fue administrada de forma restrictiva, 3 ingestas al día, de una hora cada una. No se proporcionó alimentación las 12 horas previas a los procedimientos ni en las primeras horas después de los mismos. El agua fue administrada del grifo ad libitum. Se realizaron los análisis periódicos siguiendo las directrices legales establecidas para garantizar la ausencia de contaminantes y de agentes infecciosos. Todos los controles fueron almacenados en nuestros archivos.*

f5B.2. Instrumentos y aparatos:

f5B.2.1. Preparación de las ME placebo y de las ME cargadas de antagomir-92a

- Descrito en la fase 2 (f2B1.1.) y en la fase 4 (f4B.2.1.) respectivamente.

f5B.2.2. Anestesia, intubación, monitorización e inducción de un IAM percutáneo reperfundido

- Se llevó a cabo siguiendo la misma metodología descrita en la fase 4 (f4B.2.3. y f4B.2.4.) con la excepción de que se utilizó un catéter AMI 5F en lugar de 6F para realizar la coronariografía izquierda e inducir el IAM.

f5B.2.3. Determinación de los enzimas de lesión miocárdica

- Troponina I (Trop I) New Generation Ref. 68898600EU (Alere™, Izasa Werfen Group).
- Triage MeterPro (Alere™, Izasa Werfen Group).

f5B.2.4. Ecocardiografía intravascular

- Introdutor 12F (Terumo® corporation, Tokyo, Japan).
- Catéter de ultrasonidos AcuNav™ 10F (Siemens, Malvern, USA).
- Ecocardiógrafo Vivid Q (GE Healthcare, Belford, UK).

f5B.2.5. Implantación de un holter subcutáneo

- Reveals® DX9528 y XT9528 y programador 9790 (Medtronic, Minneapolis, USA).
- Tallas, mosquitos, bisturí, tijeras de disección, suturas.

f5B.2.6. Evaluación de la permeabilidad de la LAD al mes postIAM

- Introdutor 7F (Terumo® corporation, Tokyo, Japan).
- Starter guidewire, "J" curved fixed core 0.035"/0.89mm de 150 cm (Boston Scientific International S.A., Nanterre Cedex, France).
- Catéter guía AMI 5F (Medtronic, Inc. Minneapolis, USA).
- Basix Compak™: inflador, válvula hemostática MBA y torque (Meritmedical Galway, Ireland).
- Kit manifold: sistema de inyección de contraste (Meritmedical, Galway, Ireland).
- Arco de Rx en C Arco si (IRE Rayos X, S.A. Madrid, España).

f5B.2.7. Estudio de la microcirculación al mes postIAM

- **Toracotomía y esternotomía:** bisturí, bisturí eléctrico, sierra eléctrica, tijeras, separador esternal, mosquitos y suturas.
- **Medición de la presión intracoronaria en la LAD distal:** starter guidewire "J", catéter guía AMI 5F, válvula hemostática, Kit manifold, arco de Rx, guía de presión PrimeWire (Volcano Therapeutics Inc., Zaventem, Bélgica), SmartMap pressure Guide Wire System (Volcano Therapeutics Inc., Zaventem, Bélgica).

- **Medición del flujo coronario:** flowmeter T206 (Transonic systems Inc.), lazos de goma Neo-LAC (Davis + Geck), powerlab/16 sp (ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Australia), osciloscopio Hameg HM 205-3 (Hameg instruments, S.L., Barcelona, España), Carrier Amplifier AP-601G.

f5B.2.8. Suspensión de los corazones

- Cubo con asa 4,5 L (S.G. Servicios Hospitalarios S. L.) y formol.

f5B.2.9. Necropsia y obtención de muestras

- Kit de necropsia completo.
- Punch Kai (Japan) y eppendorfs.

f5B.2.10. RMN ex vivo del corazón

- Resonancia Magnética Sigma 1,5 Tesla (GE Healthcare, Belford, UK).

f5B.2.11. Estudio histológico de la densidad vascular

- Microscopio Olympus BX41.
- Megaportas y microtomo.

f5B.2.12 Programas informáticos

- Software Collect 5S (GE Healthcare, Belford, UK).
- Software Image Pro Plus 4.5.0.29 (Media Cybernetics, USA).
- Software Chart 5 for Windows (ADInstruments, Colorado Springs, CO, USA).
- Software SigmaPlot (Systat Software Inc., UK).
- Programa estadístico "R".
- Programa SPSS 15.0.

f5B.3. Fármacos:

f5B.3.1. Grupos de tratamiento

- **Tabla 4. ME cargadas de antagomir-92a**

Identificación	Suspensión de ME cargadas de antagomir-92a
ME con antagomir-92a	<i>Polímero:</i> PLGA RG502H <i>% Antagomir-92a en microesferas:</i> 7% <i>Tamaño:</i> promedio: 9 µm 5 µm < 80% < 25 µm <i>Perfil de liberación:</i> 1-3 semanas con una remanencia de las ME de 4 semanas.
Concentración ME	3 mg de ME/ml
Antagomir-92a	I-Ssc-miR-92a (masa molecular: 5366 g/mol, secuencia CCGGGACAAGTGCAAT, bases DNA:9 y LNA:7, fabricante: IDT [Exiqon])
Dosis de antagomir / animal	3 mg de Antagomir-92a
Medio de suspensión	PBS 0.15M, Tween-80 0.01%

Volumen inyección	2 inyecciones de 5 y de 6 ml respectivamente
Metodología para su preparación	Descrita en la fase 4
Fecha de caducidad	30 min después de la preparación
Condiciones de almacenamiento	Tª ambiente

○ **Tabla 5. ME placebo**

Identificación	Suspensión de ME Placebo
Microesferas placebo	<i>Polímero:</i> PLGA RG502H <i>Tamaño:</i> promedio: 9 µm 5 µm < 80% < 25 µm
Concentración ME	3 mg ME/ml
Medio de suspensión	PBS 0.15M, Tween-80 0.01%
Volumen inyección	2 inyecciones de 5 y 6 ml respectivamente
Metodología para su preparación	Descrita en la fase 2
Fecha de caducidad	30 min tras la preparación
Condiciones de almacenamiento	Tª ambiente

○ **Tabla 6. Salino**

Identificación	Vehículo de suspensión
Medio de suspensión	PBS 0.15M, Tween-80 0.01%
Volumen inyección	2 inyecciones de 5 y 6 ml respectivamente
Fecha de caducidad	30 min tras la preparación
Condiciones de almacenamiento	Tª ambiente

f5B.3.2. Sedación e inducción anestésica

Al tratarse de animales adultos, el metabolismo de los fármacos anestésicos fue distinto respecto a los animales Large-White jóvenes que habíamos utilizado en los experimentos previos. Por ello, fue necesario reducir la velocidad de las perfusiones a la mitad:

- *Tiletamina-zolazepam 4 mg/Kg (Zoletil® 100, Virbac).*
- *Xilacina 2 mg/Kg (Xilagesic® 20%, Laboratorios Calier).*
- *Fentanilo 0.15 mg/3ml (Fentanest®, Kern Pharma) (5 µg/Kg bolus + infusión a 1.5 µg/Kg/h).*
- *Propofol 10 mg/ml (Propofol Lipuro 1%®, B Braun) (1.5-2.5 mg/Kg bolus + infusión a 5 mg/Kg/h).*

f5B.3.3. Inducción percutánea de un IAM reperfundido

- Además de los fármacos descritos en la fase 1 (f1B.3.2) puntualmente, cuando el animal presentó shock periprocedimiento, fue necesario administrar epinefrina (Adrenalina Level jeringas 1 ml, laboratorio ERN S.A.).

f5B.3.4. Implantación de un holter subcutáneo

- Povidona yodada (Betadine[®], MEDA, Spain).

f5B.3.5. Fase de estabulación de los animales

- Ácido acetilsalicílico 100 mg/día (Adiro[®], Bayer S.A., Bayer Bitterfeld GmbH).

f5B.3.6. Evaluación de la permeabilidad de la LAD al mes postIAM

- Contraste iomerol 370, 0.755 g/ml (Iopamiro[®], Bracco).

f5B.3.7. Estudio de la microcirculación al mes postIAM

- Adenosina 6mg/2ml vial (Adenocor[®], Aventis Pharma). Preparación de la perfusión de adenosina: 2 viales en 100 cc de suero fisiológico.
- Nitroglicerina 50 mg/10ml (Solinitrina[®] fuerte, Kern Pharma).

f5B.3.8. Estudio de la densidad vascular

- Tinciones de hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson.
- Parafina.

f5B.3.9. Sacrificio

- Tiopental sódico (Tiobarbital Braun 1 g, Braun Medical S.A., Barcelona).

FASE 5.- C.- MÉTODOS

El **Anexo 3** muestra un esquema de los procedimientos de esta fase del estudio.

f5C.1. Ecocardiografía intravascular (EIV).

Tras sedación intramuscular con tiletamina-zolazepam y xilacina, y anestesia intravenosa con propofol-lipuro y fentanest administrada a través de una vena auricular, los animales fueron intubados y monitorizados. A continuación, y por punción percutánea, se obtuvieron los accesos arteriales femorales colocando un introductor 5F en la arteria y uno 12F en la vena. Tras administrar 150 mg/Kg de heparina, avanzamos a través del introductor venoso la sonda endovascular, que posicionamos en el ápex del ventrículo derecho. Se colocó la sonda en la posición adecuada para obtener un plano longitudinal largo del VI de buena calidad y poder evaluar correctamente la motilidad apical y septal. La sonda se mantuvo en la misma posición durante todo el procedimiento, hasta retirarla 30 min postreperfusion. Se obtuvieron loops e imágenes bidimensionales basales, a los 30 min de la fase de isquemia, inmediatamente antes de reperfundir la LAD y durante la fase de reperfusión (**Fig.35**).

Un mes más tarde, antes del sacrificio, se repitió de nuevo la misma metodología. La presencia de discinesia septoapical fue evaluada. Todos los loops e imágenes grabadas fueron guardadas en un digital versatil disc (DVD), asignando el número del animal y fecha del estudio, y analizadas después por un ecocardiografista ciego a los procedimientos y al tratamiento asignado.

Las variables analizadas fueron: la fracción de eyección (FE) mediante la fórmula de Simpson y la variación de la FE entre el momento basal y al mes postIAM (Δ FE). Dichas variables fueron cuantificadas en 5 ciclos cardíacos consecutivos y sus valores promedios calculados.

Figura 35 Ecocardiografía intravascular. La EIV proporciona una imagen bidimensional longitudinal al eje mayor del catéter en un campo de 90°. Esta técnica nos permitió obtener un plano adecuado para nuestro experimento donde se podía visualizar la motilidad del septo y del ápex del VI. La sonda AcuNav fue introducida a través de un introductor venoso 12F y colocada en el ápex del ventrículo derecho. Se dejó colocada en la misma posición durante todo el procedimiento lo que nos permitió demostrar las alteraciones de la motilidad durante la fase de isquemia y obtener loops para calcular la FE basal, postIAM inmediato y durante la fase de perfusión.



f5C.2. Inducción percutánea de un IAM reperfundido

Tras realizar la EIV, se administró por vía intravenosa el acetilsalicilato de lisina 450 mg y se indujo el IAM siguiendo la metodología descrita en la fase 4. En esta fase, a parte del introductor venoso 12F utilizado para poder realizar la EIV y el catéter AMI 5F en lugar de 6F, el tiempo de oclusión del balón se prolongó a 60 minutos a partir del minipig 11 para incrementar las probabilidades de aparición de remodelado adverso. Si excepcionalmente fallaba la punción percutánea, los accesos vasculares se obtuvieron por disección inguinal. Todas las constantes vitales y curvas ECG quedaron registradas y almacenadas de forma continua, utilizando el software Collect 5S. La presencia de arritmias malignas, durante la isquemia o en la fase de perfusión, fueron tratadas con desfibrilación. Se decidió no administrar antiarrítmicos que pudieran interferir con el producto estudiado. Si las arritmias eran recurrentes, tanto taquicardias ventriculares sostenidas como fibrilación ventricular que requerían descargas repetidas, administramos un bolus extra de 3 ml de fentanilo con la finalidad de atenuar el estrés del animal como posible trigger arrítmico.

f5C.3. Demostración de la inducción del IAM

Para demostrar la inducción de un infarto homogéneo, en todos los grupos de tratamiento, se cuantificaron los enzimas cardíacos (Trop I basal, postinfarto inmediato y a las 6 horas) mediante el Alere® Triage MeterPro (Fig.36). La medición basal se realizó en una muestra sanguínea extraída justo después de obtener los accesos arterial y venoso; la medición postinfarto, en una muestra sanguínea obtenida en el último minuto de la fase de isquemia. Para cuantificar las Trop I y T a las 6 horas se obtuvo una muestra venosa a través del abocath auricular o bien por punción yugular, en aquellos casos en que la vía ya había sido extraída. La determinación de troponina T (Trop T) a las 6 horas se realizó en el laboratorio de nuestro centro, tras comprobar que el Triage MeterPro no cuantifica valores >10.



Figura 36 Alere Triage® MeterPro. El Alere Triage® MeterPro es una plataforma de pruebas diagnósticas rápidas que se realizan en el punto de atención al paciente. En nuestro experimento permitió realizar en el mismo quirófano determinaciones rápidas del nivel de Troponina I para confirmar enzimáticamente la presencia de lesión miocárdica. Se obtenía una muestra de sangre venosa. Con una pipeta del sistema se obtenía la alícuota exacta para la determinación, que se colocaba en una tarjeta de inmunoensayo. Tras 15 minutos de espera a temperatura ambiente, mientras se producía la reacción, dicha tarjeta era introducida en una ranura y en pocos minutos disponíamos del resultado. Inicialmente los tests se realizaron por duplicado para verificar la calidad de los mismos y su reproducibilidad en el modelo porcino.

Para cuantificar la repercusión contráctil derivada del IAM se calculó la FE (método de Simpson) postIAM inmediato y postreperusión, a partir de los loops obtenidos por EIV (Fig.37).

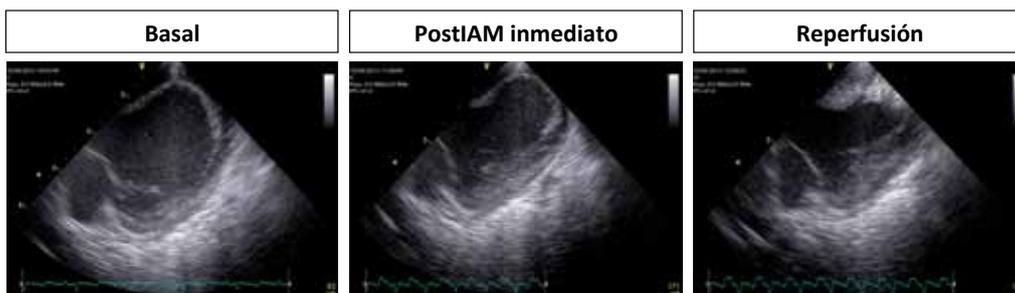


Figura 37 Análisis de la contractilidad del VI. Se obtuvieron loops de un plano longitudinal largo del VI. Utilizando el método de Simpson se calcularon el volumen telediastólico y telesistólico del VI y se calculó la fracción de eyección. Las mediciones se realizaron en el momento basal, una vez obtenidos los accesos vasculares e introducida la sonda Acunav en el ápex del ventrículo derecho, en la fase de isquemia justo en el último minuto de oclusión del balón y en la fase de reperusión, 15 minutos tras repermeabilizar la LAD.

f5C.4. Administración del fármaco: grupos de tratamiento y vía de administración

Tras la inducción del IAM, los animales fueron randomizados a recibir antagonir-92a encapsulado, ME placebo o salino. El programa estadístico "R" fue utilizado para la randomización.

Un técnico de la empresa Pierre-Fabre, ciego a la ejecución de los experimentos, transportó el tratamiento desde Pierre-Fabre (Pierre-Fabre Ibérica S.A. carretera de cerdanyola, Cerdanyola del vallès) hasta nuestro quirófano del estabulario.

En cada caso, se administró el tratamiento asignado en 2 inyecciones de 5 y 6 ml cubiertas de papel de plata, siendo así la administración ciega para todo el equipo investigador (**Fig.38**). Cada inyección fue arrastrada por 5 ml de suero fisiológico. El tratamiento fue administrado por vía intracoronaria, a través del balón coaxial desinflado, a los 5 minutos de reperfundir la LAD. La presencia de arritmias, cambios ECG o hemodinámicos durante la administración del tratamiento fue registrada y analizada.



Figura 38 Administración del fármaco asignado. Justo antes de la administración del tratamiento asignado, éste era resuspendido en PBS 0.15M y Tween-80 0.01% y dispuesto en 2 jeringas de 10 ml hasta completar 5 ml en una y 6 ml en la otra. Dichas jeringas eran cubiertas de papel de plata, de forma que la inyección del producto era ciega para los investigadores que realizaban el procedimiento. Las dos inyecciones se administraron a través del extremo distal del balón coaxial, tras aspirar y confirmar la llegada de sangre a través de la luz del sistema y eliminar las posibles burbujas de aire. Cada inyección de fármaco administrada fue arrastrada por 5 ml de suero fisiológico.

Al finalizar la administración del tratamiento, retiramos el balón y la guía intracoronaria y comprobamos el flujo coronario en la LAD y su grado utilizando la escala TIMI (Hackworthy et al., 1988) que brevemente se resume en TIMI 0: la arteria queda ocluída, TIMI 1: la arteria queda con un flujo muy pobre, TIMI 2: la arteria se rellena por completo aunque con una velocidad inferior al de la arteria circunfleja y TIMI 3: la arteria queda con un flujo idéntico al de la arteria circunfleja.

f5C.5. Implantación de un holter implantable subcutáneo

Para evaluar el potencial arritmogénico asociado al tratamiento con antagomir-92a, se decidió implantar un holter subcutáneo a un subgrupo de animales. Conforme íbamos disponiendo de Reveals[®] con batería suficiente explantados de pacientes, llevamos a cabo la implantación, que se decidía antes de iniciar el procedimiento, de una forma aleatoria y ciega al tratamiento asignado.

La implantación se realizó a nivel subcutáneo, justo donde mejor se percibía el latido cardíaco, que correspondía al ápex del ventrículo izquierdo (**Fig.39**). Se desinfectó la zona con agua, jabón y a continuación con povidona yodada. Se realizó una incisión de 2 cm y se generó una bolsa de disección donde se introducía el dispositivo.

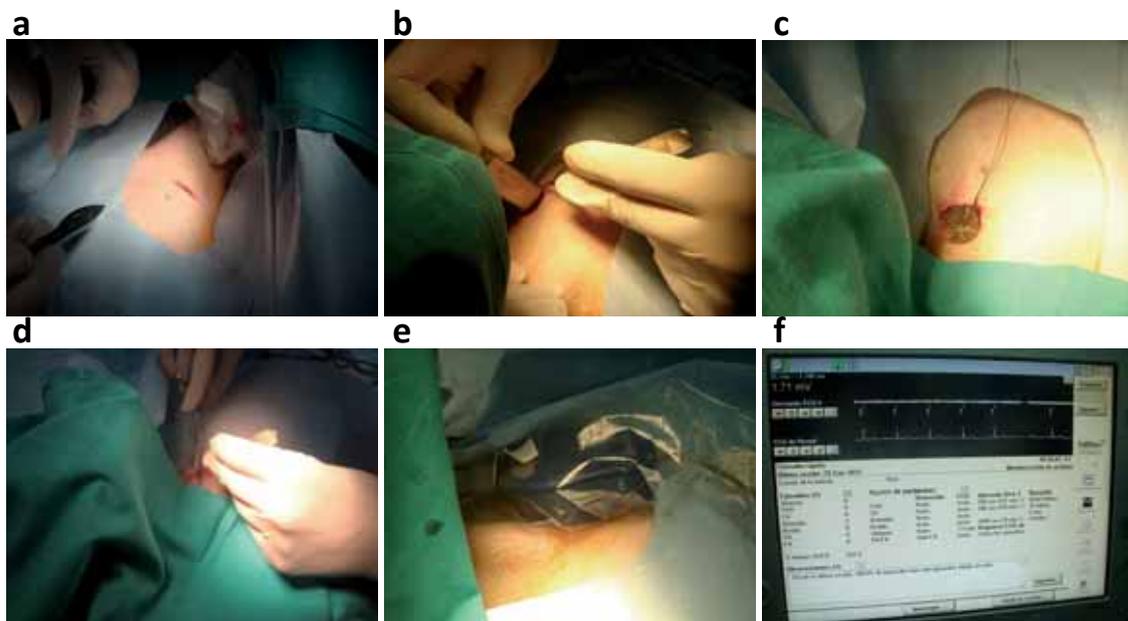


Figura 39 Implantación de un Holter implantable subcutáneo. El dispositivo Reveal tiene el aspecto de un generador de marcapasos aunque de menor tamaño (53 x 60 x 8 mm) y 17 g de peso. Dispone de dos pequeñas placas en su superficie las cuales actúan como electrodos a través de los que se registra una derivación electrocardiográfica que es almacenada en una memoria continua, de tipo bucle. La información almacenada es recuperada por medio de telemetría y puede imprimirse a través del programador. La implantación se llevó a cabo justo por encima de la punta cardíaca. Es suficiente para obtener un alojamiento adecuado una incisión de 1 a 1,5 cm (**a**) y una disección roma en la dirección establecida (**b y c**). Una vez suturado e implantado el sistema Reveal (**d**) se debe comprobar el electrograma registrado lo que se realiza por medio del programador 9790 a través de telemetría con el cabezal de programación situado sobre el dispositivo (**e y f**).

Se constataba que el latido cardíaco era detectado y se programaron los siguientes parámetros (**Tablas 7 y 8**):

Tabla 7. Parámetros de programación del holter subcutáneo

TVR	300 ms (200 lpm)	30/40 latidos
Taquicardia ventricular	340 mseg (176 lpm)	16 latidos
Asistolia		3 seg
Bradycardia	2000 ms (30 lpm)	4 latidos
Taquicardia auricular/ Fibrilación auricular (Reveal XT)	Activa	

Tabla 8. Umbrales de detección de arritmias

Sensibilidad	0.035 mV
Cegamiento tras detección	150 ms
Retraso en caída umbral de detección	150 ms

f5C.6.- Extubación, traslado del animal a la corralina y seguimiento

Una vez completado el procedimiento, y tras verificar estabilidad hemodinámica y eléctrica del animal, procedimos a suspender la anestesia. Antes de despertarlo, se le colocó un parche de fentanilo, y una vez despierto, fue trasladado a la corralina. El primer y segundo día, los animales se mantuvieron en una corralina con toma de O₂ y placa térmica para favorecer la recuperación tras la intervención. Se inició ingesta líquida 4 horas postIAM. Dos veterinarias controlaron a los animales, inicialmente con una frecuencia adaptada a las necesidades de cada uno y después 2 veces al día, hasta completar un total de 30 días postIAM. Se midieron la T^a, SatO₂, FC y se exploraron zonas de punción y heridas quirúrgicas. Los animales recibieron Adiro[®] 100 mg diariamente por vía oral. Todas las variables fueron recogidas en las hojas de monitorización y archivadas para su posterior análisis.

En caso de aparición de criterios de punto final el animal sería sacrificado. Se consideraron criterios de punto final:

- ❖ Si el animal presenta una infección de la herida que le produce sufrimiento.
- ❖ Si el animal presenta signos de dolor incontrolado farmacológicamente.
- ❖ Si el animal presenta complicaciones tras el IAM que le condicionan dolor, disnea o si el tratamiento con antagomir-92a genera efectos adversos mayores.

- ❖ Si el animal presenta datos de muerte predecible.
- ❖ Si el animal presenta signos de estrés y sufrimiento (pérdida de peso, caquexia, deshidratación, diarreas, anuria, rigidez abdominal, apatía, sangrado, ataxia, blefarospasmo o ulceración corneal, disnea, tos, cianosis, T^a anormal, automutilación, comportamiento compulsivo, convulsiones o coma).

f5C.7.- Evaluación de la permeabilidad coronaria de la LAD al mes postIAM

Al mes postIAM, los animales fueron de nuevo anestesiados, intubados y monitorizados siguiendo la misma metodología que en la fase de inducción del IAM. De nuevo, un introductor 7F fue insertado en la arteria femoral, a través del cual avanzamos una guía de teflón, y a continuación el catéter guía AMI 5F para intubar selectivamente el tronco común. Se repitió una nueva coronariografía del sistema izquierdo (**Fig.40**). El Qc de la LAD fue evaluado mediante la escala TIMI y registrado (Hackworthy et al., 1988).

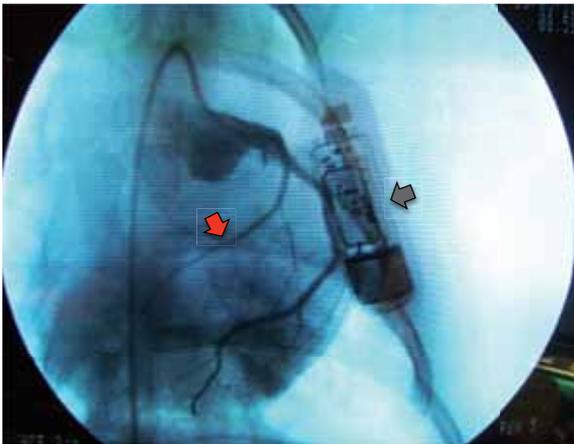


Figura 40 Permeabilidad de la LAD al mes. Un mes postIAM y postratamiento, el animal fue anestesiado e intubado de nuevo. Por vía percutánea realizamos una coronariografía izquierda de control, con el mismo catéter utilizado para inducir el IAM, un AMI 5F. El Qc en la LAD fue evaluado utilizando la escala TIMI (flecha roja). También se analizaron las características de dicha arteria en cuanto a calibre y presencia de estenosis secundarias al inflado del balón en la fase de inducción del IAM. En la imagen puede apreciarse también el Reveal® implantado 30 días antes que fue extraído a continuación para analizar posibles arritmias en el seguimiento (flecha gris).

f5C.8. Estudio de la microcirculación al mes postIAM

Para evaluar la microcirculación calculamos las resistencias microvasculares (TMR) (Fearon et al., 2003). Su cálculo lo realizamos a partir de las mediciones de la presión distal en la LAD (Pd) y del Qc (**Fig.41**). Para obtener estas medidas, una vez evaluada la permeabilidad de la LAD, se llevó a cabo la toracotomía media y pericardiectomía siguiendo la misma metodología descrita en la fase 1. Tras ello, se llevó a cabo una disección focal de 5-10 mm en el segmento medio de la LAD. Se colocó un sensor de flujo y se midió el Qc basal mediante un sistema

electromagnético, una vez que el valor se mantenía estable en el tiempo. A continuación, se avanzó de nuevo el catéter guía canulando selectivamente el tronco común y a través de él se avanzó la guía de presión Primewire hacia la LAD. Se empezó normalizando la presión entre el catéter y la guía, colocando el sensor de la guía justo en el extremo distal del catéter y después se posicionó la guía en la LAD apical, donde efectuamos la medición de la Pd intracoronaria basal. El TMR basal se calculó= Pd/Qc . Para conocer la resistencia mínima de la microcirculación (TMR_{hyp}) se indujo hiperemia máxima administrando 200 mcg de nitroglicerina intracoronaria y una perfusión intravenosa continua de adenosina a 140 $\mu g/Kg/min$, a través del introductor femoral. A los 5 minutos del inicio de la perfusión, se volvieron a medir tanto el Qc_{hyp} como la Pd_{hyp} y se calculó la $TMR_{hyp} = Pd_{hyp} / Qc_{hyp}$.

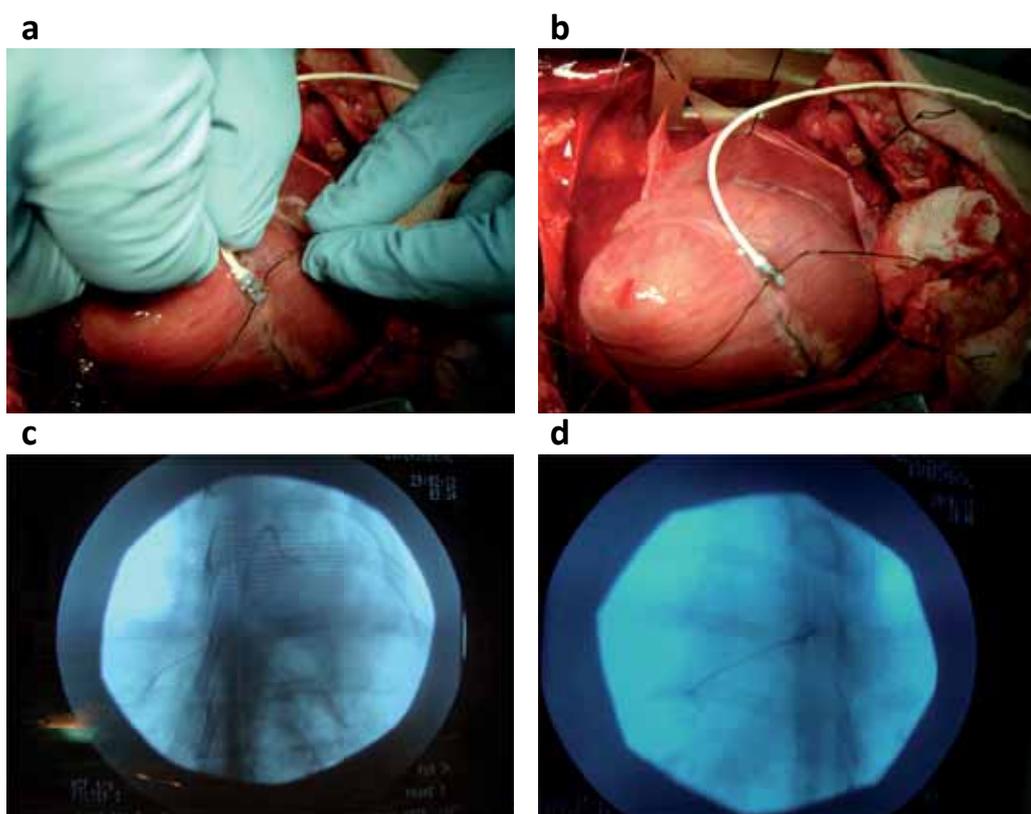


Figura 41. Estudio de la microcirculación coronaria. Para conocer la resistencia de la microcirculación se midió el Qc implantando un sensor de flujo en la LAD media (a y b) y la presión coronaria a nivel distal colocando una guía de presión Primewire (Volcano Therapeutics Inc.) que se avanzó hasta el segmento más distal de la LAD (c). En la imagen de fluoroscopia (d) puede observarse tanto la guía en la LAD distal como el sensor radiopaco que aparece en su segmento medio.

f5C.9. Extracción del holter subcutáneo

Antes del sacrificio, se realizó la lectura del Holter y toda la información almacenada fue grabada en un USB externo. Se imprimieron también los registros de los eventos arrítmicos producidos, para ser analizados por un arritmólogo ciego a los experimentos y al tratamiento asignado.

f5C.10. Necropsia y evaluación macroscópica de los órganos

Una vez sacrificado el animal, con sobredosis de tiopental, se realizó una necropsia completa y sistemática (**Fig.42**). El animal fue colocado en decúbito dorsal. La necropsia empezó con un examen externo donde observamos la piel para identificar lesiones, coloraciones anormales etc... A continuación, realizamos una incisión por la línea media desde la mandíbula hasta el pubis. Retiramos la piel cortando el plexo axilar y el plexo de la región inguinal. Desarticulamos la unión coxofemoral de ambos miembros posteriores colocándolos en posición paralela al cuerpo.

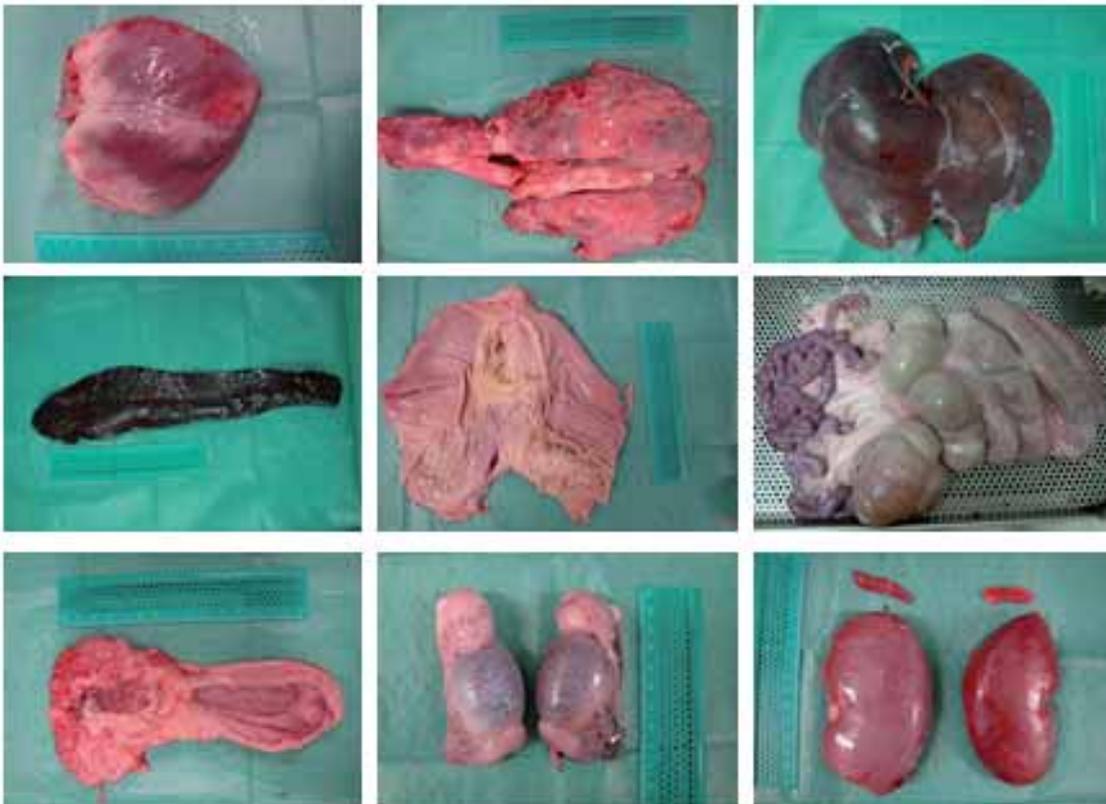


Figura 42 Necropsia de los animales. Realizamos una necropsia completa y sistemática a todos los animales del estudio anotando la fecha y el número de animal correspondiente. Tras colocar al animal en decúbito dorsal se realizó una inspección externa completa analizando la piel, mucosas. A continuación se efectuó una incisión sobre la línea media desde el extremo anterior de la mandíbula hasta la sínfisis púbica. Se revisó el tejido subcutáneo, muscular y nódulos linfoides explorables. Proseguimos con la apertura e inspección de las cavidades, tanto la torácica como la abdominal y pélvica. Ello nos permitió extraer todos los órganos, que fueron inspeccionados y pesados. Se tomaron 4 muestras de hígado, bazo, pulmón y riñón, dos de ellas se congelaron a -80 grados y las dos restantes se conservaron en formol.

Después, procedimos a abrir cavidades, tanto la torácica como la abdominal, examinando la posición de las vísceras y las características de sus líquidos presentes. A nivel de la cavidad torácica, cortamos el esófago en toda su longitud desprendiendo el conjunto de órganos. Hicimos lo mismo con la laringe, tráquea y pulmones. Examinamos el corazón. A nivel de la cavidad abdominal, el aparato digestivo se

extrajo *in toto* e *in situ*. Desprendimos las inserciones con la parte posterior de la cavidad, permitiendo retirar el estómago y las asas intestinales en forma conjunta. Desprendimos el bazo, el hígado y los riñones. Extraímos también las vísceras pélvicas, tanto urogenitales como digestivas. Para ello, cortamos la pelvis por debajo del acetábulo y la sínfisis púbica. Todos los órganos fueron pesados, escindidos y analizados, en busca de posibles tumores vasculares. Se obtuvieron 2 muestras de hígado, bazo, pulmón y riñón que fueron congeladas a -80°C y 2 muestras que se conservaron en formol. Todas las muestras fueron identificadas con el número del animal y fecha de sacrificio.

f5C.11. RMN del corazón *ex vivo*

Una vez extraído el corazón, lo rellenamos de gasas con formol para mantener su estructura y lo introducimos en un recipiente con formol. Lo mantuvimos suspendido mediante 2 suturas insertadas a nivel aórtico y ligadas a nivel del asa del recipiente, para evitar contacto con ninguna de las superficies del recipiente durante un mínimo de 2 semanas (**Fig.43**).



Figura 43 Corazón *ex vivo* suspendido en formol. Para mantener la estructura del corazón y poder realizar mediciones de la cavidad ventricular izquierda, tras su excisión, éste fue suspendido en un recipiente con formol. Para evitar contacto con la superficie que pudiera distorsionar su arquitectura cosimos una sutura a nivel de la salida de los grandes vasos y la ligamos a ambas asas del recipiente. Además, administramos inyecciones de formol a través de la válvula aórtica y pulmonar y a través de la vena cava superior. También introdujimos, con la ayuda de unas pinzas, gasas pequeñas hasta rellenar ambos ventrículos.

A partir de los 15 días se efectuó una RMN cardíaca. Se realizaron cortes ortogonales desde el ápex hasta la base del corazón, obteniéndose secuencias en T1 y T2. Las imágenes fueron analizadas por un radiólogo y un cardiólogo ciegos al tratamiento asignado. A cada corte obtenido se le asignó el nombre de loncha (L) y un número de 1 a 6, desde el ápex a la base. Se analizaron el número de lonchas afectadas en cada animal. En cada loncha afectada por el infarto se cuantificaron los siguientes parámetros (**Fig.44**):

❖ A nivel de la cicatriz:

- Espesor mínimo y máximo (T_{\min} y T_{\max}): se calculó sumando el espesor mínimo y máximo de la cicatriz respectivamente de cada L afectada por el infarto y dividiéndolo por el número total de lonchas con infarto en cada animal.

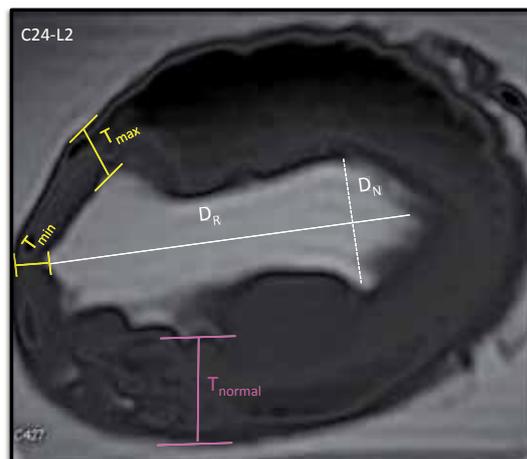
❖ A nivel de la pared miocárdica normal:

- Espesor de la pared normal (T_{normal}) a nivel de la pared posterior, justo donde se inserta el músculo papilar. Se calculó sumando los espesores de la pared posterior de cada L afectada por el infarto dividida por el número de lonchas afectadas.

❖ A nivel de la cavidad:

- D_R : diámetro del ventrículo desde el punto más expandido de la cicatriz hasta la pared normal contralateral.
- D_N : diámetro perpendicular a D_R que va de pared sana a pared sana del VI y que pasa lo más próximo al centro de la cavidad.

Figura 44 Parámetros medidos en la RMN cardíaca *ex vivo*. Tras escindir el corazón se realizó una RMN cardíaca para realizar una evaluación estructural y anatómica. Se obtuvieron cortes sagitales desde el ápex a la base del corazón. En esta imagen representativa de un corte ortogonal obtenido mediante secuencia potenciada en T2 podemos apreciar las mediciones que se realizaron en cada corte: T_{\min} : corresponde al espesor mínimo de la cicatriz, T_{\max} : espesor máximo de la cicatriz, T_{normal} : espesor de la pared ventricular normal justo donde se inserta el músculo papilar posterolateral. A nivel de la cavidad VI se midió el diámetro máximo entre el punto más expandido de la cicatriz y la pared contralateral normal (D_R) y el diámetro máximo entre paredes normales (D_N), perpendicular a D_R y que pasa lo más próximo posible al centro de la cavidad.



A partir de estas variables se calcularon:

❖ A nivel de la cicatriz:

- Porcentaje medio de adelgazamiento mínimo: $[100 - (T_{\max}/T_{\text{normal}} \times 100)]$
- Porcentaje medio de adelgazamiento máximo: $[100 - (T_{\min}/T_{\text{normal}} \times 100)]$

❖ A nivel de la cavidad:

- Índice de esfericidad $\sum D_R/D_N$

f5C.12. Análisis histológico de las muestras cardíacas.

Una vez realizada la RMN cardíaca, los corazones fueron seccionados en 5 L desde el ápex (L1) hasta la base (L5) (Fig.45 y Fig.46). A continuación, cada una de las L por separado fueron incluidas en parafina. De cada una de ellas, se obtuvo un microcorte de 4 micras que se colocaron en megaportas. Se realizaron tinciones de hematoxilina-eosina y tinciones de tricrómico de Masson.



Figura 45 Fotografía del corazón ex vivo. Una vez sacrificado el minipig, se seccionó el corazón, se pesó y se analizaron sus características macroscópicas. Puede apreciarse en la fotografía el aspecto blanquecino de la región infartada anteroapical. Se observa un adelgazamiento respecto a la zona colindante no infartada. También se aprecia el pequeño segmento de disección de la LAD media realizada para evaluar el flujo coronario.



Figura 46 Lonchas del corazón. Una vez excindido el corazón, éste fue seccionado en 5 lonchas utilizando un aparato específicamente diseñado para realizar cortes ortogonales, paralelos y del mismo grosor cada uno (10 mm).

Los megaportas teñidos con tricrómico de Masson identificaron con claridad la cicatriz y se utilizaron para realizar el conteo de vasos (**Fig.47**). Mediante microscopio óptico con amplificación x10 se efectuó un conteo de todos los vasos presentes en la cicatriz. Se utilizó el método de conteo de cuadros.

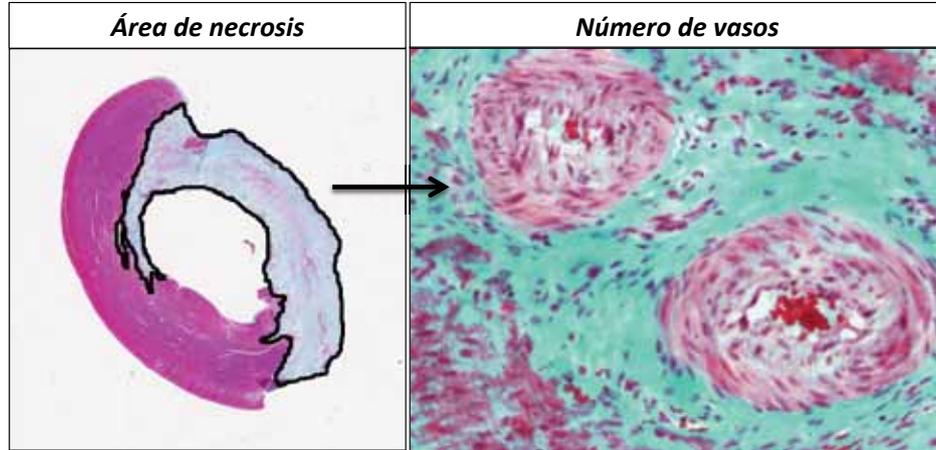


Figura 47 Densidad vascular. La densidad vascular fue calculada dividiendo el número total de vasos entre el área total de cicatriz y fue expresada como vasos/mm². Los vasos fueron cuantificados visualizando las muestras miocárdicas teñidas con tricrómico de Masson con microscopio óptico, utilizando el método de conteo de cuadros para lo cual se utilizó papel milimetrado. Las secciones fueron examinadas en su totalidad a un aumento de x10. El área de necrosis se calculó utilizando el software Image proPlus capaz de delimitar el área verde-azul en todas las secciones histológicas afectadas por el IAM, que se diferencia bien del miocardio normal. El área total de la cicatriz se obtuvo sumando todas las áreas de necrosis individuales de cada sección histológica.

Asimismo, los megaportas fueron escaneados y mediante el programa Image Pro Plus se delimitó el área necrótica y se calculó su extensión en cm². Para calcular la densidad vascular, dividimos el número total de vasos entre el área total de la cicatriz.

f5C.13. Análisis estadístico

Cálculo del tamaño de la muestra: aceptando un riesgo alfa de 0.001 corregido para comparaciones múltiples por el método de Bonferroni, y un riesgo beta de 0.20 en un contraste bilateral, se precisan 8 animales en cada uno de los tres grupos de tratamiento, para detectar una diferencia igual o superior a 9 unidades porcentuales en la fracción de eyección entre el valor basal y a las 4 semanas. Se asume que la desviación estándar común es de 5 unidades porcentuales, y un coeficiente de correlación entre la medida inicial y final de 0.7. Se ha estimado una tasa de pérdidas de seguimiento del 20% debido al fallecimiento de algunos animales.

Todas las variables del estudio fueron recogidas en una base de datos, con el programa SPSS 15.0. Las variables cuantitativas se presentan como media \pm s.e.m.

Para comparar variables cuantitativas entre los 3 grupos de tratamiento, utilizamos el test de ANOVA y Bonferroni post-hoc, y los test de Kruscal-Wallis and U-Mann-Whitney cuando no se cumplían los criterios de distribución normal. Las variables cualitativas se presentan como porcentaje. La comparación de medias entre los 3 grupos se realizó mediante el test de Chi-cuadrado. Una $p < 0.05$ fue considerada significativa. Se utilizó el paquete SPSS 15.0 para realizar los cálculos estadísticos.

FASE 5. D.- RESULTADOS

f5D.1.- Diagrama de flujo

De los 30 animales adquiridos, 2 animales murieron por consecuencias derivadas del estrés del transporte y otro tuvo que ser sacrificado por una infección grave. Finalmente, 27 animales fueron incluidos y aleatorizados a cada uno de los 3 grupos de tratamiento del estudio (**Fig.48**). El primer animal de este grupo de experimentos, asignado a salino, tuvo que ser excluido de los análisis al incumplir con la metodología descrita, en cuanto al balón utilizado y tiempo de oclusión, con consecuencias que podrían influir en los resultados.

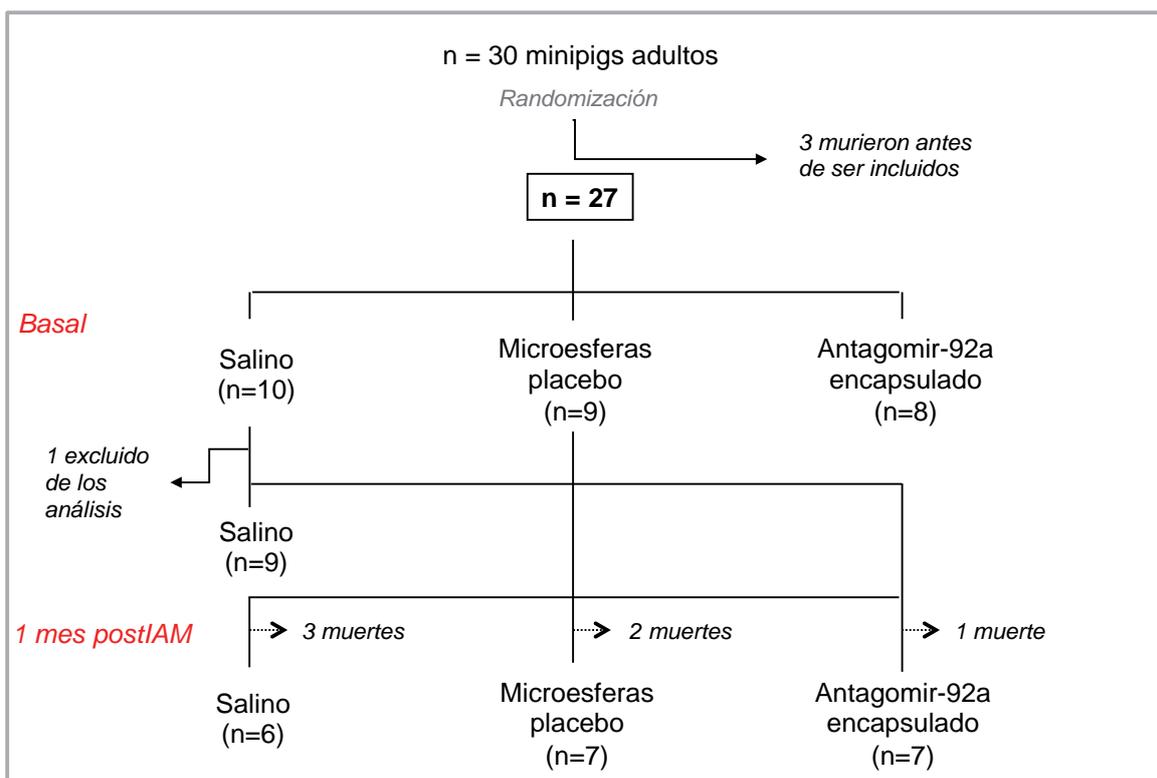


Figura 48 Diagrama de flujo del estudio.

f5D.2.- Mortalidad del estudio

20 animales completaron el mes de seguimiento, siendo sacrificados a los 33±4 días. La mortalidad global del estudio fue del 23%. Las causas de mortalidad están representadas en la tabla (**Tabla 9**) y en la (**Fig.49**). No detectamos diferencias en la mortalidad entre los grupos ($p=0.59$).

	Salino (n=9)	ME placebo (n=9)	Antagomir-92a encapsulado (n=8)	p
Mortalidad en la fase isquémica, n (2 de 26= 7.7%)	0	2	0	0.13
Causas de mortalidad, n				
• Hemorragia retroperitoneal		1		
• Tormenta arrítmica		1		
Mortalidad en la fase de reperfusión, n (2 de 24= 8.3%)	2	0	0	0.16
Causas de mortalidad, n				
• Shock cardiogénico secundario a trombo en el tronco común.	1			
• Bradicardia y asistolia	1			
Mortalidad durante los 30d postIAM, n (2 de 22= 9.1%)	1	0	1	0.59
Causas de mortalidad, n				
• Muerte súbita (probable arritmia. No se observaron signos de IC o complicaciones mecánicas postIAM en la necropsia)	1			
• IC			1	
Mortalidad global, n (6 de 26=23%)	3	2	1	0.59

Tabla 9 Causas de mortalidad del estudio. ME: microesferas, 30d: 30 días, IC: insuficiencia cardíaca.

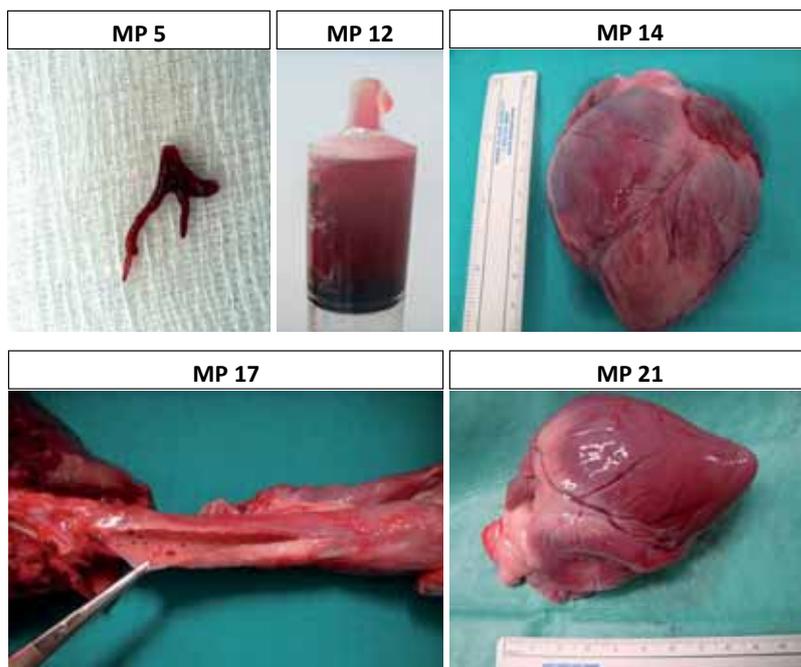


Figura 49 Mortalidad y causas.

El minipig (MP) 5 murió por la impactación de un trombo en el tronco común en el momento de la reperfusión, como pudo objetivarse en la necropsia; el MP 12 por una hemorragia retroperitoneal y hemoperitoneo yatrógeno secundaria a la punción femoral; el MP 14 por tormenta arrítmica; el MP 17 por IC con presencia de líquido rosáceo patológico en la tráquea y edema en los pulmones; el MP 21 murió de bradicardia y asistolia postIAM sin un desencadenante claro; el MP 13 murió en la corralina durante la madrugada del 1^{er} día postIAM sin observar complicaciones mecánicas en la necropsia.

f5D.3. Características basales de los animales

No detectamos diferencias estadísticamente significativas en las características basales de los animales entre los grupos de tratamiento del estudio (**Tabla 10**).

	Salino (n=9)	ME placebo (n=9)	Antagomir-92a encapsulado (n=8)	p
Edad, meses	12.6±1	12.2±0.7	12.4±0.8	0.96
Machos, %	100	100	100	--
Peso, Kg	24.5±1.7	27.3±1.8	26.8±1.3	0.42
FC, latidos/min	82±8	73±7	86±9	0.49
Presión arterial, mmHg				
• Sistólica	123±6	118±6	117±8	0.79
• Diastólica	75±5	65±3	73±6	0.27
Sat O₂, %	97.6±0.8	98.2±0.6	97.2±1	0.67
CO₂, mmHg	38.7±1.6	36.2±1.1	35.2±1.5	0.25
T^a, °C	36.3±0.4	36.5±0.3	36.7±0.4	0.74
Hematocrito, %	30.5±1.5	28.7±1.7	28.4±1.6	0.61
Creatinina, mg/dL	0.78±0.03	0.77±0.05	0.79±0.03	0.93
Tamaño de la LAD††, n(%)				0.46
• Pequeña	2(22.2)	0(0)	1(12.5)	
• Mediana	3(33.3)	2(22.2)	1(12.5)	
• Grande	1(11.1)	5(55.6)	3(37.5)	
• Muy grande	3(33.3)	2(22.2)	3(37.5)	

Tabla 10 Características basales de los animales. ME: microesferas, FC: frecuencia cardíaca, SatO₂: saturación de oxígeno, CO₂: presión parcial de dióxido de carbono (capnografía), ††Tamaño de la LAD: LAD pequeña: no alcanza el ápex del VI, LAD mediana: alcanza el ápex pero sin girar, LAD grande: gira hacia la cara posterior irrigando todo el ápex, LAD muy grande: irriga parte del septo posterior. Los datos están expresados como media ± s.e.m.

f5D.4. Inducción de un IAM comparable en los tres grupos de tratamiento

En todos los animales se obtuvieron los accesos por punción, excepto en 2 casos (minipig 19 que recibió antagomir-92a encapsulado y minipig 23 que recibió ME placebo) que precisaron disección de la región inguinal, tras punción arterial fallida.

La elevación de enzimas miocárdicos (**Tabla 11**) así como la contractilidad al finalizar la inducción del infarto (**Tabla 12**) fueron similares en los 3 grupos de tratamiento, de lo que se puede deducir que se indujeron infartos de similar extensión en los tres grupos.

	Salino (n=9)	ME placebo (n=9)	Antagomir-92a encapsulado (n=8)	P
Trop I basal, ng/ml (n=26)	0.03±0.006	0.02±0.004	0.02±0.009	0.32
Trop I postIAM, ng/ml (n=26)	0.4±0.13	0.3±0.07	0.2±0.06	0.16
Trop I 6h, ng/ml (n=22)	>10	>10	>10	--
Trop T 6h, ng/ml (n=22)	3.7±1	4.7±0.7	4.3±0.6	0.87

Tabla 11 Enzimas cardíacos. ME: microesferas, Trop I: troponina I, Trop T: troponina T. Los datos están expresados como media ± s.e.m.

	Salino (n=9)	ME placebo (n=9)	Antagomir-92a encapsulado (n=8)	P
FE VI MOD A4C basal, %	72.6±9.2	71.9±8.5	68.1±5.9	0.52
CO MOD AAC basal, l/min	2.3±0.2	1.9±0.3	1.6±0.3	0.22
FE VI MOD A4C postIAM, %	47.9±4	52.3±4.8	51.7±3.4	0.72
CO MOD A4C postIAM, l/min	1.8±0.2	1.8±0.4	1.7±0.2	0.92
FE VI MOD A4C reperfusión, %	56.4±3.4	53.4±4.5	59.1±3.5	0.6
CO MO A4C reperfusión, l/min	1.6±0.2	1.4±0.2	2±0.6	0.49

Tabla 12 Contractilidad del VI. ME: microesferas, FE VI: fracción de eyección del VI, MOD: método de discos; A4C: plano ecocardiográfico de 4 cámaras. Los datos están expresados como media ± s.e.m.

f5D.5. Permeabilidad de la LAD

El grado TIMI en la LAD fue similar en todos los grupos, tanto al finalizar la administración del tratamiento como al mes postIAM (**Tabla 13**).

	Salino	ME placebo	Antagomir-92a encapsulado	P
TIMI basal (n=26) • 3, n(%)	n=9 9 (100)	n=9 9 (100)	n=8 8 (100)	--
TIMI postIAM y postto (n=26) • 1, n(%) • 2, n(%) • 3, n(%) • No evaluable, n(%)	n=9 1 (11.1) 2 (22.2) 6 (66.7) 0	n=9 0 2 (22.2) 6 (66.7) 1 (11.1)	n=8 0 4 (50) 3 (37.5) 1 (12.5)	0.52
TIMI 1 mes postIAM (n=20) • 0, n(%) • 1, n(%) • 2, n(%) • 3, n(%)	n=6 1 (16.7) 0 0 5 (83.3)	n=7 1(14.3) 0 0 6 (85.7)	n=7 0 0 1 (14.3) 6 (85.7)	0.57

Tabla 13 Flujo TIMI en la LAD. Brevemente flujo TIMI 0: LAD ocluida, TIMI 1: flujo muy pobre sin rellenarse el vaso principal, TIMI 2: la LAD se rellena por completo pero con una velocidad inferior a la de la arteria circunfleja, TIMI 3: la LAD presenta un flujo normal con una velocidad igual al de la arteria circunfleja. El flujo TIMI no puede ser valorado en 2 casos tras el IAM y tratamiento (postto) por presentar dichos animales shock e hipotensión severa.

f5D.6. Variables hemodinámicas y analíticas al mes postIAM

Al mes de seguimiento, se observó una tendencia a tener una menor frecuencia cardíaca en el grupo tratado. No se observaron diferencias en el crecimiento del animal ni en el resto de parámetros hemodinámicos. No se observó insuficiencia renal durante el estudio (**Tabla 14**).

	Salino (n=6)	ME placebo (n=7)	Antagomir-92a encapsulado (n=7)	P
Edad, meses	14.2±1.4	14.1±0.7	13.9±0.8	0.97
Peso, Kg	25.8±3.4	28.4±3	27.1±2	0.82
ΔPeso 1m, Kg	0.7±1.9	0.5±1.3	-0.7±1.6	0.81
FC, latidos/min	100±14.3	84±8	75±3.7	0.18
Presión arterial, mmHg • Sistólica • Diastólica	96.9±9.8 58±7	119±8.1 69±5.6	119±7.1 68±6.2	0.12 0.43

	Salino (n=6)	ME placebo (n=7)	Antagomir-92a encapsulado (n=7)	p
Sat O ₂ , %	98.2±0.7	97.9±0.6	97.4±1	0.81
CO ₂ , mmHg	35.2±1.9	36.8±2.3	35±1.8	0.78
T ^a , °C	36.7±0.09	35.9±0.42	36.7±0.6	0.45
Hematocrito, %	22.9±0.97	24.8±1.15	25.4±2.16	0.56
Creatinina, mg/dL	0.74±0.09	0.77±0.07	0.79±0.05	0.87

Tabla 14 Parámetros hemodinámicos y analíticos al mes postIAM. ME: microesferas, Δpeso: diferencia entre el peso al mes de seguimiento y el peso basal, FC: frecuencia cardíaca, SatO₂: saturación de oxígeno, CO₂: presión parcial de dióxido de carbono (capnografía). Los datos están expresados como media ± s.e.m.

f5D.7. El tratamiento con antagomir-92a encapsulado induce neoangiogénesis

Las secciones histológicas pusieron de manifiesto diferencias en el proceso de cicatrización entre los tres grupos de tratamiento. Mientras que en los grupos control la cicatriz aparecía muy adelgazada en toda su extensión, el grupo que recibió antagomir-92a encapsulado presentaba un espesor de la cicatriz significativamente mayor (**Fig.50**) Además, podían observarse focos de tejido viable dentro del miocardio afectado por el infarto.

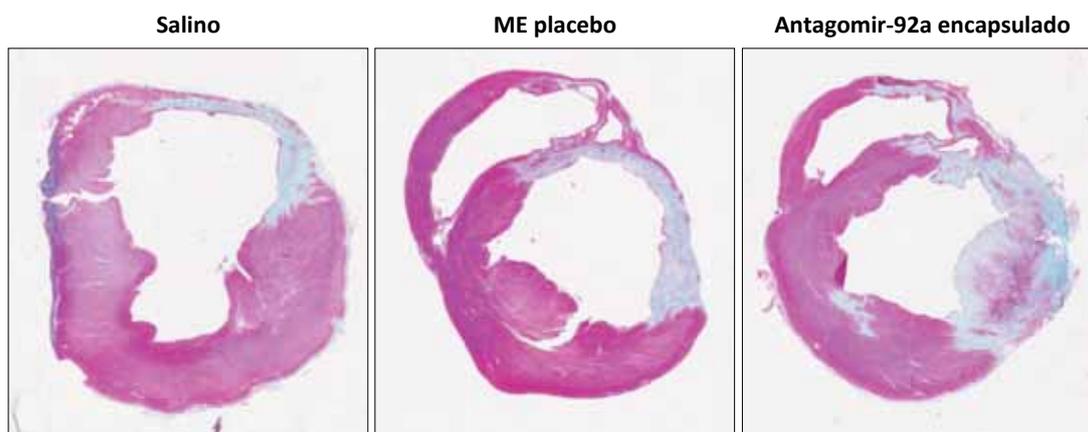


Figura 50 Secciones histológicas de corazón teñidas con tricrómico de Masson. En la figura se muestran tres imágenes representativas de secciones histológicas de la misma loncha cardíaca de tres animales diferentes, correspondientes a cada uno de los tres grupos de tratamiento del estudio. Mientras que los dos animales control presentan un adelgazamiento y expansión de la cicatriz, el animal tratado con antagomir-92a encapsulado muestra una reparación miocárdica favorable.

Para investigar si las diferencias observadas en el proceso de cicatrización podrían atribuirse a neoangiogénesis, analizamos la densidad vascular en la cicatriz.

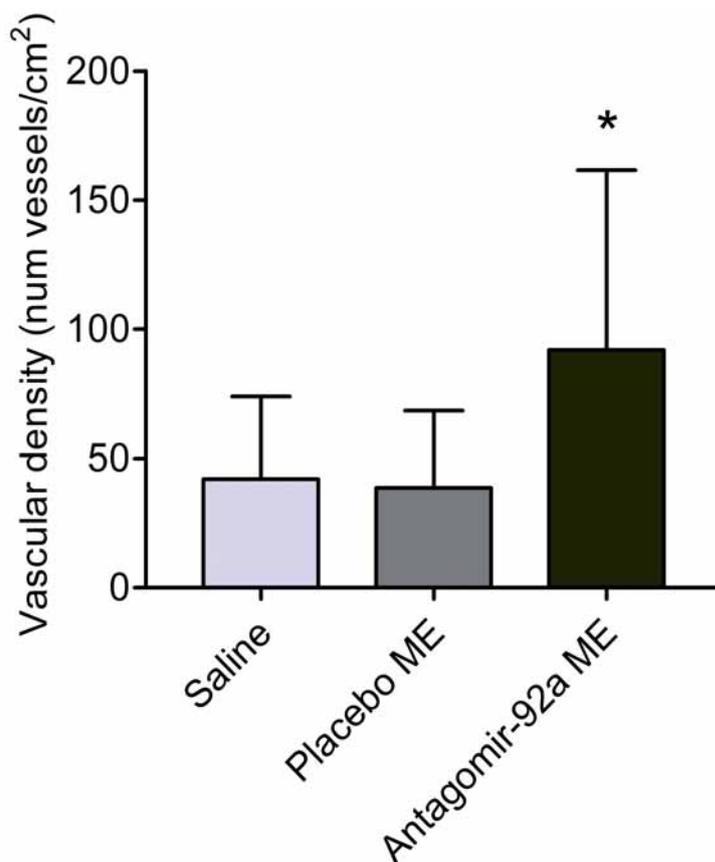


Figura 51 La inhibición del miR-92a mediante el antagomir-92a encapsulado induce neoangiogénesis en la zona del IAM. La gráfica muestra el efecto de la administración intracoronaria de antagomir-92a sobre la densidad vascular en la zona del infarto. * P< 0.01. Se representa la media \pm s.e.m. n=20

Cuantificamos el número de vasos en toda el área necrótica demostrando significativamente mayor densidad vascular en el área necrótica de aquellos animales que recibieron antagomir-92a encapsulado comparado con los controles (161.57 ± 58.71 versus 68.49 ± 23.56 en el grupo de ME placebo versus 73.91 ± 24.97 en el grupo salino, $p=0.001$) (**Fig.51**).

La formación de vasos se vió incrementada tanto en la zona infartada como en el anillo periinfarto (**Fig.52**).

Los vasos neoformados se caracterizaron por tener una pared más gruesa, lo que ya se ha descrito en previos estudios (Kalkman et al., 1997) (**Fig.53**).

Considerando globalmente estos datos, podemos concluir, que el tratamiento con antagomir-92a induce angiogénesis detectable al mes postIAM.

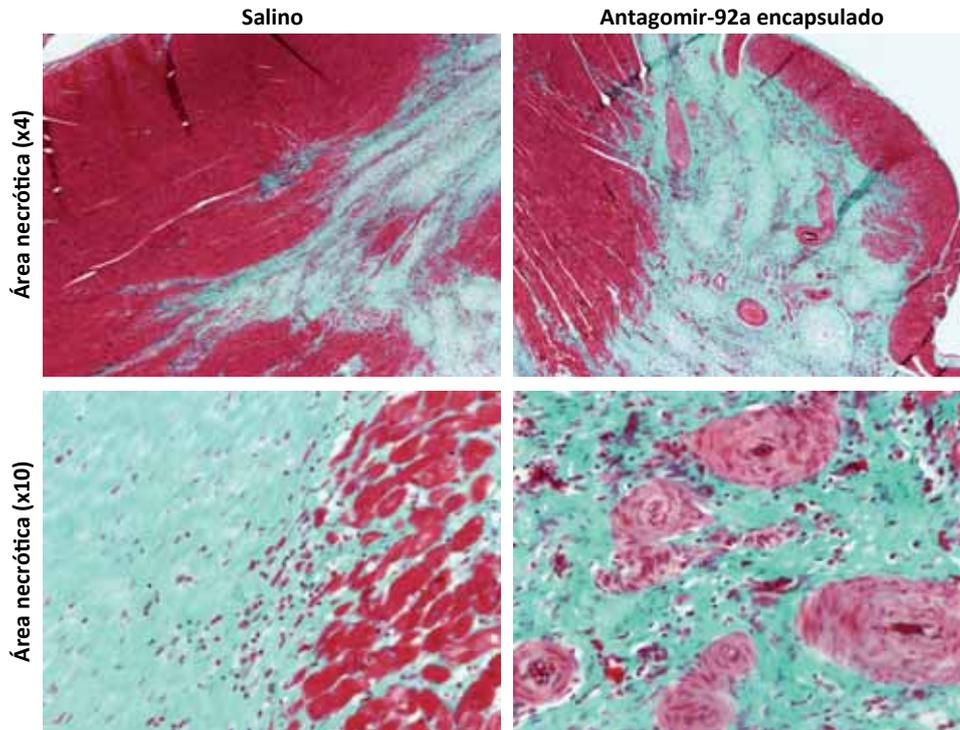


Figura 52 Campos histológicos de secciones de corazón teñidas con tricrómico de Masson. En la figura se muestran campos histológicos teñidos con tricrómico de Masson y visualizados con microscopio óptico. Corresponden a dos animales del estudio, uno pertenece al grupo control y el otro fue tratado con antagomir-92a encapsulado. El animal tratado con antagomir-92a muestra elevado número de vasos en la cicatriz que no están presentes en el animal control.

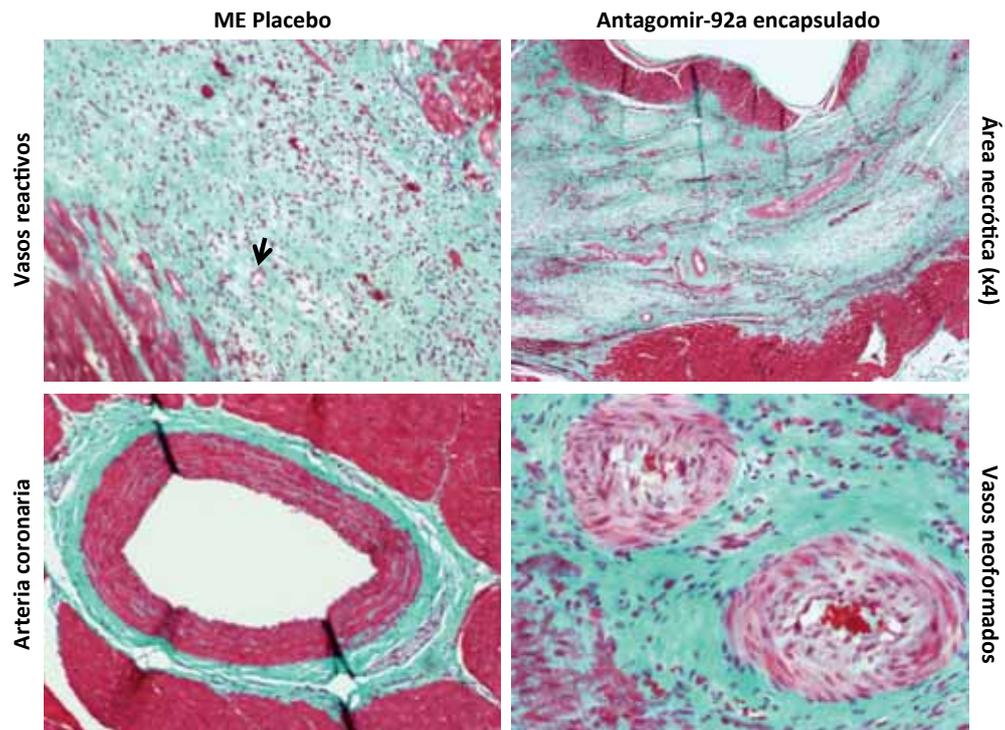


Figura 53 Estructura de los vasos neoformados. En la figura puede apreciarse la diferente estructura de los vasos dentro de la cicatriz. Se observan vasos reactivos (flecha negra) con una monocapa endotelial fina en la cicatriz de una animal control. Los vasos neoformados, como puede apreciarse en la cicatriz de un minipig del estudio tratado con antagomir-92a, presentan una capa media ancha y fibrótica, que se diferencia claramente de la estructura de pared de una arteria coronaria.

f5D.8. El tratamiento con antagomir-92a encapsulado reduce las resistencias microvasculares

Un mes después del IAM, los animales tratados con antagomir-92a encapsulado presentaron una resistencia microvascular basal (true microcirculatory resistance: TMR basal) significativamente menor que los controles (7.47 ± 1.33 vs 19.62 ± 2.98 , $p=0.005$). La resistencia microvascular mínima (TMR hyp), bajo vasodilatación máxima con nitroglicerina intracoronaria y perfusión intravenosa de adenosina a $140 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$, fue también significativamente menor en los animales tratados (5.0 ± 1.15 vs 14.49 ± 2.4 , $p= 0.006$) (**Fig.54**).

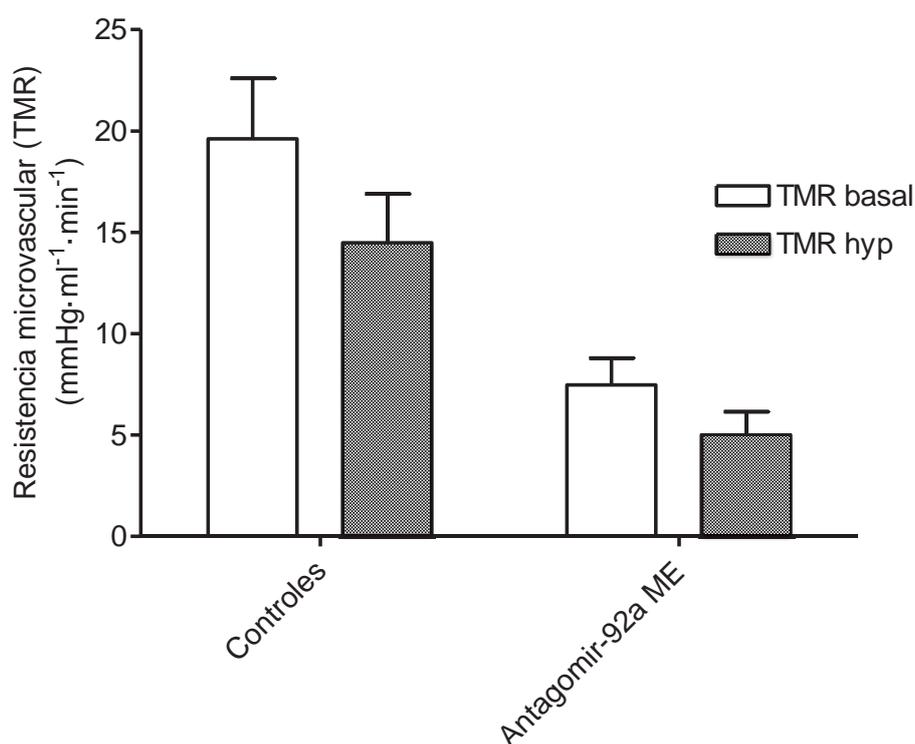


Figura 54 Resistencia de la microcirculación de la región infartada. Mediante un sensor de flujo colocado en la LAD media y una guía de presión en el segmento más distal de la LAD se midieron respectivamente el Qc y la Pd. El cociente entre la Pd y el Qc permitió conocer la resistencia microvascular real basal (TMR basal). A continuación se administró nitroglicerina intracoronaria y perfusión de adenosina a través del introductor venoso femoral a $140 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ y se volvieron a medir el Qc hyp y la Pd hyp. Se calculó la mínima resistencia microvascular real (TMR hyp). Tanto la TMR basal como la TMR hyp fueron significativamente menores en el grupo tratado con antagomir-92a encapsulado. Se realizaron todas las mediciones en un total de 13 animales (7 controles y 6 tratados). En 3 animales no se pudo diseccionar la LAD por presentar una pericarditis severa postIAM; en 1 animal la LAD se encontró ocluida con flujo TIMI 0 al mes postIAM; un animal presentó shock perioperatorio precisando adrenalina y noradrenalina impidiendo obtener valores fiables de flujo y presiones y finalmente en 2 animales el sensor de flujo clampaba el flujo coronario impidiendo obtener valores estables. Los datos están expresados como media \pm s.e.m. $n=13$.

Consistentemente, tanto la TMR basal como la TMR hyp se correlacionaron significativamente con la densidad vascular (R^2 0.35, $p=0.033$ y R^2 0.31, $p=0.047$ respectivamente) (**Fig.55 y Fig.56**).

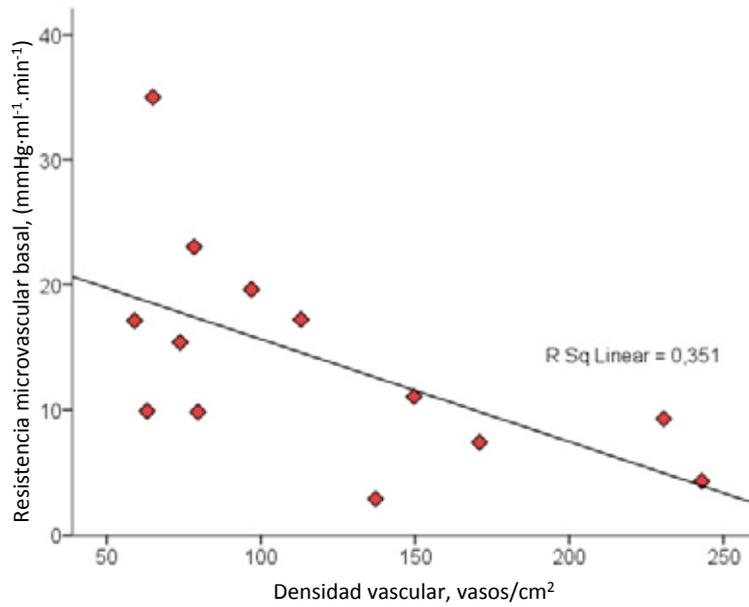


Figura 55 Correlación entre la resistencia microvascular basal y la densidad vascular. n=13.

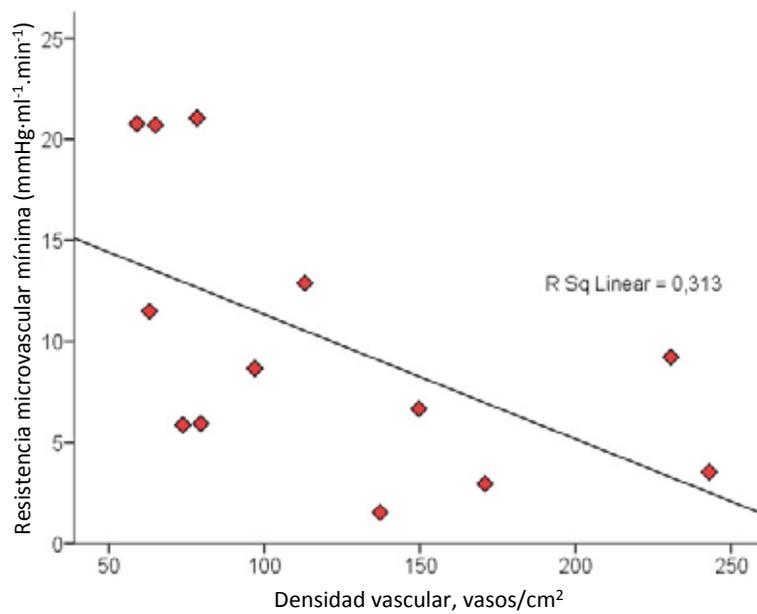


Figura 56 Correlación entre la mínima resistencia microvascular y la densidad vascular. n=13.

f5D.9. El tratamiento con antagomir-92a encapsulado previene la aparición de discinesia septoapical

La motilidad regional fue evaluada mediante EIV (**Fig.57**). Al mes postIAM, el porcentaje de animales con discinesia septoapical fue significativamente menor en el grupo tratado con antagomir-92a encapsulado en comparación con los controles ($p=0.03$) (**Fig.58 y Tabla 15**).

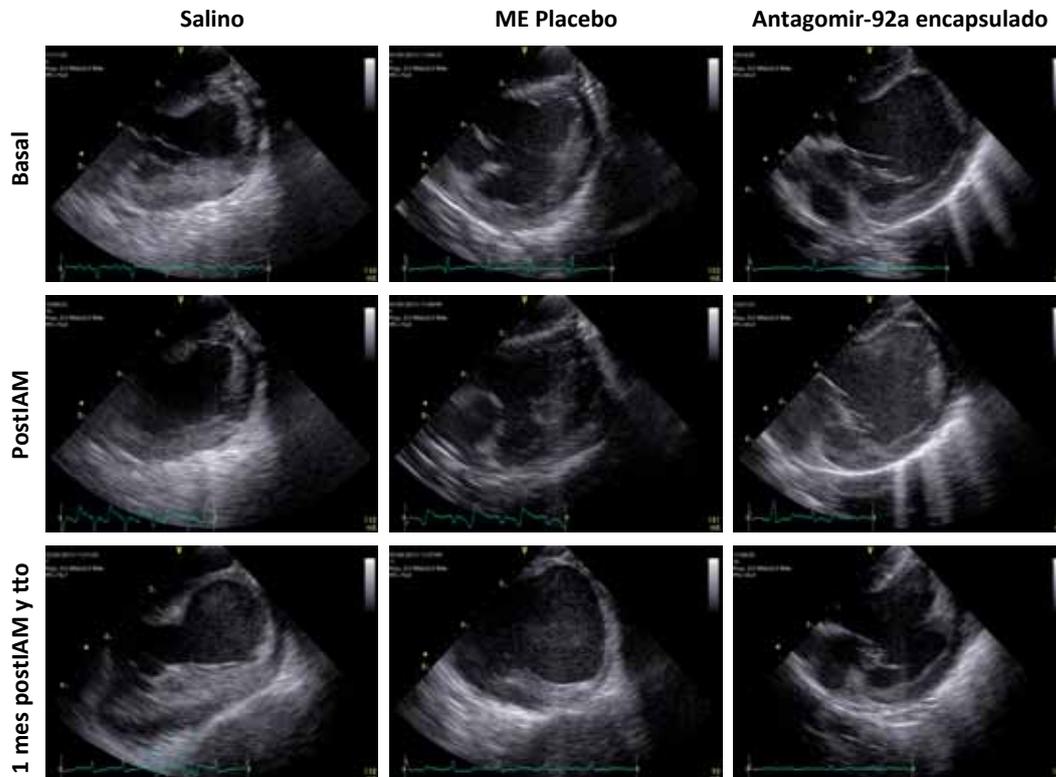


Figura 57 Análisis de la motilidad regional mediante EIV. En la figura se muestran imágenes representativas de dos dimensiones mostrando el ápex del VI, septo y la válvula mitral obtenidas mediante un ecocardiógrafo Vivid Q. Corresponden a tres animales diferentes del estudio, cada uno de ellos correspondiente a uno de los 3 grupos de tratamiento del estudio. Las EIV fueron realizadas en el momento basal (justo tras obtener los accesos vasculares y posicionar la sonda Acunav en el ápex del VD), en la fase de isquemia (en el último minuto de oclusión del balón) y al mes postIAM (una vez el animal era anestesiado e intubado y tras obtener de nuevo los accesos vasculares). Los dos animales controles muestran un aneurisma apical que no estuvo presente en el animal tratado.

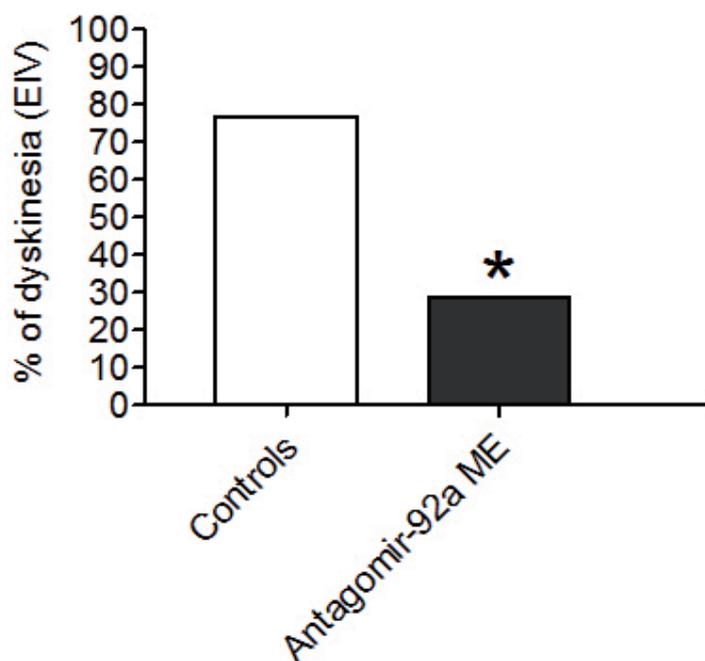


Figura 58 Porcentaje de animales con discinesia septoapical. Un mes postIAM el porcentaje de animales con discinesia septoapical en el grupo tratado y no tratado se muestra en la figura (76.9% vs 28.6%). * $p < 0.05$. $n=20$

	Controles (n=13)	Antagomir-92a encapsulado (n=7)	P
Sin discinesia, %	(3/13) 23.1%	(5/7) 71.4%	0.03
Con discinesia, %	(10/13) 76.9%	(2/7) 28.6%	

Tabla 15 Porcentaje de animales con discinesia septoapical en el grupo de animales control versus en el grupo tratado con antagomir-92a encapsulado.

f5D.10. El tratamiento con antagomir-92a encapsulado previene el desarrollo de remodelado adverso postIAM

Para determinar los efectos del antagomir-92a encapsulado sobre el desarrollo de remodelado adverso, comparamos parámetros estructurales y morfológicos característicos de remodelado mediante una RMN realizada *ex vivo* (**Fig.59**). Aquellos animales tratados con antagomir-92a encapsulado presentaron un menor adelgazamiento de la cicatriz, una menor expansión de la pared infartada y una menor deformidad de la cavidad ventricular (**Tabla 16**).

	Salino (n=6)	ME placebo (n=7)	Antagomir-92a encapsulado (n=7)	p
Número de cortes afectados por el IAM en la RMN	4.8±0.3	4.8±0.4	5.3±0.2	0.38

	Salino (n=6)	ME placebo (n=7)	Antagomir-92a encapsulado (n=7)	p
T_{max} pared infartada, mm	6.07±0.9	5.61±0.5	9.01±0.6	0.006
T_{normal} , mm	13.23±0.5	13.52±1.8	11.82±0.7	0.49
T_{min} pared infartada, mm	3.17±0.4	4.02±0.9	4.35±0.5	0.33
% de mínimo adelgazamiento	54.79±4.9	56.74±4.1	22.71±5.5	0.000
% de máximo adelgazamiento	76.40±2.18	69.86±4.72	62.54±4.19	0.05
Longitud de la pared infartada adelgazada, mm	32.2±1.8	31.7 ±4	20.5±3.6	0.03
D_R/D_N	1.93±0.2	2.02±0.2	1.29±0.1	0.03
D_N , %	14.88±0.68	13.78±1.59	17.5±1.37	0.12
Remodelado adverso, % (n)	83.3 (5)	80 (4)	16.7 (1)	0.03

Tabla 16 Parámetros morfológicos y estructurales ventriculares medidos en la RMN del corazón *ex vivo*. T_{max} : espesor máximo de la cicatriz, T_{normal} : espesor de la pared posterior normal, T_{min} : espesor mínimo de la cicatriz, D_N : diámetro entre paredes normales del VI, D_R : diámetro entre la pared infartada y la pared contralateral normal.

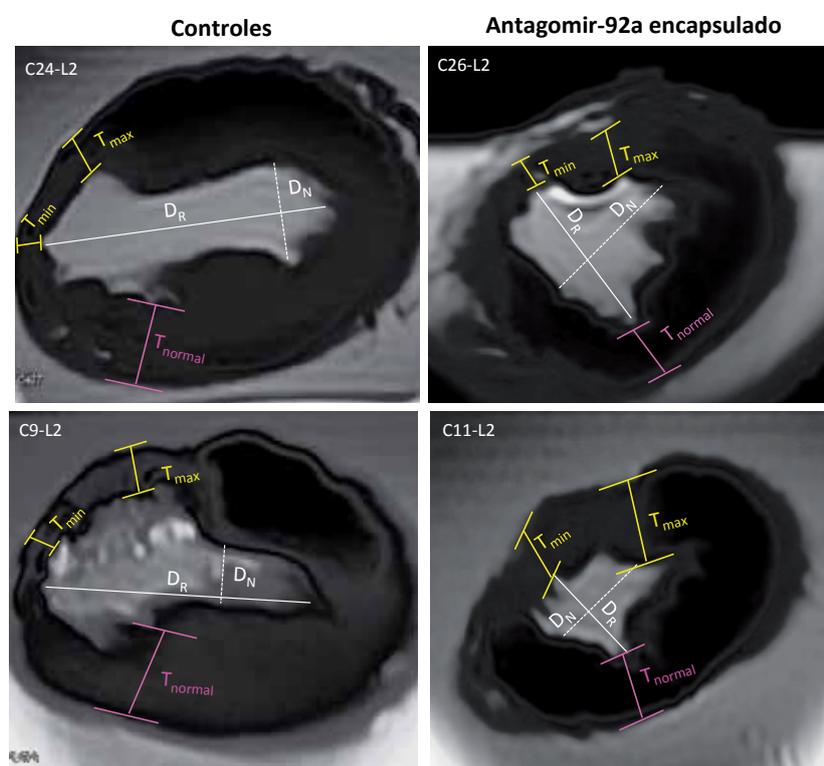


Figura 59 Parámetros morfológicos de remodelado ventricular adverso analizados mediante RMN. Los diferentes parámetros característicos de remodelado ventricular adverso fueron analizados en todos los cortes de RMN obtenidos de los corazones *ex vivo* de los minipigs. En la figura se muestran cuatro imágenes representativas del corte L2 (siendo L1 el ápex) de 4 minipigs. Las dos de la derecha corresponden a dos minipigs que recibieron tratamiento con antagomir-92a (C26 y C11) y las de la izquierda a dos animales que recibieron salino (C24) y ME placebo (C9) respectivamente. Las lonchas de los animales control muestran un adelgazamiento de la cicatriz mayor y uniforme si se compara con los animales tratados. Además, la cavidad de los animales control se encuentra deformada con una expansión de la pared infartada que aumenta el diámetro D_R respecto al diámetro entre paredes normales D_N .

f5D.11. El tratamiento con antagomir-92a encapsulado intracoronario no se asoció a efectos adversos

f5D.11.1. Arritmogenicidad

Para evaluar el potencial arritmogénico del antagomir-92a encapsulado, todos los episodios de arritmias durante el estudio fueron registrados y analizados (**Fig.60**). No se detectaron taquiarritmias malignas ni bradiarritmias significativas ni en los animales tratados ni en los controles, indicando que el antagomir-92a no exhibe un efecto proarrítmico (**Tabla 17**).

	Salino (n=9)	ME placebo (n=9)	Antagomir-92a encapsulado (n=8)	p
Fase isquemia (n=26)				
Sin arritmias, n(%)	2 (22.2)	0 (0)	1 (12.5)	0.37
Arritmias, n(%)	7 (77.8)	9 (100)	7 (87.5)	
• EEVV, n	5	7	5	
• TVNS, n	0	1	1	
• FV, n	3	3	3	
Fase reperusión (n=26)				
Sin arritmias, n(%)	5 (55.6)	3 (33.3)	3 (37.5)	0.6
Arritmias, n(%)	4 (44.4)	6 (66.7)	5 (62.5)	
• Pausa sinusal, n	1	1	0	
• Ritmo nodal, n	1	0	0	
• RIVA, n	0	2	1	
• EEVV, n	4	3	3	
• TVNS, n	0	0	1	
30d postIAM (n=10)				
Implantación de Holter subcutáneo, n	4	3	3	0.88
Sin arritmias, n(%)	0 (0)	0 (0)	0(0)	0.38
Arritmias, n(%)	2(50)	3(100)	3(100)	
• Taquicardia sinusal	2	3	3	
• Pausa sinusal	0	1	0	
• EESS	0	0	1	
No evaluable, n(%)	2(50)	0	0	

Tabla 17 Arritmias registradas durante el estudio. EEVV: extrasístoles ventriculares, TVNS: taquicardia ventricular no sostenida, FV: fibrilación ventricular, RIVA: ritmo idioventricular acelerado, EESS: extrasístoles supraventriculares. La información del Reveal no pudo ser evaluada en 2 animales asignados al grupo salino. En uno de ellos se produjo el autoexplante del Reveal en la corralina perdiéndose la información de los episodios al detectar una falsa asistolia sostenida. El otro minipig, el 21, murió en el quirófano por bradicardia y asistolia justo tras el implante.

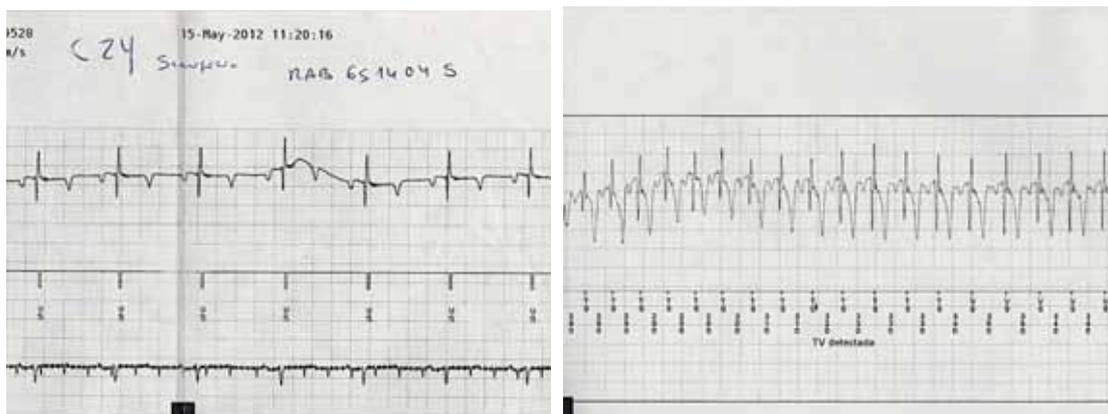


Figura 60 Lectura de los registros obtenidos de un Reveal® explantado al mes postIAM. Este dispositivo de monitorización registra una derivación electrocardiográfica que es almacenada en una memoria continua. La información almacenada es recuperada y puede imprimirse a través del programador. Puede apreciarse que la amplitud de las deflexiones electrocardiográficas obtenida en minipigs es óptima y permite detectar arritmias y hacer su diagnóstico. El registro de la derecha corresponde a una taquicardia sinusal.

f5D.11.2. Carcinogénesis

No se observaron tumores vasculares en las necropsias de todos los animales, sugiriendo ello, la ausencia de inhibición de miR-92a en otros órganos a distancia. Tampoco se observaron linfadenopatías superiores a 1 cm ni tumores sólidos en los distintos órganos.

f5D.12. El tratamiento con antagomir-92a encapsulado se asocia a una marcada tendencia a mejorar la contractilidad del VI.

Se observó una fuerte tendencia a presentar una mejor contractilidad del VI al mes postIAM en el grupo tratado con antagomir-92a en comparación con los controles (51.43 ± 15.20 versus 41.92 ± 12.34 , $p=0.14$) (**Fig.61**). De forma paralela, la variación del gasto cardíaco fue positiva en el grupo tratado (-0.21 ± 0.96 versus 0.63 ± 0.98 , $p=0.09$) (**Fig. 62**).

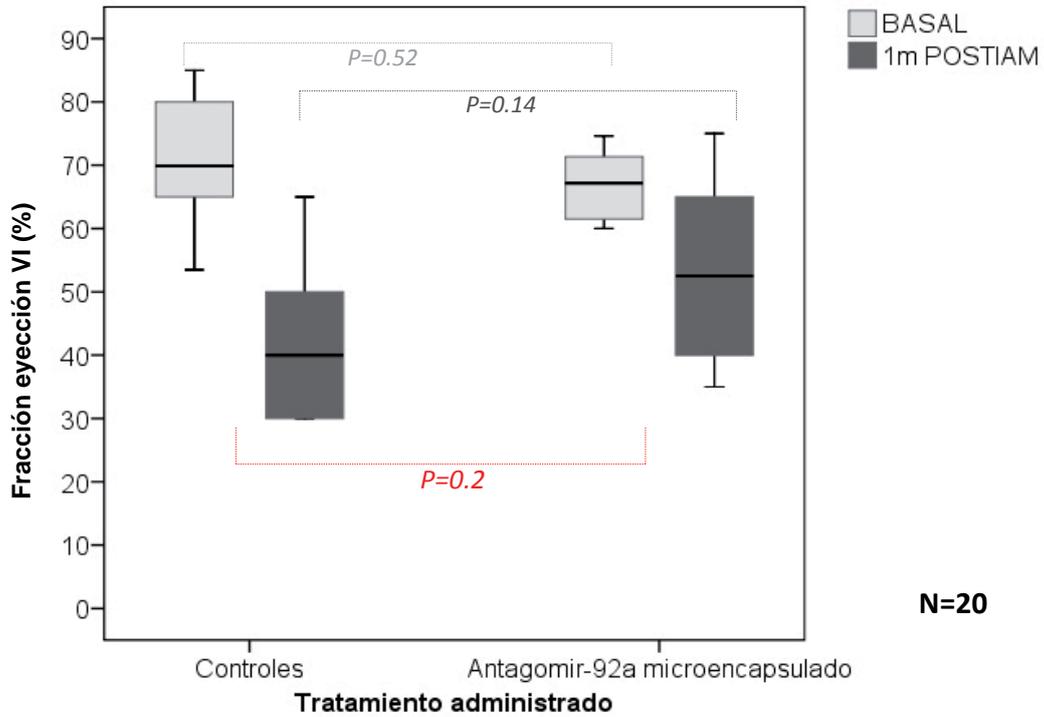


Figura 61 Contractilidad del VI. La contractilidad del VI fue medida mediante el cálculo de la FE según el método de Simpson, a partir de vídeos obtenidos mediante EIV. Se calculó la FE basal (barras gris claro), antes de inducir el IAM, y la FE un mes después del IAM y del tratamiento (barras gris oscuro). La gráfica representa la media \pm D.E. n= 20

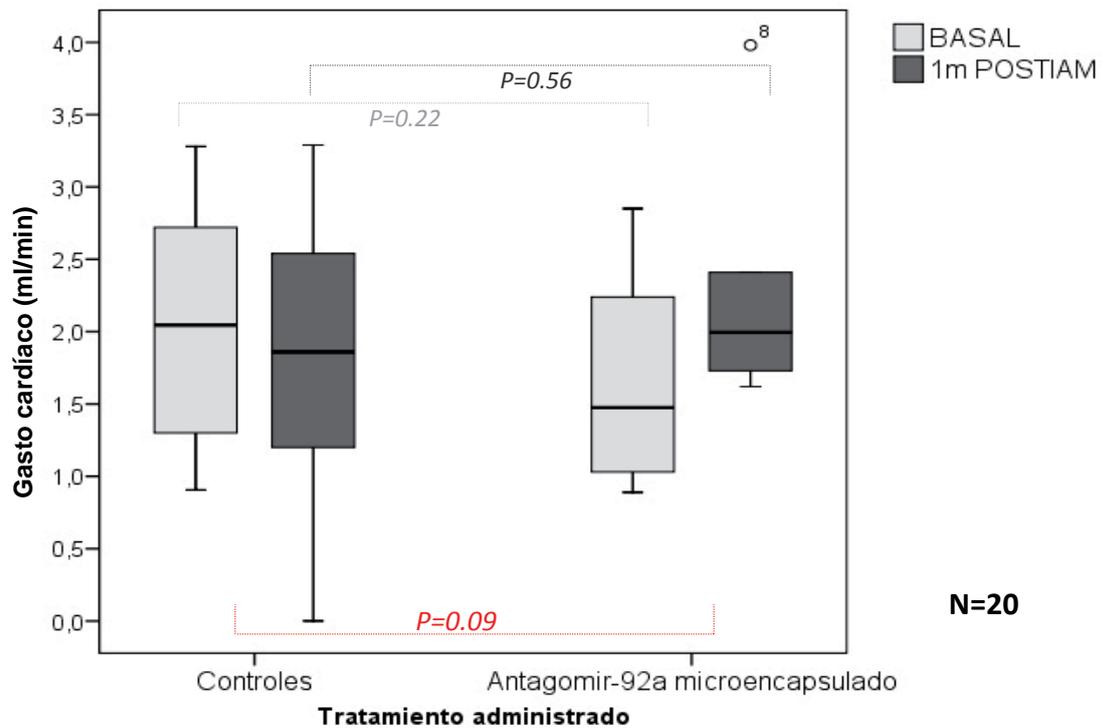


Figura 62 Gasto cardíaco y tratamiento administrado. Mediante EIV se calculó el gasto cardíaco. Se midió basalmente (barras gris claro) y tras un mes de seguimiento (barras gris oscuro). Mientras que el gasto cardíaco se redujo ligeramente en los controles un mes tras el IAM, éste aumentó en el grupo tratado con antagomir-92a encapsulado. La gráfica representa la media \pm D.E. n= 20

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

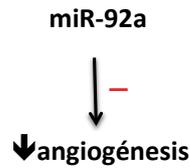
Este estudio demuestra que una administración intracoronaria aislada y precoz de antagomir-92a encapsulado en unas microesferas bioabsorbibles y específicamente diseñadas, inhibe el miR-92a localmente, de una forma sostenida. Dicha inhibición estimula la neoangiogénesis en el tejido infartado, lo que previene el desarrollo de remodelado ventricular adverso en un modelo relevante de IAM, sin evidenciar efectos sistémicos a distancia. Esta nueva estrategia terapéutica podría ser útil en aquellos paciente que sufren un IAM, que son tratados con angioplastia urgente, y que se encuentran en riesgo de sufrir remodelado adverso postIAM.

1- INHIBICIÓN DEL MIR-92a: UNA NUEVA DIANA TERAPÉUTICA PARA INDUCIR NEOANGIOGÉNESIS POSTIAM

En nuestro modelo porcino de infarto reperfundido, evidenciamos que la inhibición del miR-92a es capaz de inducir angiogénesis. El análisis de la densidad vascular en el área de infarto puso de manifiesto una formación de vasos significativamente superior en el grupo de animales tratado con antagomir-92a encapsulado en comparación con los grupos control. Consistentemente, la resistencia microvascular, tanto basal como bajo hiperemia máxima fue significativamente inferior en el grupo tratado.

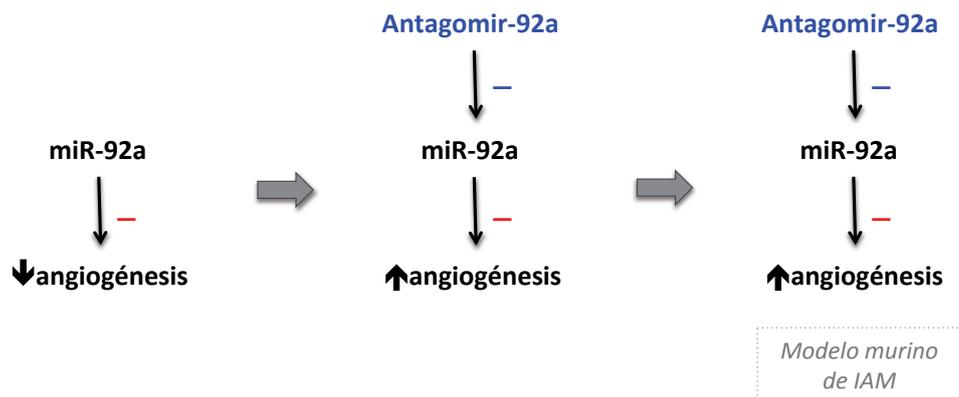
El descubrimiento de los microRNAs y de su poder regulador de la vasculogénesis ha sido previamente demostrado (Bonauer et al., 2010; Hans et al., 2010). Actúan modulando una red de proteínas diana, cada día mejor y más conocidas, involucradas en la migración, proliferación y diferenciación de las células endoteliales. Dichos microRNAs, denominados angiomiros, pueden ejercer una regulación negativa o bien positiva sobre la formación de nuevos vasos (Wang and Olson, 2009). Los primeros estudios *in vitro* demostraron que tanto la sobreexpresión forzada de microRNAs proangiogénicos como la inhibición de microRNAs antiangiogénicos lleva a la formación de nuevos vasos (Kuehbacher et al., 2008). Uno de estos microRNAs, el miR-92a que pertenece al cluster-17-92a, se expresa altamente en las células endoteliales y tiene un rol crítico en la neovascularización postnatal (Bonauer and Dimmeler, 2009; Doebele et al., 2010). Su expresión aumenta en el contexto de la isquemia (Bonauer et al., 2009). Considerando su rol

antiangiogénico se pensó que su inhibición podría ofrecer efectos beneficiosos en el seno de la cardiopatía isquémica (Doebele et al., 2010).



Se testaron las consecuencias de su inhibición en un modelo murino de IAM y en un modelo de vasculopatía periférica. Se administró, por vía intravenosa, un antagomir-92a diseñado específicamente para unirse al miR-92a y se demostró que la inhibición del miR-92a conducía a la formación de nuevos vasos (Bonauer et al., 2009).

Igualmente, en un modelo murino de fractura ósea, la administración de antagomir-92a indujo angiogénesis. En este caso el antagomir-92a fue administrado sistémicamente, dos veces por semana. Se observó un incremento del callo óseo y una mejor reparación a nivel de la fractura (Murata et al., 2013).



Sin embargo, la falta de reproducibilidad de los resultados obtenidos en animales pequeños hacía necesario demostrar dicho efecto en una especie filogenéticamente más próxima al ser humano. En nuestro modelo de infarto, y por primera vez en la especie porcina, confirmamos que la inhibición del miR-92a es capaz de inducir angiogénesis. Además, por primera vez los resultados se obtuvieron en minipigs en fase adulta, con la finalidad de eliminar posibles diferencias en el fenómeno angiogénico y en la reparación miocárdica condicionadas por la propia edad y desarrollo (Bujak et al., 2008). Es bien conocido, que similares patologías tienen un

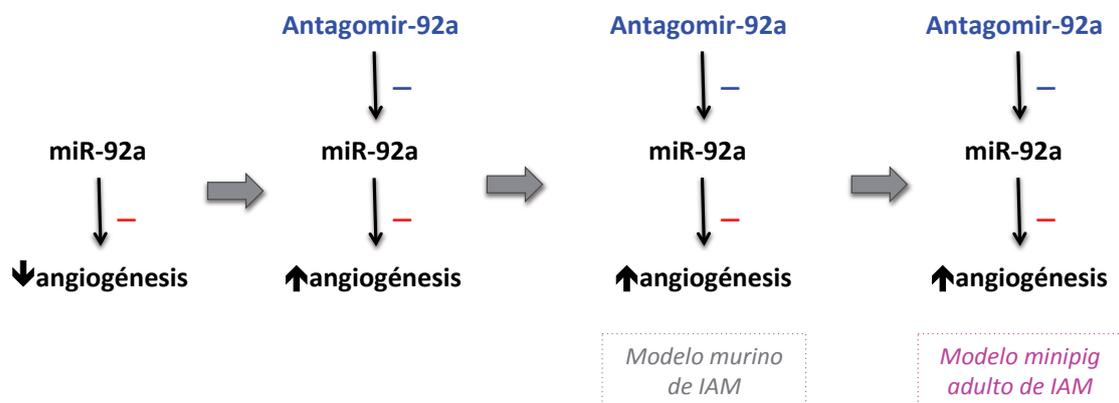
comportamiento y una mecanística distinta según la edad en la que se presentan (Horn et al., 2012). En este sentido, parte de las incongruencias que se observan cuando se trasladan las estrategias terapéuticas a la especie humana podrían atribuirse, entre otros factores, a la propia infancia de los animales de experimentación (Unger, 2007; Dyson and Singer, 2009). Respecto al sexo, elegimos machos en la fase biológica final por afectar la cardiopatía isquémica predominantemente a hombres. Sin embargo, las primeras fases se realizaron con hembras, con el fin de detectar posibles diferencias del efecto del tratamiento en función del género (Wald and Wu, 2010; Meyer et al., 2013).

Por primera vez también, nuestro estudio demuestra que los vasos neoformados son funcionalmente maduros, al observar una reducción muy significativa de la resistencia microvascular en el árbol vascular del tejido dañado, cuando se compara con la resistencia cuantificada en los animales de los grupos control. Además de un nivel de resistencias basalmente menor, ésta decrece todavía más tras administrar adenosina, lo que refleja que las células endoteliales responden al estímulo vasodilatador administrado (Kennedy et al., 1985).

Con ello, ratificamos que en la edad adulta e independientemente del sexo, el miR-92a representa una diana terapéutica para inducir vasos funcionalmente maduros en un miocardio que sufre un IAM.

El poder regulador de toda una red de dianas y vías interrelacionadas explicaría este poder angiogénico, solventando una de las limitaciones asociadas a la administración de un factor proangiogénico aislado. Las dianas terapéuticas no han sido específicamente investigadas en nuestro estudio. Sin embargo, el estudio previo de Bonauer utilizó los softwares TargetScan y el miRanda para predecir los targets putativos del miR-92a (Bonauer et al., 2009). Se predijo una gran diversidad de mRNAs dianas que codifican para proteínas reguladoras de la función endotelial, tales como la integrina subunidad $\alpha 5$ (ITGA5) y αv , la histone deacetylase Sirtuin 1 (Sirt 1), la small guanosine triphosphate-binding protein (Rap-1), una proteína envuelta en la vía de señalización de las integrinas, el receptor sphingosine-1-phosphate receptor 1 (S1P1) y el mitogen-activated kinase kinase 4 (MKK4). Tanto la integrina αv , el S1P1 como el MKK4 son dianas del miR-92a que han sido demostradas *in vitro* (Lai et al., 2013). La regulación del RNAm que codifica para la integrina subunidad $\alpha 5$, como target directo del miR-92a, fue demostrado *in vitro* e *in vivo*, en ratones (Bonauer et al., 2009). La inhibición directa de la expresión de la ITGA5 mediante un RNA interferencia en células endoteliales humanas reprimió la formación vascular mientras que su

sobreexpresión revirtió la supresión de la angiogénesis mediada por el miR-92a (Bonauer et al., 2009). Otro de los mRNA que se vió reprimido, cuando se sobreexpresa el miR-92a en células endoteliales humanas, es el endothelial NO-synthase (eNOS), que controla el tono vascular y es esencial para la neovascularización postnatal. La comparación del patrón de expresión génica en células endoteliales que sobreexpresan miR-92a frente a células endoteliales depleccionadas de ITGA5 puso de manifiesto que algunos genes son regulados secundariamente, como consecuencia de la down-regulación de la ITGA5 y no como targets directos del miR-92a. Un ejemplo de ello fue la regulación de la expresión de la eNOS, regulada por la propia ITGA5. Ello pone de manifiesto que la regulación del miR-92a genera cambios en algunos RNAm, que a su vez regulan secundariamente la expresión de otras proteínas demostrando la regulación en cascada de diferentes vías interconectadas e involucradas en el proceso de la angiogénesis.

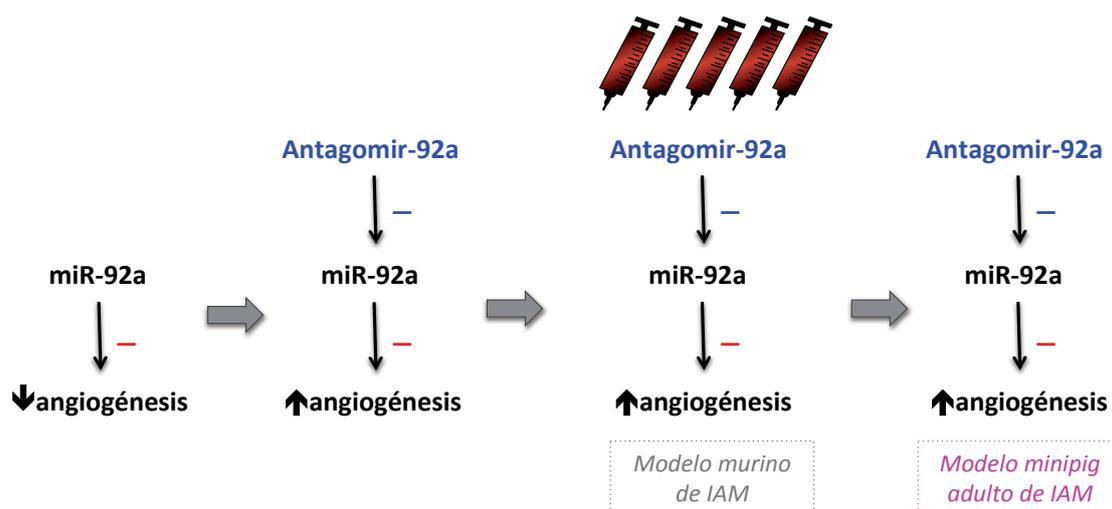


2.- LAS MICROESFERAS CONSTITUYEN UN VEHÍCULO APROPIADO PARA LIBERAR ANTAGOMIR-92a

Las microesferas han resultado ser un vehículo apropiado para liberar antagomir-92a, con alta eficiencia de encapsulación. La conservación de la integridad y propiedades del antagomir-92a se demuestra mediante el análisis de la expresión del miR-92a, que queda significativa y sostenidamente inhibido.

Para lograr un efecto molecular sostenido, la terapia con antagomires se ha administrado en inyecciones repetidas, en días sucesivos y a dosis altas (Bonauer et al., 2009; Murata et al., 2013). La inestabilidad química del RNA y su vida media muy corta, al ser degradados por las RNAsas que se encuentran en todos los organismos

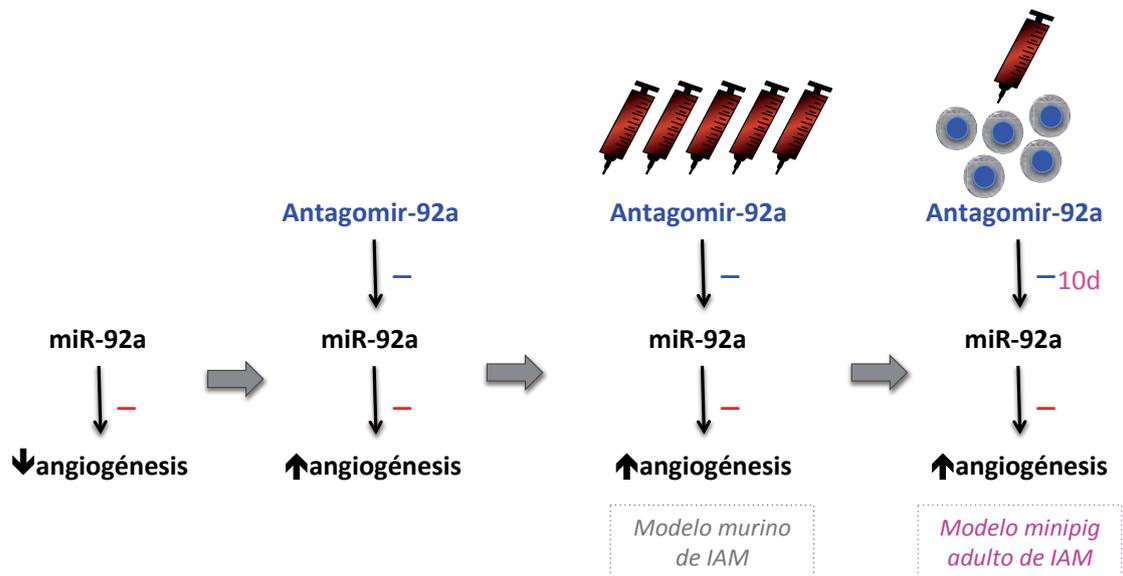
vivos, son propiedades que hacen necesaria una administración en inyecciones múltiples (Cerritelli and Crouch, 2009). En el estudio de Bonauer, los ratones con IAM recibieron hasta 5 inyecciones intravenosas de 8 mg/Kg de peso (Bonauer et al., 2009). Aunque en el terreno experimental y en animales de pequeño tamaño las consecuencias de ello son despreciables, la translación a la especie humana, de una terapia que implica inyecciones intravenosas repetidas y a tan elevadas dosis, se enfrenta a importantes impedimentos tanto de seguridad como logístico-económicos. Por ello, existe gran interés en buscar un sistema de liberación adecuado que permita una liberación sostenida del antagomir.



Diferentes sistemas de liberación han sido desarrollados para liberar fármacos, como los liposomas o las nanopartículas. Los liposomas son vehículos coloidales formados por una bicapa de fosfolípidos. Su tamaño y su concentración en aquellos tejidos con mayor permeabilidad capilar los hace inadecuados para nuestro estudio (Allen, 1997). Las nanopartículas son partículas menores de 1 μm por lo que se biodistribuyen sistémicamente. Otros vehículos, como los virus diseñados por bioingeniería con afinidad por el miocardio, también han sido desarrollados pero su afinidad incompleta por el miocardio requiere dosis mayores y tampoco evita la biodistribución sistémica.

Nuestra investigación ha aportado un nuevo vehículo adecuado para ácidos nucleicos y apropiado para nuestro escenario patológico. Éste se basa en la microencapsulación que consiste en recubrir el propio RNA con una película de material polimérico, obteniendo estructuras matriciales denominadas microesferas (Saez et al., 2007). Desde el año 1931, en que surge el concepto de la microencapsulación, la técnica ha ido variando a lo largo de los años. Además su

aplicación se ha extendido a diferentes ramas (Hoffart et al., 2003; Jiang et al., 2005; Menei et al., 2005; Tamber et al., 2005; Cross and Wang, 2011; Li W et al., 2013). Aunque sus bondades terapéuticas son amplias, como enmascarar propiedades organolépticas indeseables de algunas sustancias o aislar componentes con formulación sensible a condiciones ambientales, una de las máspreciadas es la capacidad de liberar fármacos de una forma controlada y mantener niveles séricos del fármaco durante largos periodos de tiempo. En el ámbito cardiovascular, la aspirina aparece como uno de los primeros medicamentos microencapsulados, con la finalidad de prevenir la irritación gástrica. Sin embargo su utilización para encapsular antagomires y aplicarlos al ámbito de la cardiopatía isquémica no ha sido descrita. Por primera vez nuestro estudio aplica las microesferas en el IAM y en la terapéutica basada en los microRNAs. Además de lograr que el antagomir-92a mantenga su integridad una vez encapsulado, éste vehículo permite una liberación sostenida del mismo. Nuestro experimento demuestra que el antagomir-92a encapsulado ejerce su efecto molecular, inhibiendo el miR-92a, y que la inhibición se mantiene al menos 10 días postIAM habiendo realizado una administración única.



Los PLGA que utilizamos como matriz polimérica para la encapsulación son biocompatibles y no producen toxicidad cuando se introducen en el organismo por diferentes vías. Además el carácter biodegradable y biabsorbible de las microesferas hace que dicho vehículo desaparezca una vez finalizado el proceso de reparación postIAM (Visscher et al., 1985). La degradación se produce en dos etapas, la primera comprende la escisión hidrolítica de los enlaces éster y se llama degradación y la segunda se llama erosión y en ella se pierde la masa de la matriz (Göpferich, 1996).

Adaptamos la velocidad de estos fenómenos de degradación a nuestro experimento, diseñando unas partículas capaces de liberar antagomir-92a durante 2-3 semanas in vitro, periodo en el que acontecen principalmente las reacciones y procesos implicados en la reparación del miocardio dañado.

La demostración de que se puede encapsular el antagomir-92a, con alta eficiencia de encapsulación, manteniendo su efecto molecular de forma sostenida hace posible el extender la aplicación de la microencapsulación a otros antagomires y a otras patologías.

3.- LAS MICROESFERAS CARGADAS DE ANTAGOMIR-92a PUEDEN ADMINISTRARSE POR VÍA INTRACORONARIA QUEDANDO RETENIDAS EN EL MIOCARDIO INFARTADO

Las microesferas cargadas de antagomir-92a han podido ser administradas por vía intracoronaria, quedando retenidas en el tejido infartado y distribuidas de forma dispersa a nivel de la luz de sus capilares.

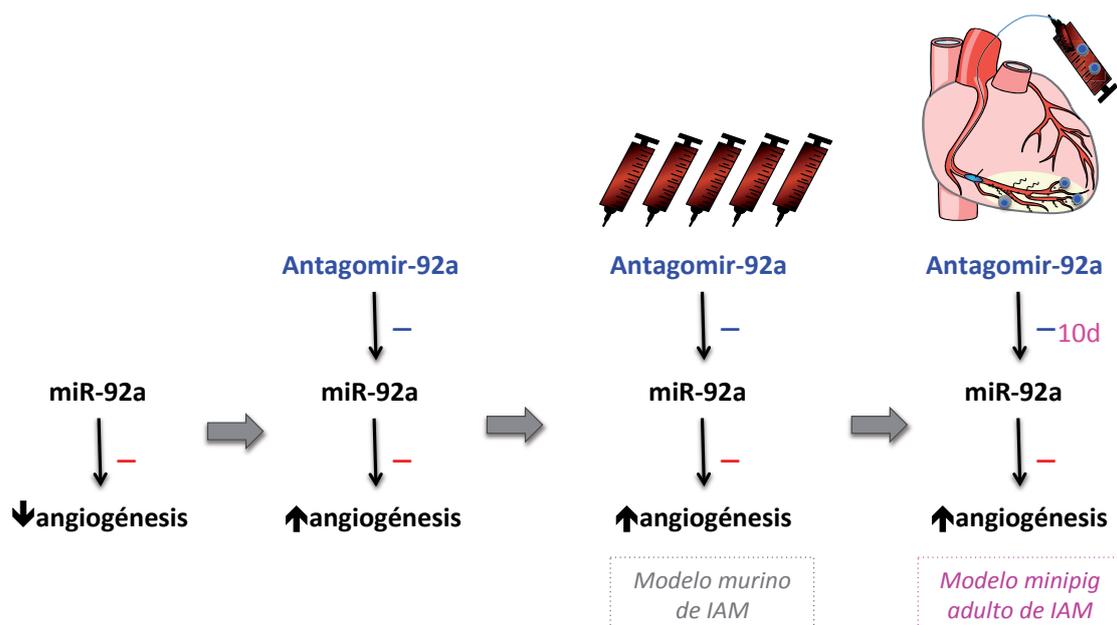
Estudios previos ponen de manifiesto que la administración intravenosa de antagomires puede producir efectos moleculares y biológicos en órganos donde dichos efectos no son deseados (Munroe and Zhu, 2006; Liang et al., 2007; Fabian et al., 2010). Concretamente, el cluster-17-92 ha sido involucrado en la patogenia de una gran variedad de tumores sólidos, como el de pulmón (Lin et al., 2013), estómago (Wu et al., 2013), hepatocarcinoma (Shigoka et al., 2010), mama (Nilsson et al., 2012; Chan et al., 2013), ovario (Ohyagi-Hara et al., 2013) y colon (Nishida et al., 2012; Yamada et al., 2013), así como tumores hematológicos (Tanaka et al., 2009; Hong, 2010). Su sobreexpresión, en células del tumor, promueve la angiogénesis tumoral (Dews et al., 2006). Ello, junto a la ubicuidad y abundancia de los microRNAs en el organismo, genera dudas sobre la seguridad de dicha terapia.

Por otro lado, aunque ratones y humanos comparten un parecido génico constituyendo un modelo útil en este escenario, el volumen plasmático entre las dos especies es tan diferente que la cantidad de fármaco necesaria para estar uniformemente distribuída por todos los órganos o compartimentos es exponencialmente mayor en humanos. Calculamos una dosis de 4 Kg de antagomir para reproducir la concentración del fármaco alcanzado a nivel cardíaco en el estudio de Bonauer (Bonauer et al., 2009). Por todo ello, la translación de la terapia con antagomires a situaciones clínicas hace indispensable que la liberación pueda

realizarse localmente y que el antagomir actúe exclusivamente en el tejido diana enfermo.

Para poder liberar el antagomir-92a exclusivamente en el tejido miocárdico infartado era necesario administrar las microesferas por vía intracoronaria y diseñarlas de tal manera que quedaran retenidas en los capilares miocárdicos, sin alcanzar la circulación sistémica. La administración intracoronaria, a través de la arteria responsable del infarto, se realizó a través de un balón coaxial sin observar alteraciones hemodinámicas, eléctricas y sin evento arrítmicos durante la inyección. Respecto a su diseño, se estudiaron todas sus propiedades *in vitro*. El tipo de polímero y su concentración en la fase orgánica, masa molecular, la concentración de alcohol polivinílico en la fase acuosa externa y la velocidad de agitación en el momento de formar las partículas fueron ajustadas hasta obtener unas partículas homogéneas, reproducibles, de un tamaño medio de 9 micras. Éste tamaño fue considerado apropiado para su retención, teniendo en cuenta el tamaño de la red microvascular cardíaca.

Demostramos en nuestros experimentos *in vivo*, que las microesferas que habíamos diseñado y que marcamos con fluorescencia estaban exclusivamente presentes en el tejido infartado. Ninguna partícula tuvo un tamaño superior a 25 micras evitando el riesgo de oclusión arteriolar anterógrada, lo que concuerda con la ausencia de necrosis miocárdica histológica en nuestro estudio. Aunque el porcentaje de microesferas con un tamaño inferior a 5 micras se aproximó al 15% en nuestro estudio, ninguna fue detectada a distancia siendo probablemente rápidamente fagocitadas por el sistema macrofágico. Se sabe que cuanto más pequeñas son las partículas más rápidamente son fagocitadas (Champion et al., 2008). Sin embargo, considerando su biodistribución sistémica, su carga sólo representaría un 1% del peso corporal frente al 85% del principio activo retenido en el tejido diana, de aproximadamente 20 gramos. Aunque ello fue aceptado en nuestro estudio, la translación a la clínica requeriría mejorar la homogeneización optimizando el proceso de separación por centrifugación para intentar eliminar esta proporción de microesferas de pequeño tamaño.



4.- LA ADMINISTRACIÓN INTRACORONARIA DE ANTAGOMIR-92a ENCAPSULADO NO PRODUCE TOXICIDAD LOCAL NI A DISTANCIA

Los experimentos de bioseguridad aportaron suficientes evidencias para descartar un daño tisular significativo.

Considerando la extensión de la red microvascular cardíaca junto a la difusión intercelular simple de oxígeno, a través de la membrana, intuimos que la retención de microesferas en los capilares miocárdicos podría ser bien tolerada (Pohorille and Deamer, 2009). Nuestros experimentos con el sistema de cristales piezoeléctricos y los análisis histológicos así lo demostraron, descartando daño miocárdico irreversible. Además los experimentos se realizaron en animales sanos, sin embargo la inyección está prevista realizarla sobre un tejido necrótico, lo que eleva todavía más la seguridad de su administración. Aunque la determinación de enzimas cardíacos podría haber complementado nuestros estudios, su elevación en procesos como el síndrome de discinesia apical donde no se produce necrosis miocárdica (Novaro and Almahameed, 2008) y su medición en experimentos llevados a cabo en la especie porcina, muestran que una elevación de troponinas no traduce necesariamente daño miocárdico irreversible (Feng et al., 1998).

A parte de las consecuencias derivadas de la oclusión capilar, nos preguntamos si las propias microesferas podrían generar una reacción tisular local. En

experimentos previos donde se han administrado microcápsulas de PLGA, mediante inyección intramuscular, se ha observado por microscopía óptica y electrónica, una mínima y localizada miositis en el punto de inyección que disminuye paralelamente a la degradación de las microcápsulas, hasta su completa resolución (Visscher et al., 1985; Visscher et al., 1987, Visscher et al., 1988). Siempre desaparecen por completo todos los fragmentos que se van originando del proceso de biodegradación. Además, en nuestro caso no observamos salida de las microesferas hacia el miocardio, siendo biodegradadas en el propio espacio intravascular.

Respecto a los efectos a distancia, podemos afirmar que no evidenciamos microesferas fluorescentes en ninguna de las múltiples muestras analizadas. Tampoco observamos neoformaciones sólidas ni vasculares en todas las necropsias realizadas. Todo ello globalmente ofrece evidencias de la bioseguridad de la terapia. Aunque podríamos haber cuantificado los niveles de miR-92a a distancia, en otros órganos la necesidad de sedar al animal para realizar biopsias durante el seguimiento, por otra parte afecto de un infarto extenso, nos llevó a eludir su realización. Sin embargo, estas determinaciones podrían realizarse en otra serie de experimentos futuros para aportar más datos sobre bioseguridad a distancia.

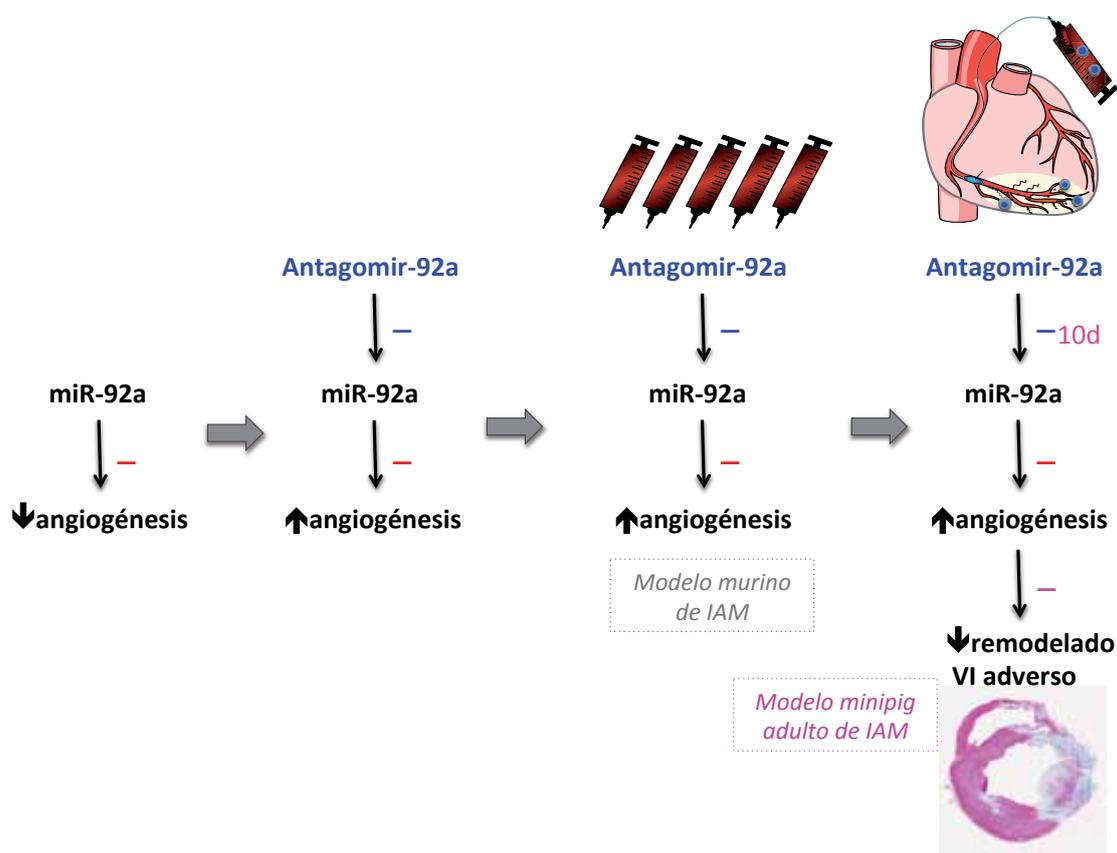
5.- LA ADMINISTRACIÓN INTRACORONARIA DE ANTAGOMIR-92a ENCAPSULADO CONSTITUYE UNA NUEVA ESTRATEGIA TERAPÉUTICA PARA PREVENIR EL REMODELADO ADVERSO POSTIAM

Los resultados morfológicos obtenidos en la RMN, y funcionales mediante el EIV, demuestran que la administración intracoronaria aislada de antagomir-92a evita el remodelado adverso postIAM.

Tras demostrar que la inhibición sostenida del miR-92a mediante el antagomir-92a encapsulado induce vasos y teniendo en cuenta la asociación entre un mal estado de la microcirculación y el remodelado adverso, investigamos las consecuencias que podría tener la neoangiogénesis sobre el proceso de cicatrización postIAM. Aunque su papel favorable en el modelo murino de IAM, mejorando la recuperación contráctil tras un IAM ha sido demostrado, su papel sobre el proceso de remodelado adverso se desconocía. Nuestro trabajo, por primera vez demuestra que la génesis rápida de vasos desde el momento de la reperfusión coronaria tiene efectos beneficiosos a largo plazo y que van más allá del propio tamaño del infarto. Mediante ecocardiografía intravascular objetivamos una reducción significativa de la discinesia septoapical en el

grupo de animales tratados con antagomir-92a encapsulado y en la RMN cardíaca *ex vivo* los diferentes parámetros morfológicos de remodelado adverso estuvieron significativamente menos presentes en dicho grupo.

Nuestros resultados apoyan, de nuevo, la asociación entre vasculogénesis y remodelado ventricular, y demuestran que la inducción terapéutica de vasos en una intensidad y rapidez suficiente puede facilitar los procesos que acontecen durante la reparación postIAM.



Los mecanismos por los cuales la neoangiogénesis genera una cicatrización favorable no han sido específicamente analizados en nuestro estudio pero pueden postularse varias hipótesis. La observación de tejido viable en la cicatriz de los animales tratados, no observada en los controles, pone en evidencia que una declinación de la apoptosis de los cardiomiocitos remanentes en la cicatriz es un mecanismo plausible. En este sentido, la histone deacetylase Sirt1, uno de los targets del miR-92a descritos, ha sido involucrada en el control de la supervivencia de los cardiomiocitos así como de su hipertrofia (Sundaresan et al., 2011). El papel

antiapoptótico de la Sirt-1 se atribuye al incremento en la resistencia del corazón a insultos patológicos, como el estrés oxidativo (Alcendor et al., 2007; Hsu et al., 2008). El control del miR-92a sobre la apoptosis también se ha puesto de manifiesto en algunos tumores (Niu et al., 2012).

Paralelamente, la formación de nuevos vasos también podría facilitar la migración de determinadas células inflamatorias a la zona dañada. Un diferente grado y composición de la respuesta inflamatoria en la cicatriz desde las primeras horas postIAM podría ser otro fenómeno diferencial con consecuencias sobre el proceso de cicatrización. Es bien conocido que miocarditis agudas, infecciosas o inmunitarias, pueden conducir a un adelgazamiento miocárdico y a una disfunción ventricular de rápida instauración (Wakisaka et al., 2004; Heymans, 2006). Además paralelamente, algunos de los targets regulados por el miR-92a podrían tener un rol en la activación de determinadas células o citoquinas proinflamatorias (Seropian et al., 2013; Barin and Čiháková D, 2013). Precisamente la Sirt1 ejerce un papel protector sobre la inflamación cardíaca, de manera que el aumento de su síntesis, secundariamente a la inhibición del miR-92a, podría evitar una respuesta inflamatoria excesiva con consecuencias desfavorables sobre el remodelado ventricular (Planavila et al., 2011).

Aunque hemos atribuido todos los beneficios funcionales observados a la neoangiogénesis, otros mecanismos subyacentes independientes podrían haber contribuido en el remodelado favorable observado en los animales tratados con antagomir-92a. Conocemos, por el estudio de Bonauer que el eNOS es un target down-regulado por el miR-92a (Bonauer et al., 2009). Este enzima regula la formación de NO a partir de L-arginina (Balligand et al, 2009). A parte de promover la vasodilatación y angiogénesis, el NO tiene influencias directas e indirectas sobre la función cardíaca, optimizando el acoplamiento excitación-contracción en los cardiomiocitos y regulando la respiración mitocondrial (Belge et al., 2005). Más recientemente se ha descrito la habilidad de la NOS para modular la señalización redox mediante el control de la producción y reactividad de los radicales libres de oxígeno. Ello la ha implicado en el control del remodelado miocárdico que ocurre durante el estrés cardíaco, incluyendo los insultos isquémicos (Hare and Stamler, 2005; Massion and Balligand, 2007; Manoury et al., 2012). El balance nitroso-redox es clave para la homeostasis celular tras un estrés pro-oxidante, como el isquémico. Considerando que la inhibición del miR92a se traduce en un incremento de NOS y de sus funciones, parte del remodelado adaptativo podría ser atribuido a este mecanismo.

Otro de los targets identificados del miR-92a, son las integrinas alfa. Estas proteínas son receptores de la superficie celular implicadas en la transducción de señales entre la matriz extracelular y el medio intracelular y el citoesqueleto. Juegan un papel crucial en la organización, diferenciación, migración y supervivencia celular. En experimentos con ratones, en los que se produce una disrupción de la expresión de estas proteínas, se produce una sustitución de la matriz extracelular cardíaca por fibrosis (Keller et al., 2001). Ello, junto a otras evidencias, ha establecido el rol de las integrinas en la fisiopatogenia celular y molecular del remodelado ventricular adverso (Ross, 2002; Manso et al., 2006). Cada vez se conoce más que la matriz extracelular no es un mero andamio inerte para los cardiomiocitos, sino un medio donde diferentes células y sistemas enzimáticos se alteran conduciendo a una mala cicatrización tras un IAM (Gallagher et al., 2007; Spinale, 2007; Kandalam et al., 2010). Respecto a las células del intersticio, los macrófagos han emergido como una célula crucial en la respuesta fibrótica postIAM (Leor et al., 2006). Su activación y secreción de metaloproteinasas condiciona el grado de reacción inflamatoria y fibrótica (Zamilpa et al., 2012). A la vez, su llegada al tejido dañado induce la secreción de citoquinas y factores de crecimiento que modulan la respuesta angiogénica, por lo que se encuentran envueltos, a múltiples niveles, en el proceso de reparación (Lambert et al., 2008; Frantz et al., 2013). Otra célula con un rol relevante en el intersticio es el miofibroblasto. Los miofibroblastos son fibroblastos fenotípicamente transformados en el corazón enfermo que se activan para iniciar la reparación fibrótica. La persistencia de miofibroblastos activados en el miocardio conlleva una activación sostenida de vías de señalización transformando la fibrosis reparativa en un proceso desadaptativo que afecta a la resistencia tisular y se asocia a remodelado adverso (Miller et al., 2011; Dobaczewski et al., 2012; Weber et al., 2013). Respecto a los componentes del intersticio, el colágeno tipo 1 es el componente principal del sincitio de los cardiomiocitos. Un ratio inferior o igual a uno entre la producción de colágeno tipo 3 y de colágeno tipo 1 (propéptido aminoterminal de procolágeno tipo 3 dividido entre el telopéptido de colágeno tipo 1) se ha asociado a remodelado adverso (Eschalier et al., 2013). Otro tipo de colágeno de la matriz extracelular, el colágeno tipo VI, se eleva tras un IAM y se ha visto involucrado en la activación de los miofibroblastos y en el remodelado postIAM (Naugle et al., 2006). Por tanto, diferencias en la formación del tejido fibroso también pueden subyacer en las diferencias observadas. Los propios fibroblastos producen moléculas, como el lumicano, un proteoglicano localizado en la matriz extracelular capaz de unirse al colágeno. Dicho proteoglicano regula los niveles de la forma dimérica del colágeno tipo I, disminuye la actividad de la metaloproteinasa-9 encargada de degradar el colágeno de la matriz e incrementa la fibrosis mediada

por la inducción de la vía SMAD3 (Bujak et al., 2007). La inflamación induce la formación de dicho proteoglicano por parte de los fibroblastos, alterando la producción de moléculas y mecanismos importantes para el remodelado cardíaco y la fibrosis (Engelbrechtsen et al., 2013). Diversos grados y composición del tejido inflamatorio, condicionados por diferente grado de vascularización, podrían impactar sobre la distinta producción de moléculas, como el lumican entre otras, y explicar las diferencias de cicatrización tan llamativas observadas entre animales tratados y no tratados. El impacto de respuestas inflamatorias defectuosas en el remodelado y ruptura miocárdica postIAM, se ha observado en modelos murinos sin metaloproteinasa-28, que presentan una deposición deficiente de colágeno y un menor número de miofibroblastos (Ma et al., 2013).

En nuestras muestras histológicas el espesor del tejido fibroso fue significativamente mayor en los animales tratados que en los controles, de lo que se deduce que deben activarse vías de fibrosis de un modo, cualitativo o cuantitativamente distinto. Globalmente, diferencias en los tipos celulares, citoquinas, respuesta inflamatoria y vasos que interaccionan en una cicatriz “viviente”, dependientes primaria o secundariamente de la inhibición del miR-92a, son mecanismos plausibles para explicar las diferencias observadas.

6.- TRANSLACIÓN DEL ESTUDIO: DE NUESTRO MODELO A LOS PACIENTES CON INFARTO

Ha sido ampliamente criticado en investigación experimental la utilización de modelos animales o metodologías difícilmente translacionables a pacientes y a situaciones clínicas (van der Worp and Macleod, 2011; Martić-Kehl et al., 2012; Ergorul and Levin, 2013). Si algo se puede defender en nuestro estudio es que intentó replicar fielmente el manejo habitual de un paciente con IAM. Ello fue posible gracias a la continua interacción de equipos clínicos y preclínicos que han investigado conjuntamente en el estudio.

Se trató de un modelo de infarto percutáneo donde los accesos fueron obtenidos idénticamente a la técnica habitual en pacientes. Además, se trató de un modelo reperfundido, lejos de las técnicas a tórax abierto o modelos no reperfundidos que se apartan de la actualidad clínica y que podrían interferir en la obtención de resultados no reproducibles.

Para dosificar el tratamiento se prefirió, el administrarlo a ser posible en 2 inyecciones intracoronarias y en un volumen aceptable clínicamente. La eficiencia de encapsulación y la buena tolerancia de la concentración de microesferas permitió conseguirlo. El tratamiento se aplicó a los 5 minutos de la reperusión, considerando que tiempos más tardíos podrían no ser cumplidos en las angioplastias urgentes, especialmente aquellas que acuden durante la madrugada. Además se sabe que las reacciones de reparación postIAM empiezan muy rápidamente después de la lesión por lo que formar vasos lo más rápidamente posible parece lo más adecuado para favorecer dichas reacciones de reparación. Aunque administraciones más tardías, en un segundo tiempo, también podrían realizarse en el escenario clínico, no podemos extrapolar los beneficios observados tras una inyección inmediata. Tampoco puede extrapolarse el estudio a fases crónicas de remodelado postIAM, precisando para ello de otros estudios experimentales de eficacia y seguridad en ese contexto temporal. En sentido contrario, una aplicación más precoz, antes de reperfundir la arteria podría haberse contemplado. Además, hay evidencias de que determinados microRNAs, entre ellos el miR-92a, están envueltos en el daño por isquemia-reperusión (Ye et al., 2011). Quizás una aplicación precoz, aportaría una cardioprotección adicional por este mecanismo. Sin embargo, en nuestros primeros experimentos piloto, en los que testamos la aplicación de microesferas a flujo parado, observamos una agregación considerable de las mismas, lo que aumenta el riesgo de embolizar arteriolas o capilares de mayor tamaño.

A los animales se les administró aspirina y heparina durante el cateterismo cardíaco para evitar que después, interacciones farmacológicas con dichos fármacos, pudieran neutralizar los resultados observados. Se utilizó el material habitual y el contraste de nuestra unidad de hemodinámica cardíaca.

El establecer metodológicamente el punto de partida en la clínica, ello nos ha facilitado el diseño de un ensayo clínico de fase 2 previsto para el próximo año y nos mantiene esperanzados de poder reproducir, en humanos, los resultados favorables observados en nuestros animales.

7.- LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Teniendo en cuenta que el remodelado adverso es un proceso progresivo que puede prolongarse bastantes meses y hasta un año después del infarto, un periodo de seguimiento más prolongado podría haber acentuado más las diferencias observadas,

especialmente en lo relativo a la contractilidad global del ventrículo izquierdo. Consideramos que un mes era apropiado para evaluar parámetros en relación a la formación de cicatriz pero probablemente no fue un tiempo lo suficientemente prolongado para que las fuerzas de pared acabaran expandiendo la cicatriz y dilatando el ventrículo, fenómeno que puede requerir meses o incluso un año para hacerse evidente (Hole et al., 2003; Hillis et al., 2006). Los nuevos experimentos con la RMN *in vivo* tras un seguimiento de 3 meses detectarán, con mayor probabilidad, diferencias en la contractilidad ventricular secundarias al impacto del tratamiento con antagomir-92a sobre el remodelado ventricular postIAM.

Por otra parte, la RMN *ex vivo* no permitió obtener información sobre los volúmenes de la cavidad ventricular izquierda (Hillis et al., 2006). La RMN *ex vivo* tampoco permitió obtener datos acerca de la distribución, propiedades y composición del tejido fibroso de la cicatriz. Los nuevos experimentos con la RMN *in vivo*, tras un seguimiento de tres meses, permitirán evaluar los volúmenes con precisión. Además, avances en las técnicas de imagen respecto a la evaluación de la fibrosis, permitirán obtener nuevos inputs para llegar a comprender el fenómeno de remodelado adverso (van den Borne et al., 2008; de Hass et al., 2012; Won et al., 2013). Paralelamente también, la caracterización histológica de sus componentes será investigada en futuros análisis de las muestras obtenidas en nuestro estudio.

Otra limitación la constituye el hecho de que únicamente pudieron implantarse holters subcutáneos a 10 de los 27 animales incluidos en el estudio. Ello fue debido a que los holters fueron obtenidos de pacientes, tras su explante, debiendo cumplir la condición de mantener suficiente batería para registrar el ritmo cardíaco durante un mes. Es poco frecuente que el holter realice un diagnóstico precoz y que pueda ser explantado antes de lo previsto. A pesar de esta dificultad, pudimos disponer de 10 dispositivos que fueron implantados de forma aleatoria y distribuidos homogéneamente entre los grupos de tratamiento. No se observaron arritmias en ninguno de los animales estudiados, lo que garantiza un bajo potencial arritmogénico tanto derivado del propio tratamiento, como de los islotes celulares supervivientes observados histológicamente a nivel de la cicatriz postIAM.

Tampoco la resistencia microvascular pudo ser cuantificada en algunos animales. Las pericarditis severas postIAM que imposibilitaron la disección de la LAD y

problemas técnicos de clampaje del flujo con el propio sensor de flujo, sin poder obtener un valor estable y fiable, fueron las principales razones que impidieron su cuantificación en algunos animales. La aplicación de herramientas diagnósticas más novedosas, como la guía que mide simultáneamente presión y temperatura, podría evitar esta limitación, obteniendo valores de flujo coronario que se correlacionan bien con el flujo coronario absoluto (Fearon et al., 2003). Su aplicación en futuros estudios podría facilitar el análisis de la resistencia microvascular, sin necesidad de aplicar técnicas invasivas.

Por otro lado en nuestro estudio, no se ha profundizado en conocer los mecanismos moleculares y celulares por los que la angiogénesis logra que el proceso de cicatrización sea reparativo y que ejerza la suficiente resistencia para que el ventrículo siga manteniendo su forma y trabaje adecuadamente. Sin embargo, las observaciones histológicas, han ratificado la presencia de focos de tejido viable en el seno cicatriz, lo que permite postular una actividad antiapoptótica y una mayor supervivencia de fibroblastos y cardiomiocitos. Ello concuerda con las evidencias publicadas hasta el momento, en que se han identificado targets del miR92a implicados en la apoptosis y en la proliferación celular (Ranji et al., 2013). Tampoco se han investigado los targets directos o indirectos del miR-92a en nuestro modelo porcino. Sin embargo, el alto grado de conservación de los microRNAs y la homología de su secuencia entre especies, hace plausible extrapolar los targets identificados en el modelo de ratón, a la especie porcina.

Finalmente, también constituye una limitación del estudio el no haber implantado un stent en la arteria responsable del IAM, como se realiza habitualmente durante la angioplastia primaria. Sin embargo, a pesar de la agresión endotelial por el inflado del balón, para inducir el IAM, sólo dos animales ocluyeron la arteria durante el seguimiento. Por otro lado, su implantación habría permitido descartar potenciales efectos adversos sobre la endotelización del stent. Sin embargo, disponemos de evidencias previas que han puesto de manifiesto que la administración de antagomir-92a *in vivo* favorece la re-endotelización y reduce la formación neointimal tras la implantación de un stent en un conducto arterial (Iaconetti et al., 2012). Este efecto favorable colateral añadiría un beneficio adicional a la terapia con antagomir-92a durante la angioplastia primaria e implantación de un stent.

RESUMEN DE RESULTADOS

RESUMEN DE RESULTADOS

- Se ha puesto a punto un **modelo de IAM reperfundido inducido percutáneamente** con una extensión suficiente para presentar la complicación de remodelado adverso postIAM, foco de interés en nuestro trabajo.
- Se ha diseñado un **sistema de encapsulación de antagomir-92a** apropiado que puede ser liberado directa y selectivamente por vía intracoronaria. Se trata de microesferas bioabsorbibles y biocompatibles de PLGA capaces de quedar retenidas en la microcirculación cardíaca y desintegrarse en un periodo de liberación ajustado a los procesos de reparación miocárdica. Tras haber demostrado su utilidad en nuestro estudio, este sistema de vectorización podrá extenderse a otros antagomires y a otras condiciones patológicas.
- Se ha comprobado la tolerancia del miocardio a la microembolización capilar, demostrando que la inyección de microesferas **no produce toxicidad local** significativa, con un margen terapéutico amplio. Una dosificación de microesferas 8 veces superior y administrada a animales sanos no se ha acompañado de daño miocárdico irreversible. Además, no se objetivó una dosis máxima, a partir de la cual, los efectos se tornan irreversibles. Tampoco se han inducido arritmias, inestabilidad hemodinámica o cambios eléctricos durante las inyecciones.
- **No se han detectado efectos adversos a distancia.** El estudio necrópsico de los animales no detectó neoformaciones. Tampoco fueron observados trastornos analíticos o fenómenos inmunológicos a distancia.
- La administración de antagomir-92a encapsulado ha producido una **inhibición sostenida de su microRNA-92a** específico, que se mantiene al menos 10 días posttratamiento. Ello refleja, por un lado, la integridad de las propiedades del

fármaco una vez encapsulado, y por otro, la liberación sostenida paralela a la degradación de la micropartícula.

- **La inhibición sostenida del microRNA-92a induce neoangiogénesis.** Hemos demostrado una densidad vascular significativamente mayor en el grupo tratado con antagomir-92a encapsulado. Esta formación de vasos ocurre tanto en los bordes como en el core de la cicatriz. Con este hallazgo hemos ratificado de nuevo, en una especie más próxima al ser humano, que el miR-92a es un represor endógeno del programa angiogénico de las células endoteliales.
- **La neoangiogénesis reduce las resistencias microvasculares en el seno del infarto.** Hemos demostrado que las resistencias microvasculares en la red microvascular del tejido infartado son significativamente menores en el grupo tratado con antagomir-92a que en los controles. La reducción adicional, tras la administración de un estímulo vasodilatador traduce el carácter funcionalmente maduro de las células endoteliales neoformadas.
- **La neoangiogénesis generada se asocia a una cicatrización favorable y a la prevención de remodelado adverso postIAM.** Morfológicamente, los parámetros característicos de remodelado adverso, como adelgazamiento de la cicatriz y expansión del área dañada han estado significativamente menos presentes en el grupo tratado con antagomir-92a encapsulado, al mes postIAM. Funcionalmente, un porcentaje significativamente menor de animales presentaron discinesia y formación de aneurisma septoapical. La contractilidad global del ventrículo izquierdo mostró una fuerte tendencia a estar menos reducida en el grupo de animales tratados que en los controles.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

A partir de estos resultados se concluye que:

- I. La administración intracoronaria precoz de antagomir-92a encapsulado en un modelo porcino de IAM previene el desarrollo de remodelado ventricular adverso sin generar efectos adversos locales ni a distancia.
- II. Este nuevo tratamiento constituye una nueva estrategia terapéutica potencialmente útil en la prevención de remodelado en pacientes que sufren un IAM extenso.
- III. Los datos obtenidos deben servir de base para el diseño de estudios de fase I y II que permitan la translación de esta terapia a la práctica clínica.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

A

Abd-Elmoniem, K.Z., Tomas, M.S., Sasano, T., Soleimanifard, S., Vonken, E.J., Youssef, A., Agarwal, H., Dimaano, V.L., Calkins, H., Stuber, M., Prince, J.L., Abraham, T.P. and Abraham, M.R. (2012) Assessment of distribution and evolution of mechanical dyssynchrony in a porcine model of myocardial infarction by cardiovascular magnetic resonance. *J. Cardiovasc. Magn. Reson.* **14**, 1.

Adam, O., Löhlfelm, B., Thum, T., Gupta, S.K., Puhl, S.L., Schäfers, H.J., Böhm, M. and Laufs, U. (2012) Role of miR-21 in the pathogenesis of atrial fibrosis. *Basic Res. Cardiol.* **107**, 278.

Adams, K.F. Jr. (2004) Pathophysiologic role of the renin-angiotensin-aldosterone and sympathetic nervous systems in heart failure. *Am. J. Health Syst. Pharm. Suppl* **2**, S4-S13.

Agah, R., Frenkel, P.A., French, B.A., Michael, L.H., Overbeek, P.A. and Schneider, M.D. (1997) Gene recombination in postmitotic cells. Targeted expression of Cre recombinase provokes cardiac-restricted, site-specific rearrangement in adult ventricular muscle in vivo. *J. Clin. Invest.* **100**, 169-179.

Alcendor, R.R., Gao, S., Zhai, P., Zablocki, D., Holle, E., Yu, X., Tian, B., Wagner, T., Vatner, S.F. and Sadoshima, J. (2007) Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circ. Res.* **100**, 1512-1521.

Alpini, G., Glaser, S.S., Zhang, J.P., Francis, H., Han, Y., Gong, J., Stokes, A., Francis, T., Hughart, N., Hubble, L., Zhuang, S.M. and Meng, F. (2011) Regulation of placenta growth factor by microRNA-125b in hepatocellular cancer. *J. Hepatol.* **55**, 1339-1345.

Allen, T.M. (1997) Liposomes. Opportunities in drug delivery. *Drugs* **54**, 8-14.

Allen, T.M. and Cullis, P.R. (2013) Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65**, 36-48.

Ambros, V. (2004) The functions of animal microRNAs. *Nature* **431**, 350-355.

Anand, S. and Cheresch, D.A. (2011) Emerging role of micro-RNAs in the regulation of angiogenesis. *Genes Cancer* **2**, 1134-1138.

Anand, S., Majeti, B.K., Acevedo, L.M., Murphy, E.A., Mukthavaram, R., Schepke, L., Huang, M., Shields, D.J., Lindquist, J.N., Lapinski, P.E., King, P.D., Weis, S.M. and Cheresh, D.A. (2010) MicroRNA-132-mediated loss of p120RasGAP activates the endothelium to facilitate pathological angiogenesis. *Nat. Med.* **16**, 909-914.

Andersen, H.R., Nielsen, T.T., Rasmussen, K., Thuesen, L., Kelbaek, H., Thayssen, P., Abildgaard, U., Pedersen, F., Madsen, J.K., Grande, P., Villadsen, A.B., Krusell, L.R., Haghfelt, T., Lomholt, P., Husted, S.E., Vigholt, E., Kjaergard, H.K. and Mortensen, L.S. DANAMI-2 Investigators. (2003) A comparison of coronary angioplasty with fibrinolytic therapy in acute myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* **349**, 733-742.

Anversa, P. and Nadal-Ginard, B. (2002) Myocyte renewal and ventricular remodelling. *Nature* **415**, 240-243.

B

Bai, Y., Bai, X., Wang, Z., Zhang, X., Ruan, C. and Miao, J. (2011) MicroRNA-126 inhibits ischemia-induced retinal neovascularization via regulating angiogenic growth factors. *Exp. Mol. Pathol.* **91**, 471-477.

Balligand, J.L., Feron, O. and Dessy, C. (2009) eNOS activation by physical forces: from short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues. *Physiol. Rev.* **89**, 481-534.

Bangham, A.D. (1961) A correlation between surface charge and coagulant action of phospholipids. *Nature* **192**, 1197-1198.

Bangham, A.D. (1972) Lipid bilayers and biomembranes. *Annu. Rev. Biochem.* **41**, 753-776.

Barin, J.G. and Čiháková, D. (2013) Control of inflammatory heart disease by CD4+ T cells. (2013) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1285**, 80-96.

Barr, E., Carroll, J., Kalynych, A.M., Tripathy, S.K., Kozarsky, K., Wilson, J.M. and Leiden, J.M. (1994) Efficient catheter-mediated gene transfer into the heart using replication-defective adenovirus. *Gene Ther.* **1**, 51-58.

Bartel, D.P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281-297.

Belevych, A.E., Sansom, S.E., Terentyeva, R., Ho, H.T., Nishijima, Y., Martin, M.M., Jindal,

H.K., Rochira, J.A., Kunitomo, Y., Abdellatif, M., Carnes, C.A., Elton, T.S., Györke, S. and Terentyev, D. (2011) MicroRNA-1 and -133 increase arrhythmogenesis in heart failure by dissociating phosphatase activity from RyR2 complex. *PLoS One* **6**, e28324.

Belge, C., Massion, P.B., Pelat, M. and Balligand, J.L. (2005) Nitric oxide and the heart: update on new paradigms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1047**, 173-182.

Beltrami, A.P., Urbanek, K., Kajstura, J., Yan, S.M., Finato, N., Bussani, R., Nadal-Ginard, B., Silvestri, F., Leri, A., Beltrami, C.A. and Anversa, P. (2001) Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* **344**, 1750-1757.

Bentwich, I., Avniel, A., Karov, Y., Aharonov, R., Gilad, S., Barad, O., Barzilai, A., Einat, P., Einav, U., Meiri, E., Sharon, E., Spector, Y. and Bentwich, Z. (2005) Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat. Genet.* **37**, 766-770.

Bergmann, O., Bhardwaj, R.D., Bernard, S., Zdunek, S., Barnabé-Heider, F., Walsh, S., Zupicich, J., Alkass, K., Buchholz, B.A., Druid, H., Jovinge, S. and Frisén, J. (2009) Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* **324**, 98-102.

Bernardo, B.C., Gao, X.M., Winbanks, C.E., Boey, E.J., Tham, Y.K., Kiriazis, H., Gregorevic, P., Obad, S., Kauppinen, S., Du, X.J., Lin, R.C. and McMullen, J.R. (2012) Therapeutic inhibition of the miR-34 family attenuates pathological cardiac remodeling and improves heart function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 17615-17620.

Bonauer, A., Boon, R.A. and Dimmeler, S. (2010) Vascular microRNAs. *Curr. Drug Targets* **11**, 943-949.

Bonauer, A., Carmona, G., Iwasaki, M., Mione, M., Koyanagi, M., Fischer, A., Burchfield, J., Fox, H., Doebele, C., Ohtani, K., Chavakis, E., Potente, M., Tjwa, M., Urbich, C., Zeiher, A.M. and Dimmeler, S. (2009) MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice. *Science* **324**, 1710-1713.

Bonauer, A. and Dimmeler, S. (2009) The microRNA-17-92 cluster: still a miRacle? *Cell Cycle* **8**, 3866-3873.

Braunwald, E. and Chidsey, C.A. (1965) The adrenergic nervous system in the control of the normal and failing heart. *Proc. R. Soc. Med.* **58**, 1063-1066.

Brock, M., Samillan, V.J., Trenkmann, M., Schwarzwald, C., Ulrich, S., Gay, R.E., Gassmann, M., Ostergaard, L., Gay, S., Speich, R. and Huber, L.C. (2012) AntagomiR directed against

miR-20a restores functional BMP2 signalling and prevents vascular remodelling in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Eur. Heart J.* [Epub ahead of print].

Brodie, B.R., Stuckey, T.D., Kissling, G., Hansen, C.J., Weintraub, R.A. and Kelly, T.A. (1996) Importance of infarct-related artery patency for recovery of left ventricular function and late survival after primary angioplasty for acute myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **28**, 319-325.

Buckberg, G., Athanasuleas, C. and Conte, J. (2012) Surgical ventricular restoration for the treatment of heart failure. *Nat. Rev. Cardiol.* **9**, 703-716.

Bueno, M.J., Pérez de Castro, I. and Malumbres, M. (2008) Control of cell proliferation pathways by microRNAs. *Cell Cycle* **7**, 3143-3148.

Bujak, M., Kweon, H.J., Chatila, K., Li, N., Taffet, G. and Frangogiannis, N.G. (2008) Aging-related defects are associated with adverse cardiac remodeling in a mouse model of reperfused myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **51**, 1384-1392.

Bujak, M., Ren, G., Kweon, H.J., Dobaczewski, M., Reddy, A., Taffet, G., Wang, X.F. and Frangogiannis, N.G. (2007) Essential role of Smad3 in infarct healing and in the pathogenesis of cardiac remodeling. *Circulation* **116**, 2127-2138.

C

Callis, T.E., Pandya, K., Seok, H.Y., Tang, R.H., Tatsuguchi, M., Huang, Z.P., Chen, J.F., Deng, Z., Gunn, B., Shumate, J., Willis, M.S., Selzman, C.H. and Wang, D.Z. (2009) MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *J. Clin. Invest.* **119**, 2772-2786.

Caporali, A. and Emanuelli, C. (2011) MicroRNA regulation in angiogenesis. *Vascul. Pharmacol.* **55**, 79-86.

Caporali, A. and Emanuelli, C. (2011) MicroRNA-503 and the extended microRNA-16 family in angiogenesis. *Trends Cardiovasc. Med.* **21**, 162-166.

Caporali, A., Meloni, M., Völlenkle, C., Bonci, D., Sala-Newby, G.B., Addis, R., Spinetti, G., Losa, S., Masson, R., Baker, A.H., Agami, R., le Sage, C., Condorelli, G., Madeddu, P., Martelli, F. and Emanuelli, C. (2011) Deregulation of microRNA-503 contributes to diabetes mellitus-induced impairment of endothelial function and reparative angiogenesis after limb ischemia. *Circulation* **123**, 282-291.

Carè, A., Catalucci, D., Felicetti, F., Bonci, D., Addario, A., Gallo, P., Bang, M.L., Segnalini, P., Gu, Y., Dalton, N.D., Elia, L., Latronico, M.V., Høydal, M., Autore, C., Russo, M.A., Dorn, G.W. 2nd., Ellingsen, O., Ruiz-Lozano, P., Peterson, K.L., Croce, C.M., Peschle, C. and Condorelli, G. (2007) MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat. Med.* **13**, 613-618.

Carluccio, E., Biagioli, P., Alunni, G., Murrone, A., Pantano, P., Biscottini, E., Zuchi, C., Zingarini, G., Cavallini, C. and Ambrosio, G. (2011) Presence of extensive LV remodeling limits the benefits of CRT in patients with intraventricular dyssynchrony. *JACC Cardiovasc. Imaging* **4**, 1067-1076.

Carrington, J.C. and Ambros, V. (2003) Role of microRNAs in plant and animal development. *Science* **301**, 336-338.

Catalucci, D., Latronico, M.V. and Condorelli, G. (2008) MicroRNAs control gene expression: importance for cardiac development and pathophysiology. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1123**, 20-29.

Cerritelli, S.M. and Crouch, R.J. (2009) Ribonuclease H: the enzymes in eukaryotes. *FEBS J.* **276**, 1494-1505.

Cimmino, A., Calin, G.A., Fabbri, M., Iorio, M.V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Aqeilan, R.I., Zupo, S., Dono, M., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, C.G., Kipps, T.J., Negrini, M. and Croce, C.M. (2005) miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 13944-13949.

Cinca, J., Carreño, A., Mont, L., Blanch, P. and Soler-Soler, J. (1996) Neurally mediated negative inotropic effect impairs myocardial function during cholinergic coronary vasoconstriction in pigs. *Circulation* **94**, 1101-1108.

Cochain, C., Channon, K.M. and Silvestre, J.S. (2013) Angiogenesis in the infarcted myocardium. *Antioxid. Redox Signal* **18**, 1100-1113.

Collison, A., Herbert, C., Siegle, J.S., Mattes, J., Foster, P.S. and Kumar, R.K. (2011) Altered expression of microRNA in the airway wall in chronic asthma: miR-126 as a potential therapeutic target. *BMC Pulm. Med.* **11**, 29.

Connelly, C., Vogel, W.M., Hernandez, Y.M. and Apstein, C.S. (1982) Movement of necrotic wavefront after coronary artery occlusion in rabbit. *Am. J. Physiol.* **243**, H682-H690.

Cordes, K.R. and Srivastava D. (2009) MicroRNA regulation of cardiovascular development.

Circ. Res. **104**, 724-732.

Crackower, M.A., Sarao, R., Oudit, G.Y., Yagil, C., Kozieradzki, I., Scanga, S.E., Oliveira-dos-Santos, A.J., da Costa, J., Zhang, L., Pei, Y., Scholey, J., Ferrario, C.M., Manoukian, A.S., Chappell, M.C., Backx, P.H., Yagil, Y. and Penninger, J.M. (2002) Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature* **417**, 822-828.

Cross, D.P. and Wang, C. (2011) Stromal-derived factor-1 alpha-loaded PLGA microspheres for stem cell recruitment. *Pharm. Res.* **28**, 2477-2489.

CH

Cha, S.T., Chen, P.S., Johansson, G., Chu, C.Y., Wang, M.Y., Jeng, Y.M., Yu, S.L., Chen, J.S., Chang, K.J., Jee, S.H., Tan, C.T., Lin, M.T. and Kuo, M.L. (2010) MicroRNA-519c suppresses hypoxia-inducible factor-1alpha expression and tumor angiogenesis. *Cancer Res.* **70**, 2675-2685.

Champion, J.A., Walker, A. and Mitragotri, S. (2008) Role of particle size in phagocytosis of polymeric microspheres. *Pharm. Res.* **25**, 1815-1821.

Chan, L.S., Yue, P.Y., Mak, N.K. and Wong, R.N. (2009) Role of microRNA-214 in ginsenoside-Rg1-induced angiogenesis. *Eur. J. Pharm. Sci.* **38**, 370-377.

Chan, M., Liaw, C.S., Ji, S.M., Tan, H.H., Wong, C.Y., Thike, A.A., Tan, P.H., Ho, G.H. and Lee, A.S. (2013) Identification of Circulating MicroRNA Signatures for Breast Cancer Detection. *Clin. Cancer Res.* **19**, 4477-4487.

Chang, M.Y., Seideman, J. and Sofou, S. (2008) Enhanced loading efficiency and retention of 225Ac in rigid liposomes for potential targeted therapy of micrometastases. *Bioconjug. Chem.* **19**, 1274-1282.

Chang, K.W., Liu, C.J., Chu, T.H., Cheng, H.W., Hung, P.S., Hu, W.Y. and Lin, S.C. (2008) Association between high miR-211 microRNA expression and the poor prognosis of oral carcinoma. *J. Dent. Res.* **87**, 1063-1068.

Chang, Y., Liu, C., Yang, J., Liu, G., Feng, F., Tang, J., Hu, L., Li, L., Jiang, F., Chen, C., Wang, R., Yang, Y., Jiang, X., Wu, M., Chen, L. and Wang, H. (2013) MiR-20a triggers metastasis of gallbladder carcinoma. *J. Hepatol.* [Epub ahead of print].

Chen, H., Wang, J., Xiang, M.X., Lin, Y., He, A., Jin, C.N., Guan, J., Sukhova, G.K., Libby, P., Wang, J.A. and Shi, G.P. (2013) Cathepsin S-mediated fibroblast trans-differentiation contributes to left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* [Epub ahead of print].

Chen, L.T., Xu, S.D., Xu, H., Zhang, J.F., Ning, J.F. and Wang, S.F. (2012) MicroRNA-378 is associated with non-small cell lung cancer brain metastasis by promoting cell migration, invasion and tumor angiogenesis. *Med. Oncol.* **29**,1673-1680.

Chen, W., Saxena, A., Li, N., Sun, J., Gupta, A., Lee, D.W., Tian, Q., Dobaczewski, M. and Frangogiannis, N.G. (2012) Endogenous IRAK-M attenuates postinfarction remodeling through effects on macrophages and fibroblasts. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 2598-2608.

Chen, Y. and Gorski, D.H. (2008) Regulation of angiogenesis through a microRNA (miR-130a) that down-regulates antiangiogenic homeobox genes GAX and HOXA5. *Blood* **111**,1217-1226.

Chen, Z., Lai, T.C., Jan, Y.H., Lin, F.M., Wang, W.C., Xiao, H., Wang, Y.T., Sun, W., Cui, X., Li, Y.S., Fang, T., Zhao, H., Padmanabhan, C., Sun, R., Wang, D.L., Jin, H., Chau, G.Y., Huang, H.D., Hsiao, M. and Shyy, J.Y. (2013) Hypoxia-responsive miRNAs target argonaute 1 to promote angiogenesis. *J. Clin. Invest.* **123**, 1057-1067.

Cheng, P., Chen, C., He, H.B., Hu, R., Zhou, H.D., Xie, H., Zhu, W., Dai, R.C., Wu, X.P., Liao, E.Y. and Luo, X.H. (2013) miR-148a regulates osteoclastogenesis by targeting V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B. *J. Bone Miner. Res.* **28**, 1180-1190.

Choi, H.F., Rademakers, F.E. and Claus, P. (2011) Left-ventricular shape determines intramyocardial mechanical heterogeneity. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **301**, H2351-H2361.

Choi, Y.C., Yoon, S., Jeong, Y., Yoon, J. and Baek, K. (2011) Regulation of vascular endothelial growth factor signaling by miR-200b. *Mol. Cells* **32**, 77-82.

Christensen, G., Minamisawa, S., Gruber, P.J., Wang, Y. and Chien, K.R. (2000) High-efficiency, long-term cardiac expression of foreign genes in living mouse embryos and neonates. *Circulation* **101**, 178-184.

D

da Costa Martins, P.A., Salic, K., Gladka, M.M., Armand, A.S., Leptidis, S., el Azzouzi, H., Hansen, A., Coenen-de Roo, C.J., Bierhuizen, M.F., van der Nagel, R., van Kuik, J., de Weger,

R., de Bruin, A., Condorelli, G., Arbones, M.L., Eschenhagen, T. and De Windt, L.J. (2010) MicroRNA-199b targets the nuclear kinase Dyrk1a in an auto-amplification loop promoting calcineurin/NFAT signalling. *Nat. Cell Biol.* **12**, 1220-1227.

Dal Monte, M., Landi, D., Martini, D. and Bagnoli, P. (2013) Antiangiogenic role of miR-361 in human umbilical vein endothelial cells: functional interaction with the peptide somatostatin. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **386**,15-27.

Davis, B.H., Morimoto, Y., Sample, C., Olbrich, K., Leddy, H.A., Guilak, F. and Taylor, D.A. (2012) Effects of myocardial infarction on the distribution and transport of nutrients and oxygen in porcine myocardium. *J. Biomech. Eng.* **134**, 101005.

de Haas, H.J., van den Borne, S.W., Boersma, H.H., Slart, R.H., Fuster, V. and Narula, J. (2012) Evolving role of molecular imaging for new understanding: targeting myofibroblasts to predict remodeling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1254**, 33-41.

Decker, C., Fahr, A., Kuntsche, J. and May, S. (2012) Selective partitioning of cholesterol and a model drug into liposomes of varying size. *Chem. Phys. Lipids* **165**, 520-529.

Dejean, E., Renalier, M.H., Foisseau, M., Agirre, X., Joseph, N., de Paiva, G.R., Al Saati, T., Soulier, J., Desjobert, C., Lamant, L., Prósper, F., Felsher, D.W., Cavallé, J., Prats, H., Delsol, G., Giuriato, S. and Meggetto, F. (2011) Hypoxia-microRNA-16 downregulation induces VEGF expression in anaplastic lymphoma kinase (ALK)-positive anaplastic large-cell lymphomas. *Leukemia* **25**, 1882-1890.

Delewi, R., Andriessen, A., Tijssen, J.G., Zijlstra, F., Piek, J.J. and Hirsch, A. (2013) Impact of intracoronary cell therapy on left ventricular function in the setting of acute myocardial infarction: a meta-analysis of randomised controlled clinical trials. *Heart* **99**, 225-232.

Dentelli, P., Rosso, A., Orso, F., Olgasi, C., Taverna, D. and Brizzi, M.F. (2010) microRNA-222 controls neovascularization by regulating signal transducer and activator of transcription 5A expression. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 1562-1568.

Desmet, W., Bogaert, J., Dubois, C., Sinnaeve, P., Adriaenssens, T., Pappas, C., Ganame, J., Dymarkowski, S., Janssens, S., Belmans, A. and Van de Werf, F.(2011) High-dose intracoronary adenosine for myocardial salvage in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction. *Eur. Heart J.* **32**, 867-877.

Dews, M., Homayouni, A., Yu, D., Murphy, D., Seignani, C., Wentzel, E., Furth, E.E., Lee, W.M., Enders, G.H., Mendell, J.T. and Thomas-Tikhonenko, A. (2006) Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nat. Genet.* **38**, 1060-1065.

Diakowski, W., Ozimek, Ł., Bielska, E., Bem, S., Langner, M. and Sikorski, A.F. (2006) Cholesterol affects spectrin-phospholipid interactions in a manner different from changes resulting from alterations in membrane fluidity due to fatty acyl chain composition. *Biochim. Biophys. Acta* **1758**, 4-12.

Dobaczewski, M., de Haan, J.J. and Frangogiannis, N.G. (2012) The extracellular matrix modulates fibroblast phenotype and function in the infarcted myocardium. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* **5**, 837-847.

Doebele, C., Bonauer, A., Fischer, A., Scholz, A., Reiss, Y., Urbich, C., Hofmann, W.K., Zeiher, A.M. and Dimmeler, S. (2010) Members of the microRNA-17-92 cluster exhibit a cell-intrinsic antiangiogenic function in endothelial cells. *Blood* **115**, 4944-4950.

Dong, L., Kang, L., Ding, L., Chen, Q., Bai, J., Gu, R., Li, L. and Xu, B. (2011) Insulin modulates ischemia-induced endothelial progenitor cell mobilization and neovascularization in diabetic mice. *Microvasc. Res.* **82**, 227-236.

Duan, Y., Zhou, B., Su, H., Liu, Y. and Du, C. miR-150 regulates high glucose-induced cardiomyocyte hypertrophy by targeting the transcriptional co-activator p300. (2013) *Exp. Cell. Res.* **319**, 173-184.

Dyson, A. and Singer, M. (2009) Animal models of sepsis: why does preclinical efficacy fail to translate to the clinical setting? *Crit. Care Med.* **37**, S30-S37.

E

Eitel, I., Wöhrle, J., Suenkel, H., Meissner, J., Kerber, S., Lauer, B., Pauschinger, M., Birkemeyer, R., Axthelm, C., Zimmermann, R., Neuhaus, P., Brosteanu, O., de Waha, S., Desch, S., Gutberlet, M., Schuler, G. and Thiele, H. (2013) Intracoronary compared with intravenous bolus abciximab application during primary percutaneous coronary intervention in ST-segment elevation myocardial infarction: cardiac magnetic resonance substudy of the AIDA STEMI trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* **61**, 1447-1454.

Engelbrechtsen, K.V., Lunde, I.G., Strand, M.E., Waehre, A., Sjaastad, I., Marstein, H.S., Skrbic, B., Dahl, C.P., Askevold, E.T., Christensen, G., Bjørnstad, J.L. and Tønnessen, T. (2013)

Lumican is increased in experimental and clinical heart failure, and its production by cardiac fibroblasts is induced by mechanical and proinflammatory stimuli. *FEBS J.* **280**, 2382-2398.

Engelmann, M.G., Theiss, H.D., Hennig-Theiss, C., Huber, A., Wintersperger, B.J., Werle-Ruedinger, A.E., Schoenberg, S.O., Steinbeck, G. and Franz, W.M. (2006) Autologous bone marrow stem cell mobilization induced by granulocyte colony-stimulating factor after subacute ST-segment elevation myocardial infarction undergoing late revascularization: final results from the G-CSF-STEMI (Granulocyte Colony-Stimulating Factor ST-Segment Elevation Myocardial Infarction) trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* **48**, 1712-1721.

Ergorul, C. and Levin, L.A. (2013) Solving the lost in translation problem: improving the effectiveness of translational research. *Curr. Opin. Pharmacol.* **13**, 108-114.

Eschaliel, R., Fertin, M., Fay, R., Bauters, C., Zannad, F., Pinet, F. and Rossignol, P. (2013) Extracellular Matrix Turnover Biomarkers Predict Long-term Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction: Insights from the REVE-2 Study. *Circ. Heart Fail.* [Epub ahead of print]

F

Fabian, M.R., Sundermeier, T.R. and Sonenberg, N. (2010) Understanding how miRNAs post-transcriptionally regulate gene expression. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* **50**, 1-20.

Fan, L., Wu, Q., Xing, X., Wei, Y. and Shao, Z. (2012) MicroRNA-145 targets vascular endothelial growth factor and inhibits invasion and metastasis of osteosarcoma cells. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* **44**, 407-414.

Fang, J.H., Zhou, H.C., Zeng, C., Yang, J., Liu, Y., Huang, X., Zhang, J.P., Guan, X.Y. and Zhuang, S.M. (2011) MicroRNA-29b suppresses tumor angiogenesis, invasion, and metastasis by regulating matrix metalloproteinase 2 expression. *Hepatology* **54**, 1729-1740.

Fang, L., Deng, Z., Shatseva, T., Yang, J., Peng, C., Du, W.W., Yee, A.J., Ang, L.C., He, C., Shan, S.W. and Yang, B.B. (2011) MicroRNA miR-93 promotes tumor growth and angiogenesis by targeting integrin- β 8. *Oncogene* **30**, 806-821.

Fang, L., Du, W.W., Yang, W., Rutnam, Z.J., Peng, C., Li, H., O'Malley, Y.Q., Askeland, R.W., Sugg, S., Liu, M., Mehta, T., Deng, Z. and Yang, B.B. (2012) MiR-93 enhances angiogenesis and metastasis by targeting LATS2. *Cell Cycle* **11**, 4352-4365.

Fearon, W.F., Balsam, L.B., Farouque, H.M., Caffarelli, A.D., Robbins, R.C., Fitzgerald, P.J., Yock, P.G. and Yeung, A.C. (2003) Novel index for invasively assessing the coronary microcirculation. *Circulation* **107**, 3129-3132.

Felicetti, F., Errico, M.C., Bottero, L., Segnalini, P., Stoppacciaro, A., Biffoni, M., Felli, N., Mattia, G., Petrini, M., Colombo, M.P., Peschle, C. and Carè, A. (2008) The promyelocytic leukemia zinc finger-microRNA-221/-222 pathway controls melanoma progression through multiple oncogenic mechanisms. *Cancer Res.* **68**, 2745-2754.

Feng, Y.J., Chen, C., Fallon, J.T., Lai, T., Chen, L., Knibbs, D.R., Waters, D.D. and Wu, A.H. (1998) Comparison of cardiac troponin I, creatine kinase-MB, and myoglobin for detection of acute ischemic myocardial injury in a swine model. *Am. J. Clin. Pathol.* **110**, 70-77.

Fenske, D.B. and Cullis, P.R. (2005) Entrapment of small molecules and nucleic acid-based drugs in liposomes. *Methods Enzymol.* **391**, 7-40.

Fenske, D.B. and Cullis, P.R. (2008) Liposomal nanomedicines. *Expert. Opin. Drug Deliv.* **5**, 25-44.

Fernández-Avilés, F., San Román, J.A., García-Frade, J., Fernández, M.E., Peñarrubia, M.J., de la Fuente, L., Gómez-Bueno, M., Cantalapiedra, A., Fernández, J., Gutierrez, O., Sánchez, P.L., Hernández, C., Sanz, R., García-Sancho, J. and Sánchez, A. (2004) Experimental and clinical regenerative capability of human bone marrow cells after myocardial infarction. *Circ. Res.* **95**, 742-748.

Fiedler, J., Jazbutyte, V., Kirchmaier, B.C., Gupta, S.K., Lorenzen, J., Hartmann, D., Galuppo, P., Kneitz, S., Pena, J.T., Sohn-Lee, C., Loyer, X., Soutschek, J., Brand, T., Tuschl, T., Heineke, J., Martin, U., Schulte-Merker, S., Ertl, G., Engelhardt, S., Bauersachs, J. and Thum, T. (2011) MicroRNA-24 regulates vascularity after myocardial infarction. *Circulation* **124**, 720-730.

Fish, J.E. and Srivastava, D. (2009) MicroRNAs: opening a new vein in angiogenesis research. *Sci. Signal* **2**, pe1.

Fleige, S. and Pfaffl, M.W. (2006) RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol. Aspects Med.* **27**, 126-139.

Fleissner, F., Jazbutyte, V., Fiedler, J., Gupta, S.K., Yin, X., Xu, Q., Galuppo, P., Kneitz, S., Mayr, M., Ertl, G., Bauersachs, J. and Thum, T. (2010) Short communication: asymmetric dimethylarginine impairs angiogenic progenitor cell function in patients with coronary artery disease through a microRNA-21-dependent mechanism. *Circ. Res.* **107**, 138-143.

Fokkema, M.L., Vlaar, P.J., Vogelzang, M., Gu, Y.L., Kampinga, M.A., de Smet, B.J., Jessurun, G.A., Anthonio, R.L., van den Heuvel, A.F., Tan, E.S. and Zijlstra, F. (2009) Effect of high-dose intracoronary adenosine administration during primary percutaneous coronary intervention in acute myocardial infarction: a randomized controlled trial. *Circ. Cardiovasc. Interv.* **2**, 323-329.

Fontana, L., Fiori, M.E., Albini, S., Cifaldi, L., Giovinazzi, S., Forloni, M., Boldrini, R., Donfrancesco, A., Federici, V., Giacomini, P., Peschle, C. and Fruci, D. (2008) Antagomir-17-5p abolishes the growth of therapy-resistant neuroblastoma through p21 and BIM. *PLoS One* **3**, e2236.

Fontana, L., Pelosi, E., Greco, P., Racanicchi, S., Testa, U., Liuzzi, F., Croce, C.M., Brunetti, E., Grignani, F. and Peschle, C. (2007) MicroRNAs 17-5p-20a-106a control monocytopoiesis through AML1 targeting and M-CSF receptor upregulation. *Nat. Cell. Biol.* **9**, 775-787.

Francis, S.E., Goh, K.L., Hodivala-Dilke, K., Bader, B.L., Stark, M., Davidson, D. and Hynes, R.O. (2002) Central roles of alpha5beta1 integrin and fibronectin in vascular development in mouse embryos and embryoid bodies. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22**, 927-933.

Frantz, S., Hofmann, U., Fraccarollo, D., Schäfer, A., Kranepuhl, S., Hagedorn, I., Nieswandt, B., Nahrendorf, M., Wagner, H., Bayer, B., Pachel, C., Schön, M.P., Kneitz, S., Bobinger, T., Weidemann, F., Ertl, G. and Bauersachs, J. (2013) Monocytes/macrophages prevent healing defects and left ventricular thrombus formation after myocardial infarction. *FASEB J.* **27**, 871-881.

Freiberg, S. and Zhu, X.X. (2004) Polymer microspheres for controlled drug release. *Int. J. Pharm.* **282**, 1-18.

Friese, R.S., Altshuler, A.E., Zhang, K., Miramontes-Gonzalez, J.P., Hightower, C.M., Jirout, M.L., Salem, R.M., Gayen, J.R., Mahapatra, N.R., Biswas, N., Cale, M., Vaingankar, S.M., Kim, H.S., Courel, M., Taupenot, L., Ziegler, M.G., Schork, N.J., Pravenec, M., Mahata, S.K., Schmid-Schönbein, G.W. and O'Connor, D.T. (2013) MicroRNA-22 and promoter motif polymorphisms at the Chga locus in genetic hypertension: functional and therapeutic implications for gene expression and the pathogenesis of hypertension. *Hum. Mol. Genet.* [Epub ahead of print].

Fröbert, O., Lagerqvist, B., Olivecrona, G.K., Omerovic, E., Gudnason, T., Maeng, M., Aasa, M., Angerås, O., Calais, F., Danielewicz, M., Erlinge, D., Hellsten, L., Jensen, U., Johansson, A.C., Kåregren, A., Nilsson, J., Robertson, L., Sandhall, L., Sjögren, I., Ostlund, O., Harnek, J.

and James, S.K. (2013) Thrombus Aspiration during ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. *N. Engl. J. Med.* [Epub ahead of print].

G

Galiuto, L., Garramone, B., Scarà, A., Rebuzzi, A.G., Crea, F., La Torre, G., Funaro, S., Madonna, M., Fedele, F. and Agati, L. AMICI Investigators. (2008) The extent of microvascular damage during myocardial contrast echocardiography is superior to other known indexes of post-infarct reperfusion in predicting left ventricular remodeling: results of the multicenter AMICI study. *J. Am. Coll. Cardiol.* **51**, 552-559.

Gallagher, G.L., Jackson, C.J. and Hunyor, S.N. (2007) Myocardial extracellular matrix remodeling in ischemic heart failure. *Front. Biosci.* **12**, 1410-1419.

Garcia-Dorado, D., Inserte, J., Ruiz-Meana, M., González, M.A., Solares, J., Juliá, M., Barrabés, J.A. and Soler-Soler, J. (1997) Gap junction uncoupler heptanol prevents cell-to-cell progression of hypercontracture and limits necrosis during myocardial reperfusion. *Circulation* **96**, 3579-3586.

Garcia-Dorado, D. and Oliveras, J. (1993) Myocardial oedema: a preventable cause of reperfusion injury? *Cardiovasc. Res.* **27**, 1555-1563.

Garcia-Dorado, D., Ruiz-Meana, M. and Piper, H.M. (2009) Lethal reperfusion injury in acute myocardial infarction: facts and unresolved issues. *Cardiovasc. Res.* **83**, 165-168.

Garcia-Dorado, D., Thérroux, P., Desco, M., Solares, J., Elizaga, J., Fernandez-Avilés, F., Alonso, J. and Soriano, J. (1989) Cell-to-cell interaction: a mechanism to explain wave-front progression of myocardial necrosis. *Am. J. Physiol.* **256**, H1266-H1273.

Garcia-Dorado, D., Thérroux, P., Duran, J.M., Solares, J., Alonso, J., Sanz, E., Muñoz, R., Elizaga, J., Botas, J., Fernandez-Avilés, F., Soriano, J. and Esteban, E. (1992) Selective inhibition of the contractile apparatus. A new approach to modification of infarct size, infarct composition, and infarct geometry during coronary artery occlusion and reperfusion. *Circulation* **85**, 1160-1174.

Ge, Y., Pan, S., Guan, D., Yin, H., Fan, Y., Liu, J., Zhang, S., Zhang, H., Feng, L., Wang, Y., Xu, R. and Yin, J.Q. (2013) MicroRNA-350 induces pathological heart hypertrophy by repressing both p38 and JNK pathways. *Biochim. Biophys. Acta* **1832**, 1-10.

Ge, Y.F., Sun, J., Jin, C.J., Cao, B.Q., Jiang, Z.F. and Shao, J.F. (2013) AntagomiR-27a targets FOXO3a in glioblastoma and suppresses U87 cell growth in vitro and in vivo. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **14**, 963-968.

Ghio, S., Freemantle, N., Scelsi, L., Serio, A., Magrini, G., Pasotti, M., Shankar, A., Cleland, J.G. and Tavazzi, L. (2009) Long-term left ventricular reverse remodelling with cardiac resynchronization therapy: results from the CARE-HF trial. *Eur. J. Heart Fail.* **11**, 480-488.

Ghosh, G., Subramanian, I.V., Adhikari, N., Zhang, X., Joshi, H.P., Basi, D., Chandrashekhar, Y.S., Hall, J.L., Roy, S., Zeng, Y. and Ramakrishnan, S. (2010) Hypoxia-induced microRNA-424 expression in human endothelial cells regulates HIF- α isoforms and promotes angiogenesis. *J. Clin. Invest.* **120**, 4141-4154.

Gill, J.G., Langer, E.M., Lindsley, R.C., Cai, M., Murphy, T.L. and Murphy, K.M. (2012) Snail promotes the cell-autonomous generation of Flk1(+) endothelial cells through the repression of the microRNA-200 family. *Stem Cells Dev.* **21**, 167-176.

Good, L. (2003) Translation repression by antisense sequences. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 854-861.

Göpferich, A. (1996) Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials* **17**, 103-114.

Grundmann, S., Hans, F.P., Kinniry, S., Heinke, J., Helbing, T., Bluhm, F., Sluijter, J.P., Hoefer, I., Pasterkamp, G., Bode, C. and Moser, M. (2011) MicroRNA-100 regulates neovascularization by suppression of mammalian target of rapamycin in endothelial and vascular smooth muscle cells. *Circulation* **123**, 999-1009.

Guessous, F., Alvarado-Velez, M., Marcinkiewicz, L., Zhang, Y., Kim, J., Heister, S., Kefas, B., Godlewski, J., Schiff, D., Purow, B. and Abounader, R. (2013) Oncogenic effects of miR-10b in glioblastoma stem cells. *J. Neurooncol.* **112**, 153-163.

Guglielmelli, P., Tozzi, L., Bogani, C., Iacobucci, I., Ponziani, V., Martinelli, G., Bosi, A. and Vannucchi, A.M. AGIMM (AIRC-Gruppo Italiano Malattie Mieloproliferative) Investigators. (2011) Overexpression of microRNA-16-2 contributes to the abnormal erythropoiesis in polycythemia vera. *Blood* **117**, 6923-6927.

Gupta, M., Tiwari, S. and Vyas, S. (2012) Structuring polymers for delivery of DNA-based therapeutics: updated insights. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **29**, 447-485.

H

Hackworthy, R.A., Sorensen, S.G., Fitzpatrick, P.G., Barry, W.H., Menlove, R.L., Rothbard, R.L. and Anderson, J.L. (1988) Dependence of assessment of coronary artery reperfusion during acute myocardial infarction on angiographic criteria and interobserver variability. *Am. J. Cardiol.* **62**, 538-542.

Han, Z.B., Chen, H.Y., Fan, J.W., Wu, J.Y., Tang, H.M. and Peng, Z.H. (2012) Up-regulation of microRNA-155 promotes cancer cell invasion and predicts poor survival of hepatocellular carcinoma following liver transplantation. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **138**, 153-161.

Hans, F.P., Moser, M., Bode, C. and Grundmann, S. (2010) MicroRNA regulation of angiogenesis and arteriogenesis. *Trends Cardiovasc. Med.* **20**, 253-262.

Hare, J.M. and Stamler, J.S. (2005) NO/redox disequilibrium in the failing heart and cardiovascular system. *J. Clin. Invest.* **115**, 509-517.

Harrison, R.W., Aggarwal, A., Ou, F.S., Klein, L.W., Rumsfeld, J.S., Roe, M.T. and Wang, T.Y. (2013) American College of Cardiology National Cardiovascular Data Registry. Incidence and outcomes of no-reflow phenomenon during percutaneous coronary intervention among patients with acute myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.* **111**, 178-184.

He, L., Thomson, J.M., Hemann, M.T., Hernando-Monge, E., Mu, D., Goodson, S., Powers, S., Cordon-Cardo, C., Lowe, S.W., Hannon, G.J. and Hammond, S.M. (2005) A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* **435**, 828-833.

Hernando, V., Insete, J., Sartório, C.L., Parra, V.M., Poncelas-Nozal, M. and Garcia-Dorado, D. (2010) Calpain translocation and activation as pharmacological targets during myocardial ischemia/reperfusion. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **49**, 271-279.

Heymans, S. (2006) Inflammation and cardiac remodeling during viral myocarditis. *Ernst Schering Res. Found. Workshop* **55**, 197-218.

Hiasa, K., Ishibashi, M., Ohtani, K., Inoue, S., Zhao, Q., Kitamoto, S., Sata, M., Ichiki, T., Takeshita, A. and Egashira, K. (2004) Gene transfer of stromal cell-derived factor-1alpha enhances ischemic vasculogenesis and angiogenesis via vascular endothelial growth factor/endothelial nitric oxide synthase-related pathway: next-generation chemokine therapy for therapeutic neovascularization. *Circulation* **109**, 2454-2461.

Hillis, G.S., Ujino, K., Mulvagh, S.L., Hagen, M.E. and Oh, J.K. (2006) Echocardiographic indices of increased left ventricular filling pressure and dilation after acute myocardial infarction. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* **19**, 450-456.

Hjalmarson, A., Elmfeldt, D., Herlitz, J., Holmberg, S., Malek, I., Nyberg, G., Rydén, L., Swedberg, K., Vedin, A., Waagstein, F., Waldenström, A., Waldenström, J., Wedel, H., Wilhelmssen, L. and Wilhelmsson, C. (1981) Effect on mortality of metoprolol in acute myocardial infarction: a double-blind randomized trial. *Lancet* **2**, 823-827.

Hoffart, V., Ubrich, N., Lamprecht, A., Bachelier, K., Vigneron, C., Lecompte, T., Hoffman, M. and Maincent, P. (2003) Microencapsulation of low molecular weight heparin into polymeric particles designed with biodegradable and nonbiodegradable polycationic polymers. *Drug Deliv.* **10**, 1-7.

Hokimoto, S., Yasue, H., Fujimoto, K., Yamamoto, H., Nakao, K., Kaikita, K., Sakata, R. and Miyamoto, E. (1996) Expression of angiotensin-converting enzyme in remaining viable myocytes of human ventricles after myocardial infarction. *Circulation* **94**, 1513-1518.

Hole, T., Vegsundvåg, J.A., Morstøl, T.H. and Skaerpe, T. (2003) Early changes in left ventricular volume and function are predictors for long-term remodeling in patients with acute transmural myocardial infarction and preserved systolic function. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* **16**, 630-637.

Hong, L. (2010) The miR-17-92 cluster of microRNAs confers tumorigenicity by inhibiting oncogene-induced senescence. *Cancer Res.* **70**, 8547-8557.

Hood, E., Simone, E., Wattamwar, P., Dziubla, T. and Muzykantov, V. (2011) Nanocarriers for vascular delivery of antioxidants. *Nanomedicine* **6**, 1257-1272.

Hori, M. and Nishida, K. (2009) Oxidative stress and left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* **81**, 457-464.

Horn, M.A., Graham, H.K., Richards, M.A., Clarke, J.D., Greensmith, D.J., Briston, S.J., Hall, M.C., Dibb, K.M. and Trafford, A.W. (2012) Age-related divergent remodeling of the cardiac extracellular matrix in heart failure: collagen accumulation in the young and loss in the aged. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **53**, 82-90.

Hsu, C.P., Odewale, I., Alcendor, R.R. and Sadoshima, J. (2008) Sirt1 protects the heart from aging and stress. *Biol. Chem.* **389**, 221-231.

Hu, K., Xie, Y.Y., Zhang, C., Ouyang, D.S., Long, H.Y., Sun, D.N., Long, L.L., Feng, L., Li, Y. and Xiao, B. (2012) MicroRNA expression profile of the hippocampus in a rat model of temporal lobe epilepsy and miR-34a-targeted neuroprotection against hippocampal neurone cell apoptosis post-status epilepticus. *BMC Neurosci.* **13**, 115.

Hu, S., Huang, M., Li, Z., Jia, F., Ghosh, Z., Lijkwan, M.A., Fasanaro, P., Sun, N., Wang, X., Martelli, F., Robbins, R.C. and Wu, J.C. (2010) MicroRNA-210 as a novel therapy for treatment of ischemic heart disease. *Circulation* **122**, S124-S131.

Huang, F., Zhu, X., Hu, X.Q., Fang, Z.F., Tang, L., Lu, X.L. and Zhou, S.H. (2013) Mesenchymal stem cells modified with miR-126 release angiogenic factors and activate Notch ligand Delta-like-4, enhancing ischemic angiogenesis and cell survival. *Int. J. Mol. Med.* **31**, 484-492.

Huang, Z.P., Chen, J., Seok, H.Y., Zhang, Z., Kataoka, M., Hu, X. and Wang, D.Z. (2013) MicroRNA-22 regulates cardiac hypertrophy and remodeling in response to stress. *Circ. Res.* **112**, 1234-1243.

I

Iaconetti, C., Polimeni, A., Sorrentino, S., Sabatino, J., Pironti, G., Esposito, G., Curcio, A. and Indolfi, C. (2012) Inhibition of miR-92a increases endothelial proliferation and migration in vitro as well as reduces neointimal proliferation in vivo after vascular injury. *Basic Res. Cardiol.* **107**, 296.

Iekushi, K., Seeger, F., Assmus, B., Zeiher, A.M. and Dimmeler, S. (2012) Regulation of cardiac microRNAs by bone marrow mononuclear cell therapy in myocardial infarction. *Circulation* **125**, 1765-1773, S1-S7.

Inserte, J., Barrabés, J.A., Hernando, V. and Garcia-Dorado, D. (2009) Orphan targets for reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* **83**, 169-178.

Inserte, J., Garcia-Dorado, D., Agulló, L., Paniagua, A. and Soler-Soler, J. (2000) Urodilatin limits acute reperfusion injury in the isolated rat heart. *Cardiovasc. Res.* **45**, 351-359.

Inserte, J., Garcia-Dorado, D., Ruiz-Meana, M., Padilla, F., Barrabés, J.A., Pina, P., Agulló, L., Piper, H.M. and Soler-Soler, J. (2002) Effect of inhibition of Na(+)/Ca(2+) exchanger at the time of myocardial reperfusion on hypercontracture and cell death. *Cardiovasc. Res.* **55**, 739-748.

ISIS-1 Collaborative Group. First International Study of Infarct Survival. (1986) Randomised trial of intravenous atenolol among 16027 cases of suspected acute myocardial infarction: ISIS-1. *Lancet* **2**, 57-66.

Iwatate, M., Gu, Y., Dieterle, T., Iwanaga, Y., Peterson, K.L., Hoshijima, M., Chien, K.R. and Ross, J. (2003) *In vivo* high-efficiency transcortical gene delivery and Cre-LoxP gene switching in the adult mouse heart. *Gene Therapy* **10**, 1814-1820.

J

Janssens, S., Dubois, C., Bogaert, J., Theunissen, K., Deroose, C., Desmet, W., Kalantzi, M., Herbots, L., Sinnaeve, P., Dens, J., Maertens, J., Rademakers, F., Dymarkowski, S., Gheysens, O., Van Cleemput, J., Bormans, G., Nuyts, J., Belmans, A., Mortelmans, L., Boogaerts, M. and Van de Werf, F. (2006) Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* **367**, 113-121.

Jiang, X., Tsitsiou, E., Herrick, S.E. and Lindsay, M.A. (2010) MicroRNAs and the regulation of fibrosis. *FEBS J.* **277**, 2015-2021.

Jiang, W., Gupta, R.K., Deshpande, M.C. and Schwendeman, S.P. (2005) Biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles for injectable delivery of vaccine antigens. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 391-410.

Jimenez-Mateos, E.M., Bray, I., Sanz-Rodriguez, A., Engel, T., McKiernan, R.C., Mouri, G., Tanaka, K., Sano, T., Saugstad, J.A., Simon, R.P., Stallings, R.L. and Henshall, D.C. (2011) miRNA Expression profile after status epilepticus and hippocampal neuroprotection by targeting miR-132. *Am. J. Pathol.* **179**, 2519-2532.

Johnson, S.M., Bangham, A.D., Hill, M.W. and Korn ED. (1971) Single bilayer liposomes. *Biochim. Biophys. Acta.* **233**, 820-826.

Jones, M.N. (1995) The surface properties of phospholipid liposome systems and their characterisation. *Adv. Colloid. Interface Sci.* **54**, 93-128.

Jopling, C.L., Yi, M., Lancaster, A.M., Lemon, S.M. and Sarnow, P. (2005) Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* **309**, 1577-1581.

Jujo, K., Ii, M. and Losordo, D.W. (2008) Endothelial progenitor cells in neovascularization of infarcted myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **45**, 530-544.

Jusufović, E., Rijavec, M., Keser, D., Korošec, P., Sodja, E., Iljazović, E., Radojević, Z. and Košnik, M. (2012) Let-7b and miR-126 are down-regulated in tumor tissue and correlate with microvessel density and survival outcomes in non--small--cell lung cancer. *PLoS One* **7**, e45577.

K

Kalkman, E.A., van Haren, P., Saxena, P.R. and Schoemaker, R.G. (1997) Regionally different vascular response to vasoactive substances in the remodelled infarcted rat heart; aberrant vasculature in the infarct scar. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **29**, 1487-1497.

Kamihata, H., Matsubara, H., Nishiue, T., Fujiyama, S., Tsutsumi, Y., Ozono, R., Masaki, H., Mori, Y., Iba, O., Tateishi, E., Kosaki, A., Shintani, S., Murohara, T., Imaizumi, T. and Iwasaka, T. (2001) Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation* **104**, 1046-1052.

Kandalam, V., Basu, R., Abraham, T., Wang, X., Soloway, P.D., Jaworski, D.M., Oudit, G.Y. and Kassiri, Z. (2010) TIMP2 deficiency accelerates adverse post-myocardial infarction remodeling because of enhanced MT1-MMP activity despite lack of MMP2 activation. *Circ. Res.* **106**, 796-808.

Kane, N.M., Howard, L., Descamps, B., Meloni, M., McClure, J., Lu, R., McCahill, A., Breen, C., Mackenzie, R.M., Delles, C., Mountford, J.C., Milligan, G., Emanueli, C. and Baker, A.H. (2012) Role of microRNAs 99b, 181a, and 181b in the differentiation of human embryonic stem cells to vascular endothelial cells. *Stem Cells* **30**, 643-654.

Kang, H.J., Kim, H.S., Koo, B.K., Kim, Y.J., Lee, D., Sohn, D.W., Oh, B.H. and Park, Y.B. (2007) Intracoronary infusion of the mobilized peripheral blood stem cell by G-CSF is better than mobilization alone by G-CSF for improvement of cardiac function and remodeling: 2-year follow-up results of the Myocardial Regeneration and Angiogenesis in Myocardial Infarction with G-CSF and Intra-Coronary Stem Cell Infusion (MAGIC Cell) 1 trial. *Am. Heart J.* **153**, 237.e1-e8.

Karimabad, H.M., Shabestari, M., Baharvand, H., Vosough, A., Gourabi, H., Shahverdi, A., Shamsian, A., Abdolhoseini, S., Moazzami, K., Marjanimehr, M.M., Emami, F., Bidkhor, H.R., Hamedanchi, A., Talebi, S., Farrokhi, F., Jabbari-Azad, F., Fadavi, M., Garivani, U., Mahmoodi, M. and Aghdami, N. (2011) Lack of beneficial effects of granulocyte colony-stimulating factor in

patients with subacute myocardial infarction undergoing late revascularization: a double-blind randomized, placebo-controlled clinical trial. *Acta Cardiol.* **66**, 219-224.

Kawamoto, A., Gwon, H.C., Iwaguro, H., Yamaguchi, J.I., Uchida, S., Masuda, H., Silver, M., Ma, H., Kearney, M., Isner, J.M. and Asahara, T. (2001) Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* **103**, 634-637.

Keller, R.S., Shai, S.Y., Babbitt, C.J., Pham, C.G., Solaro, R.J., Valencik, M.L., Loftus, J.C. and Ross, R.S. (2001) Disruption of integrin function in the murine myocardium leads to perinatal lethality, fibrosis, and abnormal cardiac performance. *Am. J. Pathol.* **158**, 1079-1090.

Kennedy, C., Delbro, D. and Burnstock, G. (1985) P2-purinoceptors mediate both vasodilation (via the endothelium) and vasoconstriction of the isolated rat femoral artery. *Eur. J. Pharmacol.* **107**, 161-168.

Kirkpatrick, J.N. and St John Sutton, M. (2012) Assessment of ventricular remodeling in heart failure clinical trials. *Curr. Heart Fail. Rep.* **9**, 328-336.

Kloner, R.A. (2013) Current state of clinical translation of cardioprotective agents for acute myocardial infarction. *Circ. Res.* **113**, 451-463.

Kocher, A.A., Schuster, M.D., Szabolcs, M.J., Takuma, S., Burkhoff, D., Wang, J., Homma, S., Edwards, N.M. and Itescu, S. (2001) Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat. Med.* **7**, 430-436.

Kosaka, N., Iguchi, H., Hagiwara, K., Yoshioka, Y., Takeshita, F. and Ochiya, T. (2013) Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic microRNAs regulate cancer cell metastasis. *J. Biol. Chem.* **288**, 10849-10859.

Krützfeldt, J., Rajewsky, N., Braich, R., Rajeev, K.G., Tuschl, T., Manoharan, M. and Stoffel, M. (2005) Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* **438**, 685-689.

Kuehbacher, A., Urbich, C. and Dimmeler S. (2008) Targeting microRNA expression to regulate angiogenesis. *Trends Pharmacol. Sci.* **29**, 12-15.

Kuehbacher, A., Urbich, C., Zeiher, A.M. and Dimmeler, S. (2007) Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. *Circ. Res.* **101**, 59-68.

Kumar, B., Yadav, A., Lang, J., Teknos, T.N. and Kumar, P. (2012) Dysregulation of microRNA-34a expression in head and neck squamous cell carcinoma promotes tumor growth and tumor angiogenesis. *PLoS One* **7**, e37601.

L

Laflamme, M.A., Myerson, D., Saffitz, J.E. and Murry, C.E. (2002) Evidence for cardiomyocyte repopulation by extracardiac progenitors in transplanted human hearts. *Circ. Res.* **90**, 634-640.

Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W. and Tuschl, T. (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* **294**, 853-858.

Lai, E.C., Tomancak, P., Williams, R.W. and Rubin, G.M. (2003) Computational identification of *Drosophila* microRNA genes. *Genome Biol.* **4**, R42.

Lai, L., Song, Y., Liu, Y., Chen, Q., Han, Q., Chen, W., Pan, T., Zhang, Y., Cao, X. and Wang, Q. (2013) MicroRNA-92a negatively regulates Toll-like receptor (TLR)-triggered inflammatory response in macrophages by targeting MKK4 kinase. *J. Biol. Chem.* **288**, 7956-7967.

Lamas, G.A., Flaker, G.C., Mitchell, G., Smith, S.C. Jr., Gersh, B.J., Wun, C.C., Moyé, L., Rouleau, J.L., Rutherford, J.D. and Pfeffer, M.A. (1995) Effect of infarct artery patency on prognosis after acute myocardial infarction. The Survival and Ventricular Enlargement Investigators. *Circulation* **92**, 1101-1109.

Lambert, J.M., Lopez, E.F. and Lindsey, M.L. (2008) Macrophage roles following myocardial infarction. *Int. J. Cardiol.* **130**, 147-158.

Lanford, R.E., Hildebrandt-Eriksen, E.S., Petri, A., Persson, R., Lindow, M., Munk, M.E., Kauppinen, S. and Ørum, H. (2010) Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* **327**, 198-201.

Larsson, E., Fredlund Fuchs, P., Heldin, J., Barkefors, I., Bondjers, C., Genové, G., Arrondel, C., Gerwins, P., Kurschat, C., Schermer, B., Benzing, T., Harvey, S.J., Kreuger, J. and Lindahl, P. (2009) Discovery of microvascular miRNAs using public gene expression data: miR-145 is expressed in pericytes and is a regulator of Fli1. *Genome Med.* **1**, 108.

Lee, D.Y., Deng, Z., Wang, C.H. and Yang, B.B. (2007) MicroRNA-378 promotes cell survival, tumor growth, and angiogenesis by targeting SuFu and Fus-1 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 20350-20355.

Lee, R.C., Feinbaum, R.L. and Ambros, V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**, 843-854.

Lee, S.T., Chu, K., Jung, K.H., Kim, J.H., Huh, J.Y., Yoon, H., Park, D.K., Lim, J.Y., Kim, J.M., Jeon, D., Ryu, H., Lee, S.K., Kim, M. and Roh, J.K. (2012) miR-206 regulates brain-derived neurotrophic factor in Alzheimer disease model. *Ann. Neurol.* **72**, 269-277.

Leor, J., Rozen, L., Zulloff-Shani, A., Feinberg, M.S., Amsalem, Y., Barbash, I.M., Kachel, E., Holbova, R., Mardor, Y., Daniels, D., Ocherashvilli, A., Orenstein, A. and Danon, D. (2006) Ex vivo activated human macrophages improve healing, remodeling, and function of the infarcted heart. *Circulation* **114**, I94-I100.

Li, M., Rouaud, O. and Poncelet, D. (2008) Microencapsulation by solvent evaporation: state of the art for process engineering approaches. *Int. J. Pharm.* **363**, 26-39.

Li, R.C., Tao, J., Guo, Y.B., Wu, H.D., Liu, R.F., Bai, Y., Lv, Z.Z., Luo, G.Z., Li, L.L., Wang, M., Yang, H.Q., Gao, W., Han, Q.D., Zhang, Y.Y., Wang, X.J., Xu, M. and Wang, S.Q. (2013) In vivo suppression of microRNA-24 prevents the transition toward decompensated hypertrophy in aortic-constricted mice. *Circ. Res.* **112**, 601-605.

Li, T., Li, R.S., Li, Y.H., Zhong, S., Chen, Y.Y., Zhang, C.M., Hu, M.M. and Shen, Z.J. (2012) miR-21 as an independent biochemical recurrence predictor and potential therapeutic target for prostate cancer. *J. Urol.* **187**, 1466-1472.

Li, W., He, B., Dai, W., Zhang, Q. and Liu, Y. (2013) Evaluations of therapeutic efficacy of intravitreal injected polylactic-glycolic acid microspheres loaded with triamcinolone acetonide on a rabbit model of uveitis. *Int. Ophthalmol.* [Epub ahead of print]

Li, Y.X., Liu, D.Q., Zheng, C., Zheng, S.Q., Liu, M., Li, X. and Tang, H. (2011) miR-200a modulate HUVECs viability and migration. *IUBMB Life* **63**, 553-559.

Liang, Y., Ridzon, D., Wong, L. and Chen, C. (2007) Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC Genomics* **8**, 166.

Lin, H.Y., Chiang, C.H. and Hung, W.C. (2013) STAT3 upregulates miR-92a to inhibit RECK expression and to promote invasiveness of lung cancer cells. *Br. J. Cancer.* **109**, 731-738.

Lin, J., Teo, S., Lam, D.H., Jeyaseelan, K. and Wang, S. (2012) MicroRNA-10b pleiotropically regulates invasion, angiogenicity and apoptosis of tumor cells resembling mesenchymal subtype of glioblastoma multiforme. *Cell Death Dis.* **3**, e398.

Linde, C., Gold, M.R., Abraham, W.T., St John Sutton, M., Ghio, S., Cerkenvenik, J. and Daubert, C., on behalf of the REsynchronization reVERses Remodeling in Systolic left vEntricular dysfunction (REVERSE) Study Group. (2013) Long-term impact of cardiac resynchronization therapy in mild heart failure: 5-year results from the REsynchronization reVERses Remodeling in Systolic left vEntricular dysfunction (REVERSE) study. *Eur. Heart J.* [Epub ahead of print].

Liu, F., Lou, Y.L., Wu, J., Ruan, Q.F., Xie, A., Guo, F., Cui, S.P., Deng, Z.F. and Wang, Y. (2012) Upregulation of microRNA-210 regulates renal angiogenesis mediated by activation of VEGF signaling pathway under ischemia/perfusion injury in vivo and in vitro. *Kidney Blood Press. Res.* **35**, 182-191.

Liu, L.Z., Li, C., Chen, Q., Jing, Y., Carpenter, R., Jiang, Y., Kung, H.F., Lai, L. and Jiang, B.H. (2011) MiR-21 induced angiogenesis through AKT and ERK activation and HIF-1 α expression. *PLoS One* **6**, e19139.

Liu, Q., Li, R.T., Qian, H.Q., Wei, J., Xie, L., Shen, J., Yang, M., Qian, X.P., Yu, L.X., Jiang, X.Q. and Liu, B.R. (2013) Targeted delivery of miR-200c/DOC to inhibit cancer stem cells and cancer cells by the gelatinases-stimuli nanoparticles. *Biomaterials* **34**, 7191-7203.

Liu, Z., Yang, D., Xie, P., Ren, G., Sun, G., Zeng, X. and Sun, X. (2012) MiR-106b and MiR-15b modulate apoptosis and angiogenesis in myocardial infarction. *Cell Physiol. Biochem.* **29**, 851-862.

Loboz-Grudzień, K., Kowalska, A., Brzezińska, B., Sokalski, L. and Jaroch, J. (2007) Early predictors of adverse left ventricular remodelling after myocardial infarction treated by primary angioplasty. *Cardiol J.* **14**, 238-245.

Lodish, H.F., Zhou, B., Liu, G. and Chen, C.Z. (2008) Micromanagement of the immune system by microRNAs. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 120-130.

Lombardo, A., Niccoli, G., Natale, L., Bernardini, A., Cosentino, N., Bonomo, L. and Crea, F. (2012) Impact of microvascular obstruction and infarct size on left ventricular remodeling in reperfused myocardial infarction: a contrast-enhanced cardiac magnetic resonance imaging study. *Int. J. Cardiovasc. Imaging* **28**, 835-842.

Loot, A.E., Roks, A.J., Henning, R.H., Tio, R.A., Suurmeijer, A.J., Boomsma, F. and van Gilst, W.H. (2002) Angiotensin-(1-7) attenuates the development of heart failure after myocardial infarction in rats. *Circulation* **105**, 1548-1550.

Lou, Y.L., Guo, F., Liu, F., Gao, F.L., Zhang, P.Q., Niu, X., Guo, S.C., Yin, J.H., Wang, Y. and Deng, Z.F. (2012) miR-210 activates notch signaling pathway in angiogenesis induced by cerebral ischemia. *Mol. Cell. Biochem.* **370**, 45-51.

Louafi, F., Martinez-Nunez, R.T. and Sanchez-Elsner, T. (2010) MicroRNA-155 targets SMAD2 and modulates the response of macrophages to transforming growth factor-beta. *J. Biol. Chem.* **285**, 41328-41336.

Lu, X.Y., Wu, D.C., Li, Z.J. and Chen, G.Q. (2011) Polymer nanoparticles. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **104**, 299-323.

Lu, Y., Zhang, Y., Wang, N., Pan, Z., Gao, X., Zhang, F., Zhang, Y., Shan, H., Luo, X., Bai, Y., Sun, L., Song, W., Xu, C., Wang, Z. and Yang, B. (2010) MicroRNA-328 contributes to adverse electrical remodeling in atrial fibrillation. *Circulation* **122**, 2378-2387.

Lunde, K., Solheim, S., Aakhus, S., Arnesen, H., Abdelnoor, M., Egeland, T., Endresen, K., Ilebakk, A., Mangschau, A., Fjeld, J.G., Smith, H.J., Taraldsrud, E., Grøgaard, H.K., Bjørnerheim, R., Brekke, M., Müller, C., Hopp, E., Ragnarsson, A., Brinchmann, J.E. and Forfang, K. (2006) Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* **355**, 1199-1209.

Luo, Z., Wen, G., Wang, G., Pu, X., Ye, S., Xu, Q., Wang, W. and Xiao, Q. (2013) MicroRNA-200C and -150 Play an Important Role in Endothelial Cell Differentiation and Vasculogenesis by Targeting Transcription Repressor ZEB1. *Stem Cells* [Epub ahead of print].

M

Ma, L., Reinhardt, F., Pan, E., Soutschek, J., Bhat, B., Marcusson, E.G., Teruya-Feldstein, J., Bell, G.W. and Weinberg, R.A. (2010) Therapeutic silencing of miR-10b inhibits metastasis in a mouse mammary tumor model. *Nat. Biotechnol.* **28**, 341-347.

Ma, L. and Weinberg, R.A. (2008) Micromanagers of malignancy: role of microRNAs in regulating metastasis. *Trends Genet.* **24**, 448-456.

Ma, Y., Halade, G.V., Zhang, J., Ramirez, T.A., Levin, D., Voorhees, A., Jin, Y.F., Han, H.C., Manicone, A.M. and Lindsey, M.L. (2013) Matrix metalloproteinase-28 deletion exacerbates cardiac dysfunction and rupture after myocardial infarction in mice by inhibiting M2 macrophage activation. *Circ. Res.* **112**, 675-688.

Manoury, B., Montiel, V. and Balligand, J.L. (2012) Nitric oxide synthase in post-ischaemic

remodelling: new pathways and mechanisms. *Cardiovasc. Res.* **94**, 304-315.

Manso, A.M., Elsherif, L., Kang, S.M. and Ross, R.S. (2006) Integrins, membrane-type matrix metalloproteinases and ADAMs: potential implications for cardiac remodeling. *Cardiovasc. Res.* **69**, 574-584.

Martić-Kehl, M.I., Schibli, R. and Schubiger, P.A. (2012) Can animal data predict human outcome? Problems and pitfalls of translational animal research. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **39**, 1492-1496.

Marty, J.J., Oppenheim, R.C. and Speiser, P. (1978) Nanoparticles--a new colloidal drug delivery system. *Pharm. Acta Helv.* **53**, 17-23.

Massion, P.B. and Balligand, J.L. (2007) Relevance of nitric oxide for myocardial remodeling. *Curr. Heart Fail. Rep.* **4**, 18-25.

Matsubara, H., Takeuchi, T., Nishikawa, E., Yanagisawa, K., Hayashita, Y., Ebi, H., Yamada, H., Suzuki, M., Nagino, M., Nimura, Y., Osada, H. and Takahashi, T. (2007) Apoptosis induction by antisense oligonucleotides against miR-17-5p and miR-20a in lung cancers overexpressing miR-17-92. *Oncogene* **26**, 6099-6105.

Mattes, J., Collison, A. and Foster, P.S. (2008) Emerging role of microRNAs in disease pathogenesis and strategies for therapeutic modulation. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **10**, 150-157.

McKay, R.G., Pfeffer, M.A., Pasternak, R.C., Markis, J.E., Come, P.C., Nakao, S., Alderman, J.D., Ferguson, J.J., Safian, R.D. and Grossman, W. (1986) Left ventricular remodeling after myocardial infarction: a corollary to infarct expansion. *Circulation* **74**, 693-702.

Meimoun, P., Boulanger, J., Luyckx-Bore, A., Zemir, H., Elmkies, F., Malaquin, D., Doutrelan, L. and Tribouilloy, C. (2010) Non-invasive coronary flow reserve after successful primary angioplasty for acute anterior myocardial infarction is an independent predictor of left ventricular adverse remodelling. *Eur. J. Echocardiogr.* **11**, 711-718.

Menasché, P., Alfieri, O., Janssens, S., McKenna, W., Reichenspurner, H., Trinquart, L., Vilquin, J.T., Marolleau, J.P., Seymour, B., Larghero, J., Lake, S., Chatellier, G., Solomon, S., Desnos, M. and Hagege, A.A. (2008) The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation* **117**, 1189-1200.

Mendell, J.T. (2008) miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease. *Cell* **133**, 217-222.

Menei, P., Montero-Menei, C., Venier, M.C. and Benoit, J.P. (2005) Drug delivery into the brain using poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2**, 363-376.

Mercatelli, N., Coppola, V., Bonci, D., Miele, F., Costantini, A., Guadagnoli, M., Bonanno, E., Muto, G., Frajese, G.V., De Maria, R., Spagnoli, L.G., Farace, M.G. and Ciafrè, S.A. (2008) The inhibition of the highly expressed miR-221 and miR-222 impairs the growth of prostate carcinoma xenografts in mice. *PLoS One* **3**, e4029.

Meyer, G.P., Wollert, K.C., Lotz, J., Pirr, J., Rager, U., Lippolt, P., Hahn, A., Fichtner, S., Schaefer, A., Arseniev, L., Ganser, A. and Drexler, H. (2009) Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: 5-year follow-up from the randomized-controlled BOOST trial. *Eur. Heart J.* **30**, 2978-2984.

Meyer, S., van der Meer, P., van Deursen, V.M., Jaarsma, T., van Veldhuisen, D.J., van der Wal, M.H., Hillege, H.L. and Voors, A.A. (2013) Neurohormonal and clinical sex differences in heart failure. *Eur. Heart J.* **34**, 2538-2547.

Miller, C.L., Cai, Y., Oikawa, M., Thomas, T., Dostmann, W.R., Zaccolo, M., Fujiwara, K. and Yan, C. (2011) Cyclic nucleotide phosphodiesterase 1A: a key regulator of cardiac fibroblast activation and extracellular matrix remodeling in the heart. *Basic Res. Cardiol.* **106**, 1023-1039.

Mishra, D., Hubenak, J.R. and Mathur, A.B. (2013) Nanoparticle systems as tools to improve drug delivery and therapeutic efficacy. *J. Biomed. Mater. Res. A*. [Epub ahead of print]

Mitchell, G.F., Lamas, G.A., Vaughan, D.E. and Pfeffer, M.A. (1992) Left ventricular remodeling in the year after first anterior myocardial infarction: a quantitative analysis of contractile segment lengths and ventricular shape. *J. Am. Coll. Cardiol.* **19**, 1136-1144.

Montgomery, R.L. and van Rooij, E. (2010) MicroRNA regulation as a therapeutic strategy for cardiovascular disease. *Curr. Drug Targets* **11**, 936-942.

Mu, J., Pang, Q., Guo, Y.H., Chen, J.G., Zeng, W., Huang, Y.J., Zhang, J. and Feng, B. (2013) Functional implications of microRNA-215 in TGF- β 1-induced phenotypic transition of mesangial cells by targeting CTNNBIP1. *PLoS One* **8**, e58622.

Mulik, S., Xu, J., Reddy, P.B., Rajasagi, N.K., Gimenez, F., Sharma, S., Lu, P.Y. and Rouse, B.T. (2012) Role of miR-132 in angiogenesis after ocular infection with herpes simplex virus. *Am. J. Pathol.* **181**, 525-534.

Müller, P., Pfeiffer, P., Koglin, J., Schäfers, H.J., Seeland, U., Janzen, I., Urbschat, S. and Böhm, M. (2002) Cardiomyocytes of noncardiac origin in myocardial biopsies of human transplanted hearts. *Circulation* **106**, 31-35.

Munroe, S.H. and Zhu, J. (2006) Overlapping transcripts, double-stranded RNA and antisense regulation: a genomic perspective. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 2102-2118.

Muramatsu, F., Kidoya, H., Naito, H., Sakimoto, S. and Takakura, N. (2013) microRNA-125b inhibits tube formation of blood vessels through translational suppression of VE-cadherin. *Oncogene* **32**, 414-421.

Murata, K., Ito, H., Yoshitomi, H., Yamamoto, K., Fukuda, A., Yoshikawa, J., Furu, M., Ishikawa, M., Shibuya, H. and Matsuda, S. (2013) Inhibition of miR-92a enhances fracture healing via promoting angiogenesis in a model of stabilized fracture in young mice. *J. Bone Miner. Res.* [Epub ahead of print]

Murohara, T., Asahara, T., Silver, M., Bauters, C., Masuda, H., Kalka, C., Kearney, M., Chen, D., Symes, J.F., Fishman, M.C., Huang, P.L. and Isner, J.M. (1998) Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J. Clin. Invest.* **101**, 2567-2578.

Muzykantov, V.R. (2013) Drug delivery carriers on the fringes: natural red blood cells versus synthetic multilayered capsules. *Expert Opin. Drug Deliv.* **10**, 1-4.

N

Nair, L.S. and Laurencin, C.T. (2006) Polymers as biomaterials for tissue engineering and controlled drug delivery. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **102**, 47-90.

Nakagawa, M., Takemura, G., Kanamori, H., Goto, K., Maruyama, R., Tsujimoto, A., Ohno, T., Okada, H., Ogino, A., Esaki, M., Miyata, S., Li, L., Ushikoshi, H., Aoyama, T., Kawasaki, M., Nagashima, K., Fujiwara, T., Minatoguchi, S. and Fujiwara, H. (2008) Mechanisms by which late coronary reperfusion mitigates postinfarction cardiac remodeling. *Circ. Res.* **103**, 98-106.

Nakashima, T., Jinnin, M., Etoh, T., Fukushima, S., Masuguchi, S., Maruo, K., Inoue, Y., Ishihara, T. and Ihn, H. (2010) Down-regulation of mir-424 contributes to the abnormal

angiogenesis via MEK1 and cyclin E1 in senile hemangioma: its implications to therapy. *PLoS One* **5**, e14334.

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. and Meszaros, J.G. (2006) Type VI collagen induces cardiac myofibroblast differentiation: implications for postinfarction remodeling. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **290**, H323-H330.

Niccoli, G., Burzotta, F., Galiuto, L. and Crea, F. (2009) Myocardial no-reflow in humans. *J. Am. Coll. Cardiol.* **54**, 281-292.

Nikolic, I., Plate, K.H. and Schmidt, M.H. (2010) EGFL7 meets miRNA-126: an angiogenesis alliance. *J. Angiogenes. Res.* **2**, 9.

Nilsson, S., Möller, C., Jirström, K., Lee, A., Busch, S., Lamb, R. and Landberg, G. (2012) Downregulation of miR-92a is associated with aggressive breast cancer features and increased tumour macrophage infiltration. *PLoS One* **7**, e36051.

Nishida, N., Nagahara, M., Sato, T., Mimori, K., Sudo, T., Tanaka, F., Shibata, K., Ishii, H., Sugihara, K., Doki, Y. and Mori, M. (2012) Microarray analysis of colorectal cancer stromal tissue reveals upregulation of two oncogenic miRNA clusters. *Clin. Cancer Res.* **18**, 3054-3070.

Niu, H., Wang, K., Zhang, A., Yang, S., Song, Z., Wang, W., Qian, C., Li, X., Zhu, Y. and Wang, Y. (2012) miR-92a is a critical regulator of the apoptosis pathway in glioblastoma with inverse expression of BCL2L1. *Oncol. Rep.* **28**, 1771-1777.

Nolan, T., Hands, R.E. and Bustin, S.A. (2006) Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat. Protoc.* **1**, 1559-1582.

Nong, Z., O'Neil, C., Lei, M., Gros, R., Watson, A., Rizkalla, A., Mequanint, K., Li, S., Frontini, M.J., Feng, Q. and Pickering, J.G. (2011) Type I collagen cleavage is essential for effective fibrotic repair after myocardial infarction. *Am. J. Pathol.* **179**, 2189-2198.

Northcott, P.A., Fernandez-L, A., Hagan, J.P., Ellison, D.W., Grajkowska, W., Gillespie, Y., Grundy, R., Van Meter, T., Rutka, J.T., Croce, C.M., Kenney, A.M. and Taylor, M.D. (2009) The miR-17/92 polycistron is upregulated in sonic hedgehog-driven medulloblastomas and induced by N-myc in sonic hedgehog-treated cerebellar neural precursors. *Cancer Res.* **69**, 3249-3255.

Novaro, G.M. and Almahameed, S. (2008) Release pattern of cardiac troponin in left ventricular apical ballooning syndrome: insights into the mechanisms of stress cardiomyopathy. *Int. J. Cardiol.* **131**, e31-e32.

O

O'Donnell, K.A., Wentzel, E.A., Zeller, K.I., Dang, C.V. and Mendell, J.T. (2005) c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* **435**, 839-843.

Ogawa, Y. (1997) Injectable microcapsules prepared with biodegradable poly(alpha-hydroxy) acids for prolonged release of drugs. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **8**, 391-409.

Ohtsuka, M., Takano, H., Zou, Y., Toko, H., Akazawa, H., Qin, Y., Suzuki, M., Hasegawa, H., Nakaya, H. and Komuro, I. (2004) Cytokine therapy prevents left ventricular remodeling and dysfunction after myocardial infarction through neovascularization. *FASEB J.* **18**, 851-853.

Ohyagi-Hara, C., Sawada, K., Kamiura, S., Tomita, Y., Isobe, A., Hashimoto, K., Kinose, Y., Mabuchi, S., Hisamatsu, T., Takahashi, T., Kumasawa, K., Nagata, S., Morishige, K., Lengyel, E., Kurachi, H. and Kimura, T. (2013) miR-92a inhibits peritoneal dissemination of ovarian cancer cells by inhibiting integrin $\alpha 5$ expression. *Am. J. Pathol.* **182**, 1876-1889.

Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S.M., Li, B., Pickel, J., McKay, R., Nadal-Ginard, B., Bodine, D.M., Leri, A. and Anversa, P. (2001) Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* **410**, 701-705.

Ørn, S., Manhenke, C., Greve, O.J., Larsen, A.I., Bonarjee, V.V., Edvardsen, T. and Dickstein, K. (2009) Microvascular obstruction is a major determinant of infarct healing and subsequent left ventricular remodeling following primary percutaneous coronary intervention. *Eur. Heart J.* **30**, 1978-1985.

Ota, A., Tagawa, H., Karnan, S., Tsuzuki, S., Karpas, A., Kira, S., Yoshida, Y. and Seto, M. (2004) Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma. *Cancer Res.* **64**, 3087-3095.

Ouyang, Y.B., Lu, Y., Yue, S., Xu, L.J., Xiong, X.X., White, R.E., Sun, X. and Giffard, R.G. (2012) miR-181 regulates GRP78 and influences outcome from cerebral ischemia in vitro and in vivo. *Neurobiol. Dis.* **45**, 555-563.

P

Palmer, R.M., Ferrige, A.G. and Moncada, S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**, 524-526.

Panizzi, P., Swirski, F.K., Figueiredo, J.L., Waterman, P., Sosnovik, D.E., Aikawa, E., Libby, P., Pittet, M., Weissleder, R. and Nahrendorf, M. (2010) Impaired infarct healing in atherosclerotic mice with Ly-6C(hi) monocytosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* **55**, 1629-1638.

Papahadjopoulos, D., Allen, T.M., Gabizon, A., Mayhew, E., Matthay, K., Huang, S.K., Lee, K.D., Woodle, M.C., Lasic, D.D. and Redemann, C. (1991) Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 11460-11464.

Park, J.H., Ye, M. and Park, K. (2005) Biodegradable polymers for microencapsulation of drugs. *Molecules* **10**, 146-161.

Parodi, G., and Antoniucci, D. (2010) Left ventricular remodeling after primary percutaneous coronary intervention. *Am. Heart J.* **160**, S11-S15.

Parodi, G., Memisha, G., Carrabba, N., Signorini, U., Migliorini, A., Cerisano, G., and Antoniucci, D. (2007) Prevalence, predictors, time course, and long-term clinical implications of left ventricular functional recovery after mechanical reperfusion for acute myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.* **100**, 1718-1722.

Pasquinelli, A.E., Reinhart, B.J., Slack, F., Martindale, M.Q., Kuroda, M.I., Maller, B., Hayward, D.C., Ball, E.E., Degnan, B., Müller, P., Spring, J., Srinivasan, A., Fishman, M., Finnerty, J., Corbo, J., Levine, M., Leahy, P., Davidson, E. and Ruvkun, G. (2000) Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* **408**, 86-89.

Patrick, D.M., Montgomery, R.L., Qi, X., Obad, S., Kauppinen, S., Hill, J.A., van Rooij, E. and Olson, E.N. (2010) Stress-dependent cardiac remodeling occurs in the absence of microRNA-21 in mice. *J. Clin. Invest.* **120**, 3912-3916.

Payne, T.R., Oshima, H., Okada, M., Momoi, N., Tobita, K., Keller, B.B., Peng, H. and Huard, J. (2007) A relationship between vascular endothelial growth factor, angiogenesis, and cardiac repair after muscle stem cell transplantation into ischemic hearts. *J. Am. Coll. Cardiol.* **50**, 1677-1684.

Pearson, J.D. (2009) Endothelial progenitor cells - hype or hope? *J. Thromb. Haemost.* **7**, 255-262.

Pedroso de Lima, M.C., Simoes, S., Pires, P., Faneca, H. and Duzgunes, N. (2001) Cationic lipid-DNA complexes in gene delivery: from biophysics to biological applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **47**, 277-294.

Pfeffer, J.M. and Pfeffer, M.A. (1988) Angiotensin converting enzyme inhibition and ventricular remodeling in heart failure. *Am. J. Med.* **84**, 37-44.

Pfeffer, M.A. and Braunwald, E. (1990) Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* **81**, 1161-1172.

Pfeffer, M.A., Braunwald, E., Moyé, L.A., Basta, L., Brown, E.J. Jr., Cuddy, T.E., Davis, B.R., Geltman, E.M., Goldman, S., Flaker, G.C., Klein, M., Lamas, G.A., Packer, M., Rouleau, J., Rouleau, J.L., Rutherford, J., Wertheimer, J.H. and Hawkins, M. (1992) Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *N. Engl. J. Med.* **327**, 669-677.

Pfeffer, M.A., McMurray, J.J., Velazquez, E.J., Rouleau, J.L., Køber, L., Maggioni, A.P., Solomon, S.D., Swedberg, K., Van de Werf, F., White, H., Leimberger, J.D., Henis, M., Edwards, S., Zelenkofske, S., Sellers, M.A. and Califf, R.M. Valsartan in Acute Myocardial Infarction Trial Investigators. (2003) Valsartan, captopril, or both in myocardial infarction complicated by heart failure, left ventricular dysfunction, or both. *N. Engl. J. Med.* **349**, 1893-1906.

Pitt, B., Remme, W., Zannad, F., Neaton, J., Martinez, F., Roniker, B., Bittman, R., Hurley, S., Kleiman, J. and Gatlín, M. Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study Investigators. (2003) Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1309-1321.

Planavila, A., Iglesias, R., Giralt, M. and Villarroya, F. (2011) Sirt1 acts in association with PPAR α to protect the heart from hypertrophy, metabolic dysregulation, and inflammation. *Cardiovasc. Res.* **90**, 276-284.

Plummer, P.N., Freeman, R., Taft, R.J., Vider, J., Sax, M., Umer, B.A., Gao, D., Johns, C., Mattick J.S., Wilton, S.D., Ferro, V., McMillan, N.A., Swarbrick, A., Mittal, V. and Mellick, A.S. (2013) MicroRNAs regulate tumor angiogenesis modulated by endothelial progenitor cells. *Cancer Res.* **73**, 341-352.

Pohorille, A. and Deamer, D. (2009) Self-assembly and function of primitive cell membranes. *Res. Microbiol.* **160**, 449-456.

Poliseno, L., Tuccoli, A., Mariani, L., Evangelista, M., Citti, L., Woods, K., Mercatanti, A., Hammond, S. and Rainaldi, G. (2006) MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. *Blood* **108**, 3068-3071.

Poltronieri, P., D'Urso, P.I., Mezzolla, V. and D'Urso, O.F. (2013) Potential of anti-cancer therapy based on anti-miR-155 oligonucleotides in glioma and brain tumours. *Chem. Biol. Drug Des.* **81**, 79-84.

Popović, A.D., Nesković, A.N., Babić, R., Obradović, V., Bozinović, L., Marinković, J., Lee, J.C., Tan, M. and Thomas, J.D. (1994) Independent impact of thrombolytic therapy and vessel patency on left ventricular dilation after myocardial infarction. Serial echocardiographic follow-up. *Circulation* **90**, 800-807.

Post, F., Giannitsis, E., Riemer, T., Maier, L.S., Schmitt, C., Schumacher, B., Heusch, G., Mudra, H., Voigtländer, T., Erbel, R., Darius, H., Katus, H., Hamm, C., Senges, J., Gori, T. and Münzel, T. (2012) Pre- and early in-hospital procedures in patients with acute coronary syndromes: first results of the "German chest pain unit registry". *Clin. Res. Cardiol.* **101**, 983-991.

Protti, A., Dong, X., Sirker, A., Botnar, R. and Shah, A.M. (2012) MRI-based prediction of adverse cardiac remodeling after murine myocardial infarction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **303**, H309-H314.

Pullamsetti, S.S., Doebele, C., Fischer, A., Savai, R., Kojonazarov, B., Dahal, B.K., Ghofrani, H.A., Weissmann, N., Grimminger, F., Bonauer, A., Seeger, W., Zeiher, A.M., Dimmeler, S. and Schermuly, R.T. (2012) Inhibition of microRNA-17 improves lung and heart function in experimental pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **185**, 409-419.

Puri, A., Loomis, K., Smith, B., Lee, J.H., Yavlovich, A., Heldman, E. and Blumenthal, R. (2009) Lipid-based nanoparticles as pharmaceutical drug carriers: from concepts to clinic. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **26**, 523-580.

Q

Qiao, Y., Ma, N., Wang, X., Hui, Y., Li, F., Xiang, Y., Zhou, J., Zou, C., Jin, J., Lv, G., Jin, H. and Gao, X. (2011) MiR-483-5p controls angiogenesis in vitro and targets serum response factor. *FEBS Lett.* **585**, 3095-3100.

Quaini, F., Urbanek, K., Beltrami, A.P., Finato, N., Beltrami, C.A., Nadal-Ginard, B., Kajstura, J., Leri, A. and Anversa, P. (2002) Chimerism of the transplanted heart. *N. Engl. J. Med.* **346**, 5-15.

R

Rakowski, T., Zalewski, J., Legutko, J., Bartus, S., Rzeszutko, L., Dziewierz, A., Sorysz, D., Bryniarski, L., Zmudka, K., Kaluza, G.L., Dubiel, J.S. and Dudek, D. (2007) Early abciximab administration before primary percutaneous coronary intervention improves infarct-related artery patency and left ventricular function in high-risk patients with anterior wall myocardial infarction: a randomized study. *Am. Heart. J.* **153**, 360-365.

Ramaraj, R. and Movahed, M.R. (2008) Microvascular dysfunction following primary percutaneous coronary intervention in the setting of ST-elevation myocardial infarction. *J. Invasive Cardiol.* **20**, 603-614.

Ranji, N., Sadeghizadeh, M., Shokrgozar, M.A., Bakhshandeh, B., Karimipour, M., Amanzadeh, A. and Azadmanesh, K. (2013) MiR-17-92 cluster: an apoptosis inducer or proliferation enhancer. *Mol. Cell. Biochem.* **380**, 229-238.

Rather, M.I., Nagashri, M.N., Swamy, S.S., Gopinath, K.S. and Kumar, A. (2013) Oncogenic microRNA-155 down-regulates tumor suppressor CDC73 and promotes oral squamous cell carcinoma cell proliferation: implications for cancer therapeutics. *J. Biol. Chem.* **288**, 608-618.

Reffelmann, T., Hale, S.L., Dow, J.S. and Kloner, R.A. (2003) No-reflow phenomenon persists long-term after ischemia/reperfusion in the rat and predicts infarct expansion. *Circulation* **108**, 2911-2917.

Reffelmann, T. and Kloner, R.A. (2006) The no-reflow phenomenon: A basic mechanism of myocardial ischemia and reperfusion. *Basic Res. Cardiol.* **101**, 359-372.

Ripa, R.S., Jørgensen, E., Wang, Y., Thune, J.J., Nilsson, J.C., Søndergaard, L., Johnsen, H.E., Køber, L., Grande, P. and Kastrup, J. (2006) Stem cell mobilization induced by subcutaneous granulocyte-colony stimulating factor to improve cardiac regeneration after acute ST-elevation myocardial infarction: result of the double-blind, randomized, placebo-controlled stem cells in myocardial infarction (STEMMI) trial. *Circulation* **113**, 1983-1992.

Rodríguez-Leor, O., Fernández-Nofrerías, E., Mauri, F., Salvatella, N., Carrillo, X., Curós, A., Serra, J., Valle, V. and Bayes-Genis, A. (2011) Analysis of reperfusion delay in patients with

acute myocardial infarction treated with primary angioplasty based on first medical contact and time of presentation. *Rev. Esp. Cardiol.* **64**, 476-483.

Rodríguez-Sinovas, A., Abdallah, Y., Piper, H.M. and Garcia-Dorado, D. (2007) Reperfusion injury as a therapeutic challenge in patients with acute myocardial infarction. *Heart Fail. Rev.* **12**, 207-216.

Rodríguez-Sinovas, A., Bis, J., Anivarro, I., de la Torre, J., Bayés-Genís, A. and Cinca, J. (2003) Coronary smooth muscle reactivity to muscarinic stimulation after ischemia-reperfusion in porcine myocardial infarction. *J. Appl. Physiol.* **95**, 81-88.

Rodríguez-Sinovas, A., Boengler, K., Cabestrero, A., Gres, P., Morente, M., Ruiz-Meana, M., Konietzka, I., Miró, E., Totzeck, A., Heusch, G., Schulz, R. and Garcia-Dorado, D. (2006) Translocation of connexin 43 to the inner mitochondrial membrane of cardiomyocytes through the heat shock protein 90-dependent TOM pathway and its importance for cardioprotection. *Circ. Res.* **99**, 93-101.

Ross, R.S. (2002) The extracellular connections: the role of integrins in myocardial remodeling. *J. Card. Fail.* **8**, S326-S331.

Ruiz-Meana, M., Insete, J., Fernandez-Sanz, C., Hernando, V., Miro-Casas, E., Barba, I. and Garcia-Dorado, D. (2011) The role of mitochondrial permeability transition in reperfusion-induced cardiomyocyte death depends on the duration of ischemia. *Basic Res. Cardiol.* **106**, 1259-1268.

S

Sabatel, C., Malvaux, L., Bovy, N., Deroanne, C., Lambert, V., Gonzalez, M.L., Colige, A., Rakic, J.M., Noël, A., Martial, J.A. and Struman, I. (2011) MicroRNA-21 exhibits antiangiogenic function by targeting RhoB expression in endothelial cells. *PLoS One* **6**, e16979.

Saez, V., Hernández, J.R. and Peniche, C. (2007) Las microesferas como sistemas de liberación controlada de péptidos y proteínas. *Biotechnología Aplicada* **24**, 98-107.

Santoro, M.M. and Nicoli, S. (2013) miRNAs in endothelial cell signaling: the endomiRNAs. *Exp. Cell Res.* **319**, 1324-1330.

Sasahira, T., Kurihara, M., Bhawal, U.K., Ueda, N., Shimomoto, T., Yamamoto, K., Kirita, T. and Kuniyasu, H. (2012) Downregulation of miR-126 induces angiogenesis and lymphangiogenesis by activation of VEGF-A in oral cancer. *Br. J. Cancer* **107**, 700-706.

Sato, T., Kanke, M., Schroeder, H.G. and DeLuca PP. (1988) Porous biodegradable microspheres for controlled drug delivery. I. Assessment of processing conditions and solvent removal techniques. *Pharm. Res.* **5**, 21-30.

Saumet, A. and Lecellier, C.H. (2006) Anti-viral RNA silencing: do we look like plants? *Retrovirology* **3**, 3.

Savoie, C., Equine, O., Tricot, O., Nugue, O., Segrestin, B., Sautière, K., Elkohen, M., Pretorian, E.M., Taghipour, K., Philiat, A., Aumégeat, V., Decoulx, E., Ennezat, P.V. and Bauters, C. REmodelage VEntriculaire study group. (2006) Left ventricular remodeling after anterior wall acute myocardial infarction in modern clinical practice (from the REmodelage VEntriculaire (REVE) study group. *Am. J. Cardiol.* **98**, 1144-1149.

Sawant, R.R., and Torchilin, V.P. (2012) Challenges in development of targeted liposomal therapeutics. *AAPS J.* **14**, 303-315.

Scherr, M., Venturini, L., Battmer, K., Schaller-Schoenitz, M., Schaefer, D., Dallmann, I., Ganser, A. and Eder, M. (2007) Lentivirus-mediated antagomir expression for specific inhibition of miRNA function. *Nucleic Acids Res.* **35**, e149.

Seeger, T., Haffez, F., Fischer, A., Koehl, U., Leistner, D.M., Seeger, F.H., Boon, R.A., Zeiher, A.M. and Dimmeler, S. (2013) Immunosenescence-associated microRNAs in age and heart failure. *Eur. J. Heart. Fail.* **15**, 385-393.

Selvamani, A., Sathyan, P., Miranda, R.C. and Sohrabji, F. (2012) An antagomir to microRNA Let7f promotes neuroprotection in an ischemic stroke model. *PLoS One* **7**, e32662.

Seropian, I.M., Cerliani, J.P., Toldo, S., Van Tassell, B.W., Ilarregui, J.M., González, G.E., Matoso, M., Salloum, F.N., Melchior, R., Gelpi, R.J., Stupirski, J.C., Benatar, A., Gómez, K.A., Morales, C., Abbate, A. and Rabinovich, G.A. (2013) Galectin-1 controls cardiac inflammation and ventricular remodeling during acute myocardial infarction. *Am. J. Pathol.* **182**, 29-40.

Shi, Z.M., Wang, J., Yan, Z., You, Y.P., Li, C.Y., Qian, X., Yin, Y., Zhao, P., Wang, Y.Y., Wang, X.F., Li, M.N., Liu, L.Z., Liu, N. and Jiang, B.H. (2012) MiR-128 inhibits tumor growth and angiogenesis by targeting p70S6K1. *PLoS One* **7**, e32709.

Shigoka, M., Tsuchida, A., Matsudo, T., Nagakawa, Y., Saito, H., Suzuki, Y., Aoki, T., Murakami, Y., Toyoda, H., Kumada, T., Bartenschlager, R., Kato, N., Ikeda, M., Takashina, T.,

Tanaka, M., Suzuki, R., Oikawa, K., Takanashi, M. and Kuroda, M. (2010) Deregulation of miR-92a expression is implicated in hepatocellular carcinoma development. *Pathol. Int.* **60**, 351-357.

Shih, T.C., Tien, Y.J., Wen, C.J., Yeh, T.S., Yu, M.C., Huang, C.H., Lee, Y.S., Yen, T.C. and Hsieh, S.Y. (2012) MicroRNA-214 downregulation contributes to tumor angiogenesis by inducing secretion of the hepatoma-derived growth factor in human hepatoma. *J. Hepatol.* **57**, 584-591.

Shim, M.S. and Kwon, Y.J. (2010) Efficient and targeted delivery of siRNA in vivo. *FEBS J.* **277**, 4814-4827.

Singh, M. and O'Hagan, D. (1998) The preparation and characterization of polymeric antigen delivery systems for oral administration. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **34**, 285-304.

Small, E.M. and Olson, E.N. (2011) Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. *Nature* **469**, 336-342.

Smits, M., Nilsson, J., Mir, S.E., van der Stoop, P.M., Hulleman, E., Niers, J.M., de Witt Hamer, P.C., Marquez, V.E., Cloos, J., Krichevsky, A.M., Noske, D.P., Tannous, B.A. and Würdinger, T. (2010) miR-101 is down-regulated in glioblastoma resulting in EZH2-induced proliferation, migration, and angiogenesis. *Oncotarget* **1**, 710-720.

Smits, M., Würdinger, T., van het Hof, B., Drexhage, J.A., Geerts, D., Wesseling, P., Noske, D.P., Vandertop, W.P., de Vries, H.E. and Reijerkerk, A. (2012) Myc-associated zinc finger protein (MAZ) is regulated by miR-125b and mediates VEGF-induced angiogenesis in glioblastoma. *FASEB J.* **26**, 2639-2647.

Spinale, F.G. (2007) Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol. Rev.* **87**, 1285-1342.

Spinetti, G., Fortunato, O., Caporali, A., Shantikumar, S., Marchetti, M., Meloni, M., Descamps, B., Floris, I., Sangalli, E., Vono, R., Faglia, E., Specchia, C., Pintus, G., Madeddu, P. and Emanuelli, C. (2013) MicroRNA-15a and microRNA-16 impair human circulating proangiogenic cell functions and are increased in the proangiogenic cells and serum of patients with critical limb ischemia. *Circ. Res.* **112**, 335-346.

Stenvang, J. and Kauppinen, S. (2008) MicroRNAs as targets for antisense-based therapeutics. *Expert Opin. Biol. Ther.* **8**, 59-81.

Stewart, D.J., Kutryk, M.J., Fitchett, D., Freeman, M., Camack, N., Su, Y., Della Siega, A., Bilodeau, L., Burton, J.R., Proulx, G. and Radhakrishnan, S. NORTHERN Trial Investigators. (2009) VEGF gene therapy fails to improve perfusion of ischemic myocardium in patients with advanced coronary disease: results of the NORTHERN trial. *Mol. Ther.* **17**, 1109-1115.

Suárez, Y. and Sessa, W.C. (2009) MicroRNAs as novel regulators of angiogenesis. *Circ. Res.* **104**, 442-454.

Sun, C.Y., She, X.M., Qin, Y., Chu, Z.B., Chen, L., Ai, L.S., Zhang, L. and Hu, Y. (2013) miR-15a and miR-16 affect the angiogenesis of multiple myeloma by targeting VEGF. *Carcinogenesis* **34**, 426-435.

Sun, Y. and Weber, K.T. (2000) Infarct scar: a dynamic tissue. *Cardiovasc. Res.* **46**, 250-256.

Sundaram, P., Hultine, S., Smith, L.M., Dews, M., Fox, J.L., Biyashev, D., Schelter, J.M., Huang, Q., Cleary, M.A., Volpert, O.V. and Thomas-Tikhonenko. (2011) A. p53-responsive miR-194 inhibits thrombospondin-1 and promotes angiogenesis in colon cancers. *Cancer Res.* **71**, 7490-7501.

Sundaresan, N.R., Pillai, V.B. and Gupta, M.P. (2011) Emerging roles of **SIRT1** deacetylase in regulating cardiomyocyte survival and hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **51**, 614-618.

Szoka, F. Jr. and Papahadjopoulos, D. (1980) Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **9**, 467-508.

T

Tamber, H., Johansen, P., Merkle, H.P. and Gander, B. (2005) Formulation aspects of biodegradable polymeric microspheres for antigen delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 357-376.

Tanaka, M., Oikawa, K., Takanashi, M., Kudo, M., Ohyashiki, J., Ohyashiki, K. and Kuroda, M. (2009) Down-regulation of miR-92 in human plasma is a novel marker for acute leukemia patients. *PLoS One* **4**, e5532.

Tang, W., Yu, F., Yao, H., Cui, X., Jiao, Y., Lin, L., Chen, J., Yin, D., Song, E. and Liu, Q. (2013) miR-27a regulates endothelial differentiation of breast cancer stem like cells. *Oncogene* [Epub ahead of print].

Taylor, D.A., Atkins, B.Z., Hungspreugs, P., Jones, T.R., Reedy, M.C., Hutcheson, K.A., Glower, D.D. and Kraus, W.E. (1998) Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat. Med.* **4**, 929-933.

Thum, T., Catalucci, D. and Bauersachs, J. (2008) MicroRNAs: novel regulators in cardiac development and disease. *Cardiovasc. Res.* **79**, 562-570.

Thum, T., Gross, C., Fiedler, J., Fischer, T., Kissler, S., Bussen, M., Galuppo, P., Just, S., Rottbauer, W., Frantz, S., Castoldi, M., Soutschek, J., Koteliansky, V., Rosenwald, A., Basson, M.A., Licht, J.D., Pena, J.T., Rouhanifard, S.H., Muckenthaler, M.U., Tuschl, T., Martin, G.R., Bauersachs, J. and Engelhardt, S. (2008) MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature* **456**, 980-984.

Tivnan, A., Orr, W.S., Gubala, V., Nooney, R., Williams, D.E., McDonagh, C., Prenter, S., Harvey, H., Domingo-Fernández, R., Bray, I.M., Piskareva, O., Ng, C.Y., Lode, H.N., Davidoff, A.M. and Stallings, R.L. (2012) Inhibition of neuroblastoma tumor growth by targeted delivery of microRNA-34a using anti-disialoganglioside GD2 coated nanoparticles. *PLoS One* **7**, e38129.

Tomita, S., Mickle, D.A., Weisel, R.D., Jia, Z.Q., Tumati, L.C., Allidina, Y., Liu, P. and Li, R.K. (2002) Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **123**, 1132-1140.

Tongers, J., Losordo, D.W. and Landmesser, U. (2011) Stem and progenitor cell-based therapy in ischaemic heart disease: promise, uncertainties, and challenges. *Eur. Heart J.* **32**, 1197-1206.

Turner, N.A. and Porter, K.E. (2013) Function and fate of myofibroblasts after myocardial infarction. *Fibrogenesis Tissue Repair* **6**, 5.

U

Ucar, A., Gupta, S.K., Fiedler, J., Erikci, E., Kardasinski, M., Batkai, S., Dangwal, S., Kumarswamy, R., Bang, C., Holzmann, A., Remke, J., Caprio, M., Jentzsch, C., Engelhardt, S., Geisendorf, S., Glas, C., Hofmann, T.G., Nessling, M., Richter, K., Schiffer, M., Carrier, L., Napp, L.C., Bauersachs, J., Chowdhury, K. and Thum, T. (2012) The miRNA-212/132 family regulates both cardiac hypertrophy and cardiomyocyte autophagy. *Nat. Commun.* **3**, 1078.

Unger, E.F. (2007) All is not well in the world of translational research. *J. Am. Coll. Cardiol.* **50**, 738-740.

Urbich, C., Dernbach, E., Reissner, A., Vasa, M., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. (2002) Shear stress-induced endothelial cell migration involves integrin signaling via the fibronectin receptor subunits alpha(5) and beta(1). *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22**, 69-75.

Urbich, C., Kuehbacher, A. and Dimmeler, S. (2008) Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovasc. Res.* **79**, 581-588.

V

van den Borne, S.W., Diez, J., Blankesteyn, W.M., Verjans, J., Hofstra, L. and Narula, J. (2010) Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts. *Nat. Rev. Cardiol.* **7**, 30-37.

van den Borne, S.W., Isobe, S., Verjans, J.W., Petrov, A., Lovhaug, D., Li, P., Zandbergen, H.R., Ni, Y., Frederik, P., Zhou, J., Arbo, B., Rogstad, A., Cuthbertson, A., Chettibi, S., Reutelingsperger, C., Blankesteyn, W.M., Smits, J.F., Daemen, M.J., Zannad, F., Vannan, M.A., Narula, N., Pitt, B., Hofstra, L. and Narula, J. (2008) Molecular imaging of interstitial alterations in remodeling myocardium after myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **52**, 2017-2028.

van der Worp, H.B. and Macleod, M.R. (2011) Preclinical studies of human disease: time to take methodological quality seriously. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **51**, 449-450.

van Rooij, E., Marshall, W.S. and Olson, E.N. (2008) Toward microRNA-based therapeutics for heart disease: the sense in antisense. *Circ. Res.* **103**, 919-928.

van Rooij, E., Sutherland, L.B., Liu, N., Williams, A.H., McAnally, J., Gerard, R.D., Richardson, J.A. and Olson, E.N. (2006) A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 18255-18260.

van Rooij, E., Sutherland, L.B., Thatcher, J.E., DiMaio, J.M., Naseem, R.H., Marshall, W.S., Hill, J.A. and Olson, E.N. (2008) Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 13027-13032.

van Solingen, C., de Boer, H.C., Bijkerk, R., Monge, M., van Oeveren-Rietdijk, A.M., Seghers, L., de Vries, M.R., van der Veer, E.P., Quax, P.H., Rabelink, T.J. and van Zonneveld, A.J. (2011) MicroRNA-126 modulates endothelial SDF-1 expression and mobilization of Sca-1(+)/Lin(-) progenitor cells in ischaemia. *Cardiovasc. Res.* **92**, 449-455.

Ventura, A., Young, A.G., Winslow, M.M., Lintault, L., Meissner, A., Erkeland, S.J., Newman, J., Bronson, R.T., Crowley, D., Stone, J.R., Jaenisch, R., Sharp, P.A. and Jacks, T. (2008)

Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell* **132**, 875-886.

Venturini, L., Battmer, K., Castoldi, M., Schultheis, B., Hochhaus, A., Muckenthaler, M.U., Ganser, A., Eder, M. and Scherr, M. (2007) Expression of the miR-17-92 polycistron in chronic myeloid leukemia (CML) CD34+ cells. *Blood* **109**, 4399-4405.

Visscher, G.E., Pearson, J.E., Fong, J.W., Argentieri, G.J., Robison, R.L. and Maulding, H.V. (1988) Effect of particle size on the in vitro and in vivo degradation rates of poly(DL-lactide-co-glycolide) microcapsules. *J. Biomed. Mater. Res.* **22**, 733-746.

Visscher, G.E., Robison, M.A. and Argentieri, G.J. (1987) Tissue response to biodegradable injectable microcapsules. *J. Biomater. Appl.* **2**, 118-131.

Visscher, G.E., Robison, R.L., Maulding, H.V., Fong, J.W., Pearson, J.E. and Argentieri, G.J. (1985) Biodegradation of and tissue reaction to 50:50 poly(DL-lactide-co-glycolide) microcapsules. *J. Biomed. Mater. Res.* **19**, 349-365.

Viticchiè, G., Lena, A.M., Cianfarani, F., Odorisio, T., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Melino, G. and Candi, E. (2012) MicroRNA-203 contributes to skin re-epithelialization. *Cell Death Dis.* **3**, e435.

Vlaar, P. J., Svilaas, T., van der Horst, I.C., Diercks, G.F., Fokkema, M.L., de Smet, B.J., van den Heuvel, A.F., Anthonio, R.L., Jessurun, G.A., Tan, E.S., Suurmeijer, A.J. and Zijlstra, F. (2008) Cardiac death and reinfarction after 1 year in the Thrombus Aspiration during Percutaneous coronary intervention in Acute myocardial infarction Study (TAPAS): a 1-year follow-up study. *Lancet* **371**, 1915-1920.

Voinea, M. and Simionescu M. (2002) Designing of 'intelligent' liposomes for efficient delivery of drugs. *J. Cell. Mol. Med.* **6**, 465-474.

Volinia, S., Calin, G.A., Liu, C.G., Ambros, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M., Prueitt, R.L., Yanaihara, N., Lanza, G., Scarpa, A., Vecchione, A., Negrini, M., Harris, C.C. and Croce, C.M. (2006) A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 2257-2261.

W

Wakisaka, Y., Niwano, S., Niwano, H., Saito, J., Yoshida, T., Hirasawa, S., Kawada, H. and Izumi, T. (2004) Structural and electrical ventricular remodeling in rat acute myocarditis and subsequent heart failure. *Cardiovasc. Res.* **63**, 689-699.

Wald, C. and Wu, C. (2010) Biomedical research. Of mice and women: the bias in animal models. *Science* **327**, 1571-1572.

Walther, W. and Stein, U. (2000) Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases. *Drugs* **60**, 249-271.

Wang, J., Gao, Y., Ma, M., Li, M., Zou, D., Yang, J., Zhu, Z. and Zhao, X. (2013) Effect of miR-21 on renal fibrosis by regulating MMP-9 and TIMP1 in kk-ay diabetic nephropathy mice. *Cell Biochem. Biophys.* [Epub ahead of print].

Wang, J., Song, Y., Zhang, Y., Xiao, H., Sun, Q., Hou, N., Guo, S., Wang, Y., Fan, K., Zhan, D., Zha, L., Cao, Y., Li, Z., Cheng, X., Zhang, Y. and Yang X. (2012) Cardiomyocyte overexpression of miR-27b induces cardiac hypertrophy and dysfunction in mice. *Cell Res.* **22**, 516-527.

Wang, S., Aurora, A.B., Johnson, B.A., Qi, X., McAnally, J., Hill, J.A., Richardson, J.A., Bassel-Duby, R. and Olson, E.N. (2008) The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev. Cell.* **15**, 261-271.

Wang, S. and Olson, E.N. (2009) Angiomirs--key regulators of angiogenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **19**, 205-211.

Wang, X., Guo, B., Li, Q., Peng, J., Yang, Z., Wang, A., Li, D., Hou, Z., Lv, K., Kan, G., Cao, H., Wu, H., Song, J., Pan, X., Sun, Q., Ling, S., Li, Y., Zhu, M., Zhang, P., Peng, S., Xie, X., Tang, T., Hong, A., Bian, Z., Bai, Y., Lu, A., Li, Y., He, F., Zhang, G. and Li, Y. (2013) miR-214 targets ATF4 to inhibit bone formation. *Nat. Med.* **19**, 93-100.

Wang, X.H., Qian, R.Z., Zhang, W., Chen, S.F., Jin, H.M. and Hu, R.M. (2009) MicroRNA-320 expression in myocardial microvascular endothelial cells and its relationship with insulin-like growth factor-1 in type 2 diabetic rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **36**, 181-188.

Watanabe, Y., Yachie, N., Numata, K., Saito, R., Kanai, A., and Tomita, M. (2006) Computational analysis of microRNA targets in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* **365**, 2-10.

Weber, K.T., Sun, Y., Bhattacharya, S.K., Ahokas, R.A. and Gerling, I.C. (2013) Myofibroblast-mediated mechanisms of pathological remodelling of the heart. *Nat. Rev. Cardiol.* **10**, 15-26.

Wei, Y., Nazari-Jahantigh, M., Chan, L., Zhu, M., Heyll, K., Corbalán-Campos, J., Hartmann, P., Thiemann, A., Weber, C. and Schober, A. (2013) The microRNA-342-5p fosters inflammatory macrophage activation through an Akt1- and microRNA-155-dependent pathway during atherosclerosis. *Circulation* **127**, 1609-1619.

Weir, R.A., Miller, A.M., Petrie, C.J., Clements, S., Steedman, T., Dargie, H.J., Squire, I.B., Ng, L.L., McInnes, I.B. and McMurray, J.J. (2012) Interleukin-21--a biomarker of importance in predicting myocardial function following acute infarction? *Cytokine* **60**, 220-225.

Weir, R.A., Murphy, C.A., Petrie, C.J., Martin, T.N., Balmain, S., Clements, S., Steedman, T., Wagner, G.S., Dargie, H.J. and McMurray, J.J. (2010) Microvascular obstruction remains a portent of adverse remodeling in optimally treated patients with left ventricular systolic dysfunction after acute myocardial infarction. *Circ. Cardiovasc. Imaging* **3**, 360-367.

Weng, C., Dong, H., Chen, G., Zhai, Y., Bai, R., Hu, H., Lu, L. and Xu, Z. (2012) miR-409-3p inhibits HT1080 cell proliferation, vascularization and metastasis by targeting angiogenin. *Cancer Lett.* **323**, 171-179.

White, S.K., Hausenloy, D.J. and Moon, J.C. (2012) Imaging the myocardial microcirculation post-myocardial infarction. *Curr. Heart. Fail. Rep.* **9**, 282-292.

Williams, A.H., Liu, N., van Rooij, E. and Olson, E.N. (2009) MicroRNA control of muscle development and disease. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **21**, 461-469.

Wischke, C. and Borchert, H.H. (2006) Fluorescein isothiocyanate labelled bovine serum albumin (FITC-BSA) as a model protein drug: opportunities and drawbacks. *Pharmazie* **61**, 770-774.

Wollert, K.C., Meyer, G.P., Lotz, J., Ringes-Lichtenberg, S., Lippolt, P., Breidenbach, C., Fichtner, S., Korte, T., Hornig, B., Messinger, D., Arseniev, L., Hertenstein, B., Ganser, A. and Drexler H. (2004) Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* **364**, 141-148.

Won, S., Davies-Venn, C., Liu, S. and Bluemke, D.A. (2013) Noninvasive imaging of myocardial extracellular matrix for assessment of fibrosis. *Curr. Opin. Cardiol.* **28**, 282-289.

Wong, S.P., French, J.K., Lydon, A.M., Manda, S.O., Gao, W., Ashton, N.G. and White, H.D.

(2004) Relation of left ventricular sphericity to 10-year survival after acute myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.* **94**, 1270-1275.

Wu, E., Ortiz, J.T., Tejedor, P., Lee, D.C., Bucciarelli-Ducci, C., Kansal, P., Carr, J.C., Holly, T.A., Lloyd-Jones, D., Klocke, F.J. and Bonow, R.O. (2008) Infarct size by contrast enhanced cardiac magnetic resonance is a stronger predictor of outcomes than left ventricular ejection fraction or end-systolic volume index: prospective cohort study. *Heart* **94**, 730-736.

Wu, Q., Yang, Z., Wang, F., Hu, S., Yang, L., Shi, Y. and Fan, D. (2013) MiR-19b/20a/92a regulates the self-renewal and proliferation of gastric cancer stem cells. *J. Cell. Sci.* **126**, 4220-4229.

Wu, X.S. (2004) Synthesis, characterization, biodegradation, and drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid polymers: Part III. Drug delivery application. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* **32**, 575-591.

Würdinger, T., Tannous, B.A., Saydam, O., Skog, J., Grau, S., Soutschek, J., Weissleder, R., Breakefield, X.O. and Krichevsky, A.M. (2008) miR-296 regulates growth factor receptor overexpression in angiogenic endothelial cells. *Cancer Cell* **14**, 382-393.

X

Xiao, C., Srinivasan, L., Calado, D.P., Patterson, H.C., Zhang, B., Wang, J., Henderson, J.M., Kutok, J.L. and Rajewsky, K. (2008) Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat. Immunol.* **9**, 405-414.

Xu, P., Guo, M., and Hay, B.A. (2004) MicroRNAs and the regulation of cell death. *Trends Genet.* **20**, 617-624.

Xu, Q., Liu, L.Z., Qian, X., Chen, Q., Jiang, Y., Li, D., Lai, L. and Jiang, B.H. (2012) MiR-145 directly targets p70S6K1 in cancer cells to inhibit tumor growth and angiogenesis. *Nucleic Acids Res.* **40**, 761-774.

Y

Yamada, N., Nakagawa, Y., Tsujimura, N., Kumazaki, M., Noguchi, S., Mori, T., Hirata, I., Maruo, K. and Akao, Y. (2013) Role of Intracellular and Extracellular MicroRNA-92a in Colorectal Cancer. *Transl. Oncol.* **6**, 482-492.

Yamakuchi, M., Lotterman, C.D., Bao, C., Hruban, R.H., Karim, B., Mendell, J.T., Huso, D. and Lowenstein, C.J. (2010) P53-induced microRNA-107 inhibits HIF-1 and tumor angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 6334-6339.

Yan, T., Liu, Y., Cui, K., Hu, B., Wang, F. and Zou, L. (2013) MiR-126 regulates EPCs function: implications for a role of miR-126 in preeclampsia. *J. Cell. Biochem.* [Epub ahead of print].

Yancy, C.W., Jessup, M., Bozkurt, B., Butler, J., Casey, D.E. Jr., Drazner, M.H., Fonarow, G.C., Geraci, S.A., Horwich, T., Januzzi, J.L., Johnson, M.R., Kasper, E.K., Levy, W.C., Masoudi, F.A., McBride, P.E., McMurray, J.J., Mitchell, J.E., Peterson, P.N., Riegel, B., Sam, F., Stevenson, L.W., Tang, W.H., Tsai, E.J. and Wilkoff, B.L. (2013) ACCF/AHA Guideline for the Management of Heart Failure: A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* [Epub ahead of print].

Yang, B., Lin, H., Xiao, J., Lu, Y., Luo, X., Li, B., Zhang, Y., Xu, C., Bai, Y., Wang, H., Chen, G. and Wang, Z. (2007) The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nat. Med.* **13**, 486-491.

Yang, C.H., Yue, J., Fan, M. and Pfeffer, L.M. (2010) IFN induces miR-21 through a signal transducer and activator of transcription 3-dependent pathway as a suppressive negative feedback on IFN-induced apoptosis. *Cancer Res.* **70**, 8108-8116.

Yang, C.H., Yue, J., Pfeffer, S.R., Handorf, C.R. and Pfeffer, L.M. (2011) MicroRNA miR-21 regulates the metastatic behavior of B16 melanoma cells. *J. Biol. Chem.* **286**, 39172-39178.

Yang, J.T., Rayburn, H. and Hynes, R.O. (1993) Embryonic meso- dermal defects in alpha5 integrin-deficient mice. *Development* **119**, 1093-1105.

Yang, T., Zhang, G.F., Chen, X.F., Gu, H.H., Fu, S.Z., Xu, H.F., Feng, Q. and Ni, Y.M. (2013) MicroRNA-214 provokes cardiac hypertrophy via repression of EZH2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **436**, 578-584.

Yang, Z., Wu, L., Zhu, X., Xu, J., Jin, R., Li, G. and Wu, F. (2013) MiR-29a modulates the angiogenic properties of human endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **434**, 143-149.

Ye, Y., Perez-Polo, J.R., Qian, J. and Birnbaum, Y. (2011) The role of microRNA in modulating myocardial ischemia-reperfusion injury. *Physiol. Genomics.* **43**, 534-542.

Yin, K.J., Olsen, K., Hamblin, M., Zhang, J., Schwendeman, S.P. and Chen, Y.E. (2012) Vascular endothelial cell-specific microRNA-15a inhibits angiogenesis in hindlimb ischemia. *J. Biol. Chem.* **287**, 27055-27064.

Yin, R., Bao, W., Xing, Y., Xi, T. and Gou, S. (2012) MiR-19b-1 inhibits angiogenesis by blocking cell cycle progression of endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **417**, 771-776.

Yin, R., Wang, R., Guo, L., Zhang, W. and Lu, Y. (2013) MiR-17-3p inhibits angiogenesis by downregulating flk-1 in the cell growth signal pathway. *J. Vasc. Res.* **50**, 157-166.

Yin, Y., Yan, Z.P., Lu, N.N., Xu, Q., He, J., Qian, X., Yu, J., Guan, X., Jiang, B.H. and Liu, L.Z. (2013) Downregulation of miR-145 associated with cancer progression and VEGF transcriptional activation by targeting N-RAS and IRS1. *Biochim. Biophys. Acta* **1829**, 239-247.

Yu, J.X., Huang, X.F., Lv, W.M., Ye, C.S., Peng, X.Z., Zhang, H., Xiao, L.B. and Wang, S.M. (2009) Combination of stromal-derived factor-1 α and vascular endothelial growth factor gene-modified endothelial progenitor cells is more effective for ischemic neovascularization. *J. Vasc. Surg.* **50**, 608-616.

Z

Zamilpa, R., Ibarra, J., de Castro Brás, L.E., Ramirez, T.A., Nguyen, N., Halade, G.V., Zhang, J., Dai, Q., Dayah, T., Chiao, Y.A., Lowell, W., Ahuja, S.S., D'Armiento, J., Jin, Y.F. and Lindsey, M.L. (2012) Transgenic overexpression of matrix metalloproteinase-9 in macrophages attenuates the inflammatory response and improves left ventricular function post-myocardial infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **53**, 599-608.

Zannad, F., Gattis Stough, W., Rossignol, P., Bauersachs, J., McMurray, J.J., Swedberg, K., Struthers, A.D., Voors, A.A., Ruilope, L.M., Bakris, G.L., O'Connor, C.M., Gheorghiade, M., Mentz, R.J., Cohen-Solal, A., Maggioni, A.P., Beygui, F., Filippatos, G.S., Massy, Z.A., Pathak, A., Piña, I.L., Sabbah, H.N., Sica, D.A., Tavazzi, L. and Pitt, B. (2012) Mineralocorticoid receptor antagonists for heart failure with reduced ejection fraction: integrating evidence into clinical practice. *Eur. Heart J.* **33**, 2782-2795.

Zhang, B. and Farwell, M.A. (2008) MicroRNAs: a new emerging class of players for disease diagnostics and gene therapy. *J. Cell. Mol. Med.* **12**, 3-21.

Zhang, H., Qi, M., Li, S., Qi, T., Mei, H., Huang, K., Zheng, L. and Tong, Q. (2012) microRNA-9 targets matrix metalloproteinase 14 to inhibit invasion, metastasis, and angiogenesis of neuroblastoma cells. *Mol. Cancer Ther.* **11**,1454-1466.

Zhao, Y. and Srivastava, D. (2007) A developmental view of microRNA function. *Trends Biochem. Sci.* **32**, 189-197.

Zhao, Y., Ransom, J.F., Li, A., Vedantham, V., von Drehle, M., Muth, A.N., Tsuchihashi, T., McManus, M.T., Schwartz, R.J. and Srivastava, D. (2007) Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell* **129**, 303-317.

Zheng, X., Chopp, M., Lu, Y., Buller, B. and Jiang, F. (2013) MiR-15b and miR-152 reduce glioma cell invasion and angiogenesis via NRP-2 and MMP-3. *Cancer Lett.* **329**, 146-154.

Zhong, J.C., Huang, D.Y., Yang, Y.M., Li, Y.F., Liu, G.F., Song, X.H. and Du, K. (2004) Upregulation of angiotensin-converting enzyme 2 by all-trans retinoic acid in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **44**, 907-912.

Zhou, M., Liu, W., Ma, S., Cao, H., Peng, X., Guo, L., Zhou, X., Zheng, L., Guo, L., Wan, M., Shi, W., He, Y., Lu, C., Jiang, L., Ou, C., Guo, Y. and Ding, Z. (2013) A novel onco-miR-365 induces cutaneous squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* **34**, 1653-1659.

Zhou, Q., Gallagher, R., Ufret-Vincenty, R., Li, X., Olson, E.N. and Wang, S. (2011) Regulation of angiogenesis and choroidal neovascularization by members of microRNA-23~27~24 clusters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 8287-8292.

Zhu, H., Yang, Y., Wang, Y., Li, J., Schiller, P.W. and Peng, T. (2011) MicroRNA-195 promotes palmitate-induced apoptosis in cardiomyocytes by down-regulating Sirt1. *Cardiovasc. Res.* **92**, 75-84.

Zhu, K., Pan, Q., Zhang, X., Kong, L.Q., Fan, J., Dai, Z., Wang, L., Yang, X.R., Hu, J., Wan, J.L., Zhao, Y.M., Tao, Z.H., Chai, Z.T., Zeng, H.Y., Tang, Z.Y., Sun, H.C. and Zhou, J. (2013) MiR-146a enhances angiogenic activity of endothelial cells in hepatocellular carcinoma by promoting PDGFRA expression. *Carcinogenesis* [Epub ahead of print].

Zhu, N., Zhang, D., Xie, H., Zhou, Z., Chen, H., Hu, T., Bai, Y., Shen, Y., Yuan, W., Jing, Q. and Qin, Y. (2011) Endothelial-specific intron-derived miR-126 is down-regulated in human breast cancer and targets both VEGFA and PIK3R2. *Mol. Cell. Biochem.* **351**, 157-164.

Zhuang, G., Wu, X., Jiang, Z., Kasman, I., Yao, J., Guan, Y., Oeh, J., Modrusan, Z., Bais, C., Sampath, D. and Ferrara, N. (2012) Tumour-secreted miR-9 promotes endothelial cell migration and angiogenesis by activating the JAK-STAT pathway. *EMBO J.* **31**, 3513-3523.

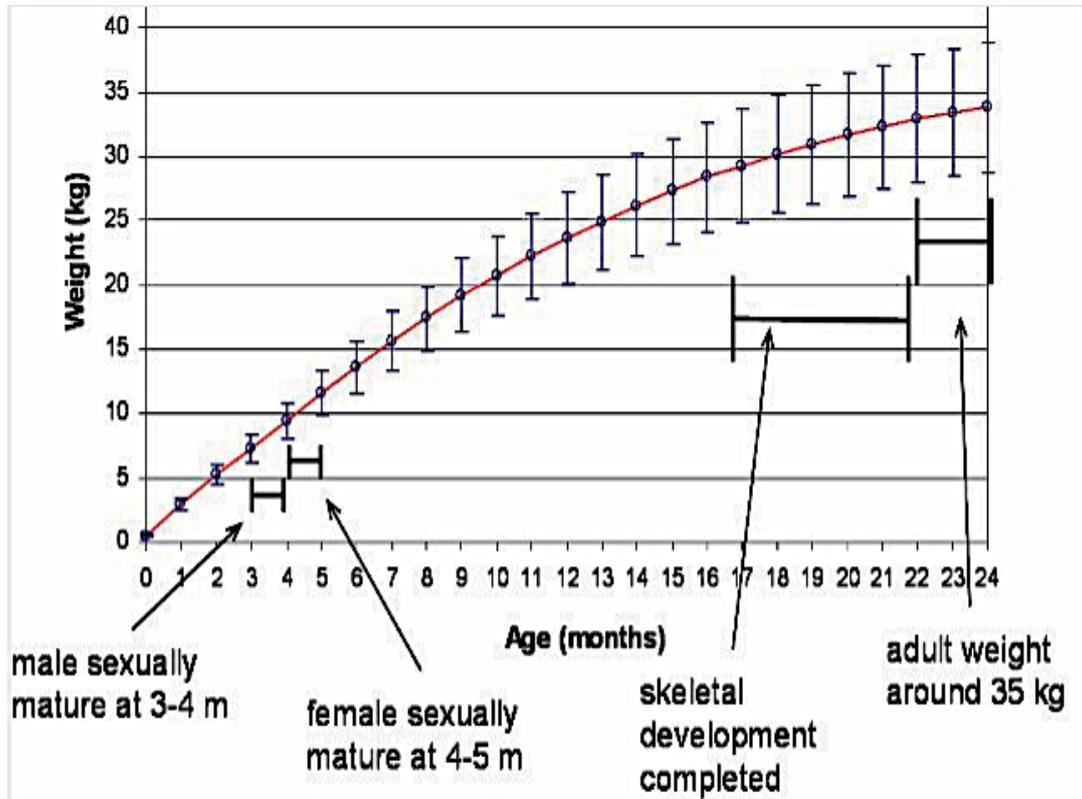
Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J. and Vitzthum, F. (2004) Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res.* **32**, 103.

Zou, C., Xu, Q., Mao, F., Li, D., Bian, C., Liu, L.Z., Jiang, Y., Chen, X., Qi, Y., Zhang, X., Wang, X., Sun, Q., Kung, H.F., Lin, M.C., Dress, A., Wardle, F., Jiang, B.H. and Lai, L. (2012) MiR-145 inhibits tumor angiogenesis and growth by N-RAS and VEGF. *Cell Cycle* **11**, 2137-2145.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO 1- Minipigs: curva de crecimiento.



ANEXO 2- Minipigs: composición de la dieta SMP.

Mini-Pig

Calculated Analysis

NUTRIENTS		Total	Supp (9)	NUTRIENTS		Total	Supp (9)
Proximate Analysis							
Moisture (1)	%	10.00		Glutamic Acid	%	1.81	
Crude Oil	%	2.13		Proline	%	0.74	
Crude Protein	%	13.03		Serine	%	0.43	
Crude Fibre	%	14.52		Hydroxyproline	%		
Ash	%	7.35		Hydroxylysine	%		
Nitrogen Free Extract	%	52.41		Alanine	%	0.06	
Digestibility Co-Efficients (7)							
Digestible Crude Oil	%	1.20		Macro Minerals			
Digestible Crude Protein	%	9.41		Calcium	%	1.01	0.75
Carbohydrates, Fibre and Non Starch Polysaccharides (NSP)							
Total Dietary Fibre	%	29.66		Total Phosphorus	%	0.59	0.22
Pectin	%	2.78		Phytate Phosphorus	%	0.22	
Hemicellulose	%	11.62		Available Phosphorus	%	0.37	0.22
Cellulose	%	14.12		Sodium	%	0.29	0.23
Lignin	%	2.85		Chloride	%	0.42	0.36
Starch	%	27.12		Potassium	%	1.37	
Sugar	%	5.54		Magnesium	%	0.31	
Energy (5)							
Gross Energy	MJ/kg	13.80		Micro Minerals			
Digestible Energy (11)	MJ/kg	11.43		Iron	mg/kg	161.59	
Metabolisable Energy (12)	MJ/kg	10.98		Copper	mg/kg	17.73	3.00
Atwater Fuel Energy (AFE) (8)	MJ/kg	11.74		Manganese	mg/kg	46.49	10.00
AFE from Oil	%	6.82		Zinc	mg/kg	118.08	86.40
AFE from Protein	%	18.55		Cobalt	µg/kg	59.60	
AFE from Carbohydrate	%	74.62		Iodine	µg/kg	62.68	
Fatty Acids							
Saturated Fatty Acids							
C12:0 Lauric	%	0.02		Selenium	µg/kg	211.35	60.00
C14:0 Myristic	%	0.05		Fluorine	mg/kg	16.58	
C16:0 Palmitic	%	0.13		Vitamins			
C18:0 Stearic	%	0.01		β-Carotene (2)	mg/kg	0.09	
Monounsaturated Fatty Acids							
C14:1 Myristoleic	%	0.02		Retinol (2)	µg/kg	3638.97	3510.00
C16:1 Palmitoleic	%	0.08		Vitamin A (2)	iu/kg	12129.89	11700.00
C18:1 Oleic	%	0.36		Cholecalciferol (3)	µg/kg	59.96	58.50
Polyunsaturated Fatty Acids							
C18:2(ω6) Linoleic	%	0.31		Vitamin D (3)	iu/kg	2398.50	2340.00
C18:3(ω3) Linolenic	%	0.02		α-Tocopherol (4)	mg/kg	65.76	54.55
C20:4(ω6) Arachidonic	%	0.06		Vitamin E (4)	iu/kg	72.34	60.00
C22:5(ω3) Clupanodonic	%			Vitamin B ₁ (Thiamine)	mg/kg	3.42	
Amino Acids							
Arginine	%	0.88		Vitamin B ₂ (Riboflavin)	mg/kg	4.50	2.94
Lysine (6)	%	0.63		Vitamin B ₆ (Pyridoxine)	mg/kg	2.76	
Methionine	%	0.18		Vitamin B ₁₂ (Cyanocobalamin)	µg/kg	7.03	6.00
Cystine	%	0.21		Vitamin C (Ascorbic Acid)	mg/kg	3.89	
Tryptophan	%	0.16		Vitamin K (Menadione)	mg/kg	3.19	2.88
Histidine	%	0.33		Folic Acid (Vitamin B ₉)	mg/kg	0.80	
Threonine	%	0.49		Nicotinic Acid (Vitamin PP) (6)	mg/kg	44.68	
Isoleucine	%	0.53		Pantothenic Acid (Vitamin B ₅)	mg/kg	10.71	
Leucine	%	0.92		Choline (Vitamin B ₄)	mg/kg	783.59	
Phenylalanine	%	0.62		Inositol	mg/kg	1278.69	
Valine	%	0.64		Biotin (Vitamin H) (6)	µg/kg	196.29	
Tyrosine	%	0.37		Notes			
Taurine	%			1. All values are calculated using a moisture basis of 10%.			
Glycine	%	1.00		Typical moisture levels will range between 9.5 - 11.5%.			
Aspartic Acid	%	0.507		2. a. Vitamin A includes Retinol and the Retinol equivalents of β-carotene			
				b. Retinol includes the Retinol equivalents of β-Carotene.			
				c. 0.48 µg Retinol = 1 µg β-carotene = 1.6 iu Vitamin A activity			
				d. 1 µg Retinol = 3.33* iu Vitamin A activity			
				e. 1 iu Vitamin A = 0.3 µg Retinol = 0.6 µg β-carotene			
				f. The standard analysis for Vitamin A does not detect β-carotene			
				3. 1µg Cholecalciferol (D ₃) = 40.0 iu Vitamin D			
				4. 1 mg all-rac-α-tocopherol = 1.1 iu Vitamin E activity			
				1 mg all-rac-α-tocopherol acetate = 1.0 iu Vitamin E activity			
				5. 1 MJ = 239.23 Kcalories = 239.23 Calories = 239,230 calories			
				6. These nutrients coming from natural raw materials such as cereals may have low availabilities due to the interactions with other compounds.			
				7. Based on in-vitro digestibility analysis.			
				8. AF Energy = Atwater Fuel Energy = ((CO%/100)*9000)+			
				((CP%/100)*4000)+((NFE%/100)*4000)/239.23			
				9. Supplemented nutrients from manufactured and mined sources.			
				11. DE Pigs (FSR 2000) = 17.47 + (0.079*CP%)+(0.158*CO%)-			
				(0.331*Ash%)-(0.140*NDF%)			
				12. ME Pigs (Farrell 79, ARC 81) = DE*0.96.			

ANEXO 3- Metodología: esquema de los procedimientos de la fase 5.

