



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Nuevas estrategias de condicionamiento miocárdico: Cardioprotección por nutraceuticos en cardiopatía isquémica

Pablo Sutelman

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



NUEVAS ESTRATEGIAS DE CONDICIONAMIENTO MIOCÁRDICO: CARDIOPROTECCIÓN POR NUTRACÉUTICOS EN CARDIOPATÍA ISQUÉMICA

Memoria de tesis doctoral presentada por
Pablo Sutelman
para optar al grado de doctor por la Universitat de Barcelona

Directores de Tesis:

- Dra. Gemma Vilahur García – Hospital de la Santa Creu i Sant Pau
- Prof. Lina Badimon Maestro– Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

Tutor de Tesis:

- Dr. Josep M. Canals Coll – Hospital Clinic Barcelona

Programa de Doctorado Medicina e Investigación Traslacional
Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud
Universidad de Barcelona

Mayo de 2023

AGRADECIMIENTOS

“Llega a ser quién eres”

Píndaro. 475 a.C.

Esta tesis doctoral no habría sido posible sin la ayuda de una innumerable cantidad de personas, que han colaborado directa e indirectamente para poder llevarla a su fin.

En primer lugar, quisiera agradecer a la Dra. Gemma Vilahur, quien con su notable conocimiento científico y técnico me ha brindado todas las herramientas necesarias para dar forma a este proyecto y muchos otros en el proceso, y ha sido una verdadera mentora con su predisposición, atención al detalle y hasta apoyo anímico cuando las horas de trabajo se hacían largas.

A la Dra. Lina Badimon, quien es y ha sido una guía y referente, y me ha dado la posibilidad de desarrollarme en el ámbito de la investigación.

Y a la Dra. Teresa Padró, que me abrió las puertas para permitirme embarcar en tamaña empresa.

A todos y cada uno de mis colegas del ICCC, que me han acompañado en gran parte de este camino, compartiendo comidas y experimentos y haciéndolo en el proceso mucho más entretenido. Sin olvidarme por supuesto de los técnicos del laboratorio, que me han ofrecido sus consejos y sabiduría sin esperar nada a cambio y gracias a los cuales sin lugar a dudas esto se ha hecho posible.

A mis compañeros y amigos de la Medicina, que me dieron el espacio para dedicarme a la tesis y tomarme el tiempo necesario para trabajar en ella, aún en nuestro día a día que puede ser intenso y demandante.

Quisiera agradecer particularmente a mi familia y amigos de toda la vida, quienes cerca o a la distancia me brindaron en todo momento su apoyo y ánimo para cumplir esta meta personal, y siempre estuvieron allí cuando hacía falta.

Y sobre todo a la mujer que me acompañó en esta locura y muchas otras, que se ha encargado de mantenerme con vida, alentarme y darme todo para poder llegar a ser quien soy.

En gran medida, esta tesis es fruto y parte de cada uno de ellos y por ese motivo les doy mis más sinceros agradecimientos.

ÍNDICE

1. ABREVIACIONES	9
2. ENUMERACIÓN DE ARTÍCULOS	13
3. INTRODUCCIÓN	14
3.1. Epidemiología de la enfermedad cardiovascular	14
3.1.1. Factores de riesgo cardiovascular	17
3.2. Fisiopatología de la cardiopatía isquémica.....	26
3.2.1. Aterosclerosis.....	26
3.2.2. Cardiopatía isquémica e infarto agudo de miocardio	32
3.3. Daño por isquemia/reperfusión	37
3.3.1. Metabolismo energético cardíaco y fenómeno de lipotoxicidad	41
3.4. Remodelado ventricular adverso e insuficiencia cardíaca.....	43
3.4.1. Mecanismos moleculares y celulares	44
3.4.2. Activación del sistema neuro-humoral	46
3.5. Estrategias de cardioprotección	47
3.5.1. Protección miocárdica endógena: condicionamiento isquémico	47
3.5.2. Condicionamiento farmacológico	51
3.6. Nutraceuticos: potenciales estrategias de cardioprotección.....	53
3.6.1. Definición y usos	53
3.6.2. Nutraceuticos, enfermedad cardiovascular y potencial de cardioprotección	55
3.6.3. Espirulina	61
3.6.4. <i>Silybum marianum</i>	62
3.7. Modelo animal de infarto agudo de miocardio	64
3.7.1. Características y potencial traslacional de modelos animales.....	64
3.7.2. Modelo porcino de infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST	65
4. HIPÓTESIS	67
5. OBJETIVOS.....	68
5.1. Objetivo 1.....	68
5.2. Objetivo 2.....	68
6. MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS	70
6.1. Artículo 1	71
6.1.1. Material suplementario.....	85

6.2. Artículo 2	87
6.2.1. Material suplementario.....	99
7. DISCUSIÓN	105
7.1. Cardioprotección mediante condicionamiento miocárdico.....	105
7.2. Nutracéuticos como vehículos terapéuticos	105
7.3. Modulación metabólica de espirulina y <i>Silybum marianum</i>	106
7.4. Cardioprotección mediante condicionamiento por espirulina y <i>Silybum marianum</i>	107
7.5. Perfil de bioseguridad de Espirulina y <i>Silybum marianum</i>	113
7.6. Limitaciones.....	114
8. CONCLUSIONES	116
9. BIBLIOGRAFÍA	118

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Prevalencia mundial de cardiopatía isquémica	14
Figura 2. Causas de mortalidad global	15
Figura 3. Niveles de prevención poblacional.....	17
Figura 4. Contribución relativa de factores de riesgo cardiovascular	20
Figura 5. Esquema de progresión de la enfermedad aterosclerótica	30
Figura 6. Fisiopatología de la enfermedad aterosclerótica	31
Figura 7. Clasificación del infarto agudo de miocardio.....	33
Figura 8. Mecanismos de daño por isquemia/reperfusión	40
Figura 9. Metabolismo lipídico cardíaco	42
Figura 10. Fenotipos y características de la insuficiencia cardíaca según FSVI	44
Figura 11. Fases temporales de aplicación del condicionamiento miocárdico	48
Figura 12. División de nutraceuticos según su origen y procesamiento	54
Figura 13. Mecanismos de acción de espirulina.....	109
Figura 14. Mecanismos de acción de <i>Silybum marianum</i>	113

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación química y principales propiedades terapéuticas de los nutraceuticos.....	55
Tabla 2. Mecanismos moleculares de cardioprotección por nutraceuticos.	58

1. ABREVIACIONES

ACE	Enzima convertidora de angiotensina
Acil-CoA	Acil-Coenzima A
ADMA	Dimetilarginina asimétrica
ADP	Difosfato de adenosina
Akt	Familia de proteínas quinasas B
AMP	Monofosfato de adenosina
AMPK	Protein-quinasa activada por monofosfato de adenosina
ApoB	Apolipoproteína B
ATII	Angiotensina II
ATP	Adenosín trifosfato
AVC	Accidente vascular cerebral
Bax	Proteína X asociada a Bcl-2
Bcl-2	Proteína de células B-2
BRCA1	Gen relacionado al cáncer de mama 1
C-HDL	Colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad
C-LDL	Colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
CaMKII	Calcio-calmodulina quinasa II
CCL2	Ligando 2 de quimioquina
CCR	Receptor de quimioquina
CD	Clúster de diferenciación
Cox	Ciclooxigenasa
CPT	Carnitin-palmitoltransferasa
CT	Colesterol total
CV	Cardiovascular
DAG	Diacilglicerol
DALY	Disability Adjusted Life Years (Años de vida ajustados por discapacidad)
DAMP	Patrones moleculares de daño celular
DAPT	Doble antiagregación plaquetaria
DASH	Dietary Approaches to Stop Hypertension (Enfoques Alimentarios para Detener la Hipertensión)
DGAT	Diacilglicerol acil-transferasa
DM	Diabetes mellitus
DNA	Ácido desoxirribonucleico

ECV	Enfermedad cardiovascular
ERK 1-2	Quinasa regulada por señales extracelulares 1/2
FA	Fibrilación auricular
FEVI	Fracción de eyección del ventrículo izquierdo
GLP-1	Péptido simil-glucagon tipo 1
GLUT	Transportador de glucosa regulado por insulina
GP IIb/IIIa	Glicoproteína IIb/IIIa
HbA1c	Hemoglobina glicada A1c
HO-1	Hemo oxigenasa-1
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HIF-1 α	Factor inducible por hipoxia-1 alfa
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A
HTA	Hipertensión arterial
I/R	Isquemia/reperfusión
IAM	Infarto agudo de miocardio
IAMCEST	Infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST
IC	Insuficiencia cardíaca
IC 95%	Intervalo de confianza 95%
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1
ICP	Intervención coronaria percutánea
IL	Interleuquina
IMC	Índice de masa corporal
JAK-STAT	Citoquina Janus quinasa/transductor de señal y activador de transcripción
JNK	Quinasa c-Jun N-terminal
KLF4	Factor 4 simil-Kruppel
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LDLac	Lipoproteína de baja densidad acetilada
LDLag	Lipoproteína de baja densidad agregada
LDLox	Lipoproteína de baja densidad oxidada
LPL	Lipoproteinlipasa
LRP1	Proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
MDR1	Mutación de resistencia a multidroga 1
MMP	Metaloproteinasas de matriz

mTOR	Diana de rapamicina en células de mamífero
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NF- κ B	Factor nuclear kappa de células B activadas
NLRP3	Dominio de pirina de la familia NLR 3
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetasa
NOX	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa
Nrf2	Factor nuclear eritroide 2
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORAI 1-3	Modulador de calcio activado por liberación de calcio 1-3
P2Y	Receptor purinérgico (purinoceptor) P2Y
PAR-1	Receptor de la trombina proteasa-activada tipo 1
PCRE	Ecuación de riesgo de cohorte agrupada
pH	Potencial de hidrógeno
PPAR- γ	Receptor activado por proliferador peroxisomal gamma
PYLL	Años de vida potencialmente perdidos
RAAS	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
RIQ	Rango intercuartílico
RISK	Quinasa de salvamiento por injuria-reperfusión
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RR	Riesgo relativo
SAFE	Factor activador de supervivencia
SCA	Síndrome coronario agudo
SCACEST	Síndrome coronario agudo con elevación del segmento ST
SCASEST	Síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST
SCORE 2	Evaluación sistemática del riesgo coronario 2
SCORE 2-OP	Evaluación sistemática del riesgo coronario 2 para personas mayores
SERCA	Enzima sarco/retículo endoplásmico ATPasa-dependiente de calcio
SIRT-1	Sirtuína-1 deacetilasa dependiente de NAD
SMAD 2/3	Proteína pequeña derivada de MAD (madres contra la decapentaplejia) 2/3
SNS	Sistema nervioso simpático
SOD	Superóxido dismutasa
STIM-1	Molécula de interacción estromal-1
TA	Tensión arterial
TAD	Tensión arterial diastólica

TAS	Tensión arterial sistólica
TET2	Tet Metilcitosina Dioxigenasa 2
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
TLR-4	Receptor simil-Toll 4
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TXA2	Tromboxano A2
VCAM-1	Proteína 1 de adhesión celular vascular
VI	Ventrículo izquierdo
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
VLDL-R	Receptor de lipoproteína de muy baja densidad
VWF	Factor de Von Willebrand

Con la finalidad de facilitar la lectura de esta tesis doctoral, las abreviaciones de moléculas y compuestos que resultan usualmente conocidas en inglés se han mantenido en dicho idioma, con su correspondiente aclaración en español, para homogeneizarlas respecto a los trabajos originales publicados en inglés incluidos como parte de esta tesis. Por otro lado, las siglas de patologías así como la medición de variables y parámetros que normalmente son utilizadas en español han permanecido en ese idioma para preservar la armonía del texto.

2. ENUMERACIÓN DE ARTÍCULOS

Esta tesis doctoral ha sido desarrollada en formato de compendio de publicaciones. La tesis consta de dos objetivos y dos artículos publicados bajo revisión por pares.

- **Artículo 1:**

Vilahur G*, Sutelman P*, Ben-Aicha S, Mendieta G, Radiké M, Schoch L, Casaní L, Borrell-Pagés M, Padro T, Badimon L.

* both authors contributed equally

[Supplementation With Spirulina Reduces Infarct Size and Ameliorates Cardiac Function in a Pig Model of STEMI.](#)

Frontiers in Pharmacology. 2022 May 3; 13: 891801. DOI: 10.3389/fphar.2022.891801.

Categoría	Journal Citation Report	Factor Impacto
Farmacología	Q1	5.988

- **Artículo 2:**

Vilahur G, Sutelman P, Mendieta G, Ben-Aicha S, Borrell-Pages M, Peña E, Crespo J, Casaní L, Badimon L.

[Triglyceride-induced cardiac lipotoxicity is mitigated by Silybum marianum.](#)

Atherosclerosis. 2021 May; 324: 91-101. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2021.03.014.

Categoría	Journal Citation Report	Factor Impacto
Sistema cardíaco y cardiovascular	Q1	6.847

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Epidemiología de la enfermedad cardiovascular

El incremento sustancial de la población mundial observado durante el último siglo ha promovido a nivel epidemiológico un proceso de transición caracterizado por una significativa reducción en la mortalidad por enfermedades comunicables a expensas de un aumento en la incidencia de patologías no comunicables. Dentro de este último grupo, la enfermedad cardiovascular (CV) constituye actualmente la principal causa de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, representada fundamentalmente por la cardiopatía isquémica y el accidente vascular cerebral (AVC) (1, 2). A nivel europeo, da cuenta del 45% de la tasa de mortalidad total, y se estima que 113 millones de personas conviven con diversos grados de enfermedad cardiovascular (ECV) (2). La **Figura 1** ilustra la prevalencia global de cardiopatía isquémica especificada según regiones geográficas.

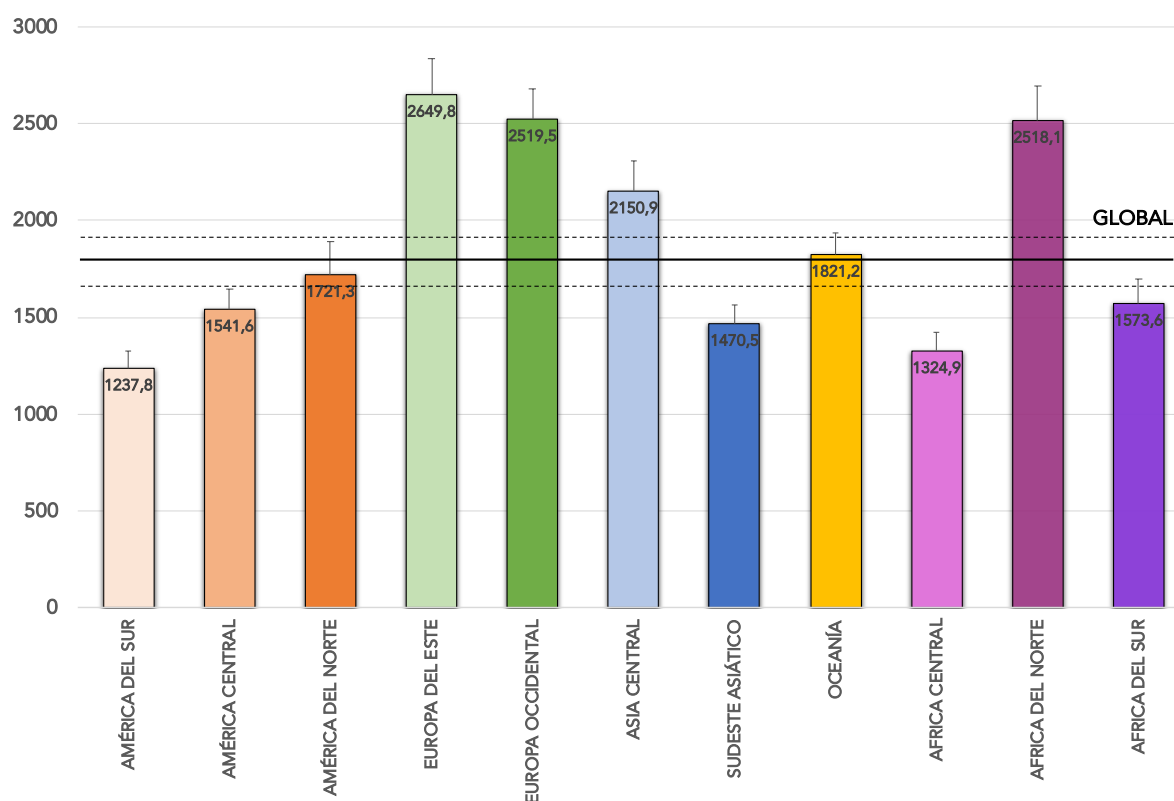


Figura 1. Prevalencia mundial de cardiopatía isquémica. Estandarizada por edad, cada 100.000 personas (Intervalo de confianza 95%). Adaptado de (3).

En este contexto, la enfermedad cardíaca de etiología isquémica representa la primera causa de muerte CV. El incremento significativo advertido en su prevalencia se debe, en gran medida, al aumento en la media de edad poblacional derivado de una mayor expectativa de vida (80,8 años en mujeres y 74,8 años en hombres en países desarrollados), y a su vez, al incremento en la aparición de patología crónica asociada, inherente al aumento etario, que contribuye asimismo a incrementar el riesgo CV total. (2, 4).

De esta manera, la ECV produce anualmente la muerte de 4 millones de personas en Europa, con una proporción ligeramente mayor en el sexo femenino (55% de mujeres), y superando ampliamente las tasas de mortalidad por cáncer y otras patologías crónicas (Figura 2) (2, 5).

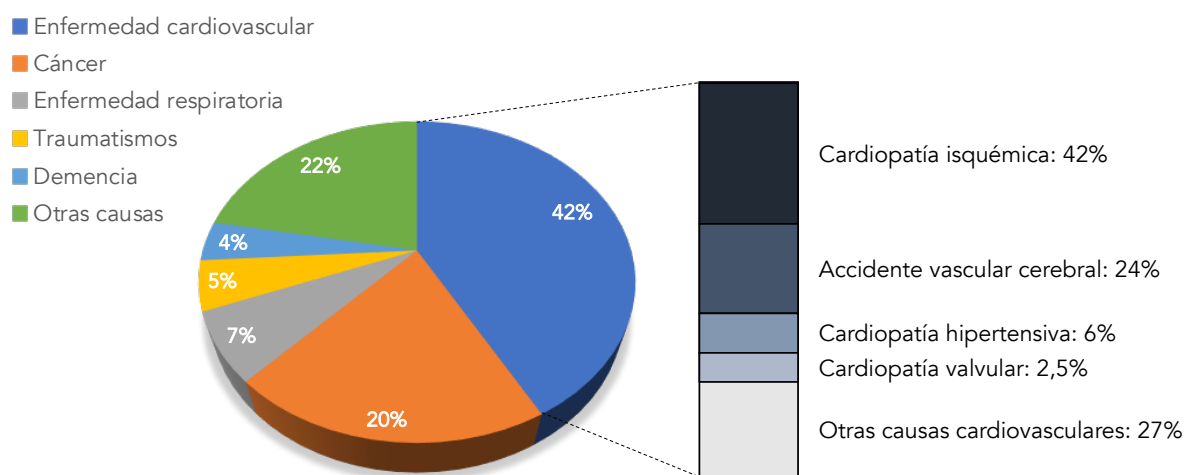


Figura 2. Causas de mortalidad global, estratificadas por patología cardiovascular. Modificado de (6).

Más aún, su impacto en la población joven resulta incluso más significativo, lo cual queda evidenciado a través de dos indicadores de relevancia: la muerte prematura de origen CV, que refleja una métrica de sobrevida potencial no cumplida, donde la ECV representa un 31% del total; y los años de vida potencialmente perdidos (PYLL por sus siglas en inglés Potential Years of Life Lost), una variable que estima los años de vida que habría vivido una persona de no haber tenido una muerte prematura (en base a la expectativa de vida calculada), alcanzando la patología CV los 37 millones de años perdidos en Europa (un 37,5% del total, comparado al cáncer que produce un 24,5%) (2).

No obstante, y contrariamente a estas cifras alarmantes, en las últimas décadas se ha advertido una reducción proporcional tanto en las tasas de mortalidad CV como en su prevalencia total ajustada por edad (7, 8), derivado principalmente por una mejoría en el pronóstico de los pacientes que padecen cardiopatía isquémica, así como una disminución en los casos de muerte súbita extra-hospitalaria (1, 9).

Igualmente, se observa una importante variabilidad en el manejo de la ECV entre distintas zonas geográficas, siendo un 30% mayor su impacto en personas provenientes de países de ingreso medio en comparación a aquellos de altos ingresos (10). Esto queda expresado en los años de vida ajustados por discapacidad (DALYs de Disability Adjusted Life Years), un parámetro que brinda información combinada de muerte prematura y discapacidad, y que resulta hasta 4 veces más alto en los países menos ricos (2).

El principal objetivo terapéutico en el abordaje de la ECV se centra en una adecuada implementación de los distintos niveles de prevención a nivel poblacional (11, 12), descrito en la **Figura 3**:

- Prevención primordial: Representa el punto focal de transición de la salud a la enfermedad, también conocida como promoción de la salud, y consiste en impedir la aparición de los factores de riesgo que predisponen al desarrollo de la patología.
- Prevención primaria: Basada en métodos de control de los factores de riesgo que buscan evitar el surgimiento de la enfermedad.
- Prevención secundaria: Dirigida a diagnosticar la enfermedad una vez instaurada, en un estadio lo más precoz posible para disminuir su impacto y consecuencias.
- Prevención terciaria: Cuya finalidad radica en limitar o reducir las complicaciones y secuelas derivadas de la enfermedad y de esta forma, conseguir una disminución en su morbi-mortalidad, mejorando así la calidad de vida de los pacientes que la padecen y optimizando su pronóstico (13).

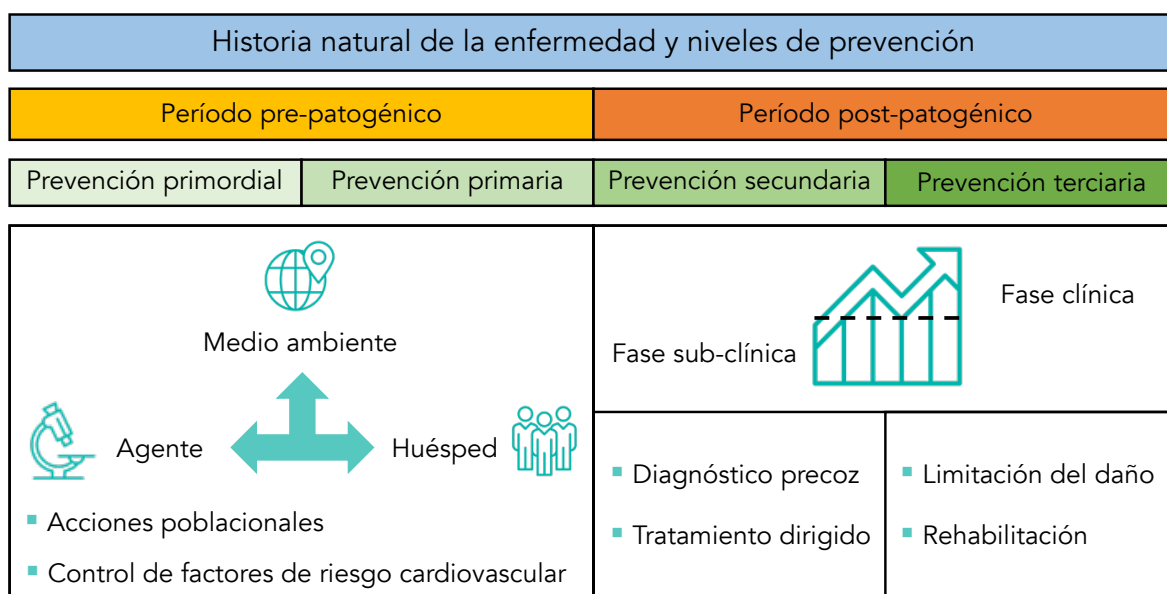


Figura 3. Niveles de prevención poblacional. En el período pre-patogénico, es importante identificar la tríada que da origen a la aparición de la enfermedad, caracterizada por la interacción entre el huésped, los agentes y el medio ambiente. Dentro del período patogénico, se destacan las fases sub-clínicas, previa al desarrollo de síntomas, y la fase clínica, con las distintas herramientas terapéuticas aplicables en cada caso particular.

La Sociedad Europea de Cardiología ha evaluado recientemente el grado y efectividad de los programas de prevención adoptados a nivel europeo a través del estudio EUROASPIRE V (14). Se investigaron 6.321 casos (entre entrevistas a pacientes y registro de historias clínicas), y se evidenció globalmente un regular control de los factores de riesgo CV, donde sólo el 47% de los pacientes alcanzaban las metas de tensión arterial, el 46% los objetivos de lípidos y el 65% los de hemoglobina glicada (HbA1c) (14), demostrando que el potencial de mejora en relación al manejo clínico de los factores de riesgo es sustancial (13).

3.1.1. Factores de riesgo cardiovascular

Los factores de riesgo representan hábitos específicos, comportamientos o condiciones que incrementan el riesgo de padecer enfermedad CV. Las guías de prevención clínica de la ECV se basan esencialmente en el establecimiento de dos objetivos: por un lado, la detección temprana de los distintos factores de riesgo, y por el otro, la estimación del riesgo CV global de un individuo, con la finalidad de desarrollar una serie de metas y prioridades terapéuticas individualizando el tratamiento según las características y preferencias de cada persona (4).

La estimación del riesgo cardiovascular se lleva a cabo empleando distintos subgrupos de edad en combinación con la presencia de factores de riesgo CV. Las escalas de riesgo más utilizadas en la actualidad corresponden a:

1. La escala de riesgo de Framingham, derivada del clásico estudio poblacional multigeneracional iniciado en 1948 en la ciudad homónima (15).
2. La evaluación sistemática del riesgo coronario (SCORE 2) y su adaptación para personas de edad mayor de 70 años de edad (SCORE 2-OP), diseñados por la Sociedad Europea de Cardiología (16, 17).
3. La ecuación de riesgo de cohorte agrupada (PCRE) elaborada por la Asociación Americana del Corazón (18).

Las recomendaciones de las escalas se encuentran clasificadas en bajo, moderado o alto riesgo estimado en un plazo de tiempo específico, y los factores de riesgo son ajustados a la edad para evitar el sub-tratamiento en pacientes jóvenes y la sobre-indicación en pacientes más ancianos. Un concepto importante a remarcar es que, si bien como se ha visto el riesgo CV aumenta en forma proporcional a la edad, el beneficio total obtenido por una intervención resultará considerablemente mayor en individuos más jóvenes debido a que poseerán un tiempo de tratamiento efectivo más prolongado.

Los factores de riesgo CV, a su vez, han sido clasificados en no modificables, es decir, aquellos que no son pasibles de ser alterados por ninguna intervención; y modificables, en los que la instauración de una terapéutica específica puede controlar o corregir el mismo (19):

- No modificables: Edad, genética, sexo.
- Modificables: Hipertensión arterial, diabetes mellitus, dislipemia, tabaquismo, dieta, sedentarismo, obesidad y factores psico-sociales.

El estudio de casos y controles INTERHEART realizado en 15.152 pacientes a través de 52 países demostró que un 92% de los casos de cardiopatía isquémica se asociaban directamente con alguno o varios de estos factores de riesgo (1, 20). A su vez, numerosos estudios también evidenciaron que la combinación de factores de riesgo conductuales como el tabaquismo, el sedentarismo, la dieta de pobre calidad y el consumo excesivo de

alcohol contribuyen al 60% de todas las muertes prematuras, reduciendo entre 7 a 18 años la expectativa de vida global de un individuo (21-23). Asimismo, un estudio de cohortes basado en dos investigaciones poblacionales a gran escala (The Nurses' Health Study que incluyó 73.196 individuos entre 1980 a 2014 y el Health Professionals Follow-Up Study con un total de 38.366 personas desde 1986 hasta 2014) advirtió que la adopción de un estilo de vida saludable resultaba en una expectativa de vida libre de diabetes, cáncer y ECV sustancialmente mayor (24). En la misma línea, el Malmö Diet and Cancer Study realizado en Suecia en 26.323 personas con un seguimiento a 18 años, evidenció que la adopción de conductas de vida beneficiosas (definidas por no fumar, peso balanceado, actividad física regular y dieta saludable) se asociaban a una disminución del 44% en el riesgo de desarrollar ECV (25).

Por su parte, el estudio Global Burden of Disease realizó una evaluación comparativa del riesgo CV a través de 195 países entre 1990 y 2017, y objetivó que el 61% de las muertes totales (intervalo de confianza - IC 95%, 59,6–62,4%) y el 48% de los DALYs (IC 95%, 46,3–50,2%) fueron debidas a factores de riesgo CV (26). Durante el período de tiempo estudiado, se observó también una reducción importante en la exposición a riesgos conductuales y ambientales, contrarrestado por un incremento en la aparición de factores de riesgo metabólicos (encabezado por un aumento del 50% en la obesidad y 25% en la DM) (7, 26). La **Figura 4** detalla la contribución particular de cada factor en el riesgo de padecer cardiopatía isquémica.

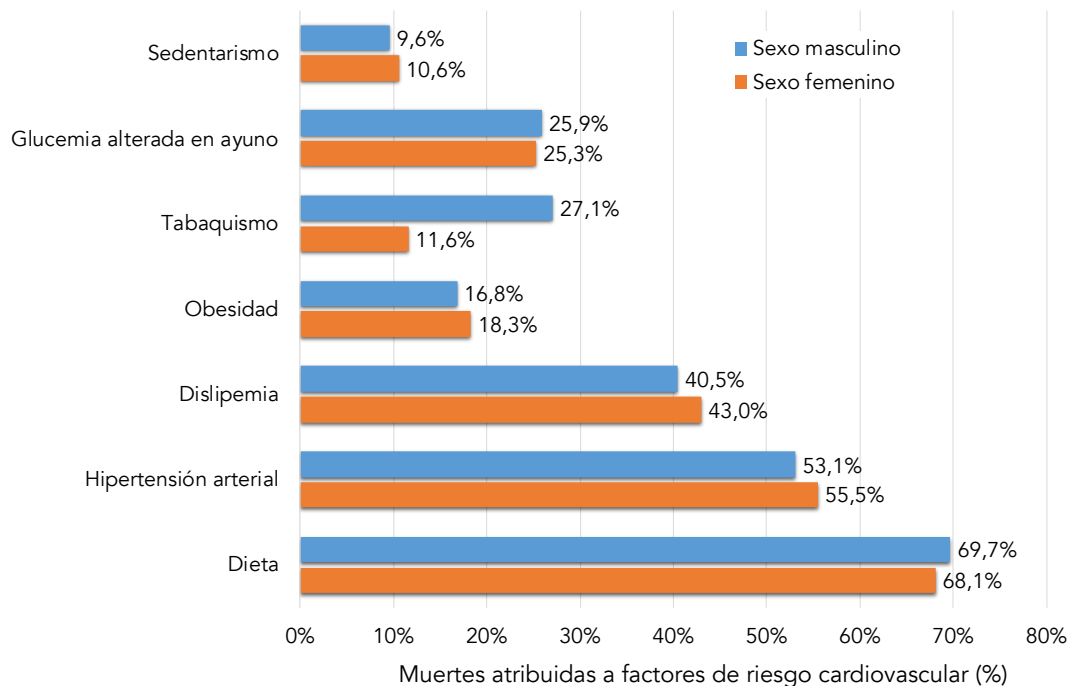


Figura 4. Contribución relativa de factores de riesgo cardiovascular en el desarrollo de cardiopatía isquémica, estratificada por sexo. Modificado de (27).

A continuación, se desarrollarán la epidemiología y características esenciales de los principales factores de riesgo CV establecidos.

3.1.1.1. Factores de riesgo cardiovascular no modificables

- **Edad**

En 2019, la población mayor de 65 años en la Unión Europea alcanzó el 17,2% del total (rango intercuartílico – RIQ, 12,1-20,0%), número que se ha visto duplicar en las últimas 5 décadas, con una expectativa de vida media actual de 77,5 años (RIQ 74,9–81,7 años) (2). El 80% de las muertes CV se producen en personas mayores de 65 años de edad, y la mortalidad de causa cardíaca representa la primera causa de muerte en este segmento poblacional (28). Esto podría explicarse, en parte, dado que la edad se asocia a la presencia de varios factores de riesgo combinados, así como también por trastornos a nivel de la fisiología vascular derivados del envejecimiento celular que predisponen directamente al desarrollo de ECV (28).

Otro concepto importante relacionado a la edad resulta el de fragilidad, que responde a un estado multi-dimensional caracterizado por una vulnerabilidad importante frente a factores externos (4). Si bien éste no resulta equivalente a la edad biológica, un número

sustancial de individuos con fragilidad corresponden a personas de edad avanzada. Existe una clara asociación demostrada entre el grado de fragilidad y la aparición de eventos CV mayores y mortalidad CV (29-31). Pero, a diferencia de la edad, constituye un indicador pasible de ser modificado mediante intervenciones en el estilo de vida.

▪ **Genética**

La herencia familiar en cardiopatía isquémica fue descrita por primera vez en 1939 (32), y desde entonces se han descubierto numerosos genes relacionados con la aparición de ECV (33). Existen en la actualidad diversas escalas de riesgo poligénicas que incluyen la identificación de distintas variables genéticas relacionadas con el desarrollo de ECV, y permiten mejorar la predicción del riesgo CV de un individuo (tanto en prevención primaria como secundaria) (34, 35). Los estudios que evaluaron el riesgo CV utilizando la aplicación de escalas poligénicas, demostraron que aquellos pacientes con alto riesgo genético poseían un incremento del 91% en el riesgo de padecer cardiopatía isquémica (36).

Sin embargo, es importante recalcar que la adopción de hábitos de vida saludable (como el ejercicio físico regular, control adecuado de factores de riesgo y una dieta saludable) produce una disminución del 46% en la aparición de eventos CV en forma independiente a la carga genética de un individuo (36), por lo que la incorporación de estas variables y su rendimiento dentro de las escalas continúa siendo discutido (37).

▪ **Sexo**

Las guías de manejo clínico de la ECV reconocen la importancia de integrar apropiadamente el sexo y género del individuo dentro de la toma de decisiones terapéuticas, de la misma forma que resulta fundamental asegurar una apropiada representación y diversidad de éstos en el diseño de estudios clínicos (38, 39). La Organización Mundial de la Salud (OMS) define al sexo de un individuo como las características biológicas y fisiológicas que lo componen, mientras que género representa la construcción y modelo social elaborado que define a la persona y sus relaciones con el medio (40). Así, este factor de riesgo presenta un comportamiento bimodal, donde por un lado el sexo constituye un parámetro fijo, mientras que el género es un factor que promueve la aparición de cambios funcionales a nivel epigenético pasibles de ser modificados (4).

Actualmente, como se ha mencionado, el sexo femenino registra una mayor prevalencia de ECV en Europa en comparación al sexo masculino (60 millones vs. 53 millones, respectivamente), así como una mayor incidencia de nuevos casos (2). Sin embargo, la

prevalencia media estandarizada por edad continúa siendo menor para mujeres que hombres (6.369 [RIQ 5.385–7.139] vs. 7.586 [RIQ 5.963–8.143] respectivamente) (2). El sexo femenino se caracteriza por presentar una edad media mayor en la aparición de ECV, con una tasa superior de factores de riesgo asociados y una mayor proporción de complicaciones derivadas tanto de la enfermedad como su tratamiento, todo lo cual redundará en una tasa de mortalidad superior (41).

3.1.1.2. Factores de riesgo cardiovascular modificables

- **Hipertensión arterial**

La HTA constituye un factor de riesgo primario, presentando una relación directa entre el aumento en los valores de tensión arterial (TA) y el desarrollo de ECV (42). La prevalencia de HTA en países europeos es del 25% (RIQ 19,9-28,5%), habiéndose observado una reducción de la misma del 30% en los últimos 40 años (2).

Un meta-análisis de 61 estudios prospectivos con más de 1 millón de individuos incluidos demostró que la HTA incrementa significativamente el riesgo de sufrir todos los espectros de la enfermedad aterosclerótica (42), siendo responsable de 9,4 millones de muertes a nivel global y un 7% de DALYs (43).

Sin embargo, aún hoy la definición actual de HTA resulta controvertida. La Asociación Americana del Corazón define la HTA como una TA sistólica (TAS)>130 mmHg y una TA diastólica (TAD)> 80 mmHg, mientras que la Sociedad Europea de Cardiología lo hace con valores de TAS>140 mmHg y TAD> 90 mmHg (4, 44). Esta diferencia radica principalmente en los hallazgos del estudio SPRINT (45), donde un objetivo de TAS<120mmHg se asoció a una disminución significativa en los eventos CV en comparación a TAS<140 mmHg, aunque la presencia de confundidores tales como una incidencia menor de pacientes de alto riesgo y el hecho que el tratamiento intensivo de la TA produjo una mayor tasa de efectos adversos, limitó sensiblemente los hallazgos obtenidos (46). Independientemente de la meta de TA elegida, se ha calculado que la erradicación de la HTA podría conseguir una disminución en la mortalidad CV total de un 34% (47).

- **Diabetes mellitus**

La DM es una patología caracterizada por una desregulación en la homeostasis de la glucemia, clasificándose en distintos subtipos de acuerdo con el mecanismo fisiopatológico que le da origen (tipo I por supresión de islotes pancreáticos de Langerhans funcionales -5 a 10% del total-; tipo II secundaria a una resistencia a la acción sistémica de

la insulina -90 a 95% del total). Constituye un factor de riesgo mayor independiente para el desarrollo de enfermedad vascular aterosclerótica.

La prevalencia de diabetes se encuentra en franco ascenso a nivel global evidenciada a través de un aumento del 189% en los últimos 30 años (a expensas de la DM tipo 2) principalmente derivada de una epidemia mundial de obesidad, sedentarismo y malnutrición (48, 49). Se estima que 422 millones de personas en todo el mundo conviven con esta enfermedad (60 millones a nivel europeo), y proyectándose un incremento hasta 693 millones antes de mitad del siglo XXI (50).

En un meta-análisis de aproximadamente 1 millón de individuos, la DM presentó una asociación directa con mortalidad por cualquier causa tanto en hombres (riesgo relativo - RR 1,59 [IC 95%, 1,54-1,65]) como mujeres (RR 2,00 [IC 95%, 1,90-2,11]) (51), así como con la aparición de cardiopatía isquémica, AVC y mortalidad de causa CV (52). Adicionalmente, las posibilidades de padecer enfermedad microvascular (especialmente neuropatía, nefropatía y retinopatía) son significativamente mayores, impactando en la calidad de vida de los pacientes que la padecen, y representando la sexta causa mundial de discapacidad (53).

▪ Dislipemia

La dislipemia, particularmente la elevada carga de moléculas lipídicas pro-aterogénicas que contienen apoB, tales como el colesterol total (CT) y el colesterol transportado por lipoproteínas de baja densidad (C-LDL de low-density lipoprotein), han demostrado poseer una fuerte asociación con la aparición de eventos CV. La prevalencia de hipercolesterolemia en la población general excede el 50% en países de ingresos altos (2), con valores promedio de CT en la Unión Europea de 188,3 mg/dl (RIQ 179,0-192,1 mg/dl), y una tendencia actual en descenso (11% en las últimas décadas). A pesar de ello, se estima que la dislipemia es responsable directa de 4,4 millones de muertes en todo el mundo (54). La prevalencia de enfermedad aterosclerótica se incrementa linealmente con el aumento proporcional en los valores de C-LDL (55), en donde la exposición prolongada aún a valores modestos de colesterol (C-LDL >100 mg/dl) se relacionan con un aumento del 64% en el riesgo de padecer ECV (56).

Por su parte, su tratamiento reduce significativamente el desarrollo de estos eventos, donde por cada 1 mmol/L (39 mg/dL) de disminución del C-LDL se reduce un 12% la mortalidad total y un 23% el riesgo de cardiopatía isquémica (57). El estudio HOPE-3 demostró que el tratamiento de la dislipemia en pacientes sin ECV establecida redujo en forma significativa un 24% la aparición del punto final primario compuesto de mortalidad CV, infarto agudo de miocardio (IAM) no fatal y AVC (IC 95%, 0,64-0,91) (58).

▪ **Tabaquismo**

El tabaquismo, por sí sólo, es responsable de un 50% de la mortalidad total en fumadores, siendo la mitad de éstas de causa CV (4). Se calcula que el tabaquismo reduce en hasta 10 años la expectativa de vida de un fumador (59), incrementa en 5 veces el riesgo de padecer cardiopatía isquémica (60) y duplica el riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca (IC) (61). Luego de la HTA, el tabaquismo es el segundo factor principal causante de mortalidad y productor de DALYs, siendo responsable de 8,7 millones de muertes anuales globalmente (26).

La cesación tabáquica ha demostrado reducir la tasa de eventos CV en un 39% a 5 años, aunque se estima que deberían pasar hasta 25 años para que el riesgo se equipare al de una persona no fumadora (62). Las estrategias de salud pública destinadas a reducir el tabaquismo activo han evidenciado disminuir la tasa de fumadores en la Unión Europea en los últimos 15 años (63), estimándose su prevalencia actual en un 22,1% (RIQ 17,0-26,5%) (2).

▪ **Dieta**

De acuerdo al estudio Global Burden of Disease, un 52% de todas las muertes de origen CV serían atribuibles a condiciones directamente relacionadas con una dieta no saludable (26). A nivel europeo, esta cifra se encuentra aproximadamente en 2,1 millones de personas (un 49,2% de las muertes CV y un 22,4% de las muertes totales) (7, 26), calculándose que una mejora en la calidad de patrones alimentarios evitaría 1 de cada 5 muertes actuales (64).

En cuanto a la composición de la dieta, un meta-análisis de más de 200.000 personas evidenció una asociación directa entre el consumo de grasas trans y mortalidad total (65), mientras que su reemplazo por grasas poliinsaturadas reduciría el riesgo de desarrollar ECV en un 13% (66). Por otra parte, el consumo excesivo de azúcar ha sido relacionado con el desarrollo de obesidad y DM tipo 2, mientras que el exceso de sodio incrementa el riesgo de HTA, ambos impactando directamente sobre el pronóstico CV (67, 68). Asimismo, el empleo de patrones dietarios con propiedades beneficiosas ha generado una mejora considerable en el riesgo CV de las personas. La dieta mediterránea consiste en un plan de alimentación saludable basado en el consumo de vegetales (frutas y verduras) asociado a alimentos con alto contenido de fibra, siendo el aceite de oliva virgen extra la principal fuente de grasas insaturadas. El empleo de este tipo de dieta ha evidenciado disminuir un 19% el riesgo de muerte CV, un 30% el riesgo de IAM y un 27% el riesgo de AVC (69). Por

otro lado, la dieta DASH (Dietary Approaches to Stop Hypertension, es decir, enfoques dietarios para detener la HTA) corresponde a una propuesta alimentaria basada en alimentos reducidos en sodio. En un meta-análisis de 33 estudios controlados, se asoció a una reducción significativa tanto de la TAS como TAD, aunque también demostró impacto sobre el CT, HbA1c y peso corporal (70).

▪ Sedentarismo

La actividad física regular promueve una disminución del riesgo de padecer ECV a través de varios mecanismos: reducción en la TA y peso corporal, regulación de los niveles glucemia al mejorar la sensibilidad a la insulina, y modulación del metabolismo lipídico virando hacia un perfil menos aterogénico (71). La actividad física suficiente desde el punto de vista cardioprotector ha sido definida como la realización de 150 minutos de ejercicio de moderada intensidad o 75 minutos de ejercicio de alta intensidad por semana (72), aunque igualmente tiempos menores de practica aeróbica han demostrado tener efectos beneficiosos (73).

El sedentarismo, por el contrario, incrementa el riesgo de sufrir diabetes, dislipemia y aumenta el riesgo de aparición de insuficiencia cardíaca y enfermedad aterosclerótica (74), siendo responsable de hasta el 30% de los casos de ECV y un 10% de la mortalidad global (2, 75). Se estima actualmente que un 30% de la población mundial adulta es inactiva (76), más pronunciado en mujeres que hombres (1), y la adopción de actividad física periódica ha evidenciado en un meta-análisis disminuir en promedio un 20% el riesgo de desarrollar cardiopatía isquémica y AVC (77).

▪ Obesidad

En las últimas décadas, se ha constatado un aumento progresivo en la media del índice de masa corporal (IMC) de la población a nivel mundial (78), en donde un 20% presenta algún grado de obesidad, y habiéndose duplicado dicha tasa en los últimos 35 años (2).

Varios meta-análisis incluyendo más de 30 millones de individuos han demostrado una relación lineal ente el aumento del IMC y mortalidad total, así como con la aparición de DM tipo 2 y ECV (79-81). Asimismo, se ha encontrado una asociación directa entre obesidad y la aparición de muerte súbita arrítmica y el desarrollo de fibrilación auricular (FA) (82, 83).

No obstante, existe una contradicción originada en el análisis de revisiones sistemáticas previas denominada la “paradoja de la obesidad”, en donde niveles determinados de obesidad han sido encontrados protectores frente a la ECV, aunque probablemente dichas

conclusiones se deban a variabilidad y sesgos presentes en dichos estudios, no habiendo podido ser corroborada fehacientemente (84, 85). A pesar de todo, las estrategias destinadas al tratamiento de la obesidad son limitadas, y consisten principalmente en fármacos miméticos de la incretina que promueve reducciones del peso corporal, y la cirugía bariátrica, que ha demostrado reducir eventos CV mayores (86, 87).

- **Factores psico-sociales**

Los factores psico-sociales dan cuenta de un conjunto de trastornos relacionados con el estrés psíquico, el comportamiento y las relaciones en sociedad (4). Los factores psíquicos incluyen la depresión, la sensación de soledad y otros trastornos mentales, que se ha visto incrementan el riesgo de padecer patología CV (88), y predisponen a presentar una mayor tasa de factores de riesgo conductuales (mala alimentación, sedentarismo, tabaquismo), así como una mala adherencia al tratamiento, incrementando de por sí el riesgo global (89). De la misma manera, indicadores positivos de salud mental (como resiliencia y optimismo) han demostrado comportarse como factores protectores frente a la ECV (90). Por su parte, un nivel socioeconómico bajo y el estrés laboral han sido directamente asociados con la aparición temprana de eventos vasculares y mortalidad (91), en forma independiente al resto de los factores de riesgo clásicos (92).

3.2. Fisiopatología de la cardiopatía isquémica

La cardiopatía isquémica representa el proceso evolutivo final producto de la influencia de los factores de riesgo CV en el desarrollo de enfermedad aterosclerótica a nivel cardíaco. Se manifiesta a través de la progresión de placas de aterosclerosis en pared vascular de las arterias coronarias, que en condiciones fisiológicas son responsables del aporte sanguíneo al músculo cardíaco, y en este contexto, se compromete el flujo coronario en forma creciente según el avance de la enfermedad. De esta forma, se generan cuadros de hipoxia celular que en situaciones más avanzadas pueden llegar hasta la necrosis y apoptosis de cardiomiocitos durante el curso de un IAM. Por lo tanto, la aterosclerosis será el mecanismo central que marcará el curso y pronóstico de esta enfermedad.

3.2.1. Aterosclerosis

3.2.1.1. Mecanismos de disfunción endotelial y respuesta inflamatoria local

La aterosclerosis es un proceso inflamatorio sistémico, crónico y progresivo, que constituye el mecanismo fisiopatológico central de la enfermedad CV isquémica (93). La patología aterosclerótica consiste en un proceso continuo desde la aparición de las primeras placas de aterosclerosis a nivel arterial en forma subclínica, hasta el desarrollo de isquemia secundaria a obstrucción vascular, que se inicia en etapas tempranas en la vida de un individuo y se manifiesta tardíamente en forma de eventos CV mayores (93). Por lo tanto, su diagnóstico precoz constituye un pilar fundamental en la prevención y tratamiento de la ECV (94).

La aterosclerosis se caracteriza por una acumulación gradual y sostenida de partículas lipídicas en la pared arterial vascular, que promueven la inducción de una respuesta pro-inflamatoria asociada (95). El depósito de ésteres de colesterol en las arterias fue descubierto por Nikolai Anichkov a comienzos del siglo XX, y ha sido reconocido desde entonces como un mecanismo esencial para el desarrollo de dicho proceso (96). En forma análoga, Rudolph Virchow propuso en el siglo pasado la participación directa de la respuesta inflamatoria sistémica en el establecimiento de las lesiones ateroscleróticas. (97). Ambos factores confluyen y promueven un proceso inicial determinado principalmente por la aparición de disfunción endotelial.

El endotelio representa la capa celular interna de la pared vascular, pero excede ampliamente su función de barrera estableciéndose como un verdadero órgano endocrino (98). Las células endoteliales cumplen múltiples funciones básicas para el mantenimiento de la homeostasis, regulando el flujo sanguíneo selectivo, controlando el equilibrio entre vasoconstricción y vasodilatación, interactuando directamente con el sistema inmune y de coagulación modulando así su actividad, y permitiendo la internalización de macromoléculas, hormonas y factores específicos para su procesamiento a nivel de las distintas estirpes celulares (98).

Sin embargo, la exposición vascular continua a los factores de riesgo CV mencionados previamente induce progresivamente un daño a nivel del endotelio que conlleva a una alteración en la función endotelial e incrementa la permeabilidad de esta capa, favoreciendo la incorporación de partículas de C-LDL al espacio subendotelial (99). Una vez en el espacio intimal, estas partículas sufren un proceso de modificación química y estructural convirtiéndose en moléculas oxidadas (LDLox), agregadas (LDLag) o acetiladas (LDLac) (97, 100). Estas LDL modificadas estimulan el desarrollo de una respuesta inflamatoria mayor a ese nivel que promueve la progresión de la lesión aterosclerótica.

La respuesta pro-inflamatoria se caracteriza por el reclutamiento de distintos tipos celulares (principalmente monocitos y linfocitos) al lugar de la lesión (101). Inicialmente, los monocitos reclutados transmigran hacia el espacio subendotelial donde se diferencian a macrófagos, células encargadas de captar las moléculas de LDLox y LDLac en forma de

ésteres lipídicos, otorgándoles la característica apariencia histológica de células espumosas (97). Estos macrófagos saturados de partículas lipídicas potencian a su vez una respuesta inflamatoria tardía más sostenida que permite la activación de células endoteliales. Estas células endoteliales activadas estimulan la vía de señalización mediada por el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B (NF- κ B), que promueve la liberación de mediadores químicos específicos como endotelina, E-selectina, la proteína 1 de adhesión celular vascular (VCAM-1) y la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), produciendo la adhesión de una mayor cantidad de células inflamatorias al endotelio activado (102).

Por otro lado, la posterior formación de cristales de colesterol por las moléculas de LDLag desencadena en paralelo la activación del sistema inmune innato a través del receptor de clúster de diferenciación 36 (CD-36), e induce la activación del complejo inflamasoma dominio de pirina de la familia NLR 3 (NLRP3), encargado de clivar los precursores de las interleuquinas 1 β y 18 (IL-1 β e IL-18) hacia sus configuraciones activas (103, 104). Todo ello desencadena una respuesta inmune específica mediada por linfocitos T, liberando enzimas que degradan la matriz extracelular e incrementando la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés, de "reactive oxygen species") (105).

Se estima que hasta un 25% de los leucocitos presentes en las lesiones ateroscleróticas corresponden a linfocitos T CD3+, mientras que los linfocitos T CD3+CD4+ corresponden a un 10% del total. Estos se encuentran predominantemente a nivel de la capa fibrosa de la placa, y su reclutamiento ocurre a través de los receptores de quimioquinas 5 y 6 (CCR 5 y 6), cumpliendo una función regulatoria de la respuesta inflamatoria local (106). Este proceso genera una mayor liberación de factores pro-inflamatorios y de adhesión leucocitaria que incrementan la infiltración inmunitaria subintimal.

Por otro lado, las células musculares lisas inherentes a la capa media vascular son expuestas a dichos factores inflamatorios, citoquinas y productos de oxidación lipídica estimulando una modificación de su fenotipo contráctil hacia un modo proliferativo, mediado por la vía del factor 4 simil-Kruppel (KLF4), con el objetivo de migrar hacia la capa íntima vascular y colaborar en la fagocitosis de los depósitos de colesterol en su interior, adoptando así un estado similar a los macrófagos, al punto de expresar marcadores macrofágicos en su superficie (107). De hecho, se considera que hasta el 50% de las células inflamatorias en las lesiones ateroscleróticas corresponderían a este estado modificado de células musculares lisas (108).

La acumulación continua de ésteres de colesterol internalizados en células macrofágicas y musculares genera una toxicidad celular progresiva, que termina por desencadenar una respuesta de estrés mediada por el retículo endoplásmico provocando la liberación intracelular de calcio e induciendo la activación de caspasas que inician el programa de

apoptosis celular y necroptosis (109). La apoptosis sucede principalmente en etapas iniciales de la enfermedad y promueve así la apropiada eliminación de los restos celulares dentro de las lesiones ateroscleróticas para limitar así su crecimiento. La necroptosis, por el contrario, ocurre en etapas más avanzadas y suscita primordialmente un incremento en la respuesta inflamatoria, que termina por perpetuar el avance de este proceso (110).

Por otro lado, las lipoproteínas oxidadas estimulan un mecanismo denominado hematopoyesis clonal de potencial indeterminado en la médula ósea, que consisten en cambios somáticos epigenéticos aleatorios en las células madre hematopoyéticas durante el transcurso de la vida del individuo, y ha sido relacionado a una respuesta pro-inflamatoria acelerada (111, 112). Se cree que estas alteraciones ocurren en todos los tipos celulares, pero al ser las células madre hematopoyéticas una estirpe expuesta a una tasa superior de división celular, sus modificaciones se producirían en forma más frecuente. Se ha visto que estos cambios epigenéticos no conllevan de por sí un riesgo aumentado de desarrollar tumores, pero si han demostrado su asociación con un incremento en la mortalidad total cercana al 20%, a expensas predominantemente de la aparición de ECV aterosclerótica (113, 114). Una de las mutaciones identificadas en este proceso corresponde al gen de la enzima Tet Metilcitosina Dioxigenasa 2 (TET2), que induce la expresión del complejo inflamasoma NLRP3 y la subsecuente respuesta inflamatoria que contribuye a la progresión del proceso aterosclerótico (115).

3.2.1.2. Placa aterosclerótica vulnerable y proceso de aterotrombosis

Durante el crecimiento de la placa aterosclerótica, los procesos inflamatorios y de oxidación estimulan la acción de metaloproteinasas y fosfolipasas que producen la degradación del colágeno y matriz extracelular (116). De esta forma, se reduce paulatinamente el grosor de la capa fibrosa que recubre la lesión, volviendo así la placa vulnerable a ruptura o erosión (117, 118).

La **Figura 5** esquematiza los procesos intervinientes en la formación y crecimiento de la placa de aterosclerosis a nivel vascular.

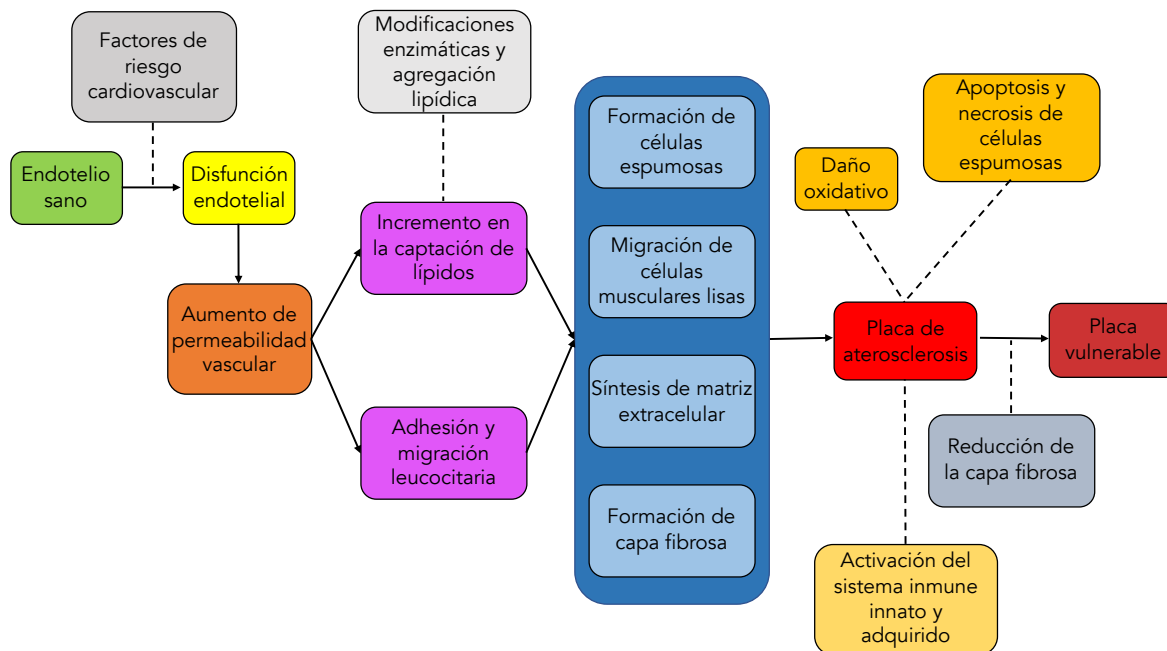


Figura 5. Esquema de progresión de la enfermedad aterosclerótica.

Una vez que se produce la pérdida de solución de continuidad de la placa de aterosclerosis, se genera la exposición de estructuras vasculares o componentes de núcleo necrótico a la circulación sanguínea desencadenando la activación del factor tisular y la propia cascada de la coagulación, dando lugar al inicio de la respuesta hemostática con la posterior formación de una monocapa de fibrina, para estimular el reclutamiento de plaquetas circulantes y células inflamatorias al lugar de lesión.

En el proceso hemostático, la interacción del factor de von Willebrand (VWF) a través de su dominio A3 con el colágeno vascular expuesto constituye el paso inicial en la respuesta de adhesión plaquetar, proporcionando así un punto de anclaje para las plaquetas a través de la interacción del receptor plaquetar glicoproteína (GP) Ib-IX-V con el dominio A1 del VWF. Este primer contacto plaquetar-vascular se ve reforzado por la interacción directa del colágeno con los receptores plaquetares GPIa y la GPVI (119, 120).

Una vez activadas, las plaquetas liberan difosfato de adenosina (ADP) y tromboxano A2 (TXA2), entre otros agonistas (121). El ADP puede unirse a dos receptores acoplados a proteínas G presentes en la superficie de la plaqueta, el receptor purinérgico P2Y1 y P2Y12 (119). Por un lado, la unión del ADP con el receptor P2Y1 deriva en un incremento en la concentración de calcio intracelular, así como en un cambio conformacional de las plaquetas, lo cual conlleva a una respuesta débil y transitoria de agregación plaquetaria. Por el contrario, la interacción del ADP con el receptor plaquetar P2Y12, además de perpetuar el aumento de calcio, disminuye los niveles de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP), con la consecuente agregación plaquetaria irreversible (120).

En cuanto al TXA₂, éste se produce por la activación de la enzima fosfolipasa A₂ y la resultante liberación de ácido araquidónico de la membrana de la plaqueta. El ácido araquidónico liberado interacciona con la enzima ciclooxigenasa-1 (Cox-1) dando lugar a la formación de TXA₂ quien, a su vez, perpetúa el incremento en los niveles intracelulares de calcio.

Finalmente, la trombina, sintetizada en el plasma tras la activación de la cascada de coagulación, interacciona con el receptor de la trombina proteasa-activada tipo 1 (PAR-1) en la superficie de la plaqueta produciendo un aumento adicional en los niveles de calcio y activación de la fosfolipasa C (120). Todo ello deriva en el cambio conformacional y la consiguiente activación del receptor plaquetar GPIIb/IIIa, que constituye el receptor plaquetar más abundante.

La unión del fibrinógeno circulante con el receptor GPIIb/IIIa da lugar a la formación de puentes entre las plaquetas activadas induciendo la formación de agregados plaquetares estables que actúan en conjunto con los factores de coagulación activados en la formación del complejo trombótico, terminando en una oclusión de la luz arterial y desencadena los fenómenos de isquemia celular e infarto tisular (120).

La **Figura 6** ilustra el proceso completo de la enfermedad aterosclerótica, desde sus inicios con la activación y disfunción endotelial, el ingreso de lipoproteínas a la pared arterial; seguido de la inducción de la respuesta inflamatoria, la remodelación vascular y la migración de células musculares lisas modificadas; con la subsiguiente formación de la capa fibrosa y su evolución hasta la desestabilización y exposición de factores con activación de la respuesta aterotrombótica.

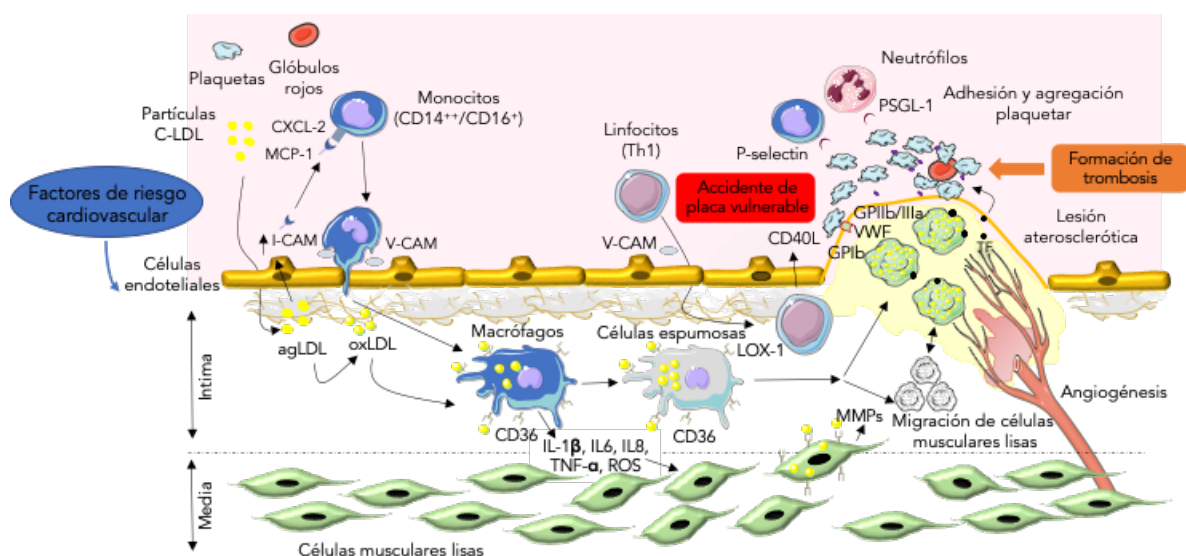


Figura 6. Fisiopatología de la enfermedad aterosclerótica. C-LDL: Colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad; CD: Clúster de diferenciación; CE: células endoteliales; CTK: citoquinas y

quimioquinas; CXCL-2: Ligando 2 de quimioquina; GP: Glicoproteína; I-CAM: Molécula de adhesión intercelular 1; IL: Interleuquina; NO: óxido nítrico; LDL: lipoproteínas de baja densidad; oxLDL: LDL oxidada; agLDL: LDL agregada; LOX-1: receptor de LDL oxidada tipo lectina 1; MCP-1: proteína quimotáctica de monocitos 1; MMP: metaloproteinasas; PSGL-1: ligando de selectina P 1; V-CAM: Molécula de adhesión vascular 1; VWF: Factor de Von Willebrand. Modificado de (121).

3.2.2. Cardiopatía isquémica e infarto agudo de miocardio

3.2.2.1. Diagnóstico y clasificación

La cardiopatía isquémica constituye la patología clínica final producto del desarrollo íntegro de la enfermedad aterosclerótica y la activación de los fenómenos aterotrombóticos a nivel cardíaco. Estos procesos se generan de forma súbita provocando la sub-oclusión u obstrucción completa de la circulación coronaria en forma aguda, dando lugar así a la isquemia celular y el daño miocárdico subsecuente. De esta forma, esta entidad da origen a los síndromes coronarios, que, basados en sus patrones electrocardiográficos podrán clasificarse en dos fenotipos particulares con bases fisiopatológicas propias y pronósticos diferenciales (**Figura 7**):

- Síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST (SCASEST): responde al desarrollo de isquemia miocárdica intermitente por obstrucción coronaria parcial (angina inestable), pudiendo progresar en grados más avanzados hacia la injuria y necrosis de cardiomiocitos (IAMSEST).
- Síndrome coronario agudo con elevación del segmento ST (SCACEST): se caracteriza por una obstrucción aguda total que da lugar al IAM con elevación del segmento ST (IAMCEST), generalmente asociado a un monto isquémico miocárdico sustancialmente mayor, cuya afectación y pronóstico dependerá esencialmente del territorio vascular comprometido y del tiempo de isquemia transcurrido (122).

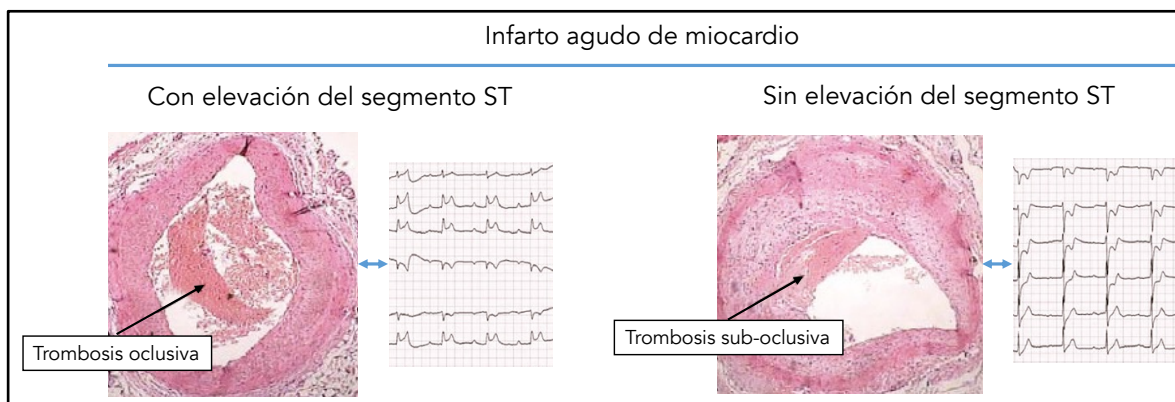


Figura 7. Clasificación del infarto agudo de miocardio con su correlación histológica y electrocardiográfica (123, 124).

El IAM se caracteriza por la presencia de daño miocárdico, definido por la elevación de biomarcadores de injuria cardíaca (principalmente troponina de alta sensibilidad) por encima del percentilo 99 del valor de referencia, asociado a evidencia de isquemia miocárdica demostrable a través de la aparición de síntomas, hallazgos en estudios de imágenes (invasivos y no invasivos) o en la evaluación histopatológica (125).

Según el sustrato fisiopatológico, el IAM puede clasificarse en distintos subgrupos (125):

- Tipo I: desencadenado por la desestabilización de la placa aterosclerótica vulnerable con su consiguiente erosión/ruptura y establecimiento del proceso aterotrombótico coronario.
- Tipo II: existencia de un desequilibrio entre el aporte y la demanda miocárdica de oxígeno y nutrientes, secundario a la aparición de distintos fenómenos (i.e., anemia, hemorragia, taquiarritmia) con la presencia o no de enfermedad aterosclerótica no complicada.
- Tipo III: se caracteriza por la muerte súbita de origen cardíaco como primera manifestación del síndrome coronario, previo a la posibilidad de poder obtener muestras de enzimas cardíacas para su análisis, con la presunción de sintomatología de etiología coronaria, cambios electrocardiográficos, fibrilación ventricular o demostración del IAM por autopsia.
- Tipo IV: secundario a procedimiento de intervencionismo percutáneo, producido dentro de las 48 horas del evento. Éstos pueden ser: 4a, relacionado a angioplastia

coronaria; 4b, por la aparición de trombosis intra-stent; 4c, por reestenosis intra-stent.

- Tipo V: originado como complicación de una intervención quirúrgica de revascularización coronaria mediante la técnica de by-pass aorto-coronario.

Es de destacar también que el IAM puede ocurrir en ausencia de demostración de trombosis o lesiones coronarias, entidad que ha sido denominada infarto de miocardio sin lesiones coronarias obstructivas (125).

La cardiopatía isquémica en sí constituye un síndrome clínico de compleja base fisiopatológica (126). Las arterias coronarias son las encargadas de aportar el flujo sanguíneo directamente hacia el tejido cardíaco. Las secciones proximales de las mismas se denominan vasos epicárdicos y corresponden al recorrido arterial desde su origen en los senos de Valsalva de la aorta hasta su inserción dentro del músculo cardíaco para continuar su trayecto intra-miocárdico. Se caracterizan por ser arterias de diámetro entre 250 μm a 5 mm, de baja resistencia, que regulan el flujo vascular a través de mecanismos de vasoconstricción y vasodilatación (127). A este nivel, cuando la progresión de una placa de aterosclerosis disminuye el área transluminal en más de un 70% (con una reducción del 50% en el diámetro coronario), se produce un aumento sustancial en las resistencias proximales al sitio de la lesión, lo cual redundará en una disminución de la presión de perfusión coronaria (128). Esto se traduce en la aparición de isquemia miocárdica, inicialmente ante el aumento en las necesidades metabólicas del tejido cardíaco afectado (lo cual sucede habitualmente durante el ejercicio o esfuerzo físico), para luego al progresar el grado de obstrucción coronaria inducir una afectación gradual en estado basal de reposo.

3.2.2.2. Tratamiento de reperfusión y revascularización coronaria

Las estrategias de reperfusión tienen como objetivo alcanzar una restauración del flujo sanguíneo coronario en forma temprana y completa (a nivel epicárdico y microvascular) para reducir así el tamaño final del infarto, que refleja el grado de compromiso y monto de tejido dañado durante el IAM, constituyendo uno de los principales parámetros pronósticos independientes en esta enfermedad.

Debido a las mejoras en el tratamiento farmacológico así como un aumento considerable en el empleo de estrategias de reperfusión (la angiografía temprana se ha incrementado en los últimos años del 9% al 60% y la intervención coronaria percutánea -ICP- del 12,5%

al 67%), la consecuencia fundamental ha sido una reducción considerable de la mortalidad CV en el IAM a 6 meses del 17,2% al 6,3% (129).

Las terapias de reperfusión se encuentran indicadas para el tratamiento primario del IAMCEST, en donde la circulación coronaria se detiene por completo y el daño isquémico resulta significativamente mayor de no restaurarse el flujo normal. La primera terapia de reperfusión desarrollada consistió en la administración de agentes fibrinolíticos (130), cuyos principales fármacos son la estreptoquinasa, tenecteplasa, alteplasa y reteplasa. Su acción consiste en convertir el plasminógeno en plasmina, que actúa a nivel de la fibrina produciendo una disolución del trombo intracoronario y de esta forma favorecen la reperfusión de los tejidos afectados (131). Numerosos ensayos clínicos randomizados y controlados han demostrado el beneficio de esta terapia en el IAMCEST, alcanzando una reducción significativa de la morbi-mortalidad en estos pacientes y permitiendo salvar 30 vidas de cada 1000 pacientes tratados durante las primeras 6 horas del inicio de los síntomas (132, 133).

No obstante, esta terapia ha sido gradualmente reemplazada por el ICP, dada su superioridad en reducción de eventos (re-infarto y AVC) y mortalidad (134-136), siendo ésta la técnica recomendada en guías internacionales tanto para el IAM con o sin elevación del segmento ST (122, 133, 137, 138). El mecanismo se basa en la introducción periférica de forma percutánea de catéteres dirigidos hacia el sitio de oclusión coronaria a través del árbol vascular arterial, para interrumpir la obstrucción trombótica y conseguir la reperfusión del flujo sanguíneo, realizándose posteriormente una angioplastia mediante el implante de mallas metálicas (stents) recubiertos de sustancias farmacoactivas, con el fin de asegurar el mantenimiento de la apertura coronaria y evitar una re-oclusión posterior.

Sin embargo, dado que la isquemia celular consiste en un proceso tiempo-dependiente, en sitios donde no existe disponibilidad precoz de empleo de técnicas de reperfusión percutáneas la terapia fibrinolítica continúa siendo una opción válida dentro de este escenario clínico (139), y en países de bajos o medianos ingresos, representan hasta el 75% de las estrategias de reperfusión empleadas dada la demora en los tiempos de acceso a la atención médica especializada (140). Aún en países de altos ingresos, un 50% de los casos no cumplen los tiempos recomendados por guías para conseguir una reperfusión a través de ICP, por lo que estos agentes continúan aún vigentes en el tratamiento de la cardiopatía isquémica (141, 142). Se recomienda iniciar la terapia fibrinolítica dentro de los 10 minutos desde el diagnóstico inicial del IAMCEST, tanto en ámbito hospitalario como pre-hospitalario (143, 144). La ICP, por su parte, debería ser realizada en forma expeditiva dentro de los 120 minutos desde el comienzo de síntomas, y en centros con un alto volumen de casos, lo cual ha demostrado asociarse a una significativa reducción de mortalidad y eventos CV (134, 145).

En cuanto a la revascularización mediante cirugía de by-pass aorto-coronario, esta técnica permite el injerto de puentes arteriales o venosos en forma quirúrgica para restaurar el flujo hacia tejidos isquémicos distales al sitio de la lesión, siendo empleada principalmente en casos de enfermedad coronaria difusa con afectación de varias arterias coronarias en forma simultánea, en donde sí ha evidenciado ser superior al ICP en términos de reducción de mortalidad (146).

3.2.2.3. Tratamiento anti-trombótico

La piedra angular del tratamiento farmacológico en la cardiopatía isquémica independientemente de la estrategia de perfusión seleccionada corresponde a la terapia antitrombótica, destinada a la inhibición de los mecanismos de activación plaquetar (principalmente aspirina e inhibidores del receptor P2Y₁₂) y del sistema de coagulación (inhibidores de la generación y activación de la trombina) que intervienen directa o indirectamente en los fenómenos aterotrombóticos mencionados previamente. La elección del fármaco o procedimiento, el momento de inicio y la duración del tratamiento dependerán de múltiples variables intrínsecas y extrínsecas (122), por lo que resulta fundamental adaptar estas estrategias a cada paciente y escenario clínico. Es importante remarcar que tanto las complicaciones isquémicas de la enfermedad, como los eventos hemorrágicos que puedan surgir del uso de estas terapias pueden impactar negativamente en el pronóstico de estos pacientes, por lo que una apropiada individualización de cada terapia es esencial (147).

Dentro de los fármacos antiplaquetares, la aspirina (ácido acetilsalicílico) fue descubierto por Felix Hoffmann en 1897 (148), y actúa a través de su grupo acetyl provocando la inactivación irreversible de la enzima Cox-1, suprimiendo de esta manera la producción de prostaglandina H₂, precursor del TXA₂, potente vasoconstrictor y activador plaquetario (149, 150). Tanto su actividad antitrombótica como sus efectos adversos sobre la mucosa gástrica se deben a la reducción consiguiente en la acción de estas prostaglandinas (151). La isoforma Cox-1 se encuentra en forma constitutiva en plaquetas e interviene en el proceso de la formación de TXA₂, mientras que la isoforma Cox-2 se encuentra en el endotelio y sintetiza prostaciclina I₂ (un importante vasodilatador e inhibidor plaquetar) (152). La aspirina a dosis reducidas produce una inactivación sobre la enzima Cox-1 100 veces más rápida que a nivel de Cox-2 (153), limitando la inhibición de prostaciclina I₂ por Cox-2 a nivel endotelial y preservando así las funciones vaso y cardioprotectoras de dicha enzima (154). Asimismo, la aspirina posee también un efecto antitrombótico adicional al producir la acetilación del fibrinógeno, promoviendo una respuesta fibrinolítica

específica (155). La inhibición selectiva de la aspirina sobre la Cox-1 a nivel plaquetario es irreversible y se mantiene durante toda la vida media de éstas (de 8 a 10 días) (156).

En base a varios estudios randomizados, la recomendación de las guías en pacientes con síndromes coronarios agudos e IAM es el inicio de un esquema terapéutico basado en la doble antiagregación plaquetaria (DAPT) con aspirina en combinación a un fármaco inhibidor del receptor plaquetar P2Y12 (146, 157, 158). Los tres fármacos principales inhibidores orales del receptor P2Y12 disponibles en la actualidad son el clopidogrel, el prasugrel y el ticagrelor. El ticagrelor o prasugrel han sido recomendados por sobre el clopidogrel en pacientes con síndromes coronarios agudos debido a su mayor potencia intrínseca, con un inicio de acción más rápido y menor variabilidad interindividual (159). Un meta-análisis de 12 estudios randomizados y controlados con un total de 52.816 pacientes evidenció una mayor reducción significativa de eventos isquémicos con ticagrelor y prasugrel en comparación a clopidogrel, a expensas de un aumento en la incidencia de eventos hemorrágicos, siendo ticagrelor el único inhibidor P2Y12 que alcanzó una disminución significativa en la mortalidad (160). Posteriormente fue desarrollado el cangrelor, un inhibidor reversible endovenoso del receptor P2Y12, que ha demostrado en 3 ensayos randomizados y controlados una reducción de eventos isquémicos periprocedimiento pero con una mayor tasa asociada de sangrados (161-163).

Por su parte, la anticoagulación en contexto de un síndrome coronario agudo, especialmente durante el manejo invasivo del mismo, resulta de vital importancia para inhibir la generación y actividad de la trombina (122). La heparina sódica representa el tratamiento estándar de anticoagulación, aunque ha sido progresivamente reemplazada por las heparinas de bajo peso molecular debido a la practicidad superior en su administración, y con una menor variabilidad de efecto, quedando la utilización de otros anticoagulantes específicos como el fondaparinux, la bivalirudina y los inhibidores de la GPIIb/IIIa para situaciones seleccionadas (122).

3.3. Daño por isquemia/reperfusión

El impacto de la enfermedad aterosclerótica a nivel cardíaco tras sufrir un evento isquémico dependerá fundamentalmente del grado de afectación del tejido miocárdico, es decir, el porcentaje de masa muscular que ha sufrido las consecuencias de la hipoxia celular prolongada con necrosis/apoptosis de cardiomiocitos y el desarrollo posterior del compromiso global de la función ventricular (164).

Las terapias de reperfusión, indistintamente del mecanismo de base, tienen como objetivo final restaurar el flujo sanguíneo en el corazón isquémico con la finalidad de limitar el daño miocárdico y preservar así la función contráctil (165). A pesar de las mejoras observadas

tanto en las técnicas de revascularización como en los tiempos para su implementación, todavía persiste un considerable riesgo residual de morbi-mortalidad en esta población, con una tasa anual media de mortalidad del 7% y una incidencia de IC luego de un IAMCEST del 22% (166).

El nivel de disfunción ventricular que se genera posterior a un infarto resultará principalmente del grado de severidad y tiempo de duración del IAM. Sin embargo, se ha observado tanto en forma experimental como en el ámbito clínico que este monto final puede ser agravado en forma tardía luego de la reperusión de los tejidos, fenómeno que ha sido denominado daño por isquemia/reperusión (I/R). Descrito en forma experimental por primera vez en 1960, se caracteriza por el daño cardíaco que tiene lugar tras la restauración del flujo sanguíneo coronario (167).

Producto de la isquemia, la reducción del aporte sanguíneo (y por lo tanto oxígeno y nutrientes) ocasiona una súbita disminución en los niveles disponibles de energía celular, estimulándose como respuesta compensadora la activación de la glicólisis anaeróbica, que mantenida en forma sostenida induce una acidificación progresiva y desencadena una pérdida en la función de la bomba de sodio/potasio dependiente de adenosín-trifosfato (ATP), con el consiguiente aumento intracelular en la concentración de sodio. En consecuencia, se ponen en marcha nuevos mecanismos para intentar mantener la homeostasis celular, principalmente derivados de la activación del intercambiador de membrana de sodio/calcio que no requiere de ATP para su funcionamiento, liberándose de esta forma sodio al medio extracelular e introduciéndose calcio dentro de los cardiomiocitos, comenzando así un proceso de acumulación gradual en su interior (168).

El retorno de la circulación al tejido isquémico producto de las terapias de reperusión genera un rápido lavado de los iones de hidrógeno acumulados durante la acidificación, induciendo un nuevo gradiente de pH que promueve su compensación mediante la activación de la bomba de sodio/hidrógeno. Esto provoca un mayor depósito intracelular de sodio y potencia a su vez el intercambiador de sodio/calcio, con un balance final que resulta en la acumulación desproporcionada de calcio dentro de la célula, llegando a niveles que ponen en riesgo la supervivencia celular (169). El calcio libre en el citosol se acopla en primera instancia a la troponina C, interactuando luego con la troponina I y provocando el desplazamiento de las moléculas de tropomiosina T y troponina T. Esto permitirá la asociación entre las cadenas de actina y miosina que tienen lugar durante el proceso de contracción muscular (169). La relajación, por otra parte, que sucede normalmente en cardiomiocitos a través del secuestro de calcio dentro de distintas organelas como el retículo sarcoplásmico, la mitocondria, y mediante su expulsión por eflujo extracelular, se encuentra limitada en el contexto del daño por I/R por la elevada sobrecarga de calcio, que impide que estos mecanismos se lleven a cabo adecuadamente,

y por tanto los cardiomiocitos permanecen en un estado de contracción muscular sostenida adoptando una forma de hipercontractura (169). Esto queda manifestado a nivel histológico por la aparición de las características bandas de necrosis por contracción en el tejido miocárdico, producto de la desorganización de la estructura sarcomérica y la contracción celular exacerbada (170).

Estos mecanismos se encuentran, a su vez, agravados por condiciones adicionales que tienen lugar durante el daño por I/R, como la activación de la enzima sarco/retículo endoplásmico ATPasa-dependiente de calcio-2 (SERCA-2), que induce la entrada de calcio en el retículo sarcoplásmico uniéndose a las proteínas fijadoras calreticulina y calceuestrina para reducir su acumulación en el citosol. Esto genera su sobrecarga dentro de esta organela, que, al superar su límite de almacenamiento, expulsa el exceso de calcio nuevamente a través de los receptores de rianodina contribuyendo a incrementar su depósito citosólico y perpetuando los mecanismos de hipercontractura (171).

Este suceso, en combinación con la inducción de la acción de calpaínas, que son proteasas de cisteína dependientes de calcio activadas por la acumulación intracelular de este ion, promueve la degradación de anquirina, soporte proteico del citoesqueleto sarcolémico e histoarquitectura celular, contribuyendo a generar una mayor pérdida en la integridad de los cardiomiocitos (172, 173).

De esta forma, estas alteraciones progresivas caracterizadas por el desequilibrio iónico y de pH que perturban la homeostasis celular dan lugar a una pérdida en la integridad de la membrana de la mitocondria debido a una transición en la permeabilidad mitocondrial (174), que conlleva un desacople de la cadena respiratoria de forma incompatible con la supervivencia celular (175).

Asimismo, durante los primeros minutos del daño por I/R se induce la formación de estrés oxidativo por la producción de ROS y nitrógeno a nivel de los complejos I y III de la cadena respiratoria mitocondrial, así como también por cambios post-transcripcionales en la enzima xantina oxidasa y la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa (176). Las principales moléculas afectadas por esta respuesta pro-oxidativa pertenecen a la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK/ERK), las quinasas c-Jun N-terminal (JNK) y la familia de proteínas quinasas B (Akt) (177). Otra proteína efectora modificada directamente por el daño oxidativo es la calcio-calmodulina kinasa II (CaMKII), contribuyendo a interferir con el proceso de manejo intracelular de calcio y agravando así su acumulación citosólica (176).

A su vez, el daño mitocondrial producido por las ROS genera la liberación de patrones moleculares de daño celular (DAMPs), que establecen la activación del sistema de inmunidad innato mediante la vía del factor NF- κ B y promueven la instauración de un proceso inflamatorio asociado (178, 179) a través de la infiltración leucocitaria

(mayoritariamente neutrófilos y macrófagos) que inducen el desacople de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS) y disfunción endotelial, contribuyendo a exacerbar el daño celular y estrés oxidativo (180).

La **Figura 8** representa los cambios moleculares que tienen lugar durante el proceso de daño por I/R dentro de los cardiomiocitos.

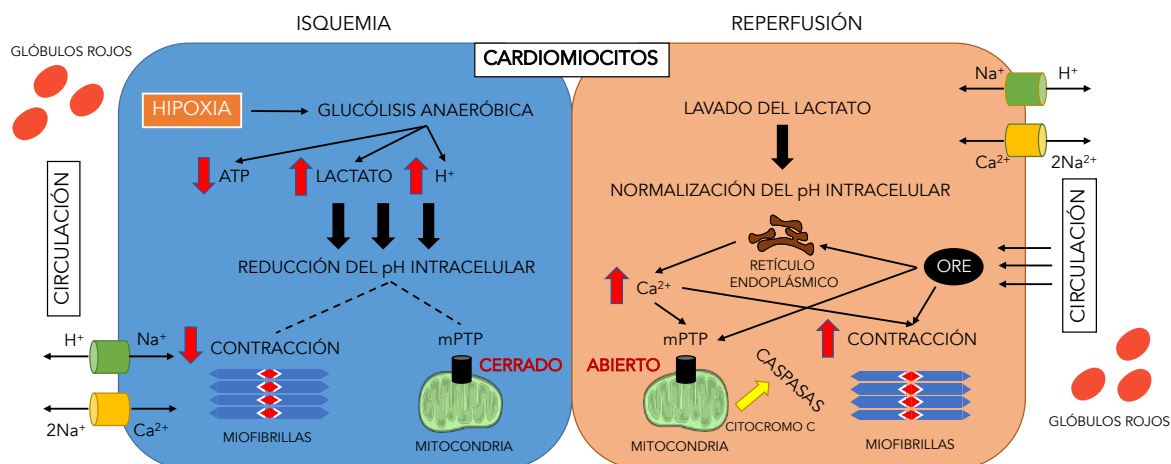


Figura 8. Mecanismos de daño por isquemia/reperfusión. Durante la reperfusión, se produce una rápida normalización del pH intracelular, que genera cambios iónicos a nivel celular mediados principalmente por la acumulación intracelular de calcio, con la formación de radicales libres y la inducción de una respuesta inmunitaria e inflamatoria, produciéndose la apertura del poro de transición mitocondrial con la subsiguiente activación del sistema de caspasas y los mecanismos de muerte celular por apoptosis/necrosis. Ca^{2+} : Calcio; H^+ : Hidrógeno; K^+ : Potasio; mPTP: Poro de transición de permeabilidad mitocondrial; Na^+ : Sodio. Adaptado de (181, 182).

Desde el punto de vista clínico, el daño por I/R puede presentar distintas manifestaciones. En primer lugar, es frecuente observar durante el período de reperfusión la aparición de inestabilidad eléctrica en la forma de arritmias ventriculares, que habitualmente se autolimitan espontáneamente y no requieren de un tratamiento específico (166). Por otro lado, el aturdimiento miocárdico es un proceso que se caracteriza por una afectación profunda en el metabolismo de los cardiomiocitos sobrevivientes, induciéndose cambios intracelulares que mantienen a las células en un estado latente, usualmente por días o semanas, hasta que se restauran definitivamente los mecanismos de homeostasis celular y recuperan su funcionalidad (183). En último lugar, la obstrucción microvascular se produce por la oclusión de vasos distales al evento coronario y puede ser agravado también por el fenómeno de daño por I/R, constituyendo uno de los parámetros más importantes predictores de morbi-mortalidad y pronóstico de la enfermedad (184). Esta obstrucción coronaria microvascular se ha estimado que sucede hasta en un 50% de los pacientes sometidos a ICP (185) y su etiología es multifactorial, comprendiendo la disfunción

endotelial, la micro-embolización de material en forma distal al sitio de la lesión, la microtrombosis coronaria y el daño capilar con atrapamiento neutrofílico (186). El fenómeno de no-reflow constituye la representación angiográfica de este fenómeno, y se manifiesta por una reducción del flujo anterógrado con restricción en la penetración de contraste hacia el tejido miocárdico (grado de perfusión o "blush") observado durante la angiografía coronaria (187).

Cabe remarcar que el daño oxidativo e inflamatorio desencadenado por la I/R no impacta únicamente en los cardiomiocitos, sino que también actúa a nivel de fibroblastos induciendo su transformación fenotípica a miofibroblastos, los cuales estimulan la producción de colágeno y el desarrollo de fibrosis intersticial, con la participación activa de metaloproteinasas de matriz (MMPs) que contribuyen a la degradación y remodelado de la matriz extracelular (188).

3.3.1. Metabolismo energético cardíaco y fenómeno de lipotoxicidad

El corazón representa un órgano de alta demanda metabólica debido a su continua función contráctil, requiriendo en promedio 0.5 $\mu\text{mol/g/s}$ de ATP, producido principalmente a través de la fosforilación oxidativa mitocondrial. El 70% de la energía consumida por el tejido cardíaco proviene en condiciones fisiológicas del metabolismo de los ácidos grasos, aunque existen vías metabólicas accesorias derivadas del consumo de la glucosa (principalmente mediada por la proteína transportadora de glucosa de tipo 4 - GLUT-4), los cuerpos cetónicos y el lactato (189, 190).

Los ácidos grasos pueden ser captados hacia el interior de los cardiomiocitos en forma pasiva, aunque predomina su transporte activo a través de una traslocasa (CD-36) y proteínas de unión a ácidos grasos (FABP) (191). Una vez en el citosol, los ácidos grasos sufren una transformación mediada por la enzima carnitin-palmitoltransferasa I (CPT-1) hacia acil-carnitina de cadena larga, para luego atravesar la membrana mitocondrial. En el interior de esta organela, pueden ser nuevamente modificados a acil-CoA por la CPT-2 iniciando el proceso de β -oxidación para la síntesis de ATP, o ser esterificados y agrupados en forma de triglicéridos para su depósito dentro de los cardiomiocitos (192). A pesar de la alta dependencia del metabolismo energético cardíaco de la disponibilidad constante de ácidos grasos, los depósitos miocárdicos de triglicéridos resultan relativamente limitados. Esto es debido principalmente a la importante regulación existente en el contenido lipídico intra-miocárdico para evitar situaciones de lipotoxicidad (193), que consisten en fenómenos citotóxicos que tienen lugar al superarse la capacidad de oxidación de los ácidos grasos acumulados, provocando de esta forma su depósito intracelular al punto de interferir con la homeostasis normal de los cardiomiocitos. Esta

situación puede ser observada en casos de alteraciones metabólicas crónicas como en la insulino-resistencia, en la DM tipo 2 o en la obesidad, aunque se produce en mayor medida durante el proceso de daño por I/R (194).

Asimismo, otro de los ácidos grasos esenciales relacionados con los fenómenos de lipotoxicidad es el diacil-glicerol (DAG). Éste puede transformarse en triglicéridos mediante la enzima DAG acil-transferasa (DGAT) contribuyendo así a exacerbar la concentración intracelular de triglicéridos. Este proceso de lipotoxicidad cardíaca estimula una respuesta pro-inflamatoria asociada (mediada por la activación de vías de señalización como el receptor simil-Toll 4 - TLR-4), con incremento del estrés oxidativo y disfunción mitocondrial, impactando directamente sobre la funcionamiento fisiológico de los cardiomiocitos y activando en última instancia los mecanismos de apoptosis celular (195, 196).

La **Figura 9** ilustra los mecanismos celulares mencionados que intervienen en el metabolismo energético celular cardíaco en condiciones fisiológicas y durante la isquemia celular.

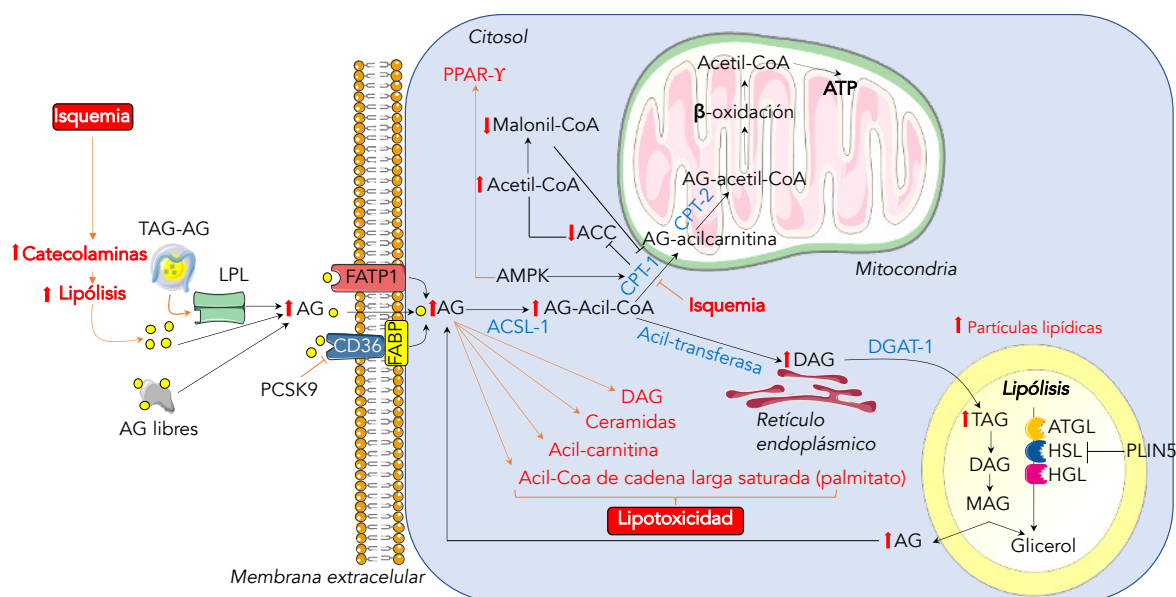


Figura 9. Metabolismo lipídico cardíaco en condiciones fisiológicas y fenómeno de lipotoxicidad por isquemia miocárdica. ACC: Acetil-CoA carboxilasa; AG: Ácidos grasos; AMP: Monofosfato de adenosina; AMPK: Protein-quinasa activada por AMP; ATGL: triglicérido lipasa adiposa; ATP: Adenosín trifosfato; BCAA: Aminoácido de cadena ramificada; CD: Clúster de diferenciación; CoA: Coenzima A; CPT: Carnitina palmitol-transferasa; DAG: Diacilglicerol; DGAT-1: Diacilglicerol O-aciltransferasa 1; FAPP: Proteína de unión a ácidos grasos; FATP1: Proteína transportadora de ácidos grasos 1; G6P: Glucosa 6-fosfato; GLUT: Transportador de glucosa; HBP: Vía biosintética de hexosamina; HGL: Lipasa gástrica humana; HSL: Lipasa sensible a hormonas; IMS: Espacio intermembrana mitocondrial; LPL: Lipoproteinlipasa; MAG: Monoacilglicerol; MCD: Malonil-CoA decarboxilasa; MPC: Transportador de piruvato mitocondrial; PCSK9: Proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9; PDH: Piruvato deshidrogenasa; PDK: Piruvato deshidrogenasa kinasa; PLIN5: Perilipina 5; PPP: Vía de fosfato de pentosa; TAG: Triglicéridos. Modificado de (192).

A nivel clínico, la esteatosis cardíaca se puede manifestar principalmente por alteraciones a nivel de la relajación y contractilidad miocárdica, que contribuyen al desarrollo de insuficiencia cardíaca, inducen cambios en la geometría ventricular y promueven un estado de sobrecarga de presión y volumen, condicionando la aparición de remodelado ventricular adverso y disfunción sistólica (191).

3.4. Remodelado ventricular adverso e insuficiencia cardíaca

El remodelado cardíaco, descrito inicialmente a principios del siglo XX, involucra los mecanismos celulares y estructurales que se ponen en marcha en el marco del daño por I/R y progresan durante la formación de la cicatriz necrótica del infarto, induciendo modificaciones a nivel de la hemodinamia cardíaca y función ventricular (197). El remodelado ventricular adverso, definido como un incremento $>20\%$ en el volumen de fin de diástole del VI, constituye un predictor mayor independiente de eventos y mortalidad CV (198, 199).

La IC, por su parte, es un síndrome clínico crónico que se ha convertido actualmente en una verdadera epidemia a nivel global (200). Afecta al 1-2% de la población mundial, aunque su prevalencia aumenta proporcionalmente con la edad alcanzando hasta el 10% en mayores de 70 años, y constituye la primera causa de hospitalización dentro de este segmento poblacional (201, 202). La enfermedad coronaria representa, a su vez, la principal causa etiológica de este síndrome, seguida por la cardiopatía valvular y diversas miocardiopatías.

El crecimiento exponencial observado en la IC tiene como explicación un fenómeno dual: si bien, por un lado, un mayor número de personas consigue sobrevivir a un síndrome coronario agudo gracias a los avances en el tratamiento farmacológico y las terapias de reperfusión, una proporción cada vez más alta de pacientes lo hacen a expensas de diversos grados de disfunción ventricular residual, que predisponen al desarrollo del remodelado miocárdico adverso y posteriormente promueven la aparición de signos y síntomas de IC. De esta forma, la incidencia de esta patología se encuentra en franco ascenso, estimándose un aumento del 50% en los casos para los próximos 25 años, con una mortalidad calculada del 50% a 5 años (203, 204), superando ampliamente a la mayoría de cánceres y enfermedades crónicas.

La IC se caracteriza por presentar distintos fenotipos, clasificados en base al nivel de alteración de la función sistólica del VI (FSVI), determinada a través de la medición de la fracción de eyección del VI (FEVI) (205):

- Insuficiencia cardíaca con FSVI reducida: FEVI ≤ 40%
- Insuficiencia cardíaca con FSVI ligeramente reducida: FEVI entre 41-49%
- Insuficiencia cardíaca con FSVI preservada: FEVI ≥ 50%

Esta división en base a la FEVI proviene esencialmente del diseño clásico de los ensayos clínicos en IC que tomaron como parámetro principal a la FEVI, así como del beneficio secundario observado con terapias específicas definidas según el nivel de FEVI, y por lo tanto constituye un parámetro con importante capacidad pronóstico en pacientes con IC (205). A pesar de ello, el proceso fisiopatológico que tienen lugar durante el remodelado cardíaco se encuentra determinado por una compleja interacción de daño progresivo a nivel molecular, celular y últimamente estructural (206).

La **Figura 10** ilustra las principales características clínicas asociadas a la insuficiencia cardíaca según cada fenotipo de función ventricular.

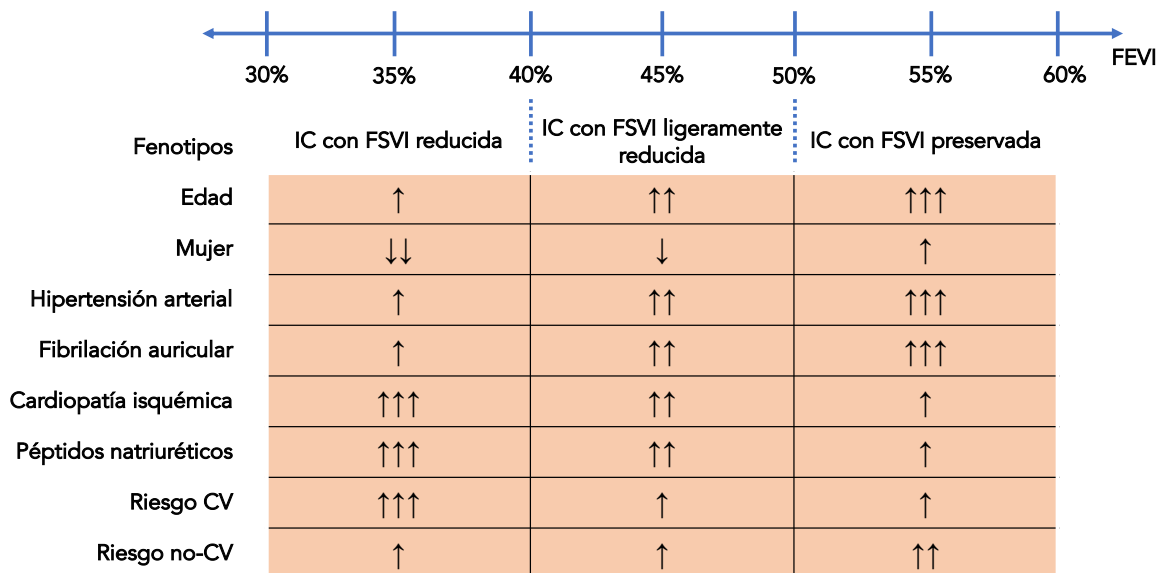


Figura 10. Fenotipos y características de la insuficiencia cardíaca según FSVI. Modificado de (207).

3.4.1. Mecanismos moleculares y celulares

El remodelado ventricular se inicia en el momento del infarto y con la posterior necrosis de cardiomiocitos y el desarrollo de fibrosis intersticial, involucrando una serie de cambios que implican tanto al músculo cardíaco isquémico como el tejido no isquémico. Debido a la

muerte celular, se liberan una serie de factores moleculares como DAMPs, péptidos natriuréticos (tipo B, tipo pro-B amino-terminal y atrial) y troponinas, en forma proporcional al grado de afectación cardíaca, y por lo tanto constituyen marcadores tanto diagnósticos como pronósticos en pacientes con IAM e IC, predictores de hospitalización y mortalidad CV (208). Estas moléculas inducen la migración de (mio)fibroblastos cardíacos hacia el sitio de la lesión, que a través de la liberación de citoquinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), IL-1, IL-6 y quimioquinas (principalmente el ligando 2 de quimioquina, CCL2) establecen la formación de un proceso pro-inflamatorio a nivel del tejido dañado (209-211).

A partir del tercer y cuarto día del IAM, se incrementa aún más el reclutamiento de células inflamatorias hacia el sitio del infarto (212), cuya actividad produce la degradación de la matriz extracelular de colágeno mediante la activación de metaloproteinasas y la re-expresión de genes fetales, lo cual induce alteraciones en la homeostasis celular, genera un adelgazamiento gradual de la pared ventricular, y posteriormente establece una progresiva dilatación del tejido isquémico-necrótico (165, 213).

Asimismo, la migración de (mio)fibroblastos en conjunción con la activación de metaloproteinasas de matriz y colagenasas contribuirán a la formación de una escara necrótica y fibrótica para estabilizar el tejido dañado (206). La matriz extracelular se encuentra compuesta en un 95% por fibras de colágeno tipo I y tipo III, cuya función primordial consiste en brindar soporte y sostén al tejido celular y vascular, a la vez que regula funciones metabólicas y mantiene la distensibilidad cardíaca necesaria para su correcto funcionamiento (214).

Durante el proceso de remodelado adverso, se genera una acumulación anormal especialmente de fibras de colágeno tipo I, inducidas por diversas vías de señalización incluyendo al factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), angiotensina II, endotelina 1 y factores de crecimiento tisulares y plaquetarios. Estas fibras resultan más elongadas que las de tipo III alterando la relación existente entre ellas y provocando una desorganización de la citoarquitectura sarcomérica, lo cual conduce a una alteración en la relajación normal de cardiomiocitos, incrementando la rigidez miocárdica y el grado de disfunción diastólica (215). Los niveles de metaloproteinasas y colagenasas llegan a su pico alrededor del día 7 del IAM, siendo su actividad regulada estrictamente por inhibidores tisulares de metaloproteinasas (213).

Diversos procesos adicionales tienen lugar durante el remodelado cardíaco, como un cambio en la expresión de isoformas de miosina de cadena pesada (a expensas de una reducción en las cadenas β y un aumento de cadenas α), un incremento de ciertos factores como el transportador de glucosa tipo 1 (GLUT-1), la galectina y la enzima convertidora de angiotensina (ACE), con una disminución concomitante en la enzima SERCA-2a, y una

modificación en el metabolismo energético virando de la β -oxidación de ácidos grasos hacia el consumo de glucosa (216, 217), como se ha comentado previamente, promoviendo la acumulación progresiva de triglicéridos a nivel miocárdico y exacerbando el fenómeno de lipotoxicidad cardíaca (218, 219).

3.4.2. Activación del sistema neuro-humoral

Los mecanismos celulares y moleculares anteriormente descritos se encuentran estrechamente regulados por la activación del sistema neuro-endocrino. Las principales vías neuro-humorales relacionadas al proceso de remodelado ventricular e IC corresponden a la activación del sistema nervioso simpático (SNS) y el sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) (220).

El primero de estos participa activamente desde los inicios del evento isquémico mediante la estimulación cardíaca β -adrenérgica y la liberación de noradrenalina, incrementando en forma temprana la frecuencia cardíaca y TA para mantener el trabajo sistólico en situaciones de reducción del volumen minuto (por deterioro del tejido contráctil).

El RAAS, por su parte, se activa durante la primera semana del IAM a través de la inducción de angiotensina II (ATII), que interactúa con el receptor tipo 1 de ATII promoviendo daño citotóxico y aumentando el nivel de hipertrofia y fibrosis intersticial miocárdica (221, 222). A nivel renal, una acción directa de la angiotensina II y la aldosterona en el sistema tubular (la primera a nivel del túbulo proximal y la segunda a nivel distal), genera un aumento en la retención de agua y sodio para mantener la volemia y compensar el estado de reducción del gasto cardíaco, lo cual termina conduciendo en forma crónica hacia una situación de congestión sistémica y pulmonar (223).

Una enzima intrínsecamente relacionada con la activación del RAAS es la neprilisina, una endopeptidasa dependiente de zinc que se encarga de degradar los péptidos natriuréticos liberados durante el estrés de cardiomiocitos (224). Estos péptidos, en conjunción con la adrenomedulina, son los encargados de equilibrar esta respuesta neuro-humoral al producir vasodilatación periférica, incrementar la diuresis y reducir el proceso de proliferación celular a nivel miocárdico (225).

En el corto plazo, los mecanismos puestos en marcha en la IC buscan promover una serie de cambios a nivel cardíaco y sistémico cuya finalidad es sostener el gasto cardíaco para soportar las necesidades metabólicas del organismo. Sin embargo, su mantenimiento en forma crónica produce efectos deletéreos tanto a nivel miocárdico, vascular, como también un impacto en la función de múltiples órganos. Es por ello que la terapia farmacológica inhibitoria del sistema neuro-humoral se ha convertido en la piedra angular del tratamiento médico de la IC (223), y ha conseguido demostrar una reducción significativa de la

mortalidad, disminuyendo la aparición de eventos CV, ingresos hospitalarios, y mejorando la capacidad funcional y calidad de vida de estos pacientes (205).

3.5. Estrategias de cardioprotección

En pacientes que sufren un evento CV isquémico, el daño acumulado generado tanto por la hipoxia celular así como el derivado de la I/R contribuye al compromiso final de infarto y últimamente de la función cardíaca global. (226). Por consiguiente, más allá de haberse conseguido obtener un descenso sustancial en las tasas de mortalidad tras un IAM secundario a la aplicación efectiva de las estrategias de reperfusión y tratamiento farmacológico combinado, el daño miocárdico residual continúa siendo sustancial, lo cual se traduce directamente en un incremento en la aparición de complicaciones CV y eventos clínicos (166). En este contexto, se han buscado desarrollar terapias novedosas destinadas a limitar el tamaño final del infarto y sus consecuencias, denominadas estrategias de cardioprotección. Estas estrategias pueden ser de tipo endógeno (condicionamiento isquémico) o de tipo exógeno (condicionamiento farmacológico)

3.5.1. Protección miocárdica endógena: condicionamiento isquémico

El condicionamiento isquémico mecánico constituyó una de las primeras técnicas establecidas de cardioprotección, desarrollada inicialmente por Murray y colaboradores en 1986, quienes demostraron en un modelo canino de IAM alcanzar una reducción significativa del 75% en el tamaño final del infarto a través de la aplicación de ciclos repetitivos de isquemia y reperfusión en forma local, mediante la oclusión coronaria transitoria previa a la inducción propia del infarto (227).

Las estrategias de cardioprotección mediante condicionamiento isquémico se basan en promover mecanismos de reparación endógenos e inhibir los procesos de daño cardíaco, para hacer frente tanto al evento isquémico en sí como al daño por I/R mediante la aplicación de procedimientos mecánicos intermitentes de isquemia y reperfusión en el marco del infarto.

Durante las últimas 4 décadas, diversas terapias de condicionamiento isquémico han sido diseñadas con este fin, diferenciándose según su modalidad de acción y tiempo de aplicación, así como en los objetivos celulares y tisulares involucrados. Sin embargo, su proceso de traslación desde la investigación experimental hacia el campo clínico ha presentado considerables retos y continúa siendo una de las áreas de investigación CV más desafiantes en la actualidad.

Globalmente, las estrategias de condicionamiento isquémico pueden clasificarse en base a su tiempo de aplicación en (Figura 11) (228):

- Pre-condicionamiento isquémico: el estímulo condicionante se administra previo al inicio del evento isquémico.
- Per-condicionamiento isquémico: el estímulo condicionante se aplica durante el período de isquemia pero previo a la reperfusión.

Post-condicionamiento isquémico: el estímulo condicionante es realizado posterior a la reperfusión.

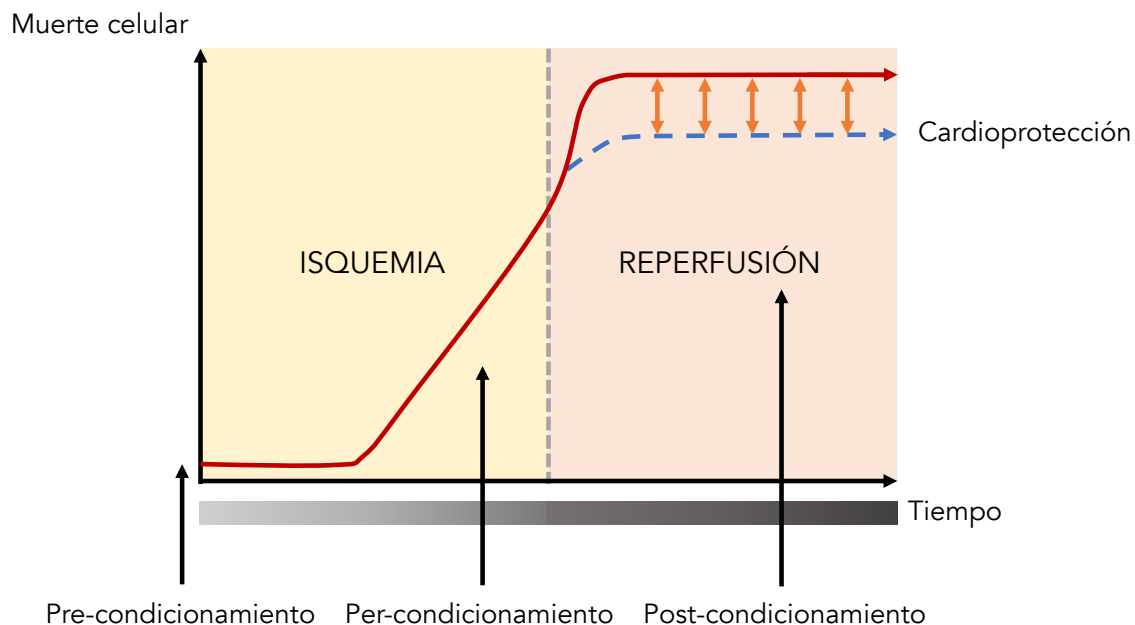


Figura 11. Fases temporales de aplicación del condicionamiento miocárdico en el daño por isquemia/reperfusión. Modificado de (229).

Por su parte, de acuerdo al sitio de aplicación, el condicionamiento isquémico puede emplearse en forma local al lugar donde ocurre la isquemia, o utilizarse en forma remota a distancia de la misma en un órgano distinto al que sufre la isquemia.

3.5.1.1. Condicionamiento isquémico local

Tras su descubrimiento, el pre-condicionamiento isquémico ha sido replicado en múltiples especies animales y humanos, así como en diversos órganos (230). Las bases

fisiopatológicas de este proceso no se encuentran completamente dilucidadas, pero involucran una actividad paracrina de los cardiomiocitos liberando factores bioactivos tras el estímulo condicionante, tales como bradiquinina, adenosina, acetilcolina, óxido nítrico, endotelina-1 y angiotensina 2 (231, 232). Estos mediadores actuarían a nivel mitocondrial a través de factores como la tirosin-quinasa, la protein-quinasa C, y principalmente activando las vías de señalización de la quinasa de salvamiento por injuria-reperfusión (RISK) y el factor activador de supervivencia (SAFE). Asimismo, éstos también inducen mediadores secundarios derivados de las vías de Erk1/2, Akt y el TNF- α , todo lo cual permite establecer un efecto cardioprotector inmediato y de corta duración (entre 2 a 3 horas) denominado primera ventana de cardioprotección (166).

A continuación, tiene lugar una actividad más tardía que se produce entre las 12 a 24 horas del estímulo inicial conocida como segunda ventana de protección, caracterizada por la inducción de factores transcripcionales que presentan latencia en su activación y que permiten mantener esta respuesta en forma sostenida (hasta 72 horas), destacándose el factor inducible por hipoxia-1 α (HIP-1 α), JAK-STAT, proteínas de acción térmicas (HSP), la enzima NOS y el FN- κ B (233).

Esta técnica se ha aplicado tanto en protocolos asociados a cirugías de revascularización quirúrgica (mediante clampeo intermitente de la aorta durante el procedimiento) como también percutánea (por inflado alternante del balón intra-coronario) para reducir las consecuencias de los tiempos prolongados de isquemia y daño por reperfusión, trayendo aparejado una preservación en los niveles de ATP miocárdico y menor propensión a las arritmias ventriculares y disfunción sistólica (234, 235).

Este proceso puede ser observado también en forma endógena, en aquellos pacientes que presentan episodios de dolor torácico anginoso por fenómenos de sub-oclusión coronaria transitoria previo al infarto, que resultan protectores frente al desarrollo posterior de isquemia reduciendo la aparición de complicaciones asociadas (236).

Sin embargo, la mayor dificultad en el desarrollo del concepto de pre-condicionamiento reside en que los eventos isquémicos suelen ser fenómenos agudos y súbitos no predecibles, por lo que no es posible su aplicación en forma programada en la práctica clínica, a excepción de los procedimientos de revascularización (percutánea o quirúrgica) realizados en forma electiva, pero que suelen tener un impacto menor en términos de complicaciones isquémicas en comparación a los cuadros de síndrome coronario agudo.

Para solventar dicho obstáculo, se desarrollaron en las últimas décadas protocolos de condicionamiento miocárdico tanto durante el propio período isquémico así como en forma posterior a la reperfusión del IAM, designándose como se ha visto antes per- y post-condicionamiento isquémico local, respectivamente. Estas técnicas evidenciaron, a nivel experimental, una reducción de hasta un 44% en el tamaño final del infarto, preservando

la función ventricular y limitando el grado de disfunción endotelial (237). De esta forma, sería posible su utilización en contexto de pacientes que presenten cuadros agudos o aquellos sometidos a revascularización en donde se observe evidencia activa de daño por I/R. Tanto el per- como el post- condicionamiento isquémico inducen cardioprotección a través de una disminución en el edema miocárdico, desarrollando una respuesta anti-inflamatoria y antioxidante (166), y utilizando vías fisiopatológicas similares a las activadas durante el pre-condicionamiento, liberando bradiquinina, adenosina, e induciendo la activación de protein-quinasas, SAFE y RISK (166).

Este efecto ha sido probado en variados modelos animales como ratones, conejos, y cerdos, aunque experimentalmente ha obtenido globalmente resultados inferiores y más heterogéneos respecto al pre-condicionamiento isquémico (238, 239). A nivel clínico, si bien diversos meta-análisis demostraron una reducción significativa en el tamaño final del infarto con esta estrategia, con menor liberación de marcadores de daño miocárdico y una mejoría en la perfusión coronaria (valorada por angiografía, gammagrafía y resonancia magnética cardíaca) (240, 241), un estudio multicéntrico y randomizado que incluyó 700 pacientes sometidos a ICP no consiguió evidenciar efectos significativos en el grado de reperfusión coronaria (242). Estas diferencias podrían deberse nuevamente a la selección de pacientes, diseño de protocolos, así como a la presencia de diversos condicionantes clínicos que pudieran afectar los resultados obtenidos.

La principal desventaja de esta técnica radica en que requiere emplear maniobras sucesivas a nivel local (clampeo aórtico en su variante quirúrgica o inflado de balón intra-coronario en forma percutánea), incrementando considerablemente el riesgo potencial de embolización distal y afectación de territorios vasculares adicionales, lo cual ha limitado efectivamente su empleo en la práctica clínica.

3.5.1.2. Condicionamiento isquémico remoto

Por lo tanto, comenzaron a investigarse protocolos de isquemia transitoria de aplicación en forma remota en distintos órganos (a través de la oclusión de la arteria renal, mesentérica o femoral, entre otras) demostrando un efecto cardioprotector a nivel miocárdico al reducir el daño por I/R (243, 244). Los mecanismos celulares y moleculares responsables de esta actividad parecerían estar relacionados a su homólogo local (245), señalándose la participación tanto de factores humorales (termolábiles, hidrofóbicos y con peso molecular >3.5 kDa) así como de vías neuronales específicas (dado que la denervación anula parcialmente el efecto cardioprotector) (245-247).

Posteriormente, el descubrimiento que la aplicación del condicionamiento remoto podría realizarse en forma no invasiva, mediante simplemente el inflado y desinflado de un

esfingomanómetro de medición de TA, permitió difundir su utilización en forma extendida y en múltiples escenarios clínicos, tanto en forma de pre- como post- condicionamiento, demostrándose una reducción en el grado del daño por I/R y disfunción cardíaca asociada (248-250).

La mayor parte de los ensayos clínicos en humanos mediante condicionamiento isquémico remoto aplicados en cirugía cardiovascular e ICP evidenciaron un efecto cardioprotector a través de una reducción en el daño miocárdico peri-procedimiento, aunque estudios randomizados y controlados con mayor muestra poblacional, así como diversos meta-análisis subsecuentes encontraron resultados contrapuestos, sin hallarse impacto significativo a nivel de eventos CV mayores o mortalidad (251-254). De hecho, un reciente estudio combinando dos protocolos clínicos de condicionamiento isquémico remoto en contexto del ICP en más de 5.000 pacientes con IAMCEST no demostró diferencias significativas en torno a muerte CV u hospitalización por IC a 12 meses, y sin modificaciones en el tamaño del infarto evaluado mediante biomarcadores (255). Por lo tanto, la variabilidad en la evidencia observada así como un efecto cardioprotector limitado coartaron su aplicación en forma más generalizada.

3.5.2. Condicionamiento farmacológico

Las estrategias farmacológicas de cardioprotección han sido evaluadas en forma paralela a las técnicas de condicionamiento isquémico, con variados resultados clínicos. El desarrollo de compuestos farmacológicos de condicionamiento se produjo históricamente a través de dos vías principales: por un lado, mediante el empleo de fármacos específicamente diseñados para contrarrestar los efectos deletéreos del daño por I/R; por otro lado, diversas drogas aprobadas y utilizadas para otra indicación clínica se emplearon con esta finalidad, dada la evidencia observada en ensayos controlados de un beneficio en cuanto a reducción de eventos cardiovasculares.

La investigación en este campo se ha focalizado principalmente en los siguientes fármacos:

- Péptido simil-glucagon tipo 1 (GLP-1): constituye una hormona incretina empleada como hipoglucemiante oral para el tratamiento de la DM tipo 2. Estos agonistas habían establecido su función cardioprotectora en estudios previos a gran escala en pacientes diabéticos de alto riesgo, evidenciando una reducción en los eventos CV, y posteriormente en estudios de prueba de concepto con una disminución en el tamaño del infarto y recuperación de la función ventricular (256, 257). Este factor ha demostrado producir cardioprotección a través de las activación de vías de señalización de RISK y SAFE (258). Sin embargo, resultados posteriores han

observado un efecto CV neutro, por lo que su indicación como cardioprotección actualmente es discutida (259, 260).

- Adenosina: Un meta-análisis de 13 estudios randomizados y controlados evaluó la co-administración de adenosina en contexto del tratamiento de reperfusión en el IAMCEST, evidenciando un efecto beneficioso en términos de reducción de la incidencia de insuficiencia cardíaca post-isquémica y fenómeno de no-reflow (261). Su actividad cardioprotectora también se ha visto relacionada a una disminución tanto en el tamaño del infarto así como de eventos CV (262), aunque otros estudios han demostrado efectos neutros o discordantes (263, 264). Esta diferencia en resultados puede haberse debido a la amplia variabilidad de dosis empleadas, a la corta biodisponibilidad de acción de la adenosina, así como en los tiempos y vías de aplicación (siendo la intra-coronaria la más efectiva en los ensayos clínicos).
- Beta-bloqueantes: Esta terapéutica ya indicada en pacientes con cardiopatía isquémica e IC ha demostrado adicionalmente una reducción en el tamaño final del infarto siendo administrados en forma temprana por vía intravenosa durante la reperfusión, mediante la modulación de la respuesta inflamatoria (principalmente neutrófilos). Sin embargo, los ensayos clínicos realizados hasta la fecha han evidenciado resultados discordantes posiblemente debidos a la diferencia de dosis empleadas y a los tiempos de administración utilizados (265, 266).
- Ivabradina: Es un inhibidor selectivo de la corriente I_f del nodo sinusal regulando de esta manera la frecuencia cardíaca en pacientes con IC. En un modelo porcino de daño por I/R promovió una reducción significativa del tamaño del infarto, aunque investigada luego en humanos en forma de post-condicionamiento falló en establecer efectos significativos (267, 268).
- Ciclosporina A: Es un fármaco que previene la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial, evitando las vías finales comunes de muerte celular programada en el daño por I/R. En forma similar a otras estrategias farmacológicas evaluadas, la ciclosporina A presentó resultados iniciales favorables en un número reducido de pacientes, que al ser extrapolados a ensayos clínicos en fase III no evidenció beneficios en reducir el tamaño del infarto o eventos CV (269-271). Esta ausencia de cardioprotección fue adjudicada en primera instancia a la formulación de la ciclosporina administrada (propiedades del vehículo), así como otras variables potencialmente confundidoras como tiempos de empleo y co-medicación. Otros

fármacos inhibidores de la apertura del poro de transición fueron evaluados en diversos escenarios clínicos pero sin resultados definitivos (272).

3.6. Nutracéuticos: potenciales estrategias de cardioprotección

3.6.1. Definición y usos

En respuesta a la búsqueda de nuevas terapias con propiedades citoprotectoras que pudieran inducir cardioprotección en el contexto del daño por I/R, han cobrado relevancia una serie de productos medicinales con características híbridas entre nutrientes y “fármacos”, con demostradas propiedades beneficiosas a nivel metabólico y celular. Este grupo se refiere particularmente a los nutracéuticos, término designado por DeFelice en 1989 y que define a un alimento o fracciones del mismo que provee efectos positivos a nivel de la salud, en la forma de prevención o tratamiento de enfermedades (273, 274). No obstante, esto deriva de un concepto histórico más antiguo aún, formulado por Hipócrates en el año 400 d.C. a través de la frase: “Deja que el alimento sea tu medicina, y la medicina tu alimento” (275).

Se calcula que actualmente entre el 50 al 70% de la población mundial consume algún derivado de nutracéuticos o suplemento dietario (276, 277), y el mercado global de nutracéuticos en 2021 fue de US\$ 382 mil millones, estimándose que ese número se duplique en los próximos 5 años (278). El aumento exponencial en su uso deriva de una mayor adopción de hábitos de vida saludables, así como su empleo en las fases iniciales de diversas condiciones clínicas para evitar o diferir el uso de tratamiento farmacológico (277).

Sin embargo, su regulación y legislación sigue siendo variable dependiendo de las distintas regiones, y no existe un término legal dentro de la Unión Europea para su definición (279). A pesar de su consumo en forma masiva, no se requieren estudios específicos que investiguen su seguridad, lo cual constituye un desafío a la hora de poder difundir su aplicación de forma más generalizada.

Los nutracéuticos pueden ser catalogados en tradicionales o no tradicionales, según deriven de compuestos naturales o sean modificados en forma artificial, respectivamente (277), tal como se puede observar en la **Figura 12**. Dentro de los primeros se destacan los nutrientes (vitaminas, ácidos grasos poliinsaturados), productos herbáceos (tanto en forma natural como los fitoquímicos extraídos de plantas) y probióticos, es decir, cultivos bacterianos viables que optimizan las propiedades saludables de la flora bacteriana endógena (280). Dentro del segundo sub-grupo, se encuentran los nutracéuticos fortificados o recombinantes, aquellos en los que se adicionan artificialmente productos

beneficiosos para incrementar sus propiedades nutritivas mediante el empleo de diversas técnicas biotecnológicas (277).

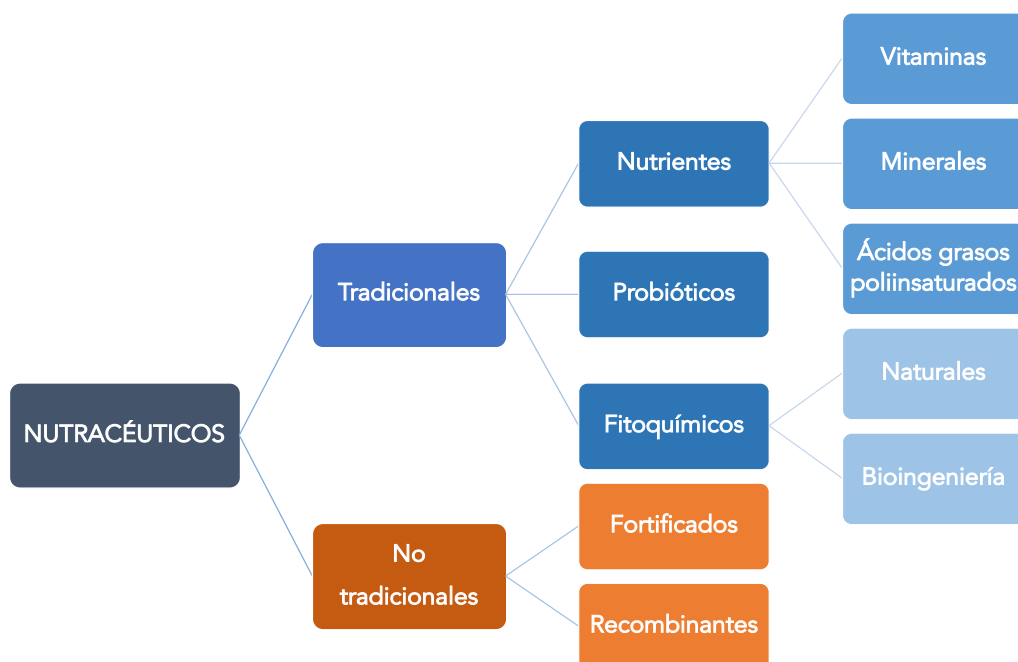


Figura 12. División de nutraceuticos según su origen y procesamiento.

Asimismo, los nutraceuticos se clasifican fundamentalmente según su composición o estructura química, dado que es ésta quien le otorga sus propiedades terapéuticas diferenciales, y le imprime características farmacodinámicas y biodisponibilidad específicas (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación química y principales propiedades terapéuticas de los nutraceuticos.

CONSTITUYENTES QUÍMICOS	PROPIEDADES TERAPÉUTICAS PROPUESTAS
Carotenoides	
Licopeno	Hipolipemiente, anti-oxidante, anti-tumoral.
β-Caroteno	Anti-oxidante.
Luteína/xantofila	Protección ocular frente a degeneración macular y cataratas.
Tocotrienol	Anti-oxidante, hipolipemiente, anti-tumoral.
Saponinas	Anti-tumoral, hipolipemiente.
Compuestos fenólicos	
Flavononas	Anti-oxidante, anti-tumoral.
Flavonas	Anti-oxidante, anti-tumoral.
Flavonoles	Anti-oxidante.
Curcumina	Anti-inflamatoria, anti-oxidante, anti-trombótica, anti-tumoral.
Glucosinolatos	Anti-tumoral.
Taninos	Anti-oxidante.
Fitoestrógenos	
Isoflavonas	Hipolipemiente, anti-oxidante, anti-tumoral.
Lignanos	Hipolipemiente, anti-oxidante, anti-tumoral.
Flavonolignanos	Modulador metabólico, anti-inflamatorio, anti-oxidante.
Fibras dietarias	
Fibras solubles	Protección del tracto digestivo, anti-tumoral, hipolipemiente.
Fibras Insolubles	Protección del tracto digestivo, anti-tumoral, hipolipemiente.
Sulfuros/Tioles	Inmuno-modulador.
Prebióticos	Protección del tracto digestivo.
Ácidos grasos	
Ácidos grasos Omega-3	Anti-inflamatorio, hipolipemiente, neuro-protector.
Ácidos grasos monoinsaturados	Anti-inflamatorio, hipolipemiente.
Probióticos	
Probióticos	Protector del tracto digestivo, inmuno-modulador.
Minerales	
Zinc, calcio, potasio, magnesio	Modulan el metabolismo celular.
Alcaloides	
Camptotecina	Anti-tumoral.
Teobromina	Diurético, vasodilatador.
Berberina	Anti-oxidante, anti-inflamatoria, neuro-protector.
Terpenos	
Mono-,di-,tri-,tetra-,poli-terpenos	Anti-inflamatorio, anti-tumoral, anti-microbiano.

3.6.2. Nutraceuticos, enfermedad cardiovascular y potencial de cardioprotección

A nivel cardiovascular, los nutraceuticos han sido evaluados tanto en monoterapia como en asociación al tratamiento farmacológico estándar, con el objetivo de limitar el impacto negativo de los factores de riesgo cardio-metabólicos y prevenir la aparición de eventos clínicos (principalmente cardiopatía isquémica e IC). Su efectividad en el tratamiento de los factores de riesgo CV ha sido analizada en numerosos ensayos controlados y

randomizados, y a través de distintas revisiones y meta-análisis sobre el tema (281-295). Globalmente, han demostrado una tendencia favorable a promover un adecuado control de los factores de riesgo, aunque con algunos resultados neutros o discordantes, derivado de la elevada heterogeneidad presente entre los distintos estudios clínicos analizados.

La principal evidencia clínica en cuanto a la actividad hipolipemiente de los nutraceuticos proviene principalmente de los fitoesteroles, la berberina y el arroz de levadura roja, promoviendo una reducción media de entre el 10-20% en los valores de colesterol total (296-302). Este efecto es mediado por una inhibición competitiva en la absorción intestinal de colesterol, asociada a una reducción en la secreción de moléculas de ApoB por los hepatocitos y una inducción en la expresión del receptor de LDL que promueve una mayor captación del C-LDL y reduce sus concentraciones plasmáticas (299-303).

A nivel de su efecto sobre la HTA, los flavonoides, dentro del grupo de los polifenoles, han demostrado inducir una significativa vasodilatación arterial reduciendo los valores de HTA, y asociándose también una disminución significativa en los niveles de insulino-resistencia (304, 305).

Por ello, dos meta-análisis posteriores han investigado la terapia con flavonoides para el tratamiento de la DM y la obesidad, demostrando una modulación en la homeostasis del metabolismo de la glucosa en conjunción con una reducción modesta en el índice de masa corporal (306, 307).

Por el contrario, en cuanto a la evaluación directa del efecto cardioprotector de los nutraceuticos sobre la cardiopatía isquémica, la investigación de su efectividad para prevenir y limitar el avance tanto de la hipoxia celular así como del daño por I/R se ha restringido primordialmente a estudios en animales en los que sí ha demostrado beneficio, pero sin haberse conseguido una correcta traslación y extensión al campo clínico.

Una importante cantidad de nutraceuticos de múltiples grupos químicos ha sido empleada para evaluar su capacidad de evitar o revertir los mecanismos de daño por I/R, no sólo limitado a nivel del sistema cardiovascular, sino también incluyendo otras condiciones clínicas variadas y órganos adicionales (308-310). No obstante, si bien el número de nutraceuticos valorados en este contexto ha sido extenso, sólo un grupo reducido y específico ha demostrado un efecto cardioprotector significativo.

Dentro de los mecanismos postulados de cardioprotección por los nutraceuticos (**Tabla 2**), se ha observado que éstos actúan a nivel de múltiples vías de señalización celular, derivado principalmente de la presencia de varios grupos químicos en cada compuesto.

Se ha descrito una inhibición de la vía del NF- κ B regulada a través del gen BRCA1 (gen supresor de tumores relacionado con el cáncer de mama), así como una disminución en los niveles de mediadores inflamatorios como IL-1 β , IL-6 y TNF- α , lo cual deriva en una importante actividad anti-inflamatoria, expandida adicionalmente por una supresión del

complejo inflammasoma NLRP3 (311, 312). A su vez, los nutraceuticos han demostrado ejercer propiedades citoprotectoras mediante una modulaci3n de la fosforilaci3n de las vfas de PI3K/Akt/eNOS, junto a la protefna X asociada a Bcl-2 (Bax), y estimulando mTOR, que representa un quinasa ubicua involucrada en los mecanismos de proliferaci3n y apoptosis celular, aunque su rol en el contexto del da1o por I/R resulta controvertida (313-315). Tambi3n se les ha atribuido propiedades anti-oxidantes derivadas de la activaci3n del factor de transcripci3n Nrf2 y la enzima hemo oxigenasa-1 (HO-1), asf como la vfa de SIRT-1 (sirtuina-1 deacetilasa dependiente de NAD) (316, 317).

Asimismo, otra de las vfas esenciales relacionada con la actividad de los nutraceuticos constituye la vfa de se1alizacion JAK-STAT. En este aspecto, cabe tener en cuenta que el da1o por I/R activa r3pidamente JAK1 y subsecuentemente JAK2, catalizando su fosforilaci3n y permitiendo el acoplamiento del dominio SH2 de STAT, en donde STAT1 se ha visto promueve la apoptosis celular mientras que STAT3 induce protecci3n de los cardiomiocitos isqu3micos a trav3s de su activaci3n por IL-10 (318-320).

Por su parte, una reducci3n en la fibrosis mioc3rdica y posterior remodelado ventricular ha sido evidenciada por la inhibici3n de AMPK, asf como producto de la activaci3n del factor inducible por hipoxia-1 alfa (HIF-1 α) (315, 321). De la misma forma, algunos nutraceuticos inducen una actividad citoprotectora mediante la activaci3n de ERK 1-2 y de la vfa RISK, especialmente aquellos pertenecientes al grupo de fitoqufimicos (322-324).

Tabla 2. Mecanismos moleculares de cardioprotección por nutraceuticos.

Anti-inflamatorio
Inhibición NF- κ B
Supresión inflammasoma NLRP3
Reducción IL-1 β
Reducción IL-6
Reducción TNF- α
Inhibición JAK/STAT
Anti-apoptótico
Inhibición ERK 1-2
Regulación PI3K/Akt/e-NOS
Modulación mTOR
Modulación BAX
Activación STIM-1/ORAI 1-3
Activación RISK
Modulación HIF-1 α
Anti-oxidante
Activación Nrf2
Activación HO-1
Anti-fibrótico
Activación AMPK

Por su parte, dentro de los compuestos fenólicos, los flavonoides han sido evaluados en varios ensayos pre-clínicos dadas sus probadas propiedades anti-oxidantes y anti-inflamatorias. Los principales representantes han sido el resveratrol y el floroglucinol, evidenciando una importante actividad anti-aterosclerótica tanto en modelos de pequeños como grandes animales, demostrando a través de un análisis proteómico preservar la depleción de enzimas anti-oxidantes que ocurre durante la reperusión, y consiguiendo así una reducción en la aparición de nuevos eventos isquémicos y una mayor supervivencia final (325-327).

Los ácidos grasos pertenecen a otro grupo químico con efecto cardioprotector. Específicamente, los ácidos grasos Omega-3, que han demostrado reducir el área del infarto en un modelo murino de IAM a través de múltiples mecanismos, como su capacidad de optimizar la función endotelial, sus propiedades anti-inflamatorias, y su actividad como inhibidor plaquetar, todo lo cual también le confiere un efecto estabilizador de las placas de aterosclerosis (328-330). Sin embargo, un metaanálisis en pacientes con IAM no detectó efectos significativos a nivel de reducción de eventos clínicos o mortalidad CV (331).

Otro de los ácidos grasos que ha tenido resultados positivos en ensayos pre-clínicos ha sido el ácido α -lipoico, gracias a sus propiedades anti-oxidantes e inhibitorias de la síntesis endógena de ROS. A su vez, el ácido α -lipoico se encuentra involucrado en el metabolismo energético cardíaco, permitiendo la oxidación de diversos cetoácidos dentro de los cardiomiocitos limitando el proceso de lipotoxicidad (332). Sin embargo, su efectividad en el ámbito clínico no ha sido valorada en profundidad.

Por su parte, la carnitina, que representa un sustrato indispensable para la correcta transferencia de ácidos grasos a través de la membrana mitocondrial para su β -oxidación, ha sido administrada en diversos estudios en modelos murinos de daño por I/R, probando su efectividad al optimizar el metabolismo energético sometido a isquemia, mediante la estimulación del transporte de ácidos grasos acumulados dentro de los cardiomiocitos durante la reperfusión para su procesamiento, y disminuyendo así el daño oxidativo e inflamatorio derivado de la cardio-lipotoxicidad (333). No obstante, su traslación a ensayos con humanos nuevamente ha demostrado resultados discordantes. En un grupo de pacientes con cardiopatía isquémica sometidos a cirugía de revascularización miocárdica, la suplementación con este nutracéutico no redujo parámetros de remodelado ventricular adverso aunque sí se observó una mejoría estadísticamente significativa de la función sistólica del VI (334). Por otro lado, su administración en forma crónica a pacientes con diagnóstico de miocardiopatía dilatada e insuficiencia cardíaca avanzada se asoció con una mayor supervivencia del grupo tratado con un seguimiento a 3 años, aunque teniendo en cuenta que dicho estudio fue desarrollado previo a la adopción del tratamiento farmacológico moderno, lo cual podría influir en el impacto real obtenido (335).

Asimismo, la suplementación crónica de diversos aminoácidos, y en particular la taurina, ha probado un efecto cardioprotector mediado por su inhibición del RAAS, evitando las consecuencias clínicas derivadas de su activación, y preservando la función mitocondrial en el daño por I/R, todo lo cual redundaría en una mejoría de la supervivencia celular (336, 337). Dentro del grupo de los minerales, los principales compuestos utilizados como terapia frente al daño por I/R han sido el zinc y el magnesio. Estos minerales participan activamente en numerosos procesos enzimáticos e intervienen directamente en la homeostasis celular. La administración de ambos minerales en forma de post-condicionamiento en modelos animales de cardiopatía isquémica ha demostrado reducir el área final del infarto y mejorar la recuperación de la función ventricular (338-340).

Por último, la administración de la coenzima Q10 ha permitido limitar la disfunción endotelial asociada a los procesos de isquemia y reperfusión, optimizando la contractilidad miocárdica en modelos animales de IAM (341), y demostrando ser eficaz en reducir el daño por I/R a través de un incremento en la capacidad enzimática de las enzimas superóxido

dismutasa (SOD) y catalasa, para prevenir efectivamente el daño celular por estrés oxidativo (342).

A nivel de la utilización de nutraceuticos en el tratamiento de la IC post-infarto, una revisión sistemática de 40 estudios evaluó su efectividad en forma complementaria a la terapia médica recomendada por guías de práctica clínica. La mayor evidencia provino principalmente de un único estudio, el Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Insufficienza cardiaca (GISSI-HF), randomizado, controlado y doble-ciego que evaluó en más de 7.000 pacientes el uso de ácidos grasos poli-insaturados en pacientes con IC en clase funcional II-III, demostrando una modesta pero significativa reducción de la mortalidad del 8% (IC 99%, 0,84-0,99) y de hospitalizaciones CV en un 7% (IC 99%, 0,87-0,99) en todo el espectro de la función ventricular (aunque más del 90% poseían una FEVI<40%) (343). Sin embargo, otras revisiones sistemáticas del tema han evidenciado un efecto nulo con diversos nutraceuticos a nivel de aparición de eventos y mortalidad total (289). Esta variabilidad observada podría deberse a estudios con muestras muy limitadas de pacientes, con diseños metodológicos heterogéneos, y muchos de los cuales se habían implementado previo a la utilización del bloqueo neuro-humoral empleado en la actualidad (344).

Una estrategia adicional de relevancia para mejorar la efectividad de la terapia con nutraceuticos en el ámbito de la protección cardiovascular consistió en administrar una suplementación combinada de estos compuestos, derivados de distintos grupos químicos. El objetivo final consistió en emplear diversos mecanismos de acción y dianas moleculares, para obtener un efecto aditivo producto de su asociación, teniendo una actividad sinérgica sobre diversos procesos enzimáticos, y de esta forma conseguir utilizar dosis menores de cada nutraceutico individual y limitar sus potenciales efectos adversos (283). En su mayor parte, para investigar su actividad cardioprotectora se emplearon una combinación de levadura de arroz rojo (con diversas concentraciones de monacolina K), junto a nutraceuticos del grupo de los compuestos fenólicos, fitoestrógenos, minerales, vitaminas, e incluyendo a también *Silybum marianum* (345-348). En estudios pre-clínicos y en humanos se evidenció una mayor actividad ateroprotectora, con reducción del daño endotelial y promoción de un efecto anti-inflamatorio, aunque sin traducirse esto en un impacto significativo sobre eventos CV mayores. Por otro lado, la quercetina, en asociación con diversos flavonoides, demostró un importante efecto de inhibición plaquetar, mediada a través de un incremento en la producción de óxido nítrico, disminuyendo el potencial oxidativo del peróxido de hidrógeno y superóxido, y estimulando una reducción en la producción de TXA2 derivada de la inhibición de la protein-quinasa C y Cox 2 (349, 350), tanto a nivel in vivo como in vitro (351, 352).

Esta tesis se ha centrado sobre dos nutraceuticos específicos que se desarrollan a continuación.

3.6.3. Espirulina

La espirulina corresponde a un nutraceutico derivado de una microalga espiral miembro de las cianobacterias (353). Las principales especies en la actualidad corresponden a *espirulina platensis*, *espirulina máxima* y *espirulina fusiforme*. Constituye un nutraceutico con un elevado contenido proteico de alta calidad incluyendo a la mayoría de los aminoácidos esenciales, y es una fuente rica de minerales, vitaminas y anti-oxidantes (conteniendo ficocianinas, carotenoides, tocoferoles y compuestos fenólicos) (354). Adicionalmente, posee aproximadamente un 5% de ácidos grasos poli-insaturados, entre los que se encuentran el ácido linoleico, ácido eicosapentaenoico y docosahexaenoico (353, 355). La espirulina es considerada un nutraceutico seguro para el consumo humano con un perfil de bioseguridad favorable en diversos estudios pre-clínicos (355).

En cuanto a su actividad metabólica, la espirulina ha demostrado múltiples efectos positivos. En pacientes obesos, evidenció un impacto significativo sobre el peso corporal, consiguiendo una reducción del índice de masa corporal y del perímetro de cintura (356, 357). Esta actividad podría estar mediada por una inhibición en la diferenciación adipocitaria, asociada a una disminución en la acumulación intra-hepática de lípidos y una modulación del centro cerebral del apetito promovida por la colecistoquinina, una hormona liberada por la acción de la fenilalanina, aminoácido presente en la composición química de la espirulina (358, 359).

En tanto a su actividad sobre el tono vasomotor, la suplementación con espirulina en pacientes de riesgo CV elevado se acompañó de una disminución significativa en los valores de TA (360, 361). Uno de los principales componentes de la espirulina, la ficocianina, sería la responsable de este efecto al inducir un incremento en la función de la NOS endotelial y limitar directamente la funcionalidad de la enzima convertidora de angiotensina, bloqueando así la actividad del RAAS (362).

De la misma forma, la espirulina ha sido evaluada para el tratamiento de la dislipemia en distintos ensayos clínicos, consiguiendo una significativa reducción en los niveles de colesterol total (entre un 10-33% dependiendo de la dosis empleada), C-LDL (15-45%) y triglicéridos (23-28%), con un incremento en los valores del colesterol de lipoproteínas de alta densidad (C-HDL) (del 11,5 al 15%) (355, 356, 360, 363). Sus mecanismos fisiopatológicos han sido investigados a nivel experimental, donde se ha demostrado una inhibición en la absorción yeyunal de colesterol y en la reabsorción del ácido biliar (364), aumentando la excreción lipídica fecal (365). A su vez, limita la función de la enzima 3-

hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A (HMG-CoA) reductasa e incrementa la actividad de la lipoprotein-lipasa (LPL), produciendo un efecto hipocolesterolémico al reducir el C-LDL y triglicéridos (366).

Respecto al metabolismo de la glucosa, ensayos clínicos con espirulina en pacientes obesos y con DM tipo 2 han evidenciado una disminución en los niveles plasmáticos de glucosa y de la HbA1c (363). El mecanismo estaría relacionado en parte con el alto contenido proteico de espirulina, que reduciría la absorción intestinal de glúcidos, a la vez que estimula la secreción endógena de insulina pancreática (363). Sin embargo, de forma similar a lo observado con otros tipos de nutraceuticos, algunos estudios han presentado resultados disímiles, con un efecto neutro a nivel metabólico y sin demostrar un impacto significativo en los factores de riesgo investigados (360, 361).

Por último, el efecto cardioprotector de la espirulina, y en especial sobre el daño por I/R, no ha sido prácticamente evaluado previamente. Su potencial efecto sobre el corazón se ha analizado únicamente en un modelo de cardiotoxicidad por doxorubicina, tanto en animales pequeños (ratón) como in vitro en cardiomiocitos humanos, observándose una reducción significativa en los puntos finales de lipoperoxidación, IC y mortalidad (367, 368). A su vez, la espirulina ha demostrado efectos citoprotectores tanto en modelos animales como humanos y ha mejorado los parámetros de disfunción vascular y endotelial (369, 370). Esto es debido a su importante actividad antiinflamatoria y anti-oxidante, evidenciadas a través de un aumento en los niveles de IL-2 y reducción de IL-6, e induciendo la función de la enzima SOD (361, 371). La ficocianina, junto al β -caroteno, tendrían un papel principal en esta acción, reduciendo la presencia de ROS, la producción de nitritos y lipoperoxidación hepática, a la vez que inhiben la actividad de la enzima NOS inducible (iNOS), Cox-2, TNF- α y NF- κ B (355, 372, 373),

Por lo tanto, la espirulina constituiría un candidato nutraceutico de gran interés para evaluar su impacto en la prevención del daño por I/R en un modelo con adecuado potencial traslacional.

3.6.4. *Silybum marianum*

La planta *Silybum marianum*, más comúnmente conocida como Cardo mariano, es un nutraceutico fitoquímico perteneciente a la familia *Asteraceae*, utilizada desde hace más de dos mil años para el tratamiento de diversas condiciones clínicas. Se encuentra compuesta por un conjunto de biomoléculas activas, de las cuales el 60 a 80% de ellas corresponden a flavonolignanos, fenoles naturales híbridos (parte flavonoide y parte lignano). Los flavonoides más abundantes corresponden a la silibinina A y silibinina B, que constituyen los componentes funcionales básicos de su principal compuesto, la silimarina

(374). El porcentaje restante se encuentra representado principalmente por ácidos grasos poliinsaturados (50% linoleico, 30% oleico) (375).

Silybum marianum ha demostrado un adecuado perfil de seguridad, y se encuentra comercializada en forma de cápsulas en dosis variables. Su biodisponibilidad es baja y dependiente en gran medida de las sustancias complementarias utilizadas como vehículo del nutraceutico (376).

Estudios iniciales pre-clínicos y posteriormente en humanos han evidenciado propiedades beneficiosas a nivel CV derivadas de su potente actividad anti-inflamatoria y anti-oxidante (377, 378). Estos efectos se encuentran mediados, por un lado, por sus propiedades inmunomoduladoras al inhibir la vía de las proteína cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y el NF- κ B, y por el otro, al inducir una importante capacidad anti-oxidante a través de distintos mecanismos complementarios: restituyendo la acción del factor nuclear 2 (376, 379), induciendo la activación de la SOD, así como una reducción en la peroxidación lipídica y una mayor quelación de metales pesados (380-383).

Adicionalmente, *Silybum marianum* ha probado tener un impacto beneficioso sobre los principales factores de riesgo CV: consigue una disminución en los niveles plasmáticos de glucemia a través de un incremento en la insulino-sensibilidad y protección frente al daño de células- β pancreáticas; promueve la vasodilatación regulando los valores de TA; reduce la albuminuria previniendo el daño nefrótico; y modula el perfil lipídico disminuyendo el grado de esteatosis hepática (378, 384-387). Los mecanismos principales responsables de esta actividad metabólica corresponden a una reducción en los niveles de IL-1 β y Cox-2, así como una disminución en la producción de colesterol mediada por una inhibición en la actividad de la enzima HMG-CoA reductasa, paso limitante en la síntesis endógena de colesterol (388-391).

Por lo tanto, derivado de su importante actividad citoprotectora, *Silybum marianum* ha sido utilizada para el tratamiento de los procesos de daño por I/R a nivel de distintos órganos, con una adecuada efectividad global (382, 392-394). En este contexto, nuestro grupo ha demostrado previamente en un modelo con alto impacto traslacional (i.e., porcino) los beneficios cardioprotectores de *Silybum marianum* en el marco del IAM. Concretamente, se ha evidenciado por vez primera que la ingesta de *Silybum marianum* reduce el daño por I/R preservando la función mitocondrial e incrementando el tejido miocárdico viable post-infarto (395). Asimismo, se ha detectado una disminución significativa en la activación de las vías del factor de crecimiento transformante β 1 (TGF- β 1) y SMAD 2/3 (implicadas en la fibrosis miocárdica), e inhibición de las metaloproteinasas 2 y 9 (MMP-2/9). Todo ello se asoció finalmente a una mejoría en la función ventricular posterior a un IAMCEST (395). Sin embargo, aún queda por determinar un posible efecto protector sobre el remodelado ventricular adverso y sus consecuencias deletéreas.

3.7. Modelo animal de infarto agudo de miocardio

El primer y principal desafío en la investigación traslacional lo representa la apropiada selección y establecimiento de un modelo animal acorde de enfermedad, que permita reproducir la fisiopatología humana de la forma más semejante posible, y considerando los tratamientos concomitantes y situaciones clínicas asociadas (396). Esto, a su vez, deberá establecerse dentro del marco de los estándares de experimentación animal, adecuándose a las recomendaciones de las guías ARRIVE y en respeto de las 3Rs desarrolladas en 1959 por Russell y Burch: reemplazo, refinamiento y reducción de animales en investigación (397, 398). Regularmente, es necesario encontrar un equilibrio entre el empleo de un modelo animal adecuadamente reproducible y al mismo tiempo costo-efectivo, que tenga la relevancia necesaria para su traslación a humanos.

Sin embargo, la alta complejidad de la enfermedad aterotrombótica, así como la etiología multifactorial de la patología CV y en especial de los mecanismos de daño por I/R dificultan enormemente la instauración de un modelo animal conveniente. Del mismo modo, las diferencias inter-especies, la variabilidad en las técnicas y protocolos utilizados y la heterogeneidad en el diseño metodológico de los estudios pre-clínicos han contribuido aún más a limitar la traslación humana de los hallazgos experimentales. (399).

3.7.1. Características y potencial traslacional de modelos animales

Los roedores habitualmente constituyen el modelo animal inicial para la fase exploratoria de la investigación pre-clínica. El uso de ratas y ratones se ve favorecido por el amplio conocimiento de su información genética, la posibilidad de introducir modificaciones particulares en genes, su corto período de gestación y los bajos costos asociados a su mantenimiento (396). Por su parte, los conejos constituyen animales de transición entre pequeños modelos a grandes animales, debido a que su relativo tamaño permite la realización más definida de IAM quirúrgicos, a la vez que presentan una funcionalidad electrofisiológica semejante a los humanos (400). Sin embargo, el sistema cardiovascular global de estos modelos dista en gran medida de la condición humana.

De los modelos animales de ECV empleados en la actualidad, el modelo porcino ha sido establecido por la comunidad científica internacional como el más relevante y representativo en investigación pre-clínica y traslacional (401), debido a las múltiples características que lo definen. Por un lado, tanto la anatomía coronaria, el tamaño de los vasos sanguíneos, y la estructura y función cardíacas se correlacionan apropiadamente a su homólogo humano (402). A diferencia del modelo canino, los cerdos exhiben dominancia

coronaria derecha en forma similar a humanos, con una clara separación entre los diferentes territorios coronarios, lo cual permite la inducción de infartos precisos y bien localizados dada la escasez de circulación colateral que sí se encuentra presente en perros (403, 404). Adicionalmente, la oclusión experimental de una arteria coronaria en cerdos induce un IAM en forma análoga a los territorios afectados en humanos y con un proceso de remodelado ventricular adverso comparable (401).

En este sentido, la principal más frecuentemente intervenida en los modelos de cardiopatía isquémica corresponde a la arteria coronaria izquierda, especialmente ambas ramas principales correspondientes a la arteria circunfleja y descendente anterior. La afectación de la primera permite generar infartos más pequeños y localizados en la pared lateral del ventrículo izquierdo, lo cual reduce considerablemente la aparición de complicaciones y mortalidad intra-procedimiento y presenta un menor impacto a nivel de la disfunción cardíaca. Por el contrario, la oclusión de la arteria descendente anterior produce infartos antero-apicales y septales con mayor compromiso de tejido miocárdico dañado, lo cual redundaría en un aumento de los eventos arrítmicos e IC aguda durante la intervención, y produce un deterioro más importante de la función ventricular (401). Si bien esto implica una mayor tasa de mortalidad inmediata o en el corto plazo, genera zonas de infarto más significativas y a la vez severas que resultan fundamentales para evaluar adecuadamente la eficacia de las estrategias terapéuticas investigadas, ya que impactos menores en la función y remodelado tendrían menor potencia para demostrar la efectividad de una nueva terapia en estudio. Asimismo, el modelo porcino presenta una alta tasa de supervivencia (>70%) con técnicas percutáneas y protocolos de intervención modernos, permitiendo la inducción de un infarto graduable según la necesidad, dependiendo del sitio de oclusión coronaria y el tiempo relativo de isquemia (405).

3.7.2. Modelo porcino de infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST

En consecuencia, el modelo porcino de IAM representa el estándar en investigación animal traslacional, y puede ser establecido a través de la oclusión coronaria tanto en forma quirúrgica como percutánea. Los modelos quirúrgicos implican la realización de toracotomía mediana y ligadura coronaria directa. Sus ventajas radican en asegurar una visualización amplia y abierta del territorio estudiado así como la posibilidad de evaluar directamente la función contráctil cardíaca durante el procedimiento, aunque en contraparte presentan una más elevada mortalidad peri-intervención, con mayor tasa de complicaciones asociadas (inflamación, infecciones, sangrado) así como un importante

daño muscular y tisular residual (derivado de la apertura mecánica de tórax) que puede desencadenar una respuesta inflamatoria adicional al del propio evento isquémico.

Para solventar dichas dificultades, el modelo percutáneo de IAM ha sido desarrollado, habiéndose observado un incremento sustancial en su utilización en forma paralela al empleo más generalizado de la ICP en humanos. Inicialmente, distintas estrategias percutáneas fueron empleadas para el establecimiento del proceso isquémico, como la ablación alcohólica intra-coronaria o intra-miocárdica (406, 407), la inyección de distintos materiales (gel de agarosa, mezclas de trombina/fibrinógeno, esponjas de espuma y microesferas) (408-411) o la administración de sustancias trombogénicas para inducir trombosis intracoronaria in situ (412). Sin embargo, todas estas estrategias se acompañaban de varias complicaciones que limitaban su aplicabilidad. Tanto la embolización con alcohol como la utilización de sustancias químicas producían una clase de infarto que no reproducía íntegramente al que se hubiese generado por oclusión de la circulación coronaria nativa, a la vez que dichas sustancias podían refluir hacia otros territorios impidiendo delimitar adecuadamente el sitio concreto del infarto.

Posteriormente, se implementó el inflado de balón intra-coronario para la obstrucción transitoria del flujo sanguíneo, lo cual permitió demarcar con detalle el sitio de oclusión propuesto así como el territorio afectado, sin las complicaciones derivadas de la cirugía cardíaca. Este método no sólo incrementó la fiabilidad de los datos obtenidos sino que además permitió un seguimiento a mediano/largo plazo, algo que con los métodos quirúrgicos resultaba menos viable (413). Los estudios realizados en nuestro grupo y en otros han evidenciado que la oclusión con balón intra-coronario a nivel proximal de la arteria descendente anterior en conjunción a un tiempo de isquemia más prolongado (90 minutos) se asoció con un mayor tamaño final del infarto (414), equivalente a hasta un 75% del total del corazón isquémico en riesgo (415, 416).

4. HIPÓTESIS

La cardiopatía isquémica representa la primera causa de mortalidad en el mundo, con un considerable impacto en la calidad de vida y pronóstico de los pacientes que la padecen, y una elevada carga económica y social para los sistemas de salud.

En el último tiempo ha quedado en relevancia que un amplio número de pacientes que sufren un IAMCEST (oclusión coronaria completa), pese a recibir una terapia de reperfusión efectiva de forma temprana, presentan áreas de infarto de gran tamaño que contribuyen al desarrollo posterior de un remodelado ventricular adverso y progresan en etapas subsiguientes a diversos grados de disfunción ventricular e insuficiencia cardíaca. De hecho, el tamaño final del infarto es uno de los principales determinantes del pronóstico global de esta patología.

A pesar de los intensos esfuerzos destinados a la búsqueda de estrategias terapéuticas capaces de mitigar las consecuencias deletéreas derivadas tanto del propio infarto en sí, así como del daño establecido por el proceso de isquemia/reperfusión, actualmente no existen terapias de cardioprotección que se implementen a nivel clínico lo que refuerza la necesidad de buscar posibles estrategias o nuevos compuestos capaces de proteger el corazón infartado.

Los nutraceuticos corresponden a un grupo de compuestos bioactivos de origen natural, que además de ser ricos en determinados nutrientes poseen comprobados beneficios para la salud cardiovascular al ejercer potentes efectos anti-inflamatorios y antioxidantes, favoreciendo la supervivencia celular y modulando positivamente diversos estados metabólicos. Sin embargo, su utilidad y efectividad como potenciales agentes cardioprotectores en el marco de un IAMCEST queda aún por ser investigado.

En base a lo anteriormente expuesto, nuestra hipótesis de trabajo es la siguiente:

La ingesta regular de espirulina y *Silybum marianum* (nutraceuticos) ejercerá efectos cardioprotectores directos que limitarán el daño estructural y funcional desencadenados en el marco de un IAMCEST.

5. OBJETIVOS

Esta hipótesis se abordará con los siguientes dos objetivos:

5.1. Objetivo 1

Estudios previos han evidenciado que la espirulina produce efectos anti-ateroscleróticos y reduce la cardiotoxicidad inducida por el tratamiento quimioterápico con antraciclinas (doxorrubicina). Sin embargo, el potencial de la espirulina para limitar el daño miocárdico y mejorar la disfunción ventricular en el contexto del infarto agudo de miocardio (daño por I/R) aún no ha sido determinado.

En base a estas observaciones, y teniendo en cuenta las propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y citoprotectoras de este nutraceutico, en nuestro primer objetivo investigamos si la suplementación oral diaria con espirulina reduce el tamaño de infarto y mejora la función cardíaca post-IAMCEST.

5.2. Objetivo 2

Hemos demostrado previamente que la ingesta de *Silybum marianum* (Cardo mariano) durante 10 días previa inducción de un IAMCEST limita el tamaño de infarto y mejora la contractibilidad cardíaca. Estos beneficios se asociaron, a nivel molecular y celular, con un menor estrés oxidativo, una preservación de la función mitocondrial y una mayor supervivencia del miocardio dañado (336). Asimismo, también hemos descrito, en el marco del IAMCEST, que la revascularización del miocardio isquémico induce la acumulación de triglicéridos a nivel cardíaco (cardiolipotoxicidad), lo cual favorece el remodelado ventricular adverso post-infarto (376).

En base a esta evidencia, y teniendo en cuenta las propiedades metabólicas beneficiosas atribuidas a *Silybum marianum*, en nuestro segundo objetivo analizamos si la ingesta regular de este nutraceutico previene de los efectos deletéreos asociados a la cardiolipotoxicidad post-infarto contribuyendo así a atenuar el remodelado ventricular adverso y preservar la función miocárdica.

Ambos objetivos se llevaron a cabo utilizando un modelo porcino altamente traslacional mediante la inducción percutánea transcatéter de un IAMCEST, en el que se combinaron

la evaluación de parámetros cardíacos estructurales y funcionales, estudios moleculares en distintos tejidos junto a análisis hematológicos y bioquímicos.

6. MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS

Los materiales y métodos utilizados se encuentran detallados en los artículos publicados como parte del proyecto de esta tesis doctoral. El artículo 1 concierne la investigación relacionada al objetivo 1 de estudio, mientras que el artículo 2 desarrolla la hipótesis correspondiente al objetivo 2.

- **Artículo 1:**

Vilahur G*, Sutelman P*, Ben-Aicha S, Mendieta G, Radiké M, Schoch L, Casaní L, Borrell-Pagés M, Padro T, Badimon L.

*** both authors contributed equally**

Supplementation With Spirulina Reduces Infarct Size and Ameliorates Cardiac Function in a Pig Model of STEMI.

Frontiers in Pharmacology. 2022 May 3; 13: 891801. DOI: 10.3389/fphar.2022.891801.

- **Artículo 2:**

Vilahur G, Sutelman P, Mendieta G, Ben-Aicha S, Borrell-Pages M, Peña E, Crespo J, Casaní L, Badimon L.

Triglyceride-induced cardiac lipotoxicity is mitigated by Silybum marianum.

Atherosclerosis. 2021 May; 324: 91-101. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2021.03.014.

6.1. Artículo 1

La espirulina constituye un nutraceutico con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y citoprotectoras. El presente trabajo investigó si la administración de espirulina induce un efecto cardioprotector en un modelo porcino de IAMCEST. Con esa finalidad, dicho nutraceutico fue administrado por un período de 10 días, y posteriormente se llevó a cabo la inducción de un IAMCEST mediante oclusión coronaria percutánea por 1,5 horas seguido de un período de 2,5 horas de reperfusión. La espirulina demostró ejercer efectos protectores frente al daño por I/R que se asociaron a una reducción significativa en el tamaño final del infarto y una mejora en la función ventricular.



Supplementation With Spirulina Reduces Infarct Size and Ameliorates Cardiac Function in a Pig Model of STEMI

Gemma Vilahur^{1,2†}, Pablo Sutelman^{1†}, Soumaya Ben-Aicha¹, Guiomar Mendieta^{1,3}, Monika Radiké¹, Leonie Schoch¹, Laura Casan^{1,2}, Maria Borrell-Pagés¹, Teresa Padro^{1,2} and Lina Badimon^{1,2,4*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Lei Xi,
Virginia Commonwealth University,
United States

Reviewed by:

Coert J. Zuurbier,
Academic Medical Center,
Netherlands
Petra Kleinbongard,
Essen University Hospital, Germany

*Correspondence:

Lina Badimon
lbadimon@santpau.cat

[†]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Translational Pharmacology,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

Received: 08 March 2022

Accepted: 14 April 2022

Published: 03 May 2022

Citation:

Vilahur G, Sutelman P, Ben-Aicha S,
Mendieta G, Radiké M, Schoch L,
Casan L, Borrell-Pagés M, Padro T
and Badimon L (2022)
Supplementation With Spirulina
Reduces Infarct Size and Ameliorates
Cardiac Function in a Pig Model
of STEMI.
Front. Pharmacol. 13:891801.
doi: 10.3389/fphar.2022.891801

¹Cardiovascular Program-ICCC, Research Institute Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, IIB-Sant Pau, Barcelona, Spain,
²CiberCV, Institute Carlos III, Madrid, Spain, ³Department of Cardiology, Clinic Hospital, Barcelona, Spain, ⁴Autonomous
University of Barcelona, Barcelona, Spain

Background and Aims: Myocardial infarction (MI) is the clinical manifestation of atherosclerotic coronary artery disease. Spirulina is an algae known to ameliorate cardiometabolic disorders and with proven anti-inflammatory and anti-oxidant effects. We investigated, in a highly translatable animal model, whether oral supplementation with spirulina protects against the deleterious effects triggered by ST-elevation MI (STEMI).

Methods: Pigs were fed a regular diet supplemented with spirulina (1 g/animal/bid) or placebo-control for 10 days. Thereafter, animals were subjected to 1.5 h percutaneous balloon-induced coronary occlusion (STEMI) followed by 2.5 h reperfusion and then sacrificed. We assessed infarct size and cardiac function. Blood samples and infarcted and remote myocardial tissue were obtained.

Results: Spirulina supplementation reduced infarct size by 64%, increased myocardial salvage by 18%, and improved cardiac function by 30% vs. controls ($p < 0.05$). These benefits were associated with attenuation in DNA-oxidative damage and apoptotic markers and increased iNOS in the infarcted myocardium, higher AMPK activation in the remote myocardium, and lower myocardial MCP-1 expression. Systemically, spirulina attenuated Cox-2 expression in STEMI-activated peripheral blood mononuclear cells and enhanced TNF- α release acutely post-STEMI. Additionally, spirulina decreased weight gain progression over time ($p < 0.05$) without changes in lipids, glucose, liver or kidney parameters.

Conclusion: A 10-day supplementation with spirulina exerts cardioprotection in a preclinical setting of STEMI by limiting cardiac damage and improving ventricular contractility through anti-oxidative, anti-inflammatory, and anti-apoptotic mechanisms.

Keywords: spirulina, STEMI, cardioprotection, antioxidation, anti-inflammatory, anti-apoptotic, weight management

INTRODUCTION

Despite significant improvement in the treatment of atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD), cardiovascular mortality remains the leading cause of death in developed countries (Badimon et al., 2017). Rupture of coronary atherosclerotic plaques and subsequent thrombus formation leads to coronary vessel occlusion and ensuing myocardial infarction (MI). Following an acute ST-segment elevation myocardial infarction (STEMI), the size of the resultant infarction is the major determinant of post-infarct left ventricular dysfunction and the subsequent development of heart failure (Heusch and Gersh, 2017), a condition which exerts a considerable global burden on healthcare and economic resources (Moran et al., 2014). New treatment strategies are needed in order to limit myocardial injury and improve clinical outcomes in patients presenting with acute STEMI.

Nutraceuticals are a group of naturally produced bioactive compounds that have proven health benefits besides their nutritive properties (Badimon et al., 2010; Vilahir et al., 2018; Carrizzo et al., 2020). In this specific cluster, microalgae have stood out as photosynthetic microorganisms capable of generating biofunctional molecules with several cytoprotective activities. Particularly, spirulina, a filamentous cyanobacterium which accounts for up to 30% of the overall microalgal biomass produced worldwide (Costa et al., 2019). Spirulina is primarily comprised of proteins and essential aminoacids providing high nutritional value, but additionally contains phenolic phytochemicals including C-phycoerythrin, vitamins, polyunsaturated fatty acids, and an elevated concentration of beta-carotene, delivering substantial antioxidative, anti-inflammatory, and anti-atherosclerotic properties beyond its beneficial effects in metabolic-associated cardiovascular disorders (Finamore et al., 2017; DiNicolantonio et al., 2020). A systematic review including 18 randomized controlled trials has reported that spirulina supplementation is safe and displays positive effects in multiple metabolic syndrome components (Yousefi et al., 2019). As such, spirulina has shown to exert a noteworthy weight management capacity eliciting a reduction in both waist circumference and body mass index in several clinical trials (DiNicolantonio et al., 2020; Grosshagauer et al., 2020). Besides, several studies with spirulina have shown an improvement in insulin sensitivity and glucose uptake mediated by C-phycoerythrin activity, and, in some studies spirulina has displayed hypolipidemic properties (Park et al., 2008; Mazokopakis et al., 2014b; Serban et al., 2016). On the other hand, cell culture approaches have demonstrated the ability of spirulina to exhibit anti-atherosclerotic effects by preventing monocyte migration through direct inhibition of P- and E-selectin adhesion molecules (Vo and Kim, 2013; Ren et al., 2018), and to effectively inhibit doxorubicin-induced cardiac damage (Khan et al., 2005; Khan et al., 2006a). However, whether oral supplementation with spirulina is able to limit infarct size and ameliorate cardiac dysfunction in the setting of myocardial infarction remains to be addressed. With this in mind, we sought to examine the potential cardioprotective effects

associated with oral daily supplementation with spirulina in a highly translatable preclinical animal model of STEMI.

MATERIALS AND METHODS

Animal Procedures

Animal management was performed following European Directive 2010/63/EU and in accordance with the ARRIVE 2.0 guidelines (Percie du Sert et al., 2020) and complies with the '3Rs (Animal Ethics Infolink, 2019). Experimental protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committees.

Study Design

The experimental design involved crossbred commercial female swine ($n = 12$; Landrace $\times$ Largewhite) fed a regular pig chow diet randomly supplemented with spirulina (1 g/animal/bid; $n = 6$) or placebo-control ($n = 6$) for 10 days. Animals were fed a normocholesterolemic diet dosed at 3.5% of pig's body weight adjusted on a daily basis. The regular chow included: gross protein 15.1%; gross fat 3.40%; gross fiber 4.00%; gross ash 5.50%; calcium 0.81%; phosphorus 0.57%; sodium 0.15%; lysine 0.89%; methionine 0.24%. All pigs were monitored to ensure intake of their chow and exclude any potential bias due to a decrease in food intake. Spirulina capsules were composed of 100% spirulina platensis (Pranarom, ACL 7846467). Placebo tablets were comprised of standard commercially available gelatin capsules. At the end of the treatment period and 2 h after the last dosage, pigs were subjected to a 1.5 h experimental STEMI induction followed by 2.5 h phase of complete reperfusion (i.e., ischemia/reperfusion). Thereafter pigs were sacrificed and cardiac tissue samples collected. The dosage of spirulina administered in this study was selected according to the use in both pigs (Yordanova et al., 2015) and clinical trials (Huang et al., 2018).

Closed-Chest Animal Model of ST-Segment Elevation Myocardial Infarction

STEMI was experimentally induced by fluoroscopy-guided percutaneous coronary intervention as previously described (Vilahir et al., 2009; Mendieta et al., 2019a; Mendieta et al., 2020) in a preclinical animal model with human resemblance. Briefly, prior to the procedure, pigs were anesthetized with a combination of intramuscular tiletamine + zolazepam (7 mg/kg) + medetomidine (0.07 mg/kg). Animals received a continuous and stable flow of oxygen (inspired fraction of 0.5%) during all the intervention with permanent control of arterial saturation. Anesthesia was maintained with inhalatory isoflurane (2%) throughout the entire procedure (both in the course of myocardial infarction induction as well as in the reperfusion period). Continuous electrocardiographic monitoring with hemodynamic parameters was performed. Coronary occlusion of the mid left anterior descending artery posterior to the emergence of the first diagonal branch was induced by balloon inflation, verifying a Thrombolysis In Myocardial Infarction (TIMI) 0 flow downwards. A period of 1.5 h was sustained

with complete coronary obstruction and subsequently reperfusion was achieved by balloon deflation confirming TIMI 3 flow restoration.

Cardiac Function Evaluation

A Phillips iE33 echocardiography system equipped with a S5-1 Sector Array transducer was employed for the attainment of transthoracic echocardiography in every animal prior to STEMI induction, post-STEMI, and after 2.5 h of reperfusion as previously performed (Vilahur et al., 2014b). Left ventricle ejection fraction (LVEF) was assessed as a surrogate for LV global systolic function. All measurements were acquired by an independent operator blinded to treatment group.

Cardiac Sample Collection and Myocardial Damage Assessment

After the 2.5 h reperfusion period animals were injected with Evan's Blue dye to properly define the area-at-risk (AAR) in order to ensure comparable degree of jeopardized myocardium (i.e., ischemic heart). Subsequently, pigs were sacrificed during anesthesia with an intravenous administration of 10 ml KCl 2M. Hearts were carefully excised and segmented in six transverse divisions (1 cm width) in order to alternatively collect slices for 2,3,5-triphenyltetrazolium (TTC) staining (infarct size assessment) or molecular/immunohistochemical analyses. In this latter regard, myocardial samples from both infarcted and remote regions were obtained, frozen, pulverized in liquid nitrogen and minced in Tripure® or lysis buffer for RNA and protein isolation, respectively. The AAR and TTC staining were appraised by an independent blinded observer through planimetry assessment employing ImageJ® software analysis (NIH). Infarct size was expressed as % AAR.

Myocardial Oxidative Damage

Paraffin-embedded myocardial tissue from the infarcted region was cut and placed on poly-L-lysine-coated slides and deparaffinized. Antigen removal was required before staining for 8-hydroxyguanosine (8OH-G, mouse monoclonal antibody; Abcam ab48508), a sensitive biomarker of intracellular DNA damage induced by oxidative stress. Four images per animal were captured by Nikon Eclipse 80i microscope and digitized by Retiga 1300i Fast camera, and staining of the myocardial tissue was quantified and expressed as % stained area.

Molecular Footprint of the Infarcted Heart

We assessed in both the infarcted and remote myocardium protein expression levels of: 1) inducible nitric oxide synthase (iNOS); 2) monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), an inflammatory chemokine; 3) adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK) phosphorylation, a key marker of cardiac metabolism and autophagy; and 4) total and truncated caspase-3, a marker for apoptotic cell death execution. Besides, we also investigated caspase-3 transcript levels by real-time PCR-7000 Sequence Detection System of ABI PRISM (Applied Biosystems) by an assay-on demand. Protein expression was normalized to β -actin and presented in

arbitrary density units (AU) whereas for gene expression analyses, the threshold cycle (Ct) values were determined and normalized to the housekeeping 18S rRNA.

Systemic Inflammatory Response: Peripheral Blood Mononuclear Cells and Circulating Cytokine Levels

We assessed the impact of spirulina supplementation on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) activation and cytokine release. For this purpose, 20 ml of blood were collected into EDTA tubes at the three tested time points (prior-STEMI, post-STEMI, and 2.5 h post-reperfusion) from all animals. Blood samples were immediately subjected to Ficoll-paque Plus (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, United States) density gradient centrifugations to isolate PBMCs. PBMC were processed for protein analyses of cyclooxygenase 2 (Cox-2) which was normalized to Ponceau staining. We also analyzed tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) levels in plasma using commercially available enzyme-linked immunosorbent assay kits (porcine TNF- α and IL-1 β from Quantikine Porcine Kits from R&D Systems). According to the manufacturers, the minimum detection limits for TNF- α and IL-1 β were 23.4 and 39.1 pg/ml⁻¹, respectively.

Biochemical Plasma Analysis

Blood samples were obtained at baseline, day 10, prior-STEMI, acutely post-STEMI (5 min following coronary occlusion) and after 2.5 h of reperfusion (sacrifice) for haematological (System 9000, Serono-Baker Diagnostics) and biochemical analysis (glucose and lipid levels, and kidney and liver function parameters; Clima MC-15 RAL Biotechnologies).

Weight Control

Animals were subjected to weight assessment at baseline and after completion of the 10-day experimental period.

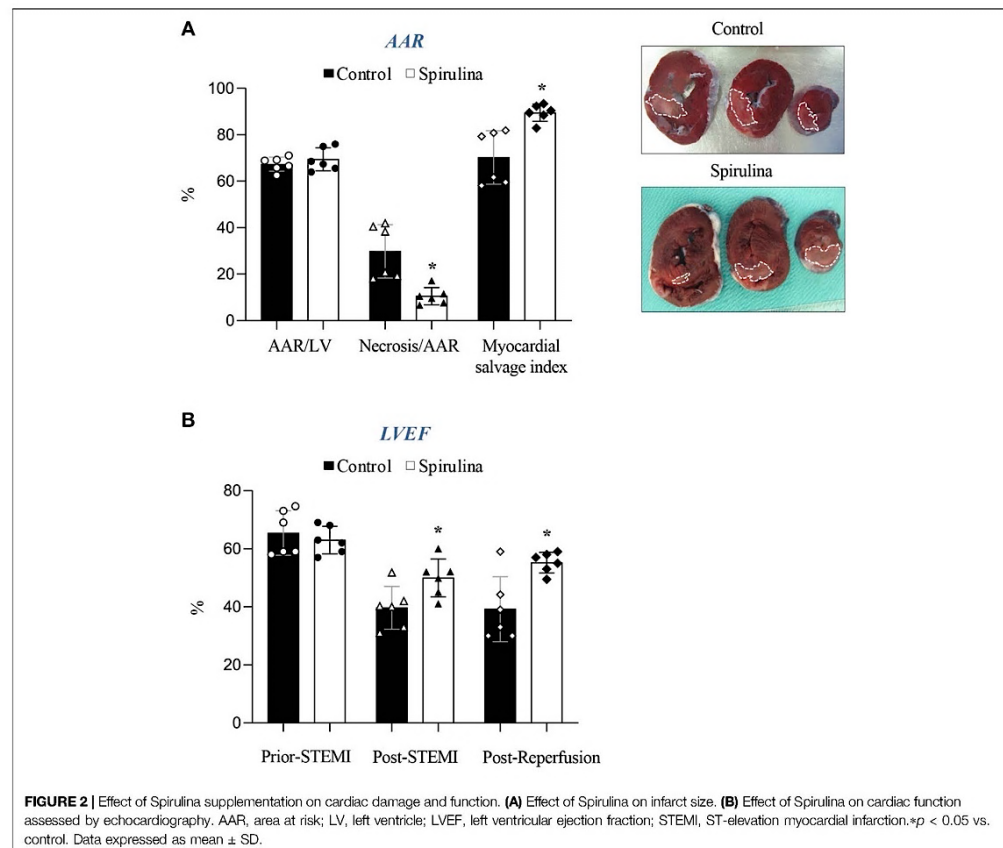
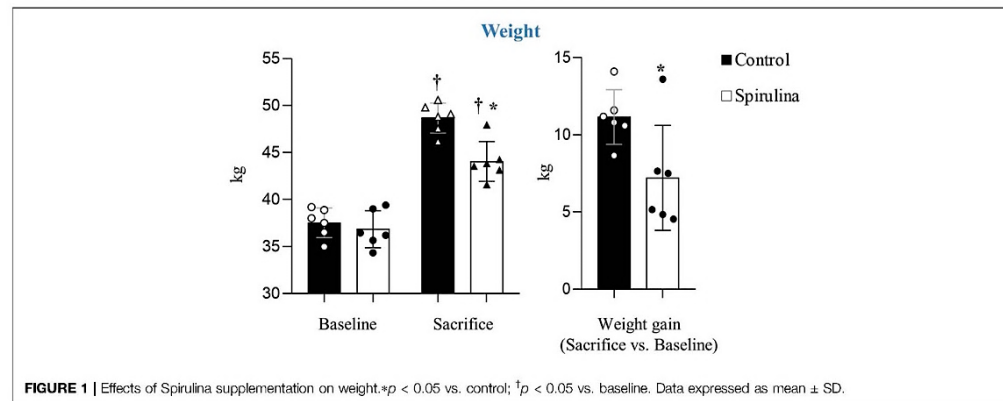
Statistical Analysis

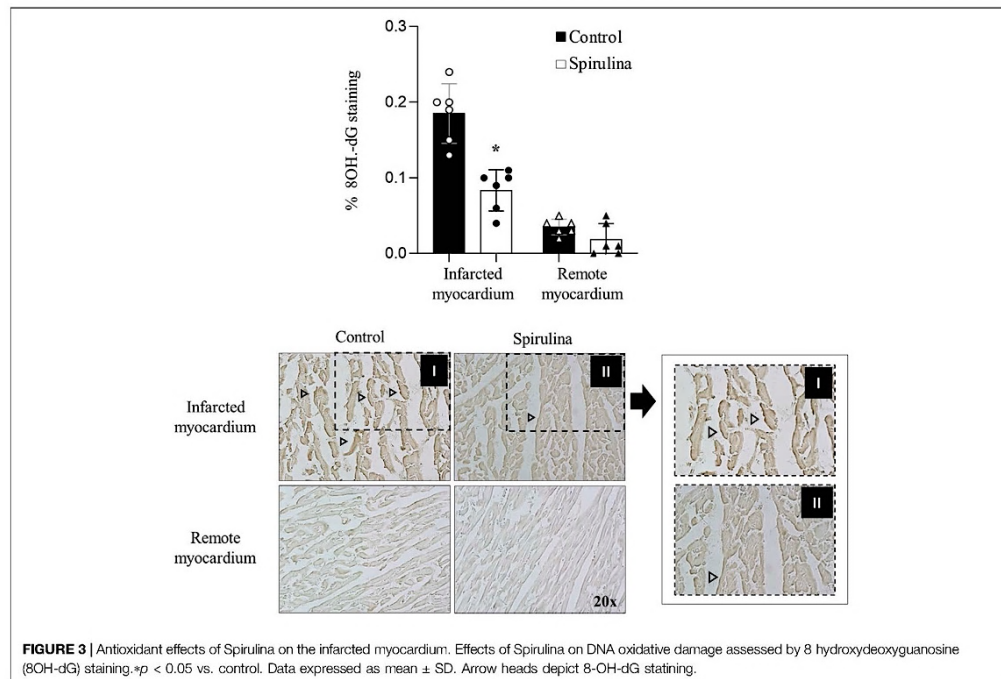
Continuous variables were expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). After testing for normal distribution (Shapiro-Wilk test), repeated ANOVA measures and paired t-test as appropriate were used to analyze variables within each group, whereas unpaired t-test was used for all single time-point measurements. A cut-off value of $p < 0.05$ was used to consider statistical significance. Statistical analyses were performed with the GraphPad Prism software package.

RESULTS

Spirulina Supplementation Limits Weight Gain

Weight gain was significantly lower in animals receiving spirulina supplementation as compared to controls (19% vs. 29%, respectively; $p = 0.01$; **Figure 1**).





Spirulina Supplementation Reduces Myocardial Damage and Improves Cardiac Function Acutely Post-ST-Segment Elevation Myocardial Infarction

Both placebo-control and spirulina-treated animals displayed a similar extent of jeopardized myocardium (AAR/LV) ($67.7\% \pm 3.5\%$ vs. $69.4\% \pm 4.9\%$, respectively; $p = 0.5$) indicating a comparable severity of balloon-induced myocardial ischemic damage (Figure 2A).

A 10-day supplementation regime with spirulina markedly limited infarct size by 64% as compared to placebo-control animals ($29.8\% \pm 11.5\%$ vs. $10.5\% \pm 3.7\%$ AAR, respectively; $p = 0.007$). Accordingly, myocardial salvage was 19% greater in the spirulina group as compared to placebo-control animals ($p < 0.05$).

The overall reduction in myocardial damage was associated with a 38% improvement in LVEF vs. controls, an effect already detected post-STEMI that persisted up to 2.5 h post-reperfusion ($p < 0.05$; Figure 2B).

Spirulina Supplementation Attenuates Myocardial DNA-Oxidative Damage

Spirulina supplemented-animals displayed a marked 58% reduction in oxidative DNA damage in the infarcted myocardium as compared to placebo-control animals ($p <$

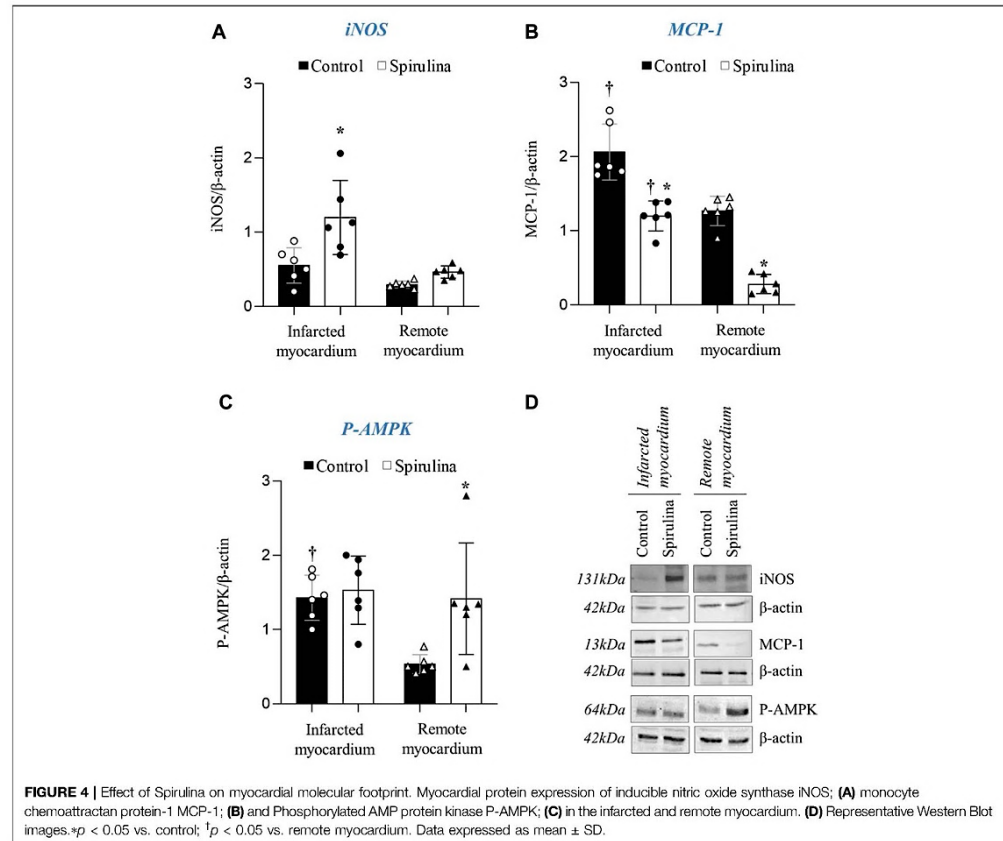
0.05; seen in dark-brown in Figure 3). 8OH-dG staining was barely detected in the remote myocardium of all pigs.

Effects of Spirulina on Myocardial Molecular Footprint

We assessed protein levels of iNOS, MCP-1, and P-AMPK. As observed in Figures 4A, D, spirulina supplementation led to a significantly higher iNOS protein level in the infarcted region ($p < 0.05$ vs. control animals) whereas exerted no impact on the remote myocardial tissue. Regarding MCP-1, spirulina supplemented-animals showed a significant reduction in both the infarcted and remote myocardium as compared to the control arm ($p < 0.05$; Figures 4B–D). P-AMPK showed higher levels in the infarcted myocardium of control pigs as compared to the remote myocardial region ($p < 0.05$) whereas levels were higher in the entire left ventricle of spirulina supplemented pigs ($p < 0.05$ vs. remote cardiac tissue from control pigs; Figures 4C,D).

Spirulina Supplementation Reduces Apoptosis Execution in the Infarcted Cardiac Region

Caspase-3 mRNA was found to be upregulated in the infarcted tissue of all animals as compared to remote cardiac regions;



yet, no differences were detected in caspase-3 protein expression (Figures 5A,B). In contrast, spirulina supplementation was associated with a significant lower levels of truncated caspase-3 in the infarcted cardiac region as compared to controls ($p < 0.05$; Figure 5C). No changes were observed in active caspase-3 in the remote myocardium of both animal groups.

Spirulina Supplementation Exerts Systemic Anti-Inflammatory Effects

Control animals showed an induction of Cox-2 protein expression in PBMCs acutely post-STEMI that was not found in spirulina supplemented animals (Figure 6A). All animals showed higher circulating levels of TNF- α 2.5 h post-reperfusion as compared to baseline, although these levels were significantly higher in the spirulina supplemented subgroup as compared to controls ($p < 0.05$). No changes

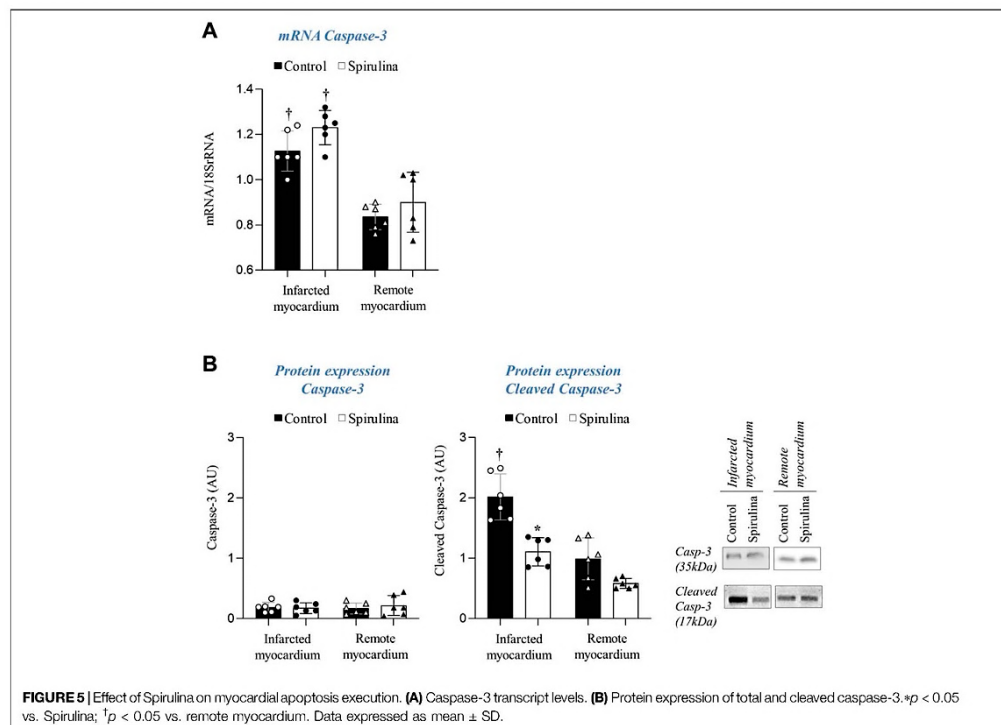
were detected in IL-1 β circulating levels in both groups at all tested time points (Figure 6B).

Spirulina Effects on the Metabolic Profile, and Hematological and Biochemical Parameters

Liver, kidney, lipid and glucose levels and hematological parameters were all within physiological ranges throughout the entire study (Table 1).

DISCUSSION

Atherosclerotic plaque rupture is the most common cause of MI (Vilabur et al., 2014a). MI-size largely determines patient's outcome. Hence, efforts have focused on the identification of strategies able to limit myocardial damage. In the following study

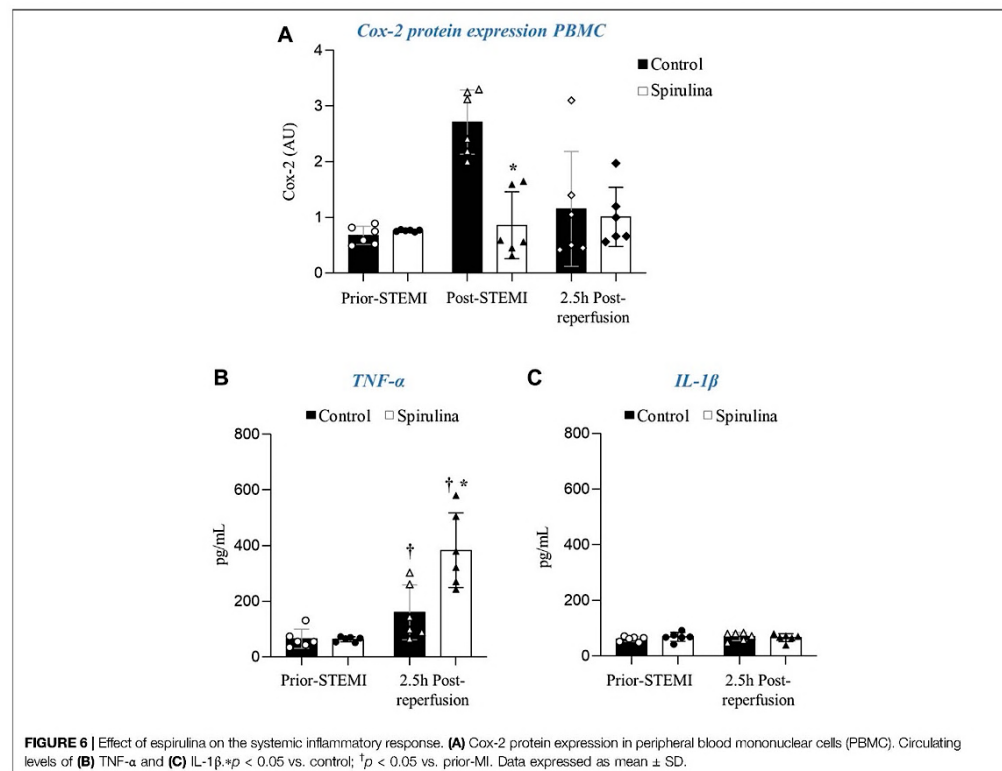


we demonstrate for the first time that a 10-day oral supplementation with spirulina exerts cardioprotection in a preclinical setting of STEMI by enhancing myocardial salvage and improving ventricular contractility through antioxidative, anti-inflammatory, and anti-apoptotic mechanisms.

Spirulina is a blue-green algae increasingly employed as a nutritional supplement because of the health outcomes associated to its regular intake, particularly regarding metabolic syndrome components (Khan et al., 2006b; Stone et al., 2016). Herein, we further prove that a 10-day supplementation with spirulina significantly limits coronary artery occlusion-related cardiac damage (i.e., infarct size). The size of infarction is strongly related to mortality and heart failure development in STEMI patients (Heusch et al., 2014). Despite efforts have focused on testing therapies to promote myocardial salvage, currently there is no therapy routinely used in the clinical setting (Heusch and Gersh, 2020).

So far, the *in vivo* effects of spirulina on the myocardium have been only investigated in a mice model of doxorubicin-induced cardiotoxicity where oral spirulina supplementation for 7 weeks elicited a decrease in lipid peroxidation, normalized antioxidant enzymes, and limited doxorubicin-induced myocardial ultrastructural changes leading to an overall significant

reduction in mortality (Khan et al., 2005). In our study we further expand spirulina-related cardioprotective properties to the setting of coronary artery total occlusion and elucidate the mechanisms behind its action. As such, we have evidenced that animals receiving spirulina supplementation have significantly higher iNOS protein levels and a diminished myocardial oxidative injury in the infarcted heart and a higher AMPK activation levels in the entire myocardial tissue. Activation of iNOS/NO signaling in the setting of MI has shown to exert both protective and detrimental effects (Yu et al., 2018). On the one hand, there is overwhelming evidence supporting the ability of NO-derived iNOS to mediate the anti-stunning, vasodilator and anti-infarct effects in preconditioned hearts (i.e., hearts more resistant to sustained ischemia-related damage because of the previous exposure to multiple short episodes of ischemia and reperfusion) (Xi et al., 1999; Bolli, 2001). In fact, iNOS was the first gene identified to mediate late ischemic pre-conditioning (Madonna et al., 2015), and gene therapy with iNOS, either 3 days or up to 2 months prior-MI induction (Li et al., 2006; Li et al., 2011), has shown to exert cardioprotection. Yet, it should also be considered that enhanced iNOS/NO may lead to peroxynitrite formation and subsequently associated oxidative damage. However, in such scenario, the powerful antioxidant properties



of spirulina might have blunted iNOS-related oxidative stress thereby switching iNOS from detrimental to protective and consequently enhancing the ability of the heart to withstand STEMI-related injury. Nevertheless, further research is warranted to determine the mechanism by which spirulina acutely induces a higher iNOS expression in the ischemic myocardium in the setting of MI. TNF-α, a cytokine known to acutely protect against infarction and contractile dysfunction, has shown to regulate iNOS (Lecour et al., 2002). Here, we detect a significant and acute increase in TNF-α plasma levels with an enhanced iNOS expression and reduced oxidative damage in the infarcted heart of spirulina supplemented animals. TNF-α has an ambivalent role in MI. Transient increase in TNF-α has shown to protect against ischemia-reperfusion injury by interacting with myocardial TNF receptor type 2 and consequent downstream activation of the cardioprotective SAFE pathway (Lecour et al., 2005) whereas excessive and long-lasting release of TNF-α has shown to exert detrimental effects (Schulz and Heusch, 2009). Moreover, we also evidence higher AMPK activation in the remote myocardium of spirulina supplemented animals

indicating that spirulina cardioprotective benefits are not only confined to the infarcted region but to the entire left ventricle. We and others have reported that AMPK signaling, besides being essential to maintain cardiac energy metabolism under ischemic stress, induces autophagy protecting against the progression of post-STEMI adverse cardiac remodeling (Kanamori et al., 2011; Vilahur et al., 2016; Mendieta et al., 2019b). A recent study has demonstrated the ability of spirulina to induce mRNA expression levels of autophagy-associated genes (i.e., AMPK and ULK1) in the liver of growing lambs, supporting our findings in the heart tissue (Liang et al., 2020). We also identify lower levels of the inflammatory marker MCP-1 in the entire myocardium of spirulina supplemented pigs. Furthermore, spirulina anti-inflammatory effects are also evident systemically by a reduced Cox-2 expression in the acute phase after coronary occlusion in PBMCs. Of note, no changes were observed in IL-1β plasma values among all animals at the different tested time points. In this regard, a low intrinsic expression of myocardial NLRP3 inflammasome (involved in processing of pro-IL-1β into its active form) has been detected in the acute phase of infarcted

TABLE 1 | Haematological parameters, (A) liver and kidney function markers, (B) plasma glucose levels and lipid profile (C) at baseline, 10 days, prior-STEMI (ST-elevation myocardial infarction), 5 min post-STEMI and at 2.5 h post-reperfusion (sacrifice).

	Time	Control	Spirulina	p value
A. Haematological parameters				
Hematocrit (vol %)	Baseline	27.0 ± 0.9	25.6 ± 0.5	0.20
	10 days	25.8 ± 1.2	24.8 ± 1.4	0.60
	Prior-STEMI	25.7 ± 0.1	23.8 ± 0.9	0.09
	Post-STEMI	26.9 ± 1.6	22.2 ± 0.9	0.03
	Sacrifice	25.8 ± 1.2	24.8 ± 1.4	0.60
Hemoglobin (g/dl)	Baseline	9.7 ± 0.6	9.3 ± 0.4	0.63
	10 days	9.7 ± 0.54	9.1 ± 0.5	0.45
	Prior-STEMI	10.8 ± 0.1	8.9 ± 0.6	0.03
	Post-STEMI	9.5 ± 0.5	8.3 ± 0.4	0.08
	Sacrifice	9.7 ± 0.5	9.1 ± 0.5	0.45
White blood cells (10 ⁹ /L)	Baseline	15.0 ± 1.9	14.4 ± 1.3	0.81
	10 days	16.5 ± 2.4	11.3 ± 1.5	0.10
	Prior-STEMI	29.2 ± 7.2	14.3 ± 1.8	0.27
	Post-STEMI	14.8 ± 2.3	11.9 ± 2.1	0.36
	Sacrifice	16.5 ± 2.4	11.3 ± 1.5	0.10
Platelet count (10 ⁹ /L)	Baseline	245.5 ± 27.5	354.2 ± 28.2	0.02
	10 days	232.1 ± 28.6	324.8 ± 31.6	0.06
	Prior-STEMI	291.5 ± 79.5	362.7 ± 33.6	0.53
	Post-STEMI	236.8 ± 29.8	317.1 ± 26.7	0.07
	Sacrifice	232.1 ± 28.6	324.8 ± 31.6	0.06
B. Kidney and liver function markers				
Blood urea nitrogen (mg/dl)	Baseline	11.0 ± 2.1	17.1 ± 4.0	0.22
	10 days	15.7 ± 7.8	15.7 ± 4.7	0.99
	Prior-STEMI	24.8 ± 2.8	17.2 ± 2.3	0.14
	Post-STEMI	15.0 ± 3.1	17.6 ± 3.1	0.56
	Sacrifice	15.7 ± 7.8	15.7 ± 4.7	0.99
Creatinine (mg/dl)	Baseline	1.0 ± 0.1	1.2 ± 0.1	0.12
	10 days	1.2 ± 0.1	1.3 ± 0.1	0.44
	Prior-STEMI	1.0 ± 0.2	1.3 ± 0.1	0.53
	Post-STEMI	1.2 ± 0.1	1.5 ± 0.2	0.15
	Sacrifice	1.2 ± 0.1	1.3 ± 0.1	0.44
Alanine aminotransferase (U/L)	Baseline	39.3 ± 11.8	35.9 ± 2.6	0.78
	10 days	37.2 ± 0.3	35.2 ± 17.0	0.91
	Prior-STEMI	45.9 ± 2.2	50.0 ± 16.9	0.81
	Post-STEMI	27.7 ± 4.4	26.6 ± 4.0	0.85
	Sacrifice	37.2 ± 0.3	35.2 ± 17.0	0.91
C. Plasma glucose levels and lipid profile				
Glucose (mg/dl)	Baseline	95.6 ± 11.9	118.5 ± 7.2	0.13
	10 days	95.6 ± 11.9	112.8 ± 23.2	0.56
	Prior-STEMI	76.2 ± 10.1	108.7 ± 8.6	0.09
	Post-STEMI	129.8 ± 14.5	140.2 ± 12.1	0.59
	Sacrifice	95.6 ± 11.9	112.8 ± 23.1	0.56
Total cholesterol (mg/dl)	Baseline	97.5 ± 3.9	82.4 ± 6.9	0.10
	10 days	95.6 ± 12.9	76.7 ± 5.7	0.27
	Prior-STEMI	78.5 ± 17.5	84.5 ± 6.2	0.78
	Post-STEMI	90.6 ± 7.6	83.1 ± 5.4	0.44
	Sacrifice	95.6 ± 12.9	76.7 ± 5.7	0.27
Triglycerides (mg/dl)	Baseline	25.8 ± 3.9	35.0 ± 7.3	0.37
	10 days	28.3 ± 4.3	32.5 ± 2.5	0.49
	Prior-STEMI	22.5 ± 0.5	23.6 ± 3.1	0.83
	Post-STEMI	26.8 ± 2.4	29.6 ± 3.6	0.67
	Sacrifice	28.3 ± 4.3	32.5 ± 2.5	0.49
High-density lipoprotein cholesterol (mg/dl)	Baseline	35.9 ± 4.2	47.9 ± 13.2	0.43
	10 days	57.8 ± 8.0	64.5 ± 4.4	0.51
	Prior-STEMI	21.6 ± 4.7	42.9 ± 7.4	0.06

(Continued on following page)

TABLE 1 | (Continued) Haematological parameters, (A) liver and kidney function markers, (B) plasma glucose levels and lipid profile (C) at baseline, 10 days, prior-STEMI (ST-elevation myocardial infarction), 5 min post-STEMI and at 2.5 h post-reperfusion (sacrifice).

	Time	Control	Spirulina	p value
	Post-STEMI	31.0 ± 6.8	47.4 ± 7.5	0.13
	Sacrifice	57.8 ± 8.0	64.5 ± 4.4	0.51
Low-density lipoprotein cholesterol (mg/dl)	Baseline	85.2 ± 16.2	56.2 ± 16.5	0.25
	10 days	96.2 ± 12.1	51.0 ± 14.22	0.06
	Prior-STEMI	52.3 ± 12.8	58.3 ± 8.7	0.73
	Post-STEMI	78.8 ± 17.0	64.1 ± 10.2	0.47
	Sacrifice	96.2 ± 12.1	51.0 ± 14.2	0.06

Data are expressed as mean ± SD. p value denotes differences between control pigs and spirulina-treated animals. All values are within physiological ranges based on our in-house data for young healthy pigs.

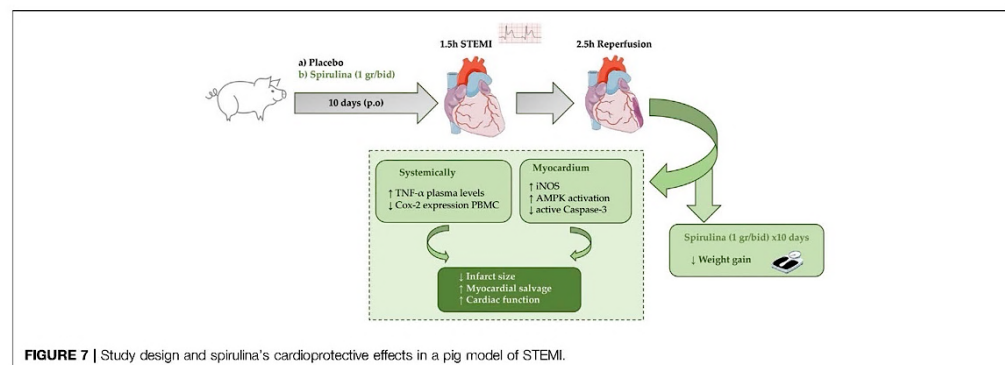


FIGURE 7 | Study design and spirulina's cardioprotective effects in a pig model of STEMI.

hearts (Jong et al., 2014), and could potentially support the detected low IL-1 β levels. Nevertheless, the overall antioxidant and anti-inflammatory effects may explain the reduction in caspase-3 activation observed in the infarcted myocardium of spirulina supplemented pigs which, in turn, has likely contributed to promote myocardial salvage and limit cardiac dysfunction in the setting of STEMI.

It has been claimed that spirulina improves several well-established cardiovascular risk factors providing benefits around weight loss and hyperlipidaemia. A recent systematic review and meta-analysis of five randomized clinical trials assessing spirulina effect on weight loss found that spirulina supplementation significantly decreases total weight, body fat percentage, and waist circumference in obese subjects (Moradi et al., 2019). Of note, there is no clinical evidence to support a potential modulation of spirulina in food intake (Moradi et al., 2019) and, in line with our observations, spirulina has shown to exert no effects in food intake in mice (Zhao et al., 2019). We observe that animals supplemented with spirulina for 10 days displayed a significant decrease in the rate of weight gain progression in comparison to control pigs. Several mechanistic pathways have been proposed to explain spirulina's ability to improve weight management. As such, spirulina high content of

anti-oxidative molecules has shown to partly inhibit lipase activity while modulating appetite and food intake (Fujimoto et al., 2012; Hassan and El-Gharib, 2015). Besides, phenylalanine, one of the essential aminoacids comprised in spirulina structure, has also shown to directly inhibit the brain appetite center (Mazokopakis et al., 2014a). Regarding the hypolipidemic response to spirulina supplementation, this has been observed to differ in clinical trials based on the dosage, duration of treatment, and the presence of comorbidities (Finamore et al., 2017; Hernández-Lepe et al., 2019). A small trial in 30 healthy volunteers with mild hyperlipidaemia demonstrated a notable reduction in total cholesterol after an 8 week supplementation with 4.2 g spirulina, although no changes were reported for HDL-cholesterol or triglyceride levels (Nakaya and Goto, 1988). Another clinical trial in Korean patients demonstrated that a 12 week supplementation with spirulina 8 g/day significantly displayed lipid-lowering activity in non-obese subjects, while in the obese subgroup no substantial change in lipid metabolism was found (Park and Lee, 2016). Moreover, spirulina supplementation for long periods has recently shown to alter the gut microbiota that ultimately affect lipid metabolism and weight (Li et al., 2021). Conversely, a study in obese individuals observed no changes in lipid profile after a 12-

week supplementation of spirulina 1 g/day despite a reduction in weight gain. We do not observe any changes in lipid profile or glucose levels after this short-term spirulina administration at doses of 1 gr/animal/bid. Further research is warranted to determine the optimal spirulina dose and timing required to improve glucose metabolism and lipid profile in each specific setting and whether these benefits are associated with changes in the gut microbiome. Importantly, it deserves to be stated that spirulina supplementation for 10 days confirmed its adequate safety profile, and no adverse events were registered, with kidney and liver function remaining unmodified throughout the entire experimental period.

This study was carried out in young and healthy pigs without comorbidities and/or associated medication. We intended to address spirulina's cardioprotective activity based on its nutraceutical profile and its consumption as a dietary supplement in subjects with no overt cardiovascular diseases exposed to a sudden ischemic event. In fact, spirulina has been proposed as a supplementary nutritional additive in healthy subjects with the aim to improve their overall health status (Karkos et al., 2011). Future studies should investigate the effects of spirulina in normal healthy hearts as well as in clinical scenarios combining metabolic comorbidities and ischemic heart disease.

In conclusion, dietary spirulina supplementation for only 10 days has proven to elicit a cardioprotective effect in case of presentation of an ischemic event, through antioxidative, anti-inflammatory, and anti-apoptotic mechanisms that leads to a reduced size of infarction and improved cardiac function (Figure 7). Because of the absence of adverse effects, spirulina supplementation may represent a simple way to counteract the deleterious mechanism triggered during STEMI and may be a promising novel strategy to enhance myocardial salvage in the setting of MI.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material, further inquiries can be directed to the corresponding author.

REFERENCES

- Animal Ethics Infolink (2019). NSW Department of Primary Industries and Animal Research Review Panel. Available at: <https://www.animaletics.org.au/three-rs>.
- Badimon, L., Bugiardini, R., Cenko, E., Cubedo, J., Dorobantu, M., Duncker, D. J., et al. (2017). Position Paper of the European Society of Cardiology-Working Group of Coronary Pathophysiology and Microcirculation: Obesity and Heart Disease. *Eur. Heart J.* 38, 1951–1958. doi:10.1093/eurheartj/ehx181
- Badimon, L., Vilahur, G., and Padro, T. (2010). Nutraceuticals and Atherosclerosis: Human Trials. *Cardiovasc. Ther.* 28, 202–215. doi:10.1111/j.1755-5922.2010.00189.x
- Bolli, R. (2001). Cardioprotective Function of Inducible Nitric Oxide Synthase and Role of Nitric Oxide in Myocardial Ischemia and Preconditioning: an Overview of a Decade of Research. *J. Mol. Cell Cardiol* 33, 1897–1918. doi:10.1006/jmcc.2001.1462

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by European Directive 2010/63/EU and the Institutional Animal Care and Use Committees of the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization: LB, GV, PS, and GM. Methodology: PS, SB-A, MR, MB-P, and LC. Formal analysis: GV, PS, SB-A, LC, and TP. Investigation: GV, PS, GM, and LS. Resources: LB and GV. Data curation: GV, PS, and LB. Writing—original draft preparation: GV, PS, MR, and LS. Writing—review and editing: PS, GM, MB-P, LS, LC, and TP. Visualization: PS and SB-A. Supervision: LB. Project administration: GV and TP. Funding acquisition: GV and LB. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

FUNDING

This work was supported by Grant PID2019-107160RB-I00 to LB and PGC 2018-094025-B-I00 (to GV) funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FFEDER) A way of making Europe; ISCIII [FIS PI19/01687] to TP Instituto de Salud Carlos III (CIBERCV CB16/11/00411 to LB, TERCEL RD16/0011/018 to LB, FIS2020-01282 to MB-P and FIS PI19/01687 to TP); the Generalitat de Catalunya-Secretaria d'Universitats i Recerca del Departament d'Economia i Coneixement de la Generalitat (2017SGR1480 to LB) and 2016PROD00043 (Agencia Gestió Ayudas Universitarias Investigación: AGAUR); the Spanish Society of Cardiology (FEC 2019 to MB-P and FED 2020 to GV) and the Fundación Investigación Cardiovascular-Fundación Jesus Serra for their continuous support.

ACKNOWLEDGMENTS

We are very grateful for the highly contribution and support of Maria Angeles Canovas and Pablo Catalina with animal handling and care.

- Carrizzo, A., Izzo, C., Forte, M., Sommella, E., Di Pietro, P., Venturini, E., et al. (2020). A Novel Promising Frontier for Human Health: The Beneficial Effects of Nutraceuticals in Cardiovascular Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 21. doi:10.3390/ijms21228706
- Costa, J. A. V., Freitas, B. C. B., Rosa, G. M., Moraes, L., Morais, M. G., and Mitchell, B. G. (2019). Operational and Economic Aspects of Spirulina-Based Biorefinery. *Bioresour. Technol.* 292, 121946. doi:10.1016/j.biortech.2019.121946
- DiNicolantonio, J. J., Bhat, A. G., and O'Keefe, J. (2020). Effects of Spirulina on Weight Loss and Blood Lipids: A Review. *Open Heart* 7, e001003. doi:10.1136/openhrt-2018-001003
- Finamore, A., Palmery, M., Bensehalia, S., and Peluso, I. (2017). Antioxidant, Immunomodulating, and Microbial-Modulating Activities of the Sustainable and Ecofriendly Spirulina. *Oxid Med. Cell Longev.* 2017, 3247528. doi:10.1155/2017/3247528
- Fujimoto, M., Tsuneyama, K., Fujimoto, T., Selmi, C., Gershwin, M. E., and Shimada, Y. (2012). Spirulina Improves Non-Alcoholic Steatohepatitis,

- Visceral Fat Macrophage Aggregation, and Serum Leptin in a Mouse Model of Metabolic Syndrome. *Dig. Liver Dis.* 44, 767–774. doi:10.1016/j.dld.2012.02.002
- Grosshagauer, S., Kraemer, K., and Somoza, V. (2020). The True Value of Spirulina. *J. Agric. Food Chem.* 68, 4109–4115. doi:10.1021/acs.jafc.9b08251
- Hassan, H. A., and El-Gharib, N. E. (2015). Obesity and Clinical Riskiness Relationship: Therapeutic Management by Dietary Antioxidant Supplementation-Aa Review. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 176, 647–669. doi:10.1007/s12010-015-1602-6
- Hernández-Lepe, M. A., Wall-Medrano, A., López-Díaz, J. A., Juárez-Oropeza, M. A., Hernández-Torres, R. P., and Ramos-Jiménez, A. (2019). Hypolipidemic Effect of Arthrospira (Spirulina) Maxima Supplementation and a Systematic Physical Exercise Program in Overweight and Obese Men: A Double-Blind, Randomized, and Crossover Controlled Trial. *Mar. Drugs* 17. doi:10.3390/md17050270
- Heusch, G., and Gersh, B. J. (2020). Is Cardioprotection Salvageable? *Circulation* 141, 415–417. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.119.044176
- Heusch, G., and Gersh, B. J. (2017). The Pathophysiology of Acute Myocardial Infarction and Strategies of protection beyond Reperfusion: a Continual challenge. *Eur. Heart J.* 38, 774–784. doi:10.1093/eurheartj/ehw224
- Heusch, G., Libby, P., Gersh, B., Yellon, D., Böhm, M., Lopschuk, G., et al. (2014). Cardiovascular Remodelling in Coronary Artery Disease and Heart Failure. *Lancet* 383, 1933–1943. doi:10.1016/S0140-6736(14)60107-0
- Huang, H., Liao, D., Pu, R., and Cui, Y. (2018). Quantifying the Effects of Spirulina Supplementation on Plasma Lipid and Glucose Concentrations, Body Weight, and Blood Pressure. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* 11, 729–742. doi:10.2147/DMSO.S185672
- Jong, W. M., Leemans, J. C., Weber, N. C., Juffermans, N. P., Schultz, M. J., Hollmann, M. W., et al. (2014). Nlrp3 Plays No Role in Acute Cardiac Infarction Due to Low Cardiac Expression. *Int. J. Cardiol.* 177, 41–43. doi:10.1016/j.ijcard.2014.09.148
- Kanamori, H., Takemura, G., Goto, K., Maruyama, R., Tsujimoto, A., Ogino, A., et al. (2011). The Role of Autophagy Emerging in Postinfarction Cardiac Remodelling. *Cardiovasc. Res.* 91, 330–339. doi:10.1093/cvr/cvr073
- Karkos, P. D., Leong, S. C., Karkos, C. D., Sivaji, N., and Assimakopoulos, D. A. (2011). Spirulina in Clinical Practice: Evidence-Based Human Applications. *Evid. Based Compl. Alternat Med.* 2011, 531053. doi:10.1093/ecam/nen058
- Khan, M., Shobha, J. C., Mohan, I. K., Naidu, M. U., Sundaram, C., Singh, S., et al. (2005). Protective Effect of Spirulina against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. *Phytother. Res.* 19, 1030–1037. doi:10.1002/ptr.1783
- Khan, M., Varadharaj, S., Ganesan, L. P., Shobha, J. C., Naidu, M. U., Parinandi, N. L., et al. (2006). C-phycocyanin Protects Against Ischemia-Reperfusion Injury of Heart through Involvement of P38 MAPK and ERK Signaling. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 290, H2136–H2145. doi:10.1152/ajpheart.01072.2005
- Khan, M., Varadharaj, S., Shobha, J. C., Naidu, M. U., Parinandi, N. L., Kutala, V. K., et al. (2006). C-phycocyanin Ameliorates Doxorubicin-Induced Oxidative Stress and Apoptosis in Adult Rat Cardiomyocytes. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 47, 9–20. doi:10.1097/01.fjc.00000191520.48404.27
- Lecour, S., Smith, R. M., Woodward, B., Opie, L. H., Rochette, L., and Sack, M. N. (2002). Identification of a Novel Role for Sphingolipid Signaling in TNF Alpha and Ischemic Preconditioning Mediated Cardioprotection. *J. Mol. Cell Cardiol.* 34, 509–518. doi:10.1006/jmcc.2002.1533
- Lecour, S., Suleman, N., Deuchar, G. A., Somers, S., Lacerda, L., Huisamen, B., et al. (2005). Pharmacological Preconditioning with Tumor Necrosis Factor-Alpha Activates Signal Transducer and Activator of Transcription-3 at Reperfusion without Involving Classic Prosurvival Kinases (Akt and Extracellular Signal-Regulated Kinase). *Circulation* 112, 3911–3918. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.581058
- Li, Q., Guo, Y., Ou, Q., Wu, W. J., Chen, N., Zhu, X., et al. (2011). Gene Transfer as a Strategy to Achieve Permanent Cardioprotection II: rAAV-Mediated Gene Therapy with Heme Oxygenase-1 Limits Infarct Size 1 Year Later without Adverse Functional Consequences. *Basic Res. Cardiol.* 106, 1367–1377. doi:10.1007/s00395-011-0208-6
- Li, Q., Guo, Y., Tan, W., Stein, A. B., Dawn, B., Wu, W. J., et al. (2006). Gene Therapy with iNOS Provides Long-Term protection against Myocardial Infarction without Adverse Functional Consequences. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 290, H584–H589. doi:10.1152/ajpheart.00855.2005
- Li, T. T., Huang, Z. R., Jia, R. B., Lv, X. C., Zhao, C., and Liu, B. (2021). Spirulina Platensis Polysaccharides Attenuate Lipid and Carbohydrate Metabolism Disorder in High-Sucrose and High-Fat Diet-Fed Rats in Association with Intestinal Microbiota. *Food Res. Int.* 147, 110530. doi:10.1016/j.foodres.2021.110530
- Liang, Y., Huang, X., Zhang, Z., Deng, K., An, S., Gao, X., et al. (2020). Spirulina Supplementation Improves Lipid Metabolism and Autophagic Activities in the Liver and Muscle of Hu Lambs Fed a High-Energy Diet. *Arch. Anim. Nutr.* 74, 476–495. doi:10.1080/1745039X.2020.1820806
- Madonna, R., Cadeddu, C., Deidda, M., Giricz, Z., Madeddu, C., Mele, D., et al. (2015). Cardioprotection by Gene Therapy: A Review Paper on Behalf of the Working Group on Drug Cardiotoxicity and Cardioprotection of the Italian Society of Cardiology. *Int. J. Cardiol.* 191, 203–210. doi:10.1016/j.ijcard.2015.04.232
- Mazokopakis, E. E., Papadomanolaki, M. G., Foustieris, A. A., Kotsiris, D. A., Lampadakis, I. M., and Ganotakis, E. S. (2014). The Hepatoprotective and Hypolipidemic Effects of Spirulina (Arthrospira Platensis) Supplementation in a Cretan Population with Non-alcoholic Fatty Liver Disease: a Prospective Pilot Study. *Ann. Gastroenterol.* 27 (4), 387–394.
- Mazokopakis, E. E., Starakis, I. K., Papadomanolaki, M. G., Mavroicidi, N. G., and Ganotakis, E. S. (2014). The Hypolipidaemic Effects of Spirulina (Arthrospira Platensis) Supplementation in a Cretan Population: A Prospective Study. *J. Sci. Food Agric.* 94, 432–437. doi:10.1002/jsfa.6261
- Mendieta, G., Ben-Aicha, S., Casani, L., Badimon, L., Sabate, M., and Viláhur, G. (2019). Intravenous Statin Administration during Ischemia Exerts Cardioprotective Effects. *J. Am. Coll. Cardiol.* 74, 475–477. doi:10.1016/j.jacc.2019.05.020
- Mendieta, G., Ben-Aicha, S., Casani, L., Badimon, L., Sabate, M., and Viláhur, G. (2019). Molecular Pathways Involved in the Cardioprotective Effects of Intravenous Statin Administration During Ischemia. *Basic Res. Cardiol.* 115, 2. doi:10.1007/s00395-019-0760-z
- Mendieta, G., Ben-Aicha, S., Gutiérrez, M., Casani, L., Arzanauskaitė, M., Carreras, F., et al. (2020). Intravenous Statin Administration during Myocardial Infarction Compared with Oral Post-Infarct Administration. *J. Am. Coll. Cardiol.* 75, 1386–1402. doi:10.1016/j.jacc.2020.01.042
- Moradi, S., Ziaei, R., Foshati, S., Mohammadi, H., Nachvak, S. M., and Rouhani, M. H. (2019). Effects of Spirulina Supplementation on Obesity: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. *Complement. Ther. Med.* 47, 102211. doi:10.1016/j.ctim.2019.102211
- Moran, A. E., Forouzanfar, M. H., Roth, G. A., Mensah, G. A., Ezzati, M., Murray, C. J., et al. (2014). Temporal Trends in Ischemic Heart Disease Mortality in 21 World Regions, 1980 to 2010: the Global Burden of Disease 2010 Study. *Circulation* 129, 1483–1492. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.004042
- Nakaya, Y. H. N., and Goto, Y. (1988). Cholesterol Lowering Effect of Spirulina. *Nutr. Rep. Int.*
- Park, H. J., and Lee, H. S. (2016). The Influence of Obesity on the Effects of Spirulina Supplementation in the Human Metabolic Response of Korean Elderly. *Nutr. Res. Pract.* 10, 418–423. doi:10.4162/nrp.2016.10.4.418
- Park, H. J., Lee, Y. J., Ryu, H. K., Kim, M. H., Chung, H. W., and Kim, W. Y. (2008). A Randomized Double-Blind, Placebo-Controlled Study to Establish the Effects of Spirulina in Elderly Koreans. *Ann. Nutr. Metab.* 52, 322–328. doi:10.1159/000151486
- Percie du Sert, N., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M. T., Baker, M., Browne, W. J., et al. (2020). Reporting Animal Research: Explanation and Elaboration for the ARRIVE Guidelines 2.0. *PLoS Biol.* 18, e3000411. doi:10.1371/journal.pbio.3000411
- Ren, Z., Xie, Z., Cao, D., Gong, M., Yang, L., Zhou, Z., et al. (2018). C-phycocyanin Inhibits Hepatic Gluconeogenesis and Increases Glycogen Synthesis via Activating Akt and AMPK in Insulin Resistance Hepatocytes. *Food Funct.* 9, 2829–2839. doi:10.1039/c8fo00257f
- Schulz, R., and Heusch, G. (2009). Tumor Necrosis Factor-Alpha and its Receptors 1 and 2: Yin and Yang in Myocardial Infarction? *Circulation* 119, 1355–1357. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.846105
- Serban, M. C., Sahebkar, A., Dragan, S., Stoichescu-Hogea, G., Ursanu, S., Andrica, F., et al. (2016). A Systematic Review and Meta-Analysis of the Impact of Spirulina Supplementation on Plasma Lipid Concentrations. *Clin. Nutr.* 35, 842–851. doi:10.1016/j.clnu.2015.09.007
- Stone, G. W., Selker, H. P., Thiele, H., Patel, M. R., Udelson, J. E., Ohman, E. M., et al. (2016). Relationship between Infarct Size and Outcomes Following Primary PCI: Patient-Level Analysis from 10 Randomized Trials. *J. Am. Coll. Cardiol.* 67, 1674–1683. doi:10.1016/j.jacc.2016.01.069

- Vilahur, G., Casaní, L., Peña, E., Crespo, J., Juan-Babot, O., Ben-Aicha, S., et al. (2018). Silybum marianum Provides Cardioprotection and Limits Adverse Remodeling post-myocardial Infarction by Mitigating Oxidative Stress and Reactive Fibrosis. *Int. J. Cardiol.* 270, 28–35. doi:10.1016/j.ijcard.2018.06.030
- Vilahur, G., Casaní, L., Peña, E., Duran, X., Juan-Babot, O., and Badimon, L. (2009). Induction of RISK by HMG-CoA Reductase Inhibition Affords Cardioprotection after Myocardial Infarction. *Atherosclerosis* 206, 95–101. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2009.02.009
- Vilahur, G., Casaní, L., Peña, E., Juan-Babot, O., Mendieta, G., Crespo, J., et al. (2014). HMG-CoA Reductase Inhibition Prior Reperfusion Improves Reparative Fibrosis post-myocardial Infarction in a Preclinical Experimental Model. *Int. J. Cardiol.* 175, 528–538. doi:10.1016/j.ijcard.2014.06.040
- Vilahur, G., Gutiérrez, M., Casaní, L., Varela, L., Capdevila, A., Pons-Lladó, G., et al. (2016). Protective Effects of Ticagrelor on Myocardial Injury after Infarction. *Circulation* 134, 1708–1719. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.116.024014
- Vilahur, G., Badimon, J. J., Bugiardini, R., and Badimon, L. (2014). Perspectives: The burden of Cardiovascular Risk Factors and Coronary Heart Disease in Europe and Worldwide. *Eur. Heart J. Suppl.* 16, A7–A11. doi:10.1093/eurheartj/sut003
- Vo, T. S., and Kim, S. K. (2013). Down-Regulation of Histamine-Induced Endothelial Cell Activation as Potential Anti-atherosclerotic Activity of Peptides from *Spirulina Maxima*. *Eur. J. Pharm. Sci.* 50, 198–207. doi:10.1016/j.ejps.2013.07.001
- Xi, L., Jarrett, N. C., Hess, M. L., and Kukreja, R. C. (1999). Essential Role of Inducible Nitric Oxide Synthase in Monophosphoryl Lipid A-Induced Late Cardioprotection: Evidence from Pharmacological Inhibition and Gene Knockout Mice. *Circulation* 99, 2157–2163. doi:10.1161/01.cir.99.16.2157
- Yordanova, G., Popova, T., Givko, N., Nedeva, R., Marchev, Y., Kistanova, E., et al. (2015). Lipid Profile of *M. Longissimus Dorsi* in Response to Dietary *Spirulina Platensis* Supplementation in Pigs. *Bulgarian J. Agric. Sci.* 21, 1054–1059.
- Yousefi, R., Saidpour, A., and Mottaghi, A. (2019). The Effects of Spirulina Supplementation on Metabolic Syndrome Components, its Liver Manifestation and Related Inflammatory Markers: A Systematic Review. *Complement. Ther. Med.* 42, 137–144. doi:10.1016/j.ctim.2018.11.013
- Yu, X., Ge, L., Niu, L., Lian, X., Ma, H., and Pang, L. (2018). The Dual Role of Inducible Nitric Oxide Synthase in Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury: Friend or Foe? *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2018, 8364848. doi:10.1155/2018/8364848
- Zhao, B., Cui, Y., Fan, X., Qi, P., Liu, C., Zhou, X., et al. (2019). Anti-Obesity Effects of Spirulina Platensis Protein Hydrolysate by Modulating Brain-Liver axis in High-Fat Diet Fed Mice. *PLoS One* 14, e0218543. doi:10.1371/journal.pone.0218543

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Vilahur, Sutelman, Ben-Aicha, Mendieta, Radiké, Schoch, Casaní, Borrell-Pagés, Padro and Badimon. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

6.1.1. Material suplementario



Supplementary Material

Supplemental Table 1. Haematological parameters (A), liver and kidney function markers (B), plasma glucose levels and lipid profile (C).

Data are expressed as mean $\pm$ SD. All values are within the physiological range.

4
5
6

A. Haematological parameters

	Time	Control	Spirulina	p Value
Hematocrit (vol %)	<i>Baseline</i>	27.0 $\pm$ 0.9	25.6 $\pm$ 0.5	0.20
	<i>10days</i>	25.8 $\pm$ 1.2	24.8 $\pm$ 1.4	0.60
Hemoglobin (g/dL)	<i>Baseline</i>	9.7 $\pm$ 0.59	9.3 $\pm$ 0.4	0.63
	<i>10days</i>	9.7 $\pm$ 0.54	9.1 $\pm$ 0.5	0.45
White Blood Cells (10⁹/L)	<i>Baseline</i>	15.0 $\pm$ 1.9	14.4 $\pm$ 1.3	0.81
	<i>10days</i>	16.5 $\pm$ 2.4	11.3 $\pm$ 1.5	0.10
Platelet count (10⁹/L)	<i>Baseline</i>	245.5 $\pm$ 27.5	354.2 $\pm$ 28.2	0.02
	<i>10days</i>	232.1 $\pm$ 28.6	324.8 $\pm$ 31.6	0.06

7
8
9

B. Kidney and liver function markers

	Time	Control	Spirulina	p Value
Blood urea nitrogen (mg/dL)	<i>Baseline</i>	11.0 $\pm$ 2.1	17.1 $\pm$ 4.0	0.22
	<i>10days</i>	15.7 $\pm$ 7.8	15.7 $\pm$ 4.7	0.99
Creatinine (mg/dL)	<i>Baseline</i>	1.0 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.1	0.12
	<i>10days</i>	1.2 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1	0.44

Alanine aminotransferase (U/L)	<i>Baseline</i>	39.3 ± 11.8	35.9 ± 2.6	0.78
	<i>10days</i>	37.2 ± 0.3	35.2 ± 17.0	0.91

C. Plasma glucose levels and lipid profile

	Time	Control	Spirulina	p Value
Glucose (mg/dL)	<i>Baseline</i>	95.6 ± 11.9	118.5 ± 7.2	0.13
	<i>10days</i>	95.6 ± 11.9	112.8 ± 23.2	0.56
Total cholesterol (mg/dL)	<i>Baseline</i>	97.5 ± 3.9	82.4 ± 6.9	0.10
	<i>10days</i>	95.6 ± 12.9	76.7 ± 5.7	0.27
Triglycerides (mg/dL)	<i>Baseline</i>	25.8 ± 3.9	35.0 ± 7.3	0.37
	<i>10days</i>	28.3 ± 4.3	32.5 ± 2.5	0.49
High-density lipoprotein cholesterol (mg/dL)	<i>Baseline</i>	35.9 ± 4.2	47.9 ± 13.2	0.43
	<i>10days</i>	57.8 ± 8.0	64.5 ± 4.4	0.51
Low-density lipoprotein cholesterol (mg/dL)	<i>Baseline</i>	85.2 ± 16.2	56.2 ± 16.5	0.25
	<i>10days</i>	96.2 ± 12.1	51.0 ± 14.22	0.06

6.2. Artículo 2

Hemos demostrado en el modelo porcino de IAMCEST el potencial de *Silybum marianum* de reducir el tamaño de infarto de manera aguda tras el evento. En este segundo estudio evaluamos el potencial de *Silybum marianum* de limitar el remodelado ventricular adverso que se desencadena tras inducir un IAMCEST. La administración oral de *Silybum marianum* redujo de manera significativa y temprana la absorción intestinal de triglicéridos con la consiguiente reducción en sus niveles plasmáticos. Tras 3 semanas de ingesta post-IAMCEST se observó una atenuación significativa del remodelado ventricular adverso y una mejora en la función ventricular que se asoció con una menor acumulación de triglicéridos en el miocardio infartado (i.e., cardiolipotoxicidad) y un aumento en los receptores encargados de la eliminación lipídica a nivel cardíaco.



Triglyceride-induced cardiac lipotoxicity is mitigated by *Silybum marianum*

Gemma Vilahur^{a,b}, Pablo Sutelman^a, Guimar Mendieta^{a,c}, Soumaya Ben-Aicha^a,
María Borrell-Pages^a, Esther Peña^a, Javier Crespo^a, Laura Casanf^{a,b}, Lina Badimon^{a,b,d,*}

^a Cardiovascular Program-ICCC, Research Institute Hospital de La Santa Creu i Sant Pau, IIB-Sant Pau, Barcelona, Spain

^b CiberCV, Instituto Carlos III, Madrid, Spain

^c Department of Cardiology, Clinic Hospital, Barcelona, Spain

^d Chair UAB, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Silybum marianum
Lipotoxicity
Triglyceride
Myocardial infarction
Lipid receptors

ABSTRACT

Background and aims: *Silybum marianum* (SM) is an herbal product with cytoprotective and antioxidant properties. We have previously demonstrated that SM ameliorates ventricular remodeling and improves cardiac performance. Here, we evaluated whether SM could exert beneficial effects against cardiac lipotoxicity in a pig model of closed-chest myocardial infarction (MI).

Methods: Study 1 investigated the effect of SM administration on lipid profile and any potential SM-related adverse effects. Animals received SM or placebo during 10 days and were afterward sacrificed. Study 2 evaluated the effectiveness of SM daily administration in reducing cardiac lipotoxicity in animals subjected to a 1.5h myocardial infarction (MI), who were subsequently reperfused for 2.5h and euthanized or kept under study for three weeks and then sacrificed.

Results: Animals administered a 10-day SM regime presented a sharp decline in plasma triglyceride levels vs. controls, with no other modifications in lipid profile. The decrease in triglyceride concentration was accompanied by a marked reduction in triglyceride intestinal absorption and glycoprotein-P expression. Three weeks post-MI the triglyceride content in the ischemic myocardium of the SM-treated animals was significantly lower than in the ischemic myocardium of placebo-controls. This effect was associated with an enhanced cardiac expression of PPAR γ and triglyceride clearance receptors. This long-term SM-administration induced a lower expression of lipid receptors in subcutaneous adipose tissue. No SM-related side-effects were registered.

Conclusion: SM administration reduces plasma triglyceride levels through attenuation of triglyceride intestinal absorption and modulates cardiac lipotoxicity in the ischemic myocardium, likely contributing to improve ventricular remodeling.

1. Introduction

Herbal products have been employed as therapeutic agents for centuries in various pathologies. *Silybum marianum* (SM), commonly known as milk thistle, is a member of the *Asteraceae* family bearing high antioxidant potential and anti-inflammatory effects [1,2]. SM seed extracts are a rich source of polyphenol compounds, primarily silymarin, which comprise its main bioactive molecule, silibinin. SM has demonstrated to be a useful resource for the treatment of gastrointestinal and hepatic disorders and mushroom poisoning by *Amanita phalloides* [3]. Additionally, it has also proven to ameliorate chemotherapy-related adverse events and to modulate metabolic syndrome conditions [4,5]. In this latter regard, SM-amelioration on metabolic disturbances is

thought to be related to silymarin's potential to enhance PPAR γ pathway mediated by isosilybin A and through induction of farnesyl X receptor (FXR) transactivity, thereby inhibiting NF- κ B signaling with the consequent reduction in the inflammatory process [6–8]. Due to its beneficial properties, SM has also shown to confer protection in the setting of ischemia/reperfusion (I/R) injury in different organs (e.g., gastric mucosa [9], liver [10], kidney [11], and brain [12]) likely through a pre-conditioning-effect [13], as well as to reduce infarct size in a rat model of open-chest myocardial infarction (MI) [14]. We have recently evidenced SM potential to exert cardioprotection and limit post-MI adverse left ventricular remodeling in a pig model of closed-chest MI. These benefits were associated with lower oxidative stress, better preservation of mitochondrial function and improved tissue survival,

* Corresponding author. c/Sant Antoni M^a Claret 167, 08025, Barcelona, Spain.
E-mail address: lbadimon@santpau.cat (L. Badimon).

<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2021.03.014>

Received 8 June 2020; Received in revised form 21 February 2021; Accepted 10 March 2021

Available online 27 March 2021

0021-9150/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

favouring overall reparative fibrosis and enhanced cardiac contractility [15,16].

Elevated triglyceride plasma levels have been linked to an increased risk of cardiovascular disease [17], and myocardial triglyceride accumulation has been associated with impaired cardiac function and cardiomyocyte death [18]. We have proven that MI *per se* elicits cardiac triglyceride deposition and lipotoxicity [19]. So far, fibrates, by primarily targeting hypertriglyceridemic disorders have demonstrated to significantly reduce major adverse cardiovascular events (MACE) without impacting all-cause and cardiovascular (CV) mortality [20]. Additionally, omega-3 fatty acids (n-3 FAs) such as eicosapentaenoic acid (EPA) in monotherapy or associated with docosahexaenoic acid (DHA) are currently recommended for patients with hypertriglyceridemia [21]. Relevantly, EPA-only therapy at 4 g/d in the randomized placebo-controlled REDUCE-IT trial displayed a significant 25% reduction in the primary end-point of a composite of CV death, nonfatal MI or stroke, coronary revascularization, or unstable angina [22]. Nonetheless, the STRENGTH trial testing a new formulation of EPA-DHA has shown no beneficial effect [23] and a previous meta-analysis involving 77,917 high-risk patients treated with n-3 FA supplementation exhibited no significant association with coronary heart disease or MACE [24]. Several mechanistic approaches have been proposed for n-3 FAs activity on triglyceride levels, in particular a reduction in hepatic triglyceride production through diacyl-glycerol acyl transferase as well as a decrease in triglyceride availability by ApoB inhibition and cellular lipogenesis [21]. However, their effects on triglyceride are still a matter of controversy. Finally, dietary guidance including the Mediterranean diet, the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diet, and paleolithic diets has shown a modest impact on lipid profile and triglyceride levels [25,26].

In the present study, we aimed to evaluate the efficacy of SM on reducing triglyceride levels and preventing cardiac lipid infiltration post-MI.

2. Materials and methods

Experimental procedures were reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committees (CEE-IR) and authorized by the Animal Experimental Committee of the local government (#5601) following the Spanish law (RD 53/2013), the European Directive 2010/63/EU and the ARRIVE guidelines [27].

2.1. Study design

The experimental protocol was conducted in healthy cross-bred commercial swine (n = 36; 4-month old Landrace x Large White) fed a regular (normocholesterolemic) pig chow diet. Animals were randomly allocated to the different arms and treatments and blindly received standard gelatin capsules (placebo pills) or SM (Simafit Capsules; Sanct Bernhard) before MI-induction.

The experimental design was divided into 2 studies (Supplemental Fig. 1):

- Study 1 aimed to evaluate the effect of SM administration on triglyceride absorption and lipid profile and to exclude any potential effect elicited by SM-administration on healthy hearts (i.e., without MI-induction). To that end, animals were administered SM for 10 days (Daily-SM; 15 mg/kg; 70% silibinin, equivalent to 10.5 mg/kg of silibinin extract/day; n = 6) or gelatin placebo capsules (Control; n = 6). At day 10 and 2h after SM administration, all pigs were sacrificed, and samples from the small intestine, liver, and myocardium were obtained from the anterior left ventricular wall (as done in the ischemic myocardium) and the posterior left ventricular wall (as done in the non-ischemic myocardium).
- Study 2 examined whether the administration of SM attenuates cardiac lipotoxicity in the setting of acute MI. For this purpose, pigs

(n = 24) were administered SM for 10 days (15 mg/kg; n = 12) or placebo to serve as controls (n = 12). At day 10 and 2h after SM administration, all pigs were subjected to 1.5h of complete percutaneous balloon occlusion of the mid-left anterior descending coronary artery. After the ischemic period, animals were reperfused for 2.5h and then either directly sacrificed (Control, n = 6; SM, n = 6) or allowed to recover and kept for three weeks with the same treatment regime (post-MI-SM, n = 6; post-MI-control, n = 6).

The daily dosage of SM used was comparable to those in clinical trials where SM was tested for tissue-protective effects [28].

2.2. Effect of SM on plasma lipids, liver and renal function

Blood samples were collected at baseline (prior SM administration), at day 10 (MI-induction), and sacrifice (3 weeks post-MI) for haematological (System 9000, Sero-Baker Diagnostics) and biochemical analysis (lipids, and liver and kidney parameters; Clima MC-15 RAL biotechnologies). Besides, a proof-of-concept study was carried out to monitor the effect of SM on lipid profile over time (48h period). For this purpose, pigs (n = 3) were orally administered SM at the same tested dose (15 mg/kg/day) for two consecutive days (t = 0h and t = 24h). Blood was drawn from the marginal ear from mildly sedated animals 1, 2, 4, 8, and 24h after SM ingestion for lipid panel assessment.

2.3. Analysis of SM effects on intestine and liver: lipid characterization by thin-layer chromatography (TLC)

Intestinal and liver samples were obtained at sacrifice (10 days; Study 1; Supplemental Fig. 1), immediately washed with PBS, and frozen in liquid N₂ for further analysis. Cholesteryl esters, triglyceride, and free cholesterol content were evaluated in the small intestine and liver following previously reported protocols, according to the method of *Bligh and Dyer* with minor modifications [29]. Briefly, one aliquot of the sample suspension was extracted with methanol/dichloromethane (2:1, vol/vol). After solvent removal under an N₂ stream, the lipid extract was re-dissolved in dichloromethane and one aliquot partitioned for TLC, which was performed on silica G-24 plates. Three different concentrations of standards (a mixture of cholesterol and cholesterol palmitate) were applied to each plate. The chromatographic developing solution was heptane/diethyl ether/acetic acid (74:21:4, vol/vol/vol). The spots corresponding to free cholesterol, cholesteryl esters, and triglycerides were quantified by densitometry against the standard curve of cholesterol and cholesterol palmitate, respectively, using a computing densitometer (Molecular Dynamics).

2.4. Myocardial sample collection in MI-induced animals

Myocardial tissues were obtained from our study in pigs as detailed in our recent paper by Vilahur et al. [15] and in Study 2 (Supplemental Fig. 1). At sacrifice (2.5h post-reperfusion or 3 weeks post-MI) animals were tranquilized, anesthetized, and sacrificed with an intravenous injection of 10 mL KCl 2 M. Hearts were rapidly excised and weighed. Myocardial tissue samples from the ischemic- and non-ischemic myocardium were obtained, frozen in liquid N₂, pulverized and homogenized in Tripure® or lysis buffer for RNA and protein isolation.

2.5. Analysis of myocardial lipids and cardiac lipid receptors

We characterized myocardial lipids by TLC within the ischemic and non-ischemic myocardium as detailed above. In addition, we assessed gene and protein expression of lipid scavenger receptors low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1), LRP5, and very low-density lipoprotein receptor (VLDLR), as well as protein levels of lipoprotein lipase (LPL), and a cluster of differentiation 36 (CD36). Gene levels were assessed by real-time PCR-7000 Sequence Detection System

Table 1

SM effects on lipids, glucose levels, liver and renal function.

Follow-up of plasma lipids and glucose (A), liver enzymes (B) and renal function (C) in animals administered *Silybum marianum* (SM) or control for 10 days. * $p < 0.05$ vs. baseline.

A. Plasma lipids and glucose levels			
Parameter	Timing	Healthy-Control	Healthy-SM
Cholesterol (mg/dL)	Baseline	84.7 ± 7.5	71.6 ± 10.1
	10 days	79.7 ± 7.5	85.6 ± 20.1
LDL-cholesterol (mg/dL)	Baseline	45.1 ± 2.0	35.9 ± 7.6
	10 days	39.7 ± 8.7	41.6 ± 6.1
HDL-cholesterol (mg/dL)	Baseline	34.6 ± 5.6	30.4 ± 5.3
	10 days	33.1 ± 2.9	30.1 ± 2.9
Total-cholesterol/HDL	Baseline	2.5 ± 0.2	2.4 ± 0.2
	10 days	2.4 ± 0.4	2.4 ± 0.2
Triglycerides (mg/dL)	Baseline	28.7 ± 2.5	25.8 ± 15.8
	10 days	34.0 ± 7.5	8.6 ± 1.5*
HDL/LDL	Baseline	0.7 ± 0.1	0.9 ± 0.1
	10 days	0.86 ± 0.1	0.75 ± 0.1
Glucose (mg/dL)	Baseline	84.7 ± 20.8	94.2 ± 21.0
	10 days	76.3 ± 23.1	89.0 ± 11.8
B. Liver enzymes			
Parameter	Timing	Healthy-Control	Healthy-SM
GOT (U/L)	Baseline	22.3 ± 9.0	35.8 ± 8.0
	10 days	25.0 ± 6.5	35.0 ± 8.4
GPT (U/L)	Baseline	28.5 ± 12.1	43.1 ± 14.7
	10 days	37.1 ± 11.1	37.1 ± 12.7
C. Renal function			
Parameter	Timing	Healthy-Control	Healthy-SM
Urea (mg/dL)	Baseline	20.2 ± 3.6	18.6 ± 4.0
	10 days	18.0 ± 2.5	17.5 ± 2.7
Creatinine (mg/dL)	Baseline	1.4 ± 0.4	1.5 ± 0.2
	10 days	1.5 ± 0.2	1.5 ± 0.2

of ABIPIRISM (Applied Biosystems) by an assay-on demand. The threshold cycle (Ct) values were determined and normalized to the housekeeping gene 18S rRNA to adjust for equal amounts of RNA. Protein expression was normalized to β -actin or Ponceau staining and presented in arbitrary density units (AU). WB antibodies and RT-PCR primers are detailed in [Supplemental Table 1](#). Additionally, immunostaining against peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) was performed in myocardial samples at 3 weeks post-MI in both SM-treated animals and placebo-control animals.

2.6. Molecular analyses in the liver and small intestine

In animals from study 1, we assessed transcript and protein levels of lipid receptors in the liver and small intestine. Besides, we also evaluated liver levels of glycoprotein P and hypoxia-inducible factor 1- α (HIF1 α).

Table 2Proof of concept study on the effects of *Silybum marianum* (SM) on plasma lipid profile over time.

	Hours	Triglycerides (mg/dL)	Total-cholesterol (mg/dL)	HDL-cholesterol (mg/dL)	LDL-cholesterol (mg/dL)
SM-intake	0	33.6 ± 7.0	68.7 ± 1.6	41.1 ± 11.4	20.7 ± 11.4
	1	9.0 ± 1.7*	65.6 ± 10.9	43.3 ± 4.2	13.8 ± 5.8
	2	6.2 ± 1.0*	64.3 ± 10.0	38.67 ± 10.5	24.4 ± 18.7
	4	17.6 ± 6.0*	58.3 ± 11.2	46.2 ± 16.4	8.6 ± 6.9
	8	30.3 ± 12.8	66.3 ± 5.5	30.2 ± 4.4	30.1 ± 4.2
	24	33 ± 2.5	33.0 ± 6.6	32.3 ± 1.5	32.0 ± 11.8
SM-intake	25	17.0 ± 1.7*	60.6 ± 7.5	45.0 ± 16.7	29.6 ± 21.0
	26	7.1 ± 1.0*	60.7 ± 5.6	38.9 ± 2.0	20.3 ± 8.3
	28	20.2 ± 1.9*	64.0 ± 1.7	44.9 ± 8.5	14.1 ± 10.1
	32	26.3 ± 1.5	62.3 ± 4.9	39.7 ± 4.9	18.1 ± 10.7
	48	34.3 ± 3.2	64.3 ± 1.1	44.5 ± 4.2	13.3 ± 5.0

n = 3 animals. * $p < 0.05$ vs. SM-intake.

2.7. Molecular analyses in peripheral fat tissue

Based on the data obtained in the myocardium 3 weeks post-MI and to determine any effect of SM on peripheral tissues post-MI, we evaluated the expression of lipid-related receptors in all pigs' subcutaneous adipose tissue.

2.8. Statistical analysis

Continuous variables are expressed as mean ± standard deviation. After testing for normal distribution (Shapiro-Wilk test) repeated measures ANOVA and paired t -test as appropriate were used to analyze variables within each group whereas unpaired t -test was used for all single time-point measurements to compare between SM-supplemented and control animals. A value of $p < 0.05$ was considered significant. The statistical analyses were performed with the statistical software package Statview.

3. Results

3.1. SM reduces triglyceride plasma levels

As shown in [Table 1A](#), a 10-day administration of SM in normolipidemic animals was associated with a significant drop in plasma triglyceride levels (from a baseline value of 25.8 ± 15.8 mg/dL to 8.6 ± 1.5 mg/dL; $p < 0.05$). No changes in triglyceride levels were detected in control pigs (28.7 ± 2.5 mg/dL to 34.0 ± 7.5 mg/dL). As per the other lipid parameters, we observed no differences in total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol or low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol after the 10-day regimen period and no modifications were detected neither in glucose levels ([Table 1A](#)), liver enzymes ([Table 1B](#)), nor renal function parameters ([Table 1C](#)). All animals showed comparable weight (37.9 ± 1.2 kg in SM vs 40.2 ± 1.5 kg in Controls).

The proof-of-concept 48 h kinetic study showed that cholesterol levels (total-, HDL- and LDL-cholesterol) remained unchanged throughout the entire testing period ([Table 2](#)). In contrast, triglyceride concentration was sharply diminished 1h after SM intake, remaining significantly lower up to 4h (50% reduction; $p < 0.05$ vs. $t = 0$) and returning to baseline values 8h post-intake. The same metabolic profile was detected after the second SM-dose at 24h ([Table 2](#)).

3.2. SM reduces triglyceride content and glycoprotein-P expression in the small intestine

Neutral lipid content in the small intestine of animals from study 1 is shown in [Fig. 1A](#). Triglycerides are the major neutral lipid component in the small intestine, being in the duodenum of control animals three-times the amount detected in the jejunum. Interestingly, there was a 55% reduction in triglyceride content in the small intestine of SM-

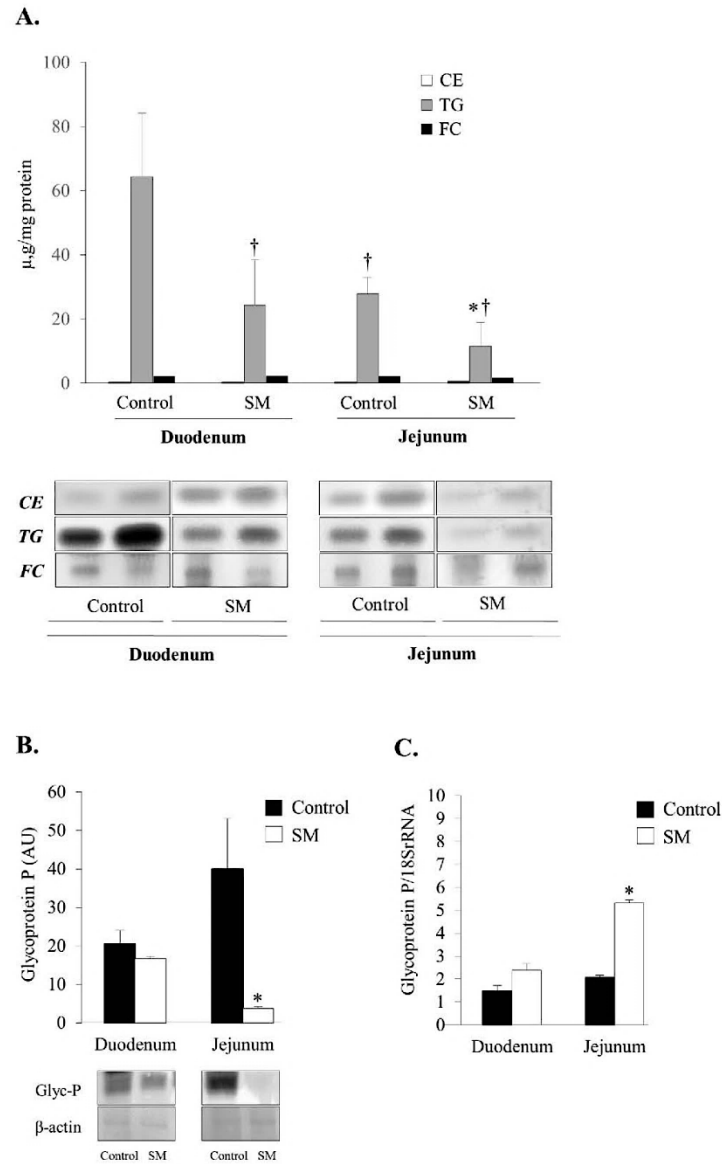


Fig. 1. Intestine lipid characterization (A) and glycoprotein-P gene (B) and protein (C) expression 10 days after SM supplementation. CE: cholesteryl esters; TG: triglycerides; FC: free cholesterol. * $p < 0.05$ vs control jejunum; $^{\dagger}p < 0.05$ vs control duodenum.

treated animals compared to levels in the same small intestine section of control animals (duodenum and jejunum; $p < 0.05$). Intestinal cholesteryl esters and free-cholesterol content remained unchanged among all animal groups.

Protein levels of glycoprotein-P (Fig. 1B) were found to be significantly reduced in the jejunum of SM supplemented animals, which was accompanied by the consequent induction of its transcript levels

(Fig. 1C). No changes in glycoprotein-P expression were observed in the duodenum between groups (Fig. 1B and C).

3.3. SM reduces triglyceride circulating levels without affecting lipotoxicity after ischemia/reperfusion (I/R) injury

We further investigated the impact of SM intake on circulating lipid

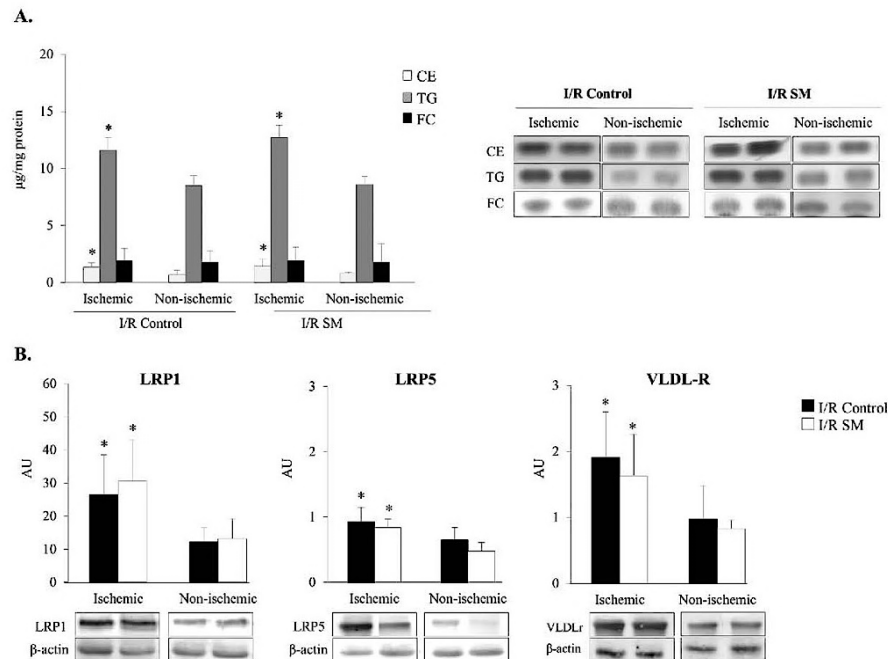


Fig. 2. *Silybum marianum* (SM) effect in cardiac lipid infiltration (A) and lipid receptors (B) early after reperfusion. (n = 6 animals/group). * $p < 0.05$ vs non-ischemic. CE: cholesteryl esters; TG: triglycerides; FC: free cholesterol.

levels in the setting of I/R. In line with our observations, administration of SM prior MI resulted in a significant acute drop in plasma triglyceride levels post SM-intake (Supplemental Table 2). We then investigated cardiac lipid content in the experimental I/R model (1.5h of complete ischemia and 2.5 h reperfusion) that resulted in an impairment of left ventricular ejection fraction (LVEF) of approximately 30%, as previously reported [20]. As shown in Fig. 2A triglyceride was the highest neutral lipid in the ischemic and non-ischemic myocardium of all animals. However, it was higher in the ischemic region as compared to non-ischemic myocardium ($p < 0.05$). Protein expression of lipid receptors was also significantly higher in the ischemic area vs non-ischemic region (Fig. 2B). During acute reperfusion, SM regimen did not result in an increased TG deposit in myocardial tissue, nor demonstrated a significant impact on lipid receptors expression (Fig. 2A and B).

3.4. Chronic SM administration after MI-induction mitigates intramyocardial triglyceride infiltration and increases cardiac expression of triglyceride clearance receptors

As shown in Supplemental Table 2, triglyceride plasma levels returned to baseline at three weeks post-MI. Of note, blood extractions were performed 12h after the last daily dose of SM. Similar to previous findings, SM-intake induced no changes in total, HDL- or LDL-cholesterol (Supplemental Table 2), liver enzymes (Supplemental Table 3A), renal function markers (Supplemental Table 3B) and haematological parameters (Supplemental Table 4) after the 3-week administration period.

At three weeks post-MI, triglyceride content at a cardiac level was significantly augmented in the ischemia region as compared to the non-infarcted myocardium of control animals (Fig. 3; $p < 0.05$). SM

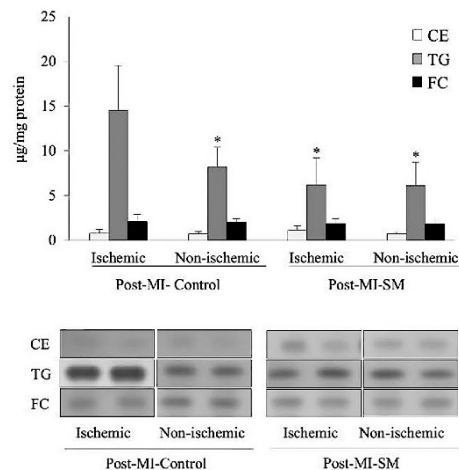


Fig. 3. *Silybum marianum* (SM) reduces cardiac lipid infiltration. MI: myocardial infarction; CE: cholesteryl esters; TG: triglyceride; FC: free cholesterol. * $p < 0.05$ vs ischemic post-MI-Control.

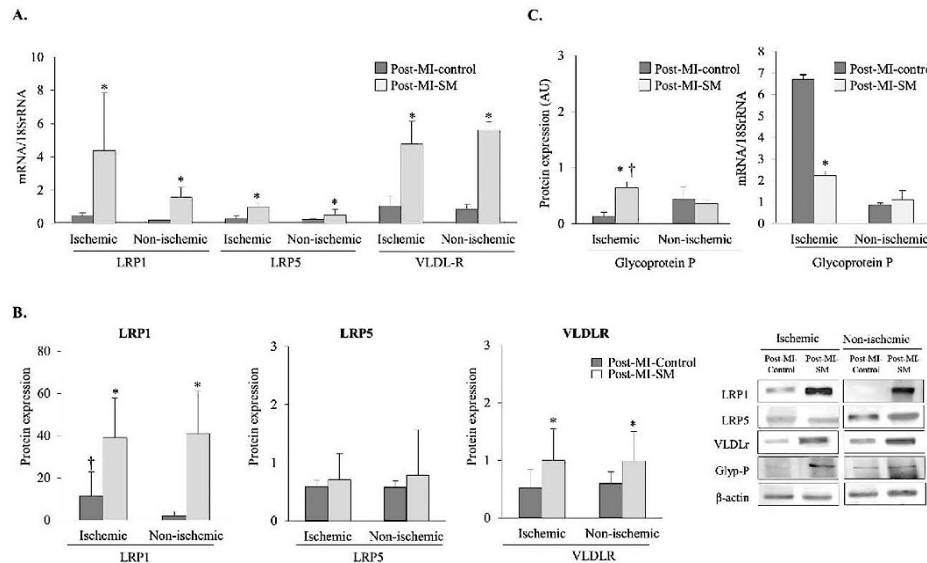


Fig. 4. *Silybum marianum* (SM) enhances cardiac lipid receptors three weeks post-myocardial infarction (MI). Effect of SM on gene (A) and protein (B) expression of scavenger receptors LRP1, LRP5, and VLDL-R and gene and protein expression of glycoprotein-P (C) three weeks post-MI (n = 6 animals/group). MI: myocardial infarction; LRP: lipoprotein receptor-related protein; VLDL-R: very low density lipoprotein receptor. * $p < 0.05$ vs post-MI-control; † $p < 0.05$ non-ischemic myocardium.

administration significantly reduced triglyceride levels in the ischemic area to values similar to the non-ischemic zone (Fig. 3).

As previously reported [20], post-MI-SM-administered animals showed a greater improvement in left ventricle ejection fraction (LVEF) as compared to post-MI-controls (post-MI vs. 3 weeks: $43 \pm 4\%$ vs. $54 \pm 3\%$ post-MI-controls and $41 \pm 2\%$ vs. $63 \pm 2\%$ post-MI-SM; $p < 0.05$). Yet, no significant correlation was detected between cardiac triglyceride content and LVEF at this time point ($r^2 = 0.13$; $y = 61.9 - 0.3x$).

Gene transcription (Fig. 4A) of lipid receptors LRP1, LRP5, and VLDL-R was significantly increased by SM in the entire left ventricle (LV). Protein levels of LRP1, VLDL-R (Fig. 4B) were found to be higher in the entire LV of post-MI-SM animals as compared to post-MI-control animals, whereas no changes were detected for LRP5. Within the post-MI-control animals, LRP1 was enhanced in the infarcted tissue as compared to non-ischemic myocardium. Yet, expression levels were always significantly lower than those displayed in post-MI SM-treated animals.

Glycoprotein-P protein expression was significantly increased in the ischemic myocardium of SM-treated pigs compared to both control animals and the non-ischemic cardiac region (Fig. 4C). SM-treated animals had higher expression of PPAR- γ in the entire myocardial tissue (ischemic and non-ischemic regions) than placebo-treated animals (Fig. 5A). We further assessed the cardiac expression of LPL and CD36, involved in triglyceride breakdown and fatty acid (FA) uptake. As shown in Fig. 5B, protein levels of LPL were significantly reduced in the ischemic myocardium of post-MI-control compared to post-MI-SM animals. In fact, LPL levels in post-MI-SM animals were comparable to those found in non-ischemic cardiac tissue. As per CD36, SM administration for three weeks enhanced CD36 protein expression in the entire LV as compared to post-MI-controls (Fig. 5C).

3.5. SM administration does not display lipid adverse effects on healthy hearts

In animals not subjected to MI (Study 1) myocardial neutral lipids (Supplemental Fig. 2A), protein expression of CD36, LRP1, LRP5, VLDL-R, and glycoprotein-P (Supplemental Fig. 2B) were similar in the SM and control groups throughout the entire myocardium.

3.6. SM does not affect lipid content nor the expression of lipid receptors, glycoprotein-P and HIF1 α in the healthy liver

No variations were detected in the content of neutral lipids within the liver in SM-supplemented animals with respect to controls on day 10 (Supplemental Fig. 3A). Interestingly, transcript levels of LRP1, LRP5, VLDL-R, and glycoprotein-P were significantly increased in SM-treated animals (Supplemental Fig. 3B), but no differences were detected in protein levels of these receptors in unchallenged animals (Supplemental Fig. 3C). No differences were neither detected as per HIF1- α expression in both animal groups (Supplemental Fig. 3D).

3.7. SM modulates scavenger receptors protein expression in the small intestine

No changes were detected in LRP1, LRP5, VLDL-R, CD36, and FABP1 transcript levels between all animals, neither in duodenum nor jejunum (Fig. 6A). In control animals, protein levels of LRP1 and VLDL-R were found to be enhanced in the duodenum as compared to the jejunum (Fig. 6B). SM was able to significantly reduce LRP1 and VLDL-R protein expression in the duodenum, whereas it enhanced its expression in the jejunum (Fig. 6B). LRP5 and CD36 levels were unaffected by SM.

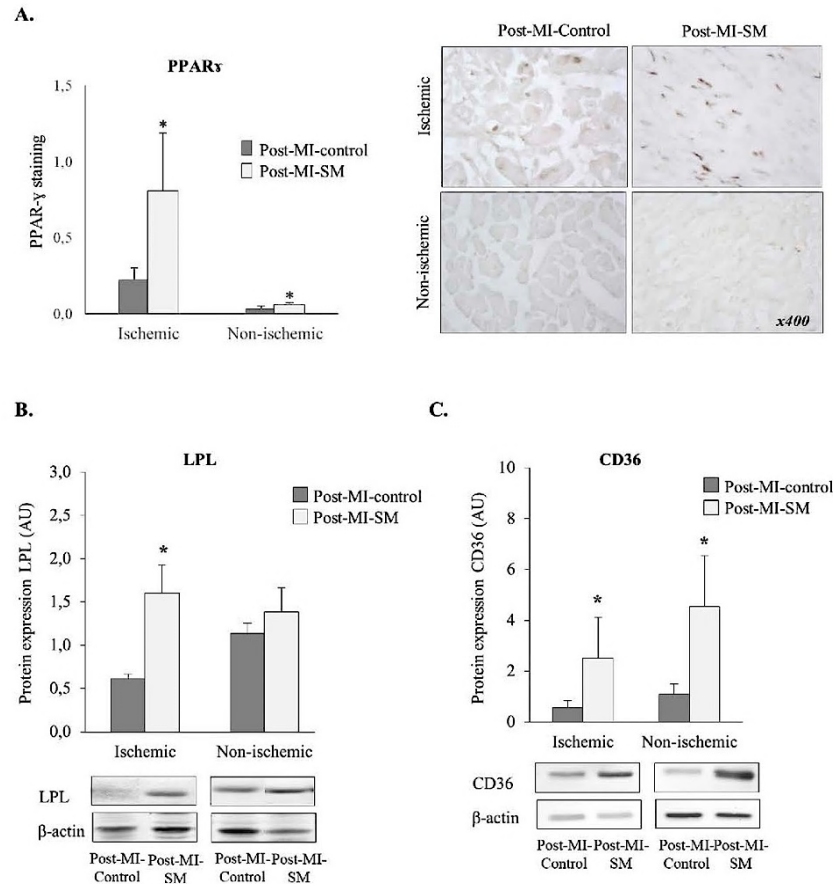


Fig. 5. Effect of SM on myocardial PPAR- γ expression (A) and LPL (B) and CD36 (C) receptors at 3 weeks post-MI.

MI: myocardial infarction; PPAR- γ : peroxisome proliferator-activated receptor- γ ; LPL: lipoprotein lipase. * $p < 0.05$ vs control.

3.8. SM elicits a reduction of lipid receptors in subcutaneous adipose tissue in animals treated for three weeks post-MI

As shown in Fig. 7, SM-administered animals showed a significant decrease in VLDL-R and LPL expression in subcutaneous adipose tissue three weeks post-MI as compared to post-MI-controls. No differences were observed in LRP5 and CD36 expression within all animals over time.

4. Discussion

In the present study, we report that SM administration markedly reduces plasma triglyceride levels through attenuation of triglyceride intestinal absorption and modulates cardiac lipotoxicity in the ischemic myocardium three weeks post-infarction. So far, pre-clinical and human trials have supported SM ability to decrease triglyceride serum levels, in particular in the setting of type II diabetes and metabolic syndrome [30]. Our data suggests that SM interferes with the process of triglyceride intestinal absorption leading to a sharp decline in triglyceride plasma

levels, an effect that remains up to 4h post-ingestion. In this regard, experimental models employing specialized techniques developed to assess intestinal function, mainly Caco-2 cell permeability and single-pass intestinal perfusion, have determined that SM uptake is predominantly achieved in the small intestine [31]. Due to its high flavonoid composition, SM presents low intestinal absorption with poor bioavailability evidencing its effects mainly in the intestinal region [32, 33]. Yet, research into novel formulations to enhance its activity in targeted tissues such as liposolid compounds, bioengineered nanoparticle delivery systems and liposomal carriers is under development [34,35]. Interestingly, in subcutaneous adipose tissue we observe a significant reduction in VLDL-R and LPL protein expression at 3 weeks post-MI allowing us to discard potential confounding mechanisms of decrease triglyceride plasma levels through adipose tissue uptake. Moreover, in the small intestine of SM-treated animals we demonstrate a reduction in glycoprotein-P levels. Conflicting evidence exists as per SM effect on glycoprotein-P activity. In some clinical studies, SM has shown to hinder glycoprotein-P mediated clearance of chemotherapy drugs [36], while other findings related to the co-administration of SM with

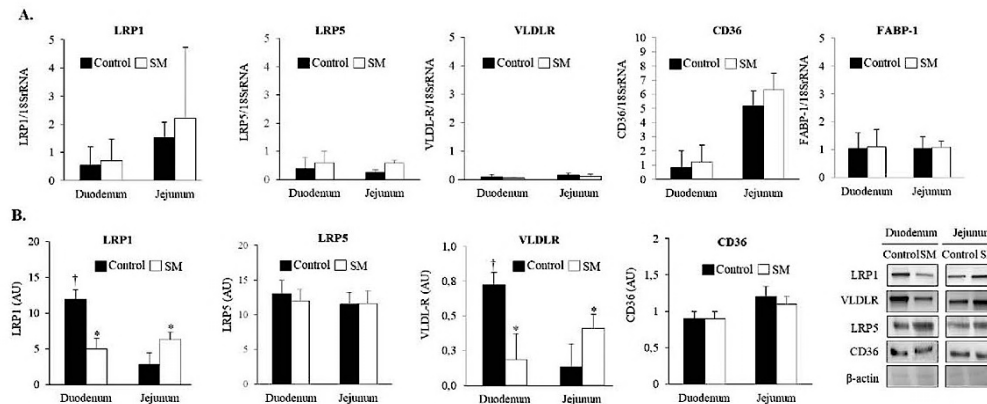


Fig. 6. Molecular analysis of lipid receptors in the small intestine.

Transcript levels (A) and protein expression (B) of lipid receptors in the small intestine of healthy animals supplemented with SM or placebo-control for 10 days. VLDL-R: very low density lipoprotein receptor; LRP: lipoprotein receptor-related protein; CD: cluster of differentiation. * $p < 0.05$ vs Control; $p < 0.05$ vs Jejunum.

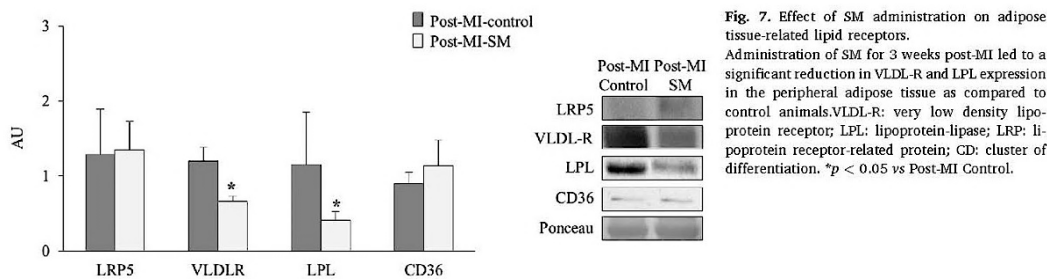


Fig. 7. Effect of SM administration on adipose tissue-related lipid receptors.

Administration of SM for 3 weeks post-MI led to a significant reduction in VLDL-R and LPL expression in the peripheral adipose tissue as compared to control animals. VLDL-R: very low density lipoprotein receptor; LPL: lipoprotein-lipase; LRP: lipoprotein receptor-related protein; CD: cluster of differentiation. * $p < 0.05$ vs Post-MI Control.

digoxin, a substrate of P-glycoprotein, displayed no variations in its pharmacokinetic profile [37]. Of note, SM has shown to impact the multidrug resistance 1 (MDR1) signaling pathway mainly through glycoprotein-P inhibition [38,39]. In fact, a study in healthy human volunteers evidenced an association between SM administration and inhibition of the MDR1 pathway [40]. Several studies, however, have pointed out the highly polymorphic condition of the MDR1 gene encoding for P-glycoprotein [41] which could result in a fluctuating *in vivo* response. Undoubtedly, further research on SM effects on MDR1 are still required.

At a cardiac level, both autopsies and imaging modalities [42] have supported the presence of excess lipid content in the infarcted area of ischemic heart disease patients, directly relating myocardial triglyceride content with ventricular dysfunction [43]. We demonstrated in a pre-clinical animal model that MI induces lipid infiltration within the jeopardized myocardium, which in turn impairs myofibroblast-induced healing of the evolving scar [19]. Besides, triglyceride accumulation in the heart has been shown to play an important role in the development of cardiac fibrosis in type II-diabetes [43]. Pre-clinical trials evaluating mitochondria-targeted antioxidants have demonstrated a crosstalk between cardiac lipotoxicity and mitochondrial oxidative stress, proving to reduce cardiac lipid damage in diet-induced obesity in rats [44]. Meanwhile, in the clinical setting, the administration of compounds known to modulate mitochondrial activity by blocking FA oxidation have decreased myocardial oxidized-FA content and insulin-resistance, ultimately enhancing cardiac function [45]. Here, we have evidence

that SM intake is not able to change cardiac triglyceride content acutely after reperfusion (2.5 h after infarction), yet, at 3-weeks after MI the daily administration of SM did result in a significant attenuation of cardiac lipotoxicity. In an earlier study [15], we detected an improvement of global ventricular performance at 3 weeks post-MI. Although we do not observe a direct correlation between cardiac triglyceride levels and cardiac performance at this time point, left ventricular remodeling remains a complex molecular and structural process extending beyond lipid deposition. Indeed, the additional benefits of SM on oxidative stress, tissue survival, and reparative fibrosis may have synergistically contributed to the general functional benefits observed on LVEF [15]. Regarding the effect on cardiac lipid receptors, these triglyceride-related structural benefits associated with SM intake were accompanied by an overall positive induction of VLDL-R and LRP1 expression within the entire LV. A study in VLDL-R and LDL-R knockout transgenic mice model has demonstrated that VLDL-R plays a key role in the peripheral uptake of triglycerides and that its deletion contributes to lipotoxicity and increased mortality [46]. Regarding SM effect on LRP1, we have earlier established that ischemia stimulates LRP1 expression in cardiomyocytes likely influencing lipid homeostasis [47]. At this time, we expand this evidence by exhibiting SM ability to further increase LRP1 activity in the injured heart. As per the role of LRP5, we do not detect changes in this receptor's expression in chronic stages post-MI, in line with our previous work [48]. However, we demonstrate that LRP5 is markedly enhanced in the ischemic myocardium in both animal groups early after reperfusion, although not being affected by SM administration. Hence, we

evidence that LRP5 seems to modulate myocardial lipid toxicity post-MI beyond its role in preventing vascular lipid infiltration [49]. Moreover, we also identify a recovery in the cardiac expression of LPL in the ischemic myocardium and higher CD36 protein expression in the entire LV of SM administered animals. LPL, through triglyceride hydrolysis, releases FAs which, upon beta-oxidation, are considered the predominant source of energy for the heart [50].

Interestingly, the hypotriglyceridemic activity of PPAR γ has been directly related to LPL induction, eventually contributing to modulate cardiac lipid metabolism [51]. In this study, we have demonstrated an enhanced expression of PPAR γ in the entire cardiac tissue of SM-treated animals in comparison to control further supporting SM-related cardiometabolic beneficial effects. At the same time, CD36 represents a key FA translocase responsible for FA cardiac uptake [52]. Of note, several studies have evaluated cardiac lipid metabolism in both LPL and CD36 knock-out mice models, displaying a significant reduction in cardiomyocyte FA uptake which is associated with an increase in plasma triglycerides levels [53,54]. Finally, we also detect an enhancement in glycoprotein-P levels in the infarcted tissue of animals under chronic SM administration. So far, an experimental study in a rat model of apnea has evidenced a significant raise in myocardial glycoprotein-P activity two weeks after intermittent exposure to hypoxia [55]. Further studies are required to determine the mechanisms by which SM may modulate glycoprotein-P expression in the cardiac tissue subjected to ischemia.

In conclusion, *Silybum marianum* acutely reduces plasma triglyceride levels as a result of decrease intestinal triglyceride absorption. Moreover, daily intake of SM for 3 weeks post-MI enhances cardiac receptors related to triglyceride metabolism and PPAR γ , ultimately leading to a reduction in myocardial triglyceride-infiltration. Because SM did not exert any effect on healthy hearts, we can postulate that SM effects on cardiac lipotoxicity in the remodeled myocardium post-MI are the result of not only lowering plasma levels but of a direct effect on triglyceride clearance in the damaged myocardium due to lipid receptors up-regulation. MI-derived tissue disruption could have passively induced the accumulation of triglycerides; however, the effects are not seen in the acute phase of MI (2.5 h reperfusion animals), when the injury is inflicted in the cardiac tissue.

It is of interest that there were no safety concerns detected during the study, as well as liver and kidney functions remained within normal range. Likewise, SM inhibition of triglyceride intestinal absorption was accompanied by differential modulation of LRP1 and VLDL-R in the different regions of the small intestine, which will require additional research to identify the significance and correlation in this finding.

Adding to our prior evidence of SM effectiveness in reducing myocardial oxidative damage, preserving mitochondrial function and improving reparative fibrosis in the heart [21], SM seems a cost-effective and promising novel therapeutic strategy not only to diminish systemic triglyceride concentrations but to prevent adverse ischemic left ventricular remodeling and the subsequent development of heart failure.

Financial support

This work was supported by Plan Nacional de Salud (PNS) [PGC2018-094025-B-I00 to G.V and PID2019-107160RB-I00 to L.B.] from the Spanish Ministry of Science and Innovation and funds FEDER “Una Manera de Hacer Europa”; and CIBERCV (to L.B.). We thank the support of the Generalitat de Catalunya (Secretaria d'Universitats i Recerca del Departament d'Economia i Coneixement de la Generalitat, 2017 SGR 1480) and the Fundación Investigación Cardiovascular-Fundación Jesus Serra for their continuous support.

CRediT authorship contribution statement

Gemma Vilàhur: Conceptualization, Methodology, Investigation, Formal analysis, Resources, Data curation, Writing – original draft, Supervision, Project administration. **Pablo Sutelman:** Methodology,

Investigation, Formal analysis, Writing – original draft, Supervision. **Guiomar Mendieta:** Writing – original draft, Formal analysis. **Soumaya Ben-Aicha:** Investigation, Formal analysis. **María Borrell-Pages:** Investigation, Formal analysis. **Esther Peña:** Investigation, Formal analysis. **Javier Crespo:** Investigation, Formal analysis. **Laura Casaní:** Investigation, Formal analysis. **Lina Badimon:** Conceptualization, Writing Review, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

Declaration of competing interest

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

Acknowledgments

We gratefully acknowledge the valuable help and support of M.A. Canovas, P. Catalina, J. Moreno, L. Nasarre, and S. Huertas with animal handling and for the proper conduct of all the experimental and molecular work.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2021.03.014>.

References

- [1] D. Delmas, Silymarin and derivatives: from biosynthesis to health benefits, *Molecules* 25 (10) (2020) 2415, <https://doi.org/10.3390/molecules25102415>.
- [2] G. Karimi, M. Vahabzadeh, P. Lari, M. Rashedinia, M. Moshiri, “Silymarin”, a promising pharmacological agent for treatment of diseases, *Iran J Basic Med Sci* 14 (2011) 308–317, PMID: 23492971; PMCID: PMC3586829.
- [3] Z. Maciño, G. Crespo, M. D'Amato, N. Brambilla, G. Giacovelli, L. Rovati, J. Costa, M. Navasa, X. Forns, Intravenous silybin monotherapy shows significant antiviral activity in HCV-infected patients in the peri-transplantation period, *J. Hepatol.* 58 (2013) 415–420, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.09.034>.
- [4] M. Vahabzadeh, N. Amiri, G. Karimi, Effects of silymarin on metabolic syndrome: a review, *J. Sci. Food Agric.* 98 (13) (2018) 4816–4823, <https://doi.org/10.1002/jsfa.9115>.
- [5] D. Delmas, J. Xiao, A. Vejux, V. Aires, Silymarin and cancer: a dual strategy in both in chemoprevention and chemosensitivity, *Molecules* 25 (9) (2020) 2009, <https://doi.org/10.3390/molecules25092009>. Published 2020 Apr 25.
- [6] L. Wang, B. Waltenberger, E.M. Pferschy-Wenzig, M. Blunder, X. Liu, C. Malainer, T. Blazevic, S. Schwaiger, J.M. Rollinger, E.H. Heiss, D. Schuster, B. Kopp, R. Bauer, H. Stuppner, V.M. Dirsch, A.G. Atanasov, Natural product agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ): a review, *Biochem. Pharmacol.* 92 (1) (2014) 73–89, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.07.018>.
- [7] M. Gu, P. Zhao, J. Huang, Y. Zhao, Y. Wang, Y. Li, Y. Li, S. Fan, Y.M. Ma, Q. Tong, L. Yang, G. Ji, C. Huang, Silymarin ameliorates metabolic dysfunction associated with diet-induced obesity via activation of farnesyl X receptor, *Front. Pharmacol.* 7 (2016) 345, <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00345>, 2016 Sep 28.
- [8] A. Federico, M. Trappolliere, C. Tuccillo, I. de Sio, A. Di Leva, C. Del Vecchio Blanco, C. Loguercio, A new silybin-vitamin E-phospholipid complex improves insulin resistance and liver damage in patients with non-alcoholic fatty liver disease: preliminary observations, *Gut* 55 (6) (2006) 901–902, <https://doi.org/10.1136/gut.2006.091967>.
- [9] M.L.F. Bittencourt, R.P. Rodrigues, R.R. Kitagawa, R. de Cássia Ribeiro Gonçalves, The gastroprotective potential of silybinin against *Helicobacter pylori* infection and gastric tumor cells [published online ahead of print, 2020 Jun 27], *Life Sci.* (2020), <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117977>, 117977.
- [10] S. Glichi, L. David, B. Moldovan, I. Baldea, D. Olteanu, M. Filip, A. Nagy, V. Luca, C. Crivii, P. Mircea, G. Katona, G.A. Filip, Hepatoprotective effects of silymarin coated gold nanoparticles in experimental cholestasis, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 115 (2020) 111117, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111117>.
- [11] N. Malkani, A. Naeem, F. Ijaz, S. Mumtaz, S. Ashraf, M.I. Sohail, *Silybum marianum* (milk thistle) improves vancomycin induced nephrotoxicity by downregulating apoptosis [published online ahead of print, 2020 Jul 7], *Mol. Biol. Rep.* (2020), <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05635-9>.
- [12] G. Shokouhi, M. Kosari-Nasab, A.A. Salari, Silymarin sex-dependently improves cognitive functions and alters TNF- α , BDNF, and glutamate in the hippocampus of mice with mild traumatic brain injury [published online ahead of print, 2020 Jul 4], *Life Sci.* 257 (2020) 118049, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118049>.
- [13] A. Zholobenko, M. Modiransky, Silymarin and its constituents in cardiac preconditioning, *Fitteropatia* 97 (2014) 122–132, <https://doi.org/10.1016/j.fitteropatia.2014.05.016>.

- [14] H. Chen, D.F. Su, T.H. Zhang, H.J. Ding, Y.C. Yang, S.C. Chen, [Effects of silybin on acute myocardial infarction and reperfusion injury in anesthetized rats], *Zhongguo Yaodi Xuebao* 13 (1) (1992) 69–71.
- [15] G. Vilahur, L. Casaní, E. Peña, J. Crespo, O. Juan-Babot, S. Ben-Aicha, G. Mendieta, M.T. Béjar, M. Borrell, L. Badimon, Silybin marianum provides cardioprotection and limits adverse remodeling post-myocardial infarction by mitigating oxidative stress and reactive fibrosis, *Int. J. Cardiol.* 270 (2018 Nov 1) 28–35, <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2018.06.030>.
- [16] G. Vilahur, L. Casaní, E. Peña, J. Crespo, O. Juan-Babot, S. Ben-Aicha, G. Mendieta, M.T. Béjar, M. Borrell, L. Badimon, Reply to the letter by Dr. Ulas to the manuscript entitled: "Silybin marianum provides cardioprotection and limits adverse remodeling post-myocardial infarction by mitigating oxidative stress and reactive fibrosis", *Int. J. Cardiol.* 270 (2018) 78, <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2018.07.056>.
- [17] N. Sarwar, J. Danesh, G. Eiriksdottir, G. Sigurdsson, N. Wareham, S. Bingham, S. M. Boekholdt, K.T. Khaw, V. Gudnason, Triglycerides and the risk of coronary heart disease: 10,158 incident cases among 262,525 participants in 29 Western prospective studies, *Circulation* 115 (2007) 450–458, <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.637793>.
- [18] R.H. Unger, Lipotoxic diseases, *Annu. Rev. Med.* 53 (2002) 319–336, <https://doi.org/10.1146/annurev.med.53.082901.104057>.
- [19] G. Vilahur, L. Casaní, O. Juan-Babot, J.M. Guerra, L. Badimon, Infiltrated cardiac lipids impair myofibroblast-induced healing of the myocardial scar post-myocardial infarction, *Atherosclerosis* 224 (2012) 368–376, <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.07.003>.
- [20] M. Jun, C. Foote, J. Lv, B. Neal, A. Patel, S.J. Nicholls, D.E. Grobbee, A. Cass, J. Chalmers, V. Perkovic, Effects of fibrates on cardiovascular outcomes: a systematic review and meta-analysis, *Lancet* 375 (9729) (2010) 1875–1884, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60656-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60656-3).
- [21] A.C. Skulas-Ray, P.W.F. Wilson, W.S. Harris, E.A. Brinton, P.M. Kris-Etherton, C. K. Richter, T.A. Jacobson, M.B. Engler, M. Miller, J.G. Robinson, C.B. Blum, D. Rodriguez-Leyva, S.D. de Ferranti, F.K. Welty, American heart association council on arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology; council on lifestyle and cardiometabolic health; council on cardiovascular disease in the young; council on cardiovascular and stroke nursing; and council on clinical cardiology. Omega-3 fatty acids for the management of hypertriglyceridemia: a science advisory from the American heart association, *Circulation* 140 (12) (2019) e673–e691, <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000709>.
- [22] D.L. Bhatt, P.G. Steg, M. Miller, E.A. Brinton, T.A. Jacobson, S.B. Ketchum, R. T. Doyle Jr., R.A. Juliano, L. Jiao, C. Granowitz, J.C. Tardif, C.M. Ballantyne, REDUCE-IT Investigators, Cardiovascular risk reduction with icosapent ethyl for hypertriglyceridemia, *N. Engl. J. Med.* 380 (2019) 11–22, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1812792>.
- [23] S.J. Nicholls, A.M. Lincoff, M. Garcia, D. Bash, C.M. Ballantyne, P.J. Barter, M. H. Davidson, J.P. Kastlein, W. Koenig, D.K. McGuire, D. Mozaffarian, P. M. Ridker, K.K. Ray, B.G. Katona, A. Himmelmann, L.E. Loss, M. Rensfeldt, T. Lundström, R. Agrawal, V. Menon, K. Wolski, S.E. Nissen, Effect of high-dose omega-3 fatty acids vs corn oil on major adverse cardiovascular events in patients at high cardiovascular risk, *JAMA* 324 (22) (2020) 2268–2280, <https://doi.org/10.1001/jama.2020.22258>.
- [24] T. Aung, J. Halsey, D. Kromhout, H.C. Gerstein, R. Marchionni, L. Tavazzi, J. M. Geleijnse, B. Rauch, A. Ness, P. Galan, E.Y. Chew, J. Bosch, R. Collins, S. Lewington, J. Armitage, R. Clarke, Omega-3 treatment trialists' collaboration. Associations of omega-3 fatty acid supplement use with cardiovascular disease risks: meta-analysis of 10 trials involving 77917 individuals, *JAMA Cardiol* 3 (2018) 225–234, <https://doi.org/10.1001/jama.2017.5205>.
- [25] J.A.S. Carson, A.H. Lichtenstein, C.A.M. Anderson, L.J. Appel, P.M. Kris-Etherton, K.A. Meyer, K. Petersen, T. Polonsky, L. Van Horn, American heart association nutrition committee of the council on lifestyle and cardiometabolic health; council on arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology; council on cardiovascular and stroke nursing; council on clinical cardiology; council on peripheral vascular disease; and stroke council. Dietary cholesterol and cardiovascular risk: a science advisory from the American heart association, *Circulation* 141 (3) (2020) e39–e53, <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000743>.
- [26] E. Ghaedi, M. Mohammadi, H. Mohammadi, N. Ramezani-Jolfaie, J. Malekzadeh, M. Hosseini-Zadeh, A. Salehi-Abargouei, Effects of a paleolithic diet on cardiovascular disease risk factors: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [published correction appears in *adv nutr.* 2020 Jul 1; 11(4):1054], *Adv Nutr* 10 (4) (2019) 634–646, <https://doi.org/10.1093/advances/nmz007>.
- [27] C. Kilkenny, W.J. Browne, I.C. Cuthill, M. Emerson, D.G. Altman, Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research, *PLoS Biol.* 8 (2010) e1000412, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000412>.
- [28] B.P. Jacobs, C. Denney, G. Ramirez, J. Sapp, V.A. Lawrence, Milk thistle for the treatment of liver disease: a systematic review and meta-analysis, *Am. J. Med.* 113 (2002) 506–515, [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(02\)01244-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(02)01244-5).
- [29] E.G. Blich, W.J. Dyer, A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 (1959) 911–917, <https://doi.org/10.1139/c59-099>.
- [30] M. Zarvandi, H. Rakhshandeh, M. Abazari, R. Shafie-Nick, A. Ghorbani, Safety and efficacy of a polyherbal formulation for the management of dyslipidemia and hyperglycemia in patients with advanced-stage of type-2 diabetes, *Biomed. Pharmacother.* 89 (2017) 69–75, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.02.016>.
- [31] L. Barthe, J. Woodley, G. Houin, Gastrointestinal absorption of drugs: methods and studies, *Fundam. Clin. Pharmacol.* 13 (1999) 154–168, <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.1999.tb00334.x>.
- [32] C. Loguercio, D. Festi, Silybin and the liver: from basic research to clinical practice, *World J. Gastroenterol.* 17 (2011) 2288–2301, <https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i18.2288>.
- [33] P. Kidd, K. Head, A review of the bioavailability and clinical efficacy of milk thistle phytosome: a silybin-phosphatidylcholine complex (Siliphos), *Alternative Med. Rev.* 10 (2005) 193–203, PMID: 16164374.
- [34] N.M. Sheta, Y.A. Elfiky, S.A. Boshra, Cardioprotective efficacy of silymarin liquisolid in isoproterenol prompted myocardial infarction in rats, *AAPS PharmSciTech* 21 (3) (2020) 81, <https://doi.org/10.1208/s12249-019-1609-3>, 2020 Jan 23.
- [35] G. Yang, Y. Zhao, Y. Zhang, B. Dang, Y. Liu, N. Feng, Enhanced oral bioavailability of silymarin using liposomes containing a bile salt: preparation by supercritical fluid technology and evaluation in vitro and in vivo, *Int. J. Nanomed.* 10 (2015) 6633–6644, <https://doi.org/10.2147/IJN.S92665>, Published 2015 Oct 22.
- [36] S. Zhang, M.E. Morris, Effects of the flavonoids biochanin A, morin, phloretin, and silymarin on P-glycoprotein-mediated transport, *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 304 (3) (2003) 1258–1267, <https://doi.org/10.1124/jpet.102.044412>.
- [37] B.J. Gurley, G.W. Barone, D.K. Williams, J. Carrier, P. Breen, C.R. Yates, P.F. Song, M.A. Hubbard, Y. Tong, S. Cheboyina, Effect of milk thistle (silybin marianum) and black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) supplementation on digoxin pharmacokinetics in humans, *Drug Metab. Dispos.* 34 (1) (2006) 69–74, <https://doi.org/10.1124/dmd.105.006312>.
- [38] S. Zhang, M.E. Morris, Effect of the flavonoids biochanin A and silymarin on the P-glycoprotein-mediated transport of digoxin and vinblastine in human intestinal Caco-2 cells, *Pharm. Res. (N. Y.)* 20 (2003) 1184–1191, <https://doi.org/10.1023/a:1025044913766>.
- [39] C. Sridar, T.C. Goosen, U.M. Kent, J.A. Williams, P.F. Hollenberg, Silybin inactivates cytochromes P450 3A4 and 2C9 and inhibits major hepatic glucuronosyltransferases, *Drug Metab. Dispos.* 32 (6) (2004) 587–594, <https://doi.org/10.1124/dmd.32.6.587>.
- [40] Y. Han, D. Guo, Y. Chen, Z.R. Tan, H.H. Zhou, Effect of continuous silymarin administration on oral talinolol pharmacokinetics in healthy volunteers, *Xenobiotica* 39 (9) (2009) 694–699, <https://doi.org/10.1080/00498250903060077>.
- [41] S. Hoffmeyer, O. Burk, O. von Richter, et al., Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 (7) (2000) 3473–3478, <https://doi.org/10.1073/pnas.050585397>.
- [42] A. Ferreira, M. Rodrigues, S. Melrinho, A. Fortuna, A. Falcão, G. Alves, Silymarin as a flavonoid-type P-glycoprotein inhibitor with impact on the pharmacokinetics of carbamazepine, oxcarbazepine and phenytoin in rats, *Drug Chem. Toxicol.* (2019 Apr 25) 1–12, <https://doi.org/10.1080/01480545.2019.1601736>.
- [43] J.W. Goldfarb, S. Arnold, M. Roth, J. Han, T1-weighted magnetic resonance imaging shows fatty deposition after myocardial infarction, *Magn. Reson. Med.* 57 (2007) 828–834, <https://doi.org/10.1002/mrm.21207>.
- [44] J.M. McGavock, R.G. Victor, R.H. Unger, L.S. Szczepaniak, American College of P, the American Physiological S. Adiposity of the heart, revisited, *Ann. Intern. Med.* 144 (2006) 517–524, <https://doi.org/10.7326/0003-4819-144-7-200604040-00011>.
- [45] S. Jiménez-González, G. Marín-Royo, R. Jurado-López, M.V. Bartolomé, A. Romero-Miranda, M. Luaces, F. Islas, M.L. Nieto, E. Martínez-Martínez, V. Cachofeiro, The crosstalk between cardiac lipotoxicity and mitochondrial oxidative stress in the cardiac alterations in diet-induced obesity in rats, *Cells* 9 (2) (2020 Feb 17) 451, <https://doi.org/10.3390/cells9020451>.
- [46] P.J. Tacke, B. Teusink, M.C. Jong, D. Harats, L.M. Havekes, K.W. van Dijk, M. H. Hofer, LDL receptor deficiency unmasks altered VLDL triglyceride metabolism in VLDL receptor transgenic and knockout mice, *J. Lipid Res.* 41 (2000) 2055–2062, PMID: 11108739.
- [47] R. Cal, J. Castellano, E. Revuelta-López, R. Alado, M. Barriga, J. Farré, G. Vilahur, L. Nasarre, L. Hove-Madsen, L. Badimon, V. Illorente-Cortés, Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates hypoxia-induced very low density lipoprotein-cholesterol ester uptake and accumulation in cardiomyocytes, *Cardiovasc. Res.* 94 (2012) 469–479, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs136>.
- [48] M. Borrell-Pages, G. Vilahur, J.C. Romero, L. Casaní, M.T. Béjar, L. Badimon, LRP5/canonical Wnt signalling and healing of ischemic myocardium, *Basic Res. Cardiol.* 111 (2016) 67, <https://doi.org/10.1007/s00395-016-0585-y>.
- [49] M. Borrell-Pages, J.C. Romero, L. Badimon, LRP5 deficiency down-regulates Wnt signalling and promotes aortic lipid infiltration in hypercholesterolaemic mice, *J. Cell Mol. Med.* 19 (2015) 770–777, <https://doi.org/10.1111/jcmm.12396>.
- [50] R.H. Eckel, Lipoprotein lipase. A multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases, *N. Engl. J. Med.* 320 (1989) 1060–1068, <https://doi.org/10.1056/NEJM198904203201607>.
- [51] S. Kersten, Peroxisome proliferator activated receptors and lipoprotein metabolism, *PPAR Res.* 2008 (2008) 132960, <https://doi.org/10.1155/2008/132960>, PMID18288277, PMCID: PMC2220040.

- [52] F. Nassir, B. Wilson, X. Han, R.W. Gross, N.A. Abumrad, CD36 is important for fatty acid and cholesterol uptake by the proximal but not distal intestine, *J. Biol. Chem.* 282 (27) (2007) 19493–19501, <https://doi.org/10.1074/jbc.M703330200>.
- [53] A.S. Augustus, J. Buchanan, T.S. Park, K. Hirata, H.L. Noh, J. Sun, S. Homma, J. D'armiento, E.D. Abel, I.J. Goldberg, Loss of lipoprotein lipase-derived fatty acids leads to increased cardiac glucose metabolism and heart dysfunction, *J. Biol. Chem.* 281 (13) (2006) 8716–8723, <https://doi.org/10.1074/jbc.M509890200>.
- [54] I.J. Goldberg, R.H. Eckel, N.A. Abumrad, Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase- and CD36-mediated pathways, *J. Lipid Res.* 50 (2009) S86–S90, <https://doi.org/10.1194/jlr.R800085-JLR200>.
- [55] J.M. Dopp, J.J. Moran, N.J. Abel, N.A. Wiegert, J.B. Cowgill, E.B. Olson, J.J. Sims, Influence of intermittent hypoxia on myocardial and hepatic P-glycoprotein expression in a rodent model, *Pharmacotherapy* 29 (4) (2009 Apr) 365–372, <https://doi.org/10.1592/phco.29.4.365>.

6.2.1. Material suplementario

Supplemental Table 1. Western Blot and RT-PCR data

Data regarding WB antibodies and RT-PCR primers employed in the study.

A. Western Blot

Antibody	Product code
CD36	LS-C81154
Glycoprotein P/ABCB-1/ MDR-1	#13978S
Lipoprotein lipase (LPL)	sc-373759
Lipoprotein receptor protein 1 (LRP-1)	ab92544
Lipoprotein receptor protein 5 (LRP-5)	ab101845
Very low density lipoprotein receptor (VLDLr)	sc-18824
Fatty Acid-Binding Protein 1 (FABP1)	sc-374482
Hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF1- α)	sc-13515

A. RT-PCR

Gene expression assay	Product code
CD36	Ss03388560_m1
ABCB-1/ MDR-1	Ss03373435_m1
Lipoprotein lipase (LPL)	Ss03394612_m1
Lipoprotein receptor protein 1 (LRP-1)	Ss06917033_m1
Lipoprotein receptor protein 5 (LRP-5)	Ss06935750_m1
Very low density lipoprotein receptor (VLDLr)	Ss03374049_m1

Supplemental Table 2. Animals follow-up.

Follow-up of plasma lipid levels up to 3 weeks post-myocardial infarction (n=6 animals/group) either maintained with Silybum Marianum (SM) or placebo-control. MI: myocardial infarction; Sac: sacrifice; *p<0.05 vs baseline control and post-MI-control.

Plasma lipids

Parameter	Timing	Post-MI Control	Post-MI SM
Cholesterol (mg/dL)	<i>Baseline</i>	96.1±20.9	87.0±13.2
	<i>MI</i>	94.6±20.1	105.7±19.8
	<i>Sac (31 days)</i>	92.0±8.9	100.2±18.2
LDL-cholesterol (mg/dL)	<i>Baseline</i>	64.5±9.8	33.2±5.0
	<i>MI</i>	31.5±11.7	58.8±18.5
	<i>Sac (31 days)</i>	41.0±4.0	50.1±22.1
HDL-cholesterol (mg/dL)	<i>Baseline</i>	35.9±8.2	24.2±6.0
	<i>MI</i>	32.1±6.9	29.6±7.1
	<i>Sac (31 days)</i>	28.8±9.1	26.9±4.3
Total-cholesterol/HDL	<i>Baseline</i>	2.8±10.0	3.5±0.9
	<i>MI</i>	3.1±0.9	3.6±1.3
	<i>Sac (31 days)</i>	3.2±0.5	4.1±1.3
Triglycerides (mg/dL)	<i>Baseline</i>	26.4±17.8	30.3±5.0
	<i>MI</i>	23.8±36.8	7.5±2.7*
	<i>Sac (31 days)</i>	25.2±14.0	25.7±2.0
HDL/LDL	<i>Baseline</i>	1.1±0.5	0.7±0.1
	<i>MI</i>	1.1±0.6	0.5±0.1
	<i>Sac (31 days)</i>	0.71±0.1	0.5±0.6

Supplemental Table 3. Liver and renal parameters.

Liver enzymes (A) and renal function (B) in animals maintained for 3 weeks post-myocardial infarction (MI; n=6 animals/group) with either *Silybum marianum* (SM) or control.

A. Liver enzymes

Parameter	Timing	Post-MI-control	Post-MI-SM
GOT	Baseline	24.5±6.1	33.2±5.3
	Sac (31 days)	27.7±5.8	34.9±7.1
GPT	Baseline	26.3±9.0	38.4±7.5
	Sac (31 days)	30.2±8.1	32.0±9.3

B. Renal function

Parameter	Timing	Post-MI-control	Post-MI-SM
Urea	Baseline	19.1±2.9	12.7±6.0
	Sac (31 days)	17.9±3.1	16.0±3.4
Creatinine	Baseline	1.2±0.3	1.4±0.3
	Sac (31 days)	1.4±0.2	1.5±0.2

Supplemental Table 4. Follow-up of haematological parameters in animals at baseline, after a 10 day and 3-week administration of Silybum marianum (SM).
Sac: sacrifice

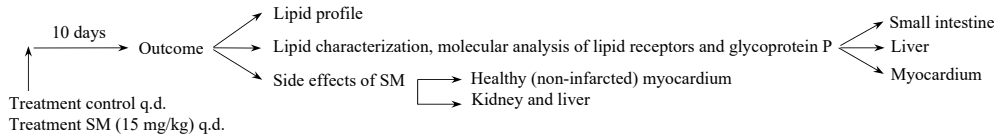
<i>Parameter</i>	<i>Timing</i>	<i>Control</i>	<i>SM</i>
Red Blood Cells (x10³/mm³)	<i>Baseline</i>	4.8±0.5	5.4±0.4
	<i>MI</i>	5.0±0.4	5.38±0.4
	<i>Sac (31 days)</i>	5.1±0.4	5.1±0.3
Hematocrit (%)	<i>Baseline</i>	18.0±2.6	24.2±1.9
	<i>MI</i>	20.5±1.6	24±2.1
	<i>Sac (31 days)</i>	22.0±1.9	23.3±23.0
Hemoglobin (gr/dL)	<i>Baseline</i>	7.0±1.2	8.4±1.3
	<i>MI</i>	13.6±2.0	8.3±1.4
	<i>Sac (31 days)</i>	12.8±1.4	8.0±1.0
Platelets (x10³/mm³)	<i>Baseline</i>	469.0±73.0	346±36.0
	<i>MI</i>	355.3±80.0	372±51.0
	<i>Sac (31 days)</i>	355.7±62.0	333±51.0
White Blood Cells (x10³/mm³)	<i>Baseline</i>	13.4±2.5	12.3±2.0
	<i>MI</i>	13.6±1.8	14.3±1.9
	<i>Sac (31 days)</i>	12.8±1.6	10.7±1.7

Supplemental Figure 1. Experimental design.

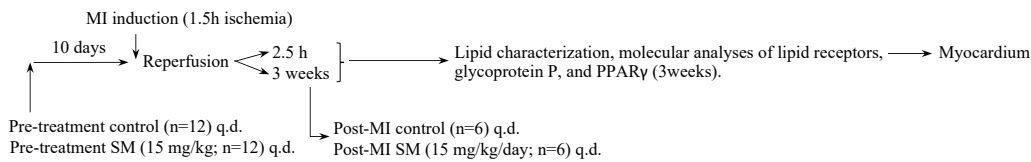
Study 1: effect of daily intake of Silybum Marianum (SM) for 10 days on lipid levels, lipid characterization and analyses of potential side-effects.

Study 2: administration of SM 2 hours prior to ischemia (myocardial infarction; MI-induction) and its effects on myocardial lipid infiltration and glycoprotein P expression shortly after reperfusion (2.5 h) or after a 3-week period.

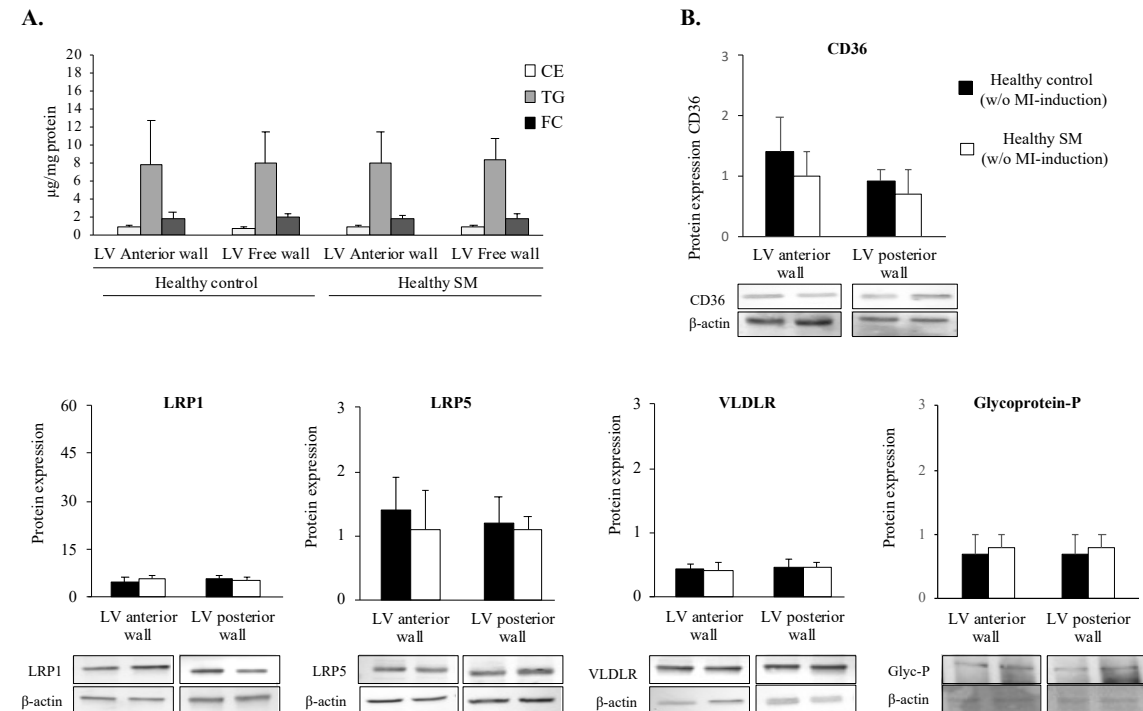
STUDY 1



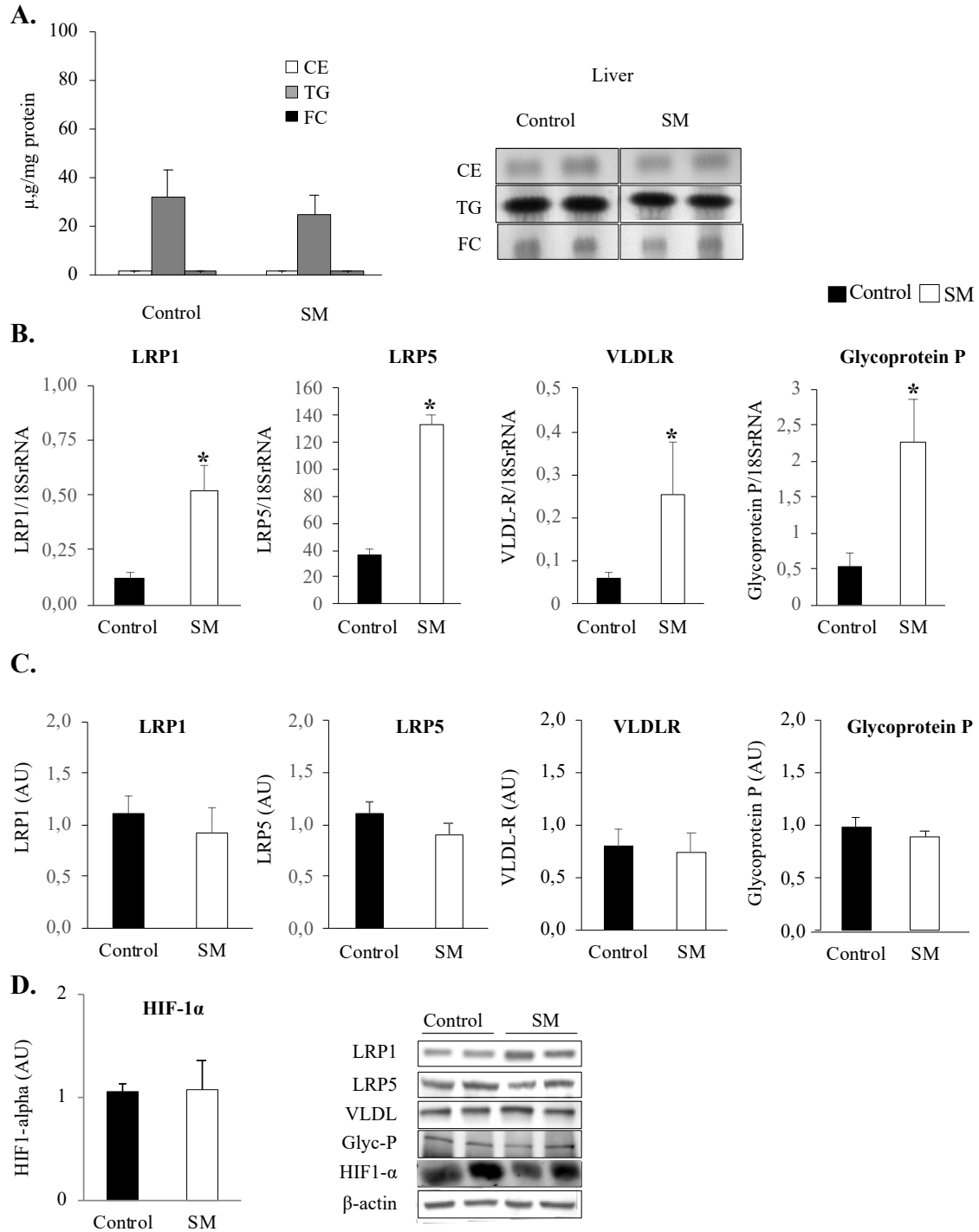
STUDY 2



Supplemental Figure 2. Effect of Silybum Marianum (SM) on myocardial lipid characterization (A) and expression of myocardial lipid receptors and glycoprotein-P (B) in non-infarcted hearts (not subjected to myocardial infarction but supplemented for 10 days with Silybum Marianum (SM) or control animals). LV: left ventricle; CE: cholesteryl esters; TG: triglycerides; FC: free cholesterol; LRP: lipoprotein receptor-related protein; VLDL-R: very low density lipoprotein receptor. N=6 animals/group.



Supplemental Figure 3. Liver lipid characterization. Neutral lipid content 10 days after SM supplementation in healthy animals (A), lipid-receptors gene (B) and protein (C) expression, and HIF1-alpha protein expression (D). CE: cholesteryl esters; TG: triglycerides; FC: free cholesterol; LRP: lipoprotein receptor-related protein; VLDL-R: very low density lipoprotein receptor; HIF: Hypoxia-inducible factor. * $p < 0.05$ vs Control; Black squares: control; White Squares: SM.



7. DISCUSIÓN

El objetivo central de esta tesis consistió en investigar e identificar nuevas terapias de cardioprotección que limiten el daño miocárdico desencadenado tras un IAM y permitan desarrollar respuestas citoprotectoras para favorecer la recuperación estructural y funcional de los tejidos involucrados.

Para dicha tarea se plantearon dos objetivos principales que consistieron en evaluar la actividad de dos nutraceuticos específicamente seleccionados, a través del desarrollo de sendos trabajos de investigación en forma independiente pero inter-relacionada, mediante el empleo de protocolos de estudio, vías y tiempos de administración semejantes así como la utilización de un modelo animal consistente.

7.1. Cardioprotección mediante condicionamiento miocárdico

El condicionamiento miocárdico en sus diversos tiempos (previo al daño celular, durante el mismo o posterior) y formas (mecánico o farmacológico, remoto o a distancia) ha resultado una herramienta efectiva y fácilmente adaptable a las variables situaciones clínicas a las que fue empleado, logrando una aplicabilidad y reproducibilidad considerable. Particularmente en la patología cardiovascular de etiología aterotrombótica, su forma de presentación súbita supone la necesidad de contar con terapias que se encuentren rápidamente disponibles y puedan ser empleadas con efectividad una vez acaecido el evento isquémico, o luego de haberse instaurado los tratamientos de perfusión correspondientes. En ese contexto, el condicionamiento farmacológico resulta la estrategia más conveniente al utilizar compuestos que puedan estar disponibles en cualquier ámbito y que no dependan del uso de herramientas mecánicas en ciclos repetitivos que podrían no ser aplicables en todos los escenarios clínicos. Para tal fin, resulta esencial seleccionar adecuadamente los compuestos químicos, siendo de elección aquellos que no requiriesen de una preparación sustancial antes de ser utilizados, pudiendo ser almacenados en su forma activa y administrados al momento de ser necesarios.

7.2. Nutraceuticos como vehículos terapéuticos

Los nutraceuticos representan un conjunto de macromoléculas presentes naturalmente en su mayoría en formas biológicamente activas, capaces de ser formulados en preparaciones relativamente sencillas de desarrollar, guardar y distribuir. De esta forma, han sido

postulados a través de las últimas décadas como potenciales candidatos para contrarrestar los efectos deletéreos de numerosas condiciones. Debido a los múltiples grupos químicos presentes en su composición, demuestran una gran variedad de funciones y actividades muy diferenciadas, habiéndose demostrado considerables propiedades moduladoras y citoprotectoras. Sin embargo, dada su utilización sistemática en ensayos no metodológicamente comparables, no se ha conseguido hasta la actualidad avanzar en el desarrollo de estudio que demuestren un efecto consistente y sostenido en humanos.

El diseño de tesis doctoral ha buscado mitigar estas disparidades observadas históricamente en el empleo de nutracéuticas como armas terapéuticas. Por un lado, se han seleccionado nutracéuticos que contengan más de un grupo químico en su composición, lo que permitiría hacer uso de varios mecanismos de acción simultáneos y coadyuvantes para potenciar su efecto local y sistémico. Asimismo, se han elaborado protocolos de investigación pre-clínicos comparables y reproducibles que permitan evitar la aparición de sesgos y factores confundidores, reduciendo así la marcada heterogeneidad presente hasta el momento. Finalmente, la utilización de modelos animales más cercanos a la anatomía y fisiopatología humanas lograrían obtener resultados más directamente extrapolables capaces de ser validables en cohortes humanas, por lo que se ha seleccionado al modelo porcino para investigar las propiedades terapéuticas de la espirulina y el *Silybum marianum* en el IAM.

7.3. Modulación metabólica de espirulina y *Silybum marianum*

Los efectos beneficiosos de la espirulina sobre los factores de riesgo CV han sido descriptos previamente. En este trabajo, hemos observado que la suplementación con espirulina no indujo cambios sustanciales en el perfil lipídico o glucémico de los animales tratados, pero sí trajo aparejada una disminución significativa en la tasa de incremento de peso en comparación a controles.

Es importante tener presente que existe evidencia conflictiva respecto al efecto metabólico real de la espirulina, específicamente sobre los valores de colesterol y glucemia, lo cual podría deberse como se ha mencionado a la extensa heterogeneidad presente en los protocolos de estudios tanto a nivel básico como clínico, con una importante variabilidad en el tiempo de tratamiento, dosis empleadas y momento de aplicación, confluyendo así en una escasez de resultados consistentes y extrapolables.

En cuanto a la modulación del peso corporal, su efecto se postula estaría mediado por una inhibición directa de la actividad de la lipasa, y a través de un bloqueo en los mecanismos neurológicos relacionados al centro cerebral del apetito (358, 359, 417). Un metaanálisis

reciente demostró que el consumo regular de espirulina produjo una reducción significativa en el peso corporal total, sin haberse constatado que sea producto de una disminución asociada en el consumo calórico (418). Adicionalmente, se observó que la suplementación con espirulina promovió cambios beneficiosos sinérgicos en la microbiota intestinal (419, 420), reduciendo el efecto negativo de las dietas hipercolesterolémicas en los animales suplementados y ejerciendo efectos anti-inflamatorios tanto a nivel intestinal como sistémico.

Se requerirá de un mayor número de estudios en el tema con diseño metodológicos comparables para identificar adecuadamente el tiempo necesario de utilización así como la dosis de espirulina a administrar.

Por su parte, la administración crónica de *Silybum marianum* ha demostrado inducir un significativo efecto hipolipemiante a nivel sistémico derivado de una reducción en la absorción intestinal de colesterol, mediada principalmente por su efecto a nivel del metabolismo de los triglicéridos. Esta actividad se ha traducido en un impacto directo sobre el miocardio isquémico en el curso de un IAM, reduciendo la infiltración lipídica y la toxicidad derivada de la misma.

De la misma forma observada con el empleo de espirulina, la evidencia relacionada a los efectos de *Silybum marianum* sobre los factores de riesgo cardiovascular es abundante con un resultado neto a favor de su modulación lipídica, pero con resultados disímiles que no permiten validar adecuadamente su efectividad.

7.4. Cardioprotección mediante condicionamiento por espirulina y *Silybum marianum*

El primer artículo de esta tesis evidenció que la suplementación dietaria con espirulina durante 10 días promueve un efecto cardioprotector frente a un evento isquémico agudo por oclusión coronaria completa (IAMCEST), que se asocia a una reducción en el tamaño final del infarto y una mejoría en la función ventricular.

Por primera vez, hemos demostrado el efecto cardioprotector de espirulina para reducir el daño por I/R secundario a un IAMCEST. La actividad cardioprotectora de espirulina se estableció en base a la inhibición de mecanismos inflamatorios, oxidativos y de muerte celular por apoptosis que constituyen la base fisiopatológica esencial del daño por I/R que se desencadena tras un IAM.

En nuestro estudio, hemos señalado los efectos directos de la acción de espirulina a nivel cardíaco al detectar una reducción del 64% en el tamaño final del infarto y un incremento del 30% en la función sistólica del VI en comparación a controles sometidos al mismo evento isquémico.

Como se ha mencionado anteriormente, los estudios más cercanos a evaluar los efectos de cardioprotección por espirulina han sido en base a un modelo animal de cardiotoxicidad por la administración de doxorubicina, un agente quimioterápico familia de las antraciclinas empleado en el tratamiento de diversas neoplasias, que genera una inhibición de la enzima topoisomerasa II impidiendo la síntesis normal del ADN y presenta un efecto cardiotóxico directo a nivel miocárdico. La espirulina fue evaluada tanto en cardiomiocitos de rata como de humanos, así como en un modelo murino, bajo un protocolo de administración de espirulina los 3 días previos a la terapia con doxorubicina y por 7 semanas posteriormente (367, 421). El tratamiento con espirulina provocó una marcada atenuación de la respuesta oxidativa, con una reducción del daño al ADN, limitando la liberación del citocromo c mitocondrial y disminuyendo la actividad de caspasas, redundando en una menor tasa de apoptosis de cardiomiocitos. A nivel clínico, esto se tradujo en una reducción significativa del riesgo de desarrollar IC así como en la mortalidad CV. Notoriamente, este efecto protector de la espirulina no fue contrabalanceado por una menor actividad anti-tumoral de la doxorubicina, que mantuvo intacta su efectividad clínica.

En nuestro estudio, hemos expandido esta evidencia al demostrar los mecanismos responsables de la actividad cardioprotectora de espirulina en el contexto de un IAMCEST, asociándose a una reducción significativa en el daño oxidativo relacionado al ADN, y a una modulación de la actividad pro-inflamatoria con una menor expresión miocárdica de MCP-1. Estos efectos anti-oxidante y anti-inflamatorio observados tras el tratamiento con espirulina podrían haber contribuido a la menor expresión de caspasa-3 detectada en tejido miocárdico isquémico, un claro indicador de reducción de muerte celular por apoptosis, promoviendo así una mayor preservación de miocardio viable post-IAM.

Asimismo, hemos identificado una inducción significativa en la activación de iNOS, mediada por la vía de señalización celular iNOS/NO. Esta vía, sin embargo, ha demostrado una actividad dual, promoviendo por un lado vasodilatación coronaria mejorando así el flujo sanguíneo y limitando el daño isquémico (422, 423); mientras que por otro lado, contribuiría con la formación de especies reactivas de nitrógeno que potenciarían el daño oxidativo celular durante el período de reperusión. En nuestro trabajo, la actividad anti-oxidante de espirulina podría haber influenciado en limitar este daño oxidativo permitiendo mantener los efectos positivos derivados de la activación de iNOS/NO.

Igualmente, hemos evidenciado posibles mecanismos adicionales de cardioprotección al exhibir un incremento en la actividad de TNF- α en los animales tratados con espirulina. TNF- α es un importante modulador de la actividad de iNOS, e interactúa con el receptor de TNF tipo 2 y modula la vía cardioprotectora mediada por SAFE, lo que podría redundar en una mayor capacidad del tejido cardíaco isquémico para atenuar el daño por I/R y limitar

así sus consecuencias deletéreas (424). No obstante, la inducción de TNF- α a nivel crónico podría ejercer un efecto adicional, similar al mencionado previamente por iNOS, provocando un impacto negativo a nivel del músculo cardíaco (425), por lo que se requeriría de información adicional para dilucidar la contribución global de TNF- α en la actividad de espirulina.

Es importante remarcar que la acción de espirulina a nivel miocárdico se ha centrado no solamente en el tejido miocárdico sometido a isquemia, sino que también actúan de forma sinérgica sobre los cardiomiocitos remotos al área de lesión, demostrado a través de la mayor expresión y actividad de AMPK en todo el corazón de los animales tratados (isquémico y no isquémico). Esta vía de activación de AMPK ha sido asociada con una modulación positiva del metabolismo energético cardíaco en corazones bajo un evento isquémico (426-428), pudiendo contribuir a optimizar la reserva energética durante un síndrome coronario mejorando así la capacidad del tejido cardíaco para contrarrestar el daño por I/R.

A nivel sistémico, los animales suplementados con espirulina demostraron un efecto anti-inflamatorio aditivo secundario a una menor expresión de Cox-2 en forma aguda post-IAM, sin observarse cambios significativos en los niveles de IL-1 β , aunque esta actividad podría haberse debido a una menor presencia del complejo inflamasoma NLRP3 en la lesión post-infarto encargado de procesar las formas activas de IL-1 β (429).

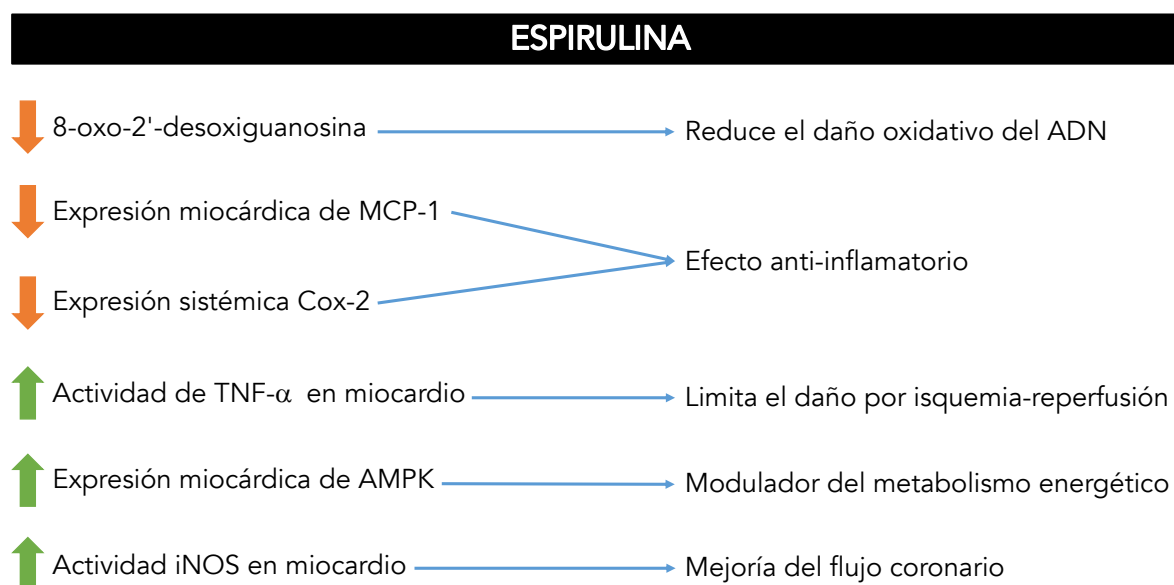


Figura 13. Mecanismos de acción de espirulina. AMPK: Protein-quinasa activada por monofosfato de adenosina; Cox-2: Ciclooxigenasa-2; iNOS: Óxido nítrico sintetasa inducible; TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa.

El segundo objetivo consistió en investigar si la administración de *Silybum marianum* es capaz de mitigar el remodelado ventricular adverso desencadenado tras un IAMCEST.

Como se ha podido evidenciar, hemos demostrado que la suplementación regular con *Silybum marianum* produjo una reducción significativa en los niveles de triglicéridos a nivel sistémico mediada por una disminución en su absorción intestinal, que a su vez se asoció a una reducción en la acumulación de triglicéridos a nivel miocárdico (lipotoxicidad cardíaca) limitando así los cambios celulares y estructurales que redundan en un mayor grado de disfunción ventricular y remodelado ventricular adverso.

En este trabajo, primeramente reportamos que la suplementación con *Silybum marianum* induce una disminución significativa y selectiva de los niveles plasmáticos de triglicéridos, sin afectar el resto de lipoproteínas específicas. Este efecto hipotrigliceridémico selectivo, observado en forma aguda desde 1 hora post-administración de *Silybum marianum*, fue secundario a una reducción superior al 50% en la absorción intestinal de triglicéridos, nuevamente sin afectar el contenido de otros lípidos neutros en el intestino delgado (i.e., ésteres del colesterol intestinal y colesterol libre). A su vez, descartamos otros potenciales mecanismos de reducción de triglicéridos, como aquellos derivados de una mayor captación en el tejido adiposo periférico, dada la disminución registrada en el receptor de la lipoproteína de muy baja densidad (VLDL-R) y LPL a 3 semanas post-infarto.

Este fenómeno, a su vez, se asoció con una disminución significativa en la expresión proteica de la proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP1) y VLDL-R en el duodeno, junto a su incremento compensatorio en el yeyuno, permitiendo identificar las vías posiblemente involucradas en la reducción de la absorción intestinal del triglicéridos. Asimismo, se observó una disminución significativa en la expresión proteica de la glicoproteína P. Esta glicoproteína se encuentra codificada dentro del gen de mutación de resistencia a multidroga 1 (MDR1 por sus siglas en inglés), responsable del metabolismo de múltiples compuestos y fármacos. La utilización de *Silybum marianum* ha sido relacionada previamente con la activación de esta vía metabólica (430-432), aunque dada la condición altamente polimórfica de este gen y la variabilidad en la expresión de la glicoproteína P (433), su real significado clínico resulta incierto, y se requiere de información adicional para valorar las potenciales interacciones entre este nutraceutico y el tratamiento farmacológico complementario presente en esta población.

Posteriormente, analizamos el impacto de la ingesta regular de *Silybum marianum* sobre la esteatosis cardíaca a 3 semanas post-infarto. Nuestros datos evidencian un claro papel cardioprotector de *Silybum marianum* para limitar la lipotoxicidad miocárdica y reducir el grado de disfunción ventricular post-infarto. Se ha descrito con anterioridad que un evento

coronario agudo da lugar a un proceso de infiltración lipídica a nivel cardíaco que induce la expansión de la cicatriz necrótica del infarto y contribuye así, secundariamente, a la disfunción sistólica isquémica (434-436). A su vez, esta toxicidad lipídica se encuentra mediada directamente por la acumulación de triglicéridos en tejido miocárdico, inicialmente viable, favoreciendo el desarrollo de fibrosis ventricular y el remodelado cardíaco adverso (436). En nuestro trabajo, la administración regular de *Silybum marianum* no evidenció cambios significativos respecto al contenido miocárdico de triglicéridos en forma aguda post-reperusión (a 2,5 horas luego de un IAMCEST). Sin embargo, sí consiguió modificar en forma significativa la acumulación de triglicéridos a nivel del tejido cardíaco isquémico a las 3 semanas del evento. Aunque no se observó correlación directa entre el grado de infiltración de triglicéridos con la función ventricular, estos efectos beneficiosos se asociaron con una recuperación de la contractilidad cardíaca y limitación del remodelado ventricular post-infarto, por lo que las propiedades citoprotectoras y anti-oxidantes de *Silybum marianum* podrían haber contribuido directamente al incremento observado en la FEVI.

La actividad cardioprotectora de *Silybum marianum* ha sido valorada en varios estudios previos, aunque en su mayor proporción las investigaciones han sido llevadas a cabo in vitro o en modelos de pequeños animales. Por un lado, el empleo de *Silybum marianum* ha demostrado en un modelo murino optimizar la función cardíaca y reducir el tamaño final del infarto así como la fibrosis intersticial a través de una atenuación en la disfunción mitocondrial, reduciendo la apoptosis de cardiomiocitos y ejerciendo una actividad anti-inflamatoria y anti-oxidante durante el daño por I/R (437). A nivel mecanístico, *Silybum marianum* también ha evidenciado un efecto citoprotector al reducir la activación de las caspasas 9 y 12, responsables de los mecanismos de apoptosis celular, y por otro lado atenuar el efecto de la enzima catalasa y la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa 2 y 4 (NOX 2-4), estimulando a la vez la citoquina relacionada con el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2), todo lo cual contribuye a limitar la respuesta pro-oxidativa post-IAM. Asimismo, ha probado mejorar la capacidad mitocondrial y del retículo endoplásmico de respuesta al estrés, induciendo una intensa actividad anti-inflamatoria basada en la inhibición final de NF- κ B, atenuando la activación del complejo inflammasoma NLRP3 y disminuyendo los niveles de TNF- α e IL-6 (437-439), de esta forma restringiendo efectivamente la progresión de la respuesta pro-inflamatoria.

Adicionalmente, *Silybum marianum* ha demostrado una actividad sinérgica al régimen anti-trombótico con clopidogrel, disminuyendo la inflamación y disfunción endotelial, y reduciendo el progreso de la lesión aterosclerótica en un modelo murino (440). Se ha postulado que este fenómeno ocurriría por una disminución en la oxidación de moléculas

de C-LDL (441, 442), así como por una reducción en los niveles de dimetilarginina asimétrica (ADMA) vascular y plasmática, aumentando los niveles de NO disponible con la consiguiente vasodilatación y citoprotección asociada (443, 444). Igualmente, en un modelo de conejo hipercolesterolémico, *Silybum marianum* ha evidenciado un efecto antiaterogénico al reducir el crecimiento y desarrollo de las placas de aterosclerosis, en forma dosis-dependiente (hasta 200 mg/kg/día de silimarina administrada) (445). Por último, en el campo clínico *Silybum marianum* se ha empleado en forma de condicionamiento farmacológico en 140 pacientes sometidos a cirugía de revascularización miocárdica, demostrando una reducción significativa en la inflamación post-quirúrgica, con una modulación positiva a nivel del metabolismo lipídico y glucémico, aunque dichos hallazgos no se asociaron a una disminución en eventos clínicos mayores (446).

Nuestros hallazgos demuestran que *Silybum marianum* es capaz de limitar la cardioprotección a través de dos mecanismos fundamentales: la inducción en la expresión de receptores encargados de prevenir la acumulación intra-miocárdica de triglicéridos (principalmente derivada de la activación de LRP1 y VLDL-R), y un efecto positivo sobre el metabolismo lipídico cardíaco mediante la inducción de receptores con actividad hipotrigliceridémica como CD-36, LPL y el receptor activado por proliferador peroxisomal gamma (PPAR- γ). Tanto la inhibición de VLDL-R como LRP1 han sido relacionados con un incremento en la infiltración cardíaca de triglicéridos y mayor mortalidad post-infarto (447, 448) por lo que su modulación por *Silybum marianum* promovería una optimización en el metabolismo lipídico cardíaco reduciendo así las consecuencias deletéreas de la lipotoxicidad. Adicionalmente, la participación de CD-36 y LPL, que en condiciones fisiológicas promueven la beta-oxidación de ácidos grasos como fuente de energía principal para el mantenimiento de la función cardíaca, ha sido analizada en modelos animales de pérdida de función demostrando un daño directo derivado de la acumulación lipídica de triglicéridos (449, 450). En este trabajo, los animales suplementados con *Silybum marianum* demostraron un aumento en la expresión de LPL y CD-36 a nivel del tejido miocárdico isquémico y de todo el VI, respectivamente, atenuando la toxicidad cardíaca por triglicéridos. Por su parte, la actividad de PPAR- γ en los animales suplementados con *Silybum marianum* se incrementó en forma significativa en todo el tejido miocárdico en comparación a controles. La actividad de PPAR- γ consiste en limitar la infiltración de triglicéridos, cuya capacidad se ha observado que depende en gran medida de la inducción complementaria de LPL (451), habiéndose registrado en nuestro trabajo una activación sinérgica de ambos receptores. Nuevamente, en forma análoga a lo descrito por la espirulina, *Silybum marianum* actuó sobre todo el miocardio y no sólo en

los cardiomiocitos isquémicos en riesgo, lo cual demuestra el perfil integral de este nutraceutico en influenciar positivamente todo el tejido cardíaco.

Estas modificaciones también se asociaron con un incremento en la expresión de glicoproteína P a nivel del tejido infartado en animales bajo efecto de *Silybum marianum*. Esta glicoproteína ha sido señalada como responsable de un potencial mecanismo compensador frente a la hipoxia celular (452), por lo que su inducción en este caso podría contribuir a la resistencia de los cardiomiocitos sometidos a isquemia y daño por I/R.

Por último, dado que la suplementación con *Silybum marianum* no indujo cambios significativos en corazones sanos no sometidos a la inducción del IAM, se podría inferir que la actividad global de este nutraceutico no sólo derivaría de la debida reducción en los niveles plasmáticos de triglicéridos sino a un efecto directo sobre el tejido miocárdico para limitar la lipotoxicidad y mejorar de esta forma la función ventricular post-infarto.

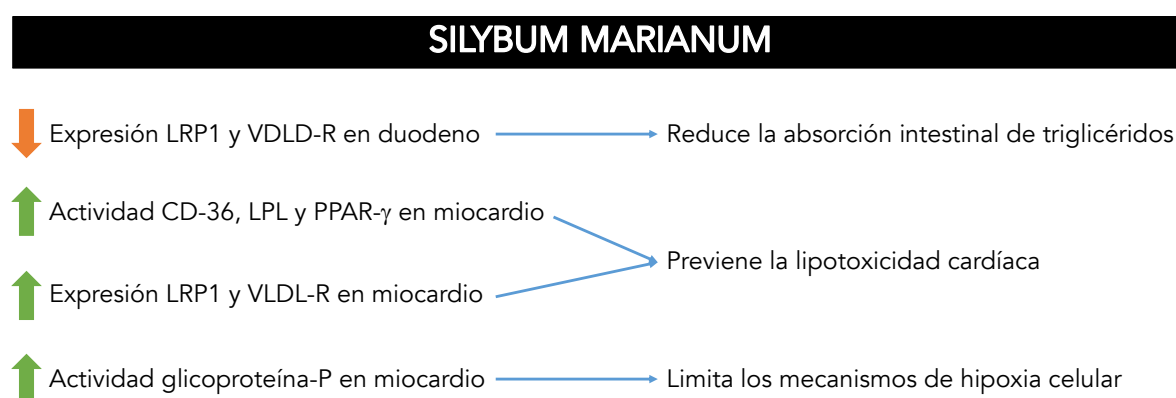


Figura 14. Mecanismos de acción de *Silybum marianum*. CD-36: Clúster de diferenciación-36; LPL: Lipoproteinlipasa; LRP1: Proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad; PPAR-γ: Receptor activado por proliferador peroxisomal gamma; VLDL-R: Receptor de lipoproteína de muy baja densidad.

7.5. Perfil de bioseguridad de Espirulina y *Silybum marianum*

La suplementación de animales con preparados nutraceuticos correspondió en ambos casos a versiones comercialmente disponibles, sin requerir de formulaciones especiales y siendo administradas por vía oral. Tanto espirulina como *Silybum marianum* demostraron una adecuada tolerancia oral, con ausencia de efecto sobre el metabolismo glucémico y el perfil lipídico (a excepción de la actividad hipotrigliceridémica de *Silybum marianum*). A diferencia de este último, la espirulina produjo un impacto en el peso corporal de los animales tratados reduciendo significativamente la progresión de la ganancia de peso esperada.

Globalmente, ambos nutracéuticos probaron exhibir un correcto perfil de bioseguridad sin haberse demostrado la aparición de efectos adversos, y sin producir alteraciones significativas a nivel de la función hepática o renal, en un modelo porcino homólogo en gran medida a la fisiopatología humana.

7.6. Limitaciones

Esta tesis doctoral, teniendo en cuenta los estudios de investigación previos y la evidencia disponible, ha buscado reducir al mínimo la presencia de limitantes que impidan su apropiada interpretación y posterior traslación al ámbito clínico. Sin embargo, es necesario dejar constancia la presencia de determinados factores que puedan tener un rol en limitar los resultados desarrollados previamente.

Por un lado, si bien existe una estrecha correlación entre el modelo porcino y la fisiopatología humana, en donde en ambos sistemas la inducción de una oclusión a nivel coronaria mediante el inflado de un balón percutáneo permite generar áreas de tejido isquémico, estos mecanismos distan de poseer los mismas bases moleculares y celulares sobrevenidas durante la aparición de un evento aterotrombótico, que consisten en lesiones ateroscleróticas que sufren un evento de rotura/erosión de la placa y estimulan respuestas pro-trombóticas e inflamatorias a dicho nivel, como se ha mencionado previamente.

Asimismo, en forma semejante a los humanos, la complicación más frecuentemente presentada en el modelo porcino durante la inducción de un infarto agudo de miocardio en forma percutánea lo constituye la aparición de arritmias ventriculares malignas, que pueden manifestarse tempranamente luego de la oclusión coronaria y se extienden durante todo el período de isquemia y reperfusión (413, 453). Por lo tanto, se han establecido diversos protocolos de profilaxis anti-arritmica para prevenir su aparición, basados principalmente en la administración en perfusión endovenosa de amiodarona (454, 455). Sin embargo, esta técnica se ha visto que podría inducir un efecto cardioprotector promoviendo una reducción en el área final del infarto al disminuir la demanda miocárdica de oxígeno (456, 457), lo cual podría interferir con los resultados obtenidos, aunque esta evidencia proviene de estudios antiguos sin haber podido ser corroborados en el contexto del tratamiento farmacológico actual.

En forma análoga, los anestésicos utilizados durante el procedimiento podrían ofrecer cierto grado de protección adicional. Principalmente el isoflurano inhalatorio, que ha demostrado disminuir el tamaño del infarto mediante la activación de canales de potasio dependientes de ATP (411, 458). Sin embargo, al utilizar la misma aproximación anestésica y anti-arritmica en todos los animales control y tratados, se ha buscado homogeneizar así un posible efecto protector para reducir la posibilidad de un potencial factor confundidor.

A su vez, existen algunas otras consideraciones a tener en cuenta al evaluar los modelos experimentales de cardiopatía isquémica. Primero, a diferencia de los humanos, los animales en investigación suelen ser de edad joven, lo cual implicaría una mayor capacidad de recuperación, y a su vez, no existiría la influencia multifactorial de los distintos factores de riesgo CV presentes en el desarrollo de los procesos de aterosclerosis y enfermedad coronaria (459). Por tanto, existe todavía una brecha a considerar entre los modelos animales disponibles en la actualidad, más enfocados en procesos trombogénicos y sus consecuencias isquémicas, frente a la compleja realidad de la enfermedad aterosclerótica humana de etiología multifactorial, lo que demandaría el desarrollo de prototipos de enfermedad más fidedignos que permitan obtener resultados consistentes y posibiliten su traslación con el menor nivel de error posible.

Por último, la inducción de un IAMCEST sin la influencia del tratamiento médico farmacológico coadyuvante no permite excluir la posibilidad de interacciones entre los nutraceuticos administrados y las medicaciones presentes en estas situaciones clínicas, aunque ambos nutraceuticos particularmente han sido analizados en pacientes de riesgo CV y no se ha encontrado evidencia de efectos adversos derivados de la posible interacción con la medicación presente.

8. CONCLUSIONES

En conclusión, esta tesis doctoral ha tenido como objetivo principal evaluar el potencial cardioprotector derivado mediante la administración de dos nutraceuticos, la espirulina y *Silybum marianum*, en un modelo porcino de IAMCEST.

En dicho escenario clínico, se han demostrado las siguientes conclusiones:

La suplementación con espirulina induce un significativo efecto anti-inflamatorio, antioxidante y anti-apoptótico a nivel de tejido miocárdico isquémico permitiendo reducir el tamaño final del infarto y consiguiendo una mejoría significativa en la función ventricular.

A pesar de no producir impacto metabólico significativo, los animales suplementados con espirulina evidenciaron una menor progresión de aumento de peso, no derivada de una menor ingesta calórica, lo cual podría tener potenciales implicaciones en el manejo de la obesidad asociada al resto de los factores de riesgo cardiovascular.

Por su parte, la administración de *Silybum marianum* permitió evidenciar una disminución aguda y significativa en los niveles plasmáticos de triglicéridos, sin impacto en el resto de lipoproteínas circulantes.

Esta actividad hipotrigliceridémica fue mediada por una reducción en la absorción intestinal de triglicéridos, sin haberse visto modificados el contenido remanente de ésteres de colesterol y colesterol libre intestinal.

Asimismo, la suplementación con *Silybum marianum* mitigó las consecuencias deletéreas de la cardiolipotoxicidad a 3 semanas del evento isquémico coronario. Este beneficio se asoció a un aumento en los receptores encargados de la eliminación lipídica a nivel cardíaco y condujo a la atenuación de remodelado ventricular adverso y a una mejora de la función contráctil miocárdica.

Es importante remarcar que la administración de ambos nutraceuticos (espirulina y *Silybum marianum*) exhibieron un adecuado perfil de bioseguridad, no registrándose eventos adversos en los animales suplementados y sin afectar significativamente los parámetros hematológicos ni la función hepática o renal.

Por lo tanto, el trabajo de investigación de esta tesis doctoral ha demostrado que el condicionamiento miocárdico con nutraceuticos (i.e., espirulina y *Silybum marianum*) puede representar una estrategia novedosa, efectiva, segura y de bajo coste capaz de ejercer efectos cardioprotectores directos en el marco de un IAMCEST, limitando así el remodelado ventricular adverso y favoreciendo la recuperación de la función cardíaca post-infarto.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Joseph P, Leong D, McKee M, Anand SS, Schwalm JD, Teo K, et al. Reducing the Global Burden of Cardiovascular Disease, Part 1: The Epidemiology and Risk Factors. *Circ Res*. 2017;121(6):677-94.
2. Timmis A, Vardas P, Townsend N, Torbica A, Katus H, De Smedt D, et al. European Society of Cardiology: cardiovascular disease statistics 2021. *Eur Heart J*. 2022;43(8):716-99.
3. Khan MA, Hashim MJ, Mustafa H, Baniyas MY, Al Suwaidi S, AlKatheeri R, et al. Global Epidemiology of Ischemic Heart Disease: Results from the Global Burden of Disease Study. *Cureus*. 2020;12(7):e9349.
4. Visseren FLJ, Mach F, Smulders YM, Carballo D, Koskinas KC, Back M, et al. 2021 ESC Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Eur Heart J*. 2021;42(34):3227-337.
5. Townsend N, Wilson L, Bhatnagar P, Wickramasinghe K, Rayner M, Nichols M. Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016. *Eur Heart J*. 2016;37(42):3232-45.
6. Roth GA, Mensah GA, Johnson CO, Addolorato G, Ammirati E, Baddour LM, et al. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update From the GBD 2019 Study. *J Am Coll Cardiol*. 2020;76(25):2982-3021.
7. Riccardi G, Vitale M, Vaccaro O. Are Europeans moving towards dietary habits more suitable for reducing cardiovascular disease risk? *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2020;30(11):1857-60.
8. Tadayon S, Wickramasinghe K, Townsend N. Examining trends in cardiovascular disease mortality across Europe: how does the introduction of a new European Standard Population affect the description of the relative burden of cardiovascular disease? *Popul Health Metr*. 2019;17(1):6.
9. Mannsverk J, Wilsgaard T, Mathiesen EB, Lochen ML, Rasmussen K, Thelle DS, et al. Trends in Modifiable Risk Factors Are Associated With Declining Incidence of Hospitalized and Nonhospitalized Acute Coronary Heart Disease in a Population. *Circulation*. 2016;133(1):74-81.
10. Di Girolamo C, Nusselder WJ, Bopp M, Bronnum-Hansen H, Costa G, Kovacs K, et al. Progress in reducing inequalities in cardiovascular disease mortality in Europe. *Heart*. 2020;106(1):40-9.
11. Castellano Vazquez JM, Fernandez Alvira JM, Fuster V. Primordial prevention: paramount in cardiovascular prevention. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2020;73(3):194-6.

12. [\[https://www.euro.who.int/en/health-topics/Health-systems/public-health-services/policy/the-10-essential-public-health-operations/epho5-disease-prevention,-including-early-detection-of-illness2\]](https://www.euro.who.int/en/health-topics/Health-systems/public-health-services/policy/the-10-essential-public-health-operations/epho5-disease-prevention,-including-early-detection-of-illness2).
13. Kotseva K, De Backer G, De Bacquer D, Ryden L, Hoes A, Grobbee D, et al. Primary prevention efforts are poorly developed in people at high cardiovascular risk: A report from the European Society of Cardiology EURObservational Research Programme EUROASPIRE V survey in 16 European countries. *Eur J Prev Cardiol.* 2021;28(4):370-9.
14. Kotseva K, De Backer G, De Bacquer D, Ryden L, Hoes A, Grobbee D, et al. Lifestyle and impact on cardiovascular risk factor control in coronary patients across 27 countries: Results from the European Society of Cardiology ESC-EORP EUROASPIRE V registry. *Eur J Prev Cardiol.* 2019;26(8):824-35.
15. Andersson C, Johnson AD, Benjamin EJ, Levy D, Vasan RS. 70-year legacy of the Framingham Heart Study. *Nat Rev Cardiol.* 2019;16(11):687-98.
16. group Sw, collaboration ESCCr. SCORE2 risk prediction algorithms: new models to estimate 10-year risk of cardiovascular disease in Europe. *Eur Heart J.* 2021;42(25):2439-54.
17. group SOw, collaboration ESCCr. SCORE2-OP risk prediction algorithms: estimating incident cardiovascular event risk in older persons in four geographical risk regions. *Eur Heart J.* 2021;42(25):2455-67.
18. Goff DC, Jr., Lloyd-Jones DM, Bennett G, Coady S, D'Agostino RB, Gibbons R, et al. 2013 ACC/AHA guideline on the assessment of cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation.* 2014;129(25 Suppl 2):S49-73.
19. Saha SP, Banks MA, Whayne TF. Managing Cardiovascular Risk Factors without Medications: What is the Evidence? *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* 2021;19(1):8-16.
20. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet.* 2004;364(9438):937-52.
21. Li Y, Pan A, Wang DD, Liu X, Dhana K, Franco OH, et al. Impact of Healthy Lifestyle Factors on Life Expectancies in the US Population. *Circulation.* 2018;138(4):345-55.
22. Mokdad AH, Forouzanfar MH, Daoud F, Mokdad AA, El Bcheraoui C, Moradi-Lakeh M, et al. Global burden of diseases, injuries, and risk factors for young people's health during 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet.* 2016;387(10036):2383-401.
23. O'Doherty MG, Cairns K, O'Neill V, Lamrock F, Jorgensen T, Brenner H, et al. Effect of major lifestyle risk factors, independent and jointly, on life expectancy with and without

- cardiovascular disease: results from the Consortium on Health and Ageing Network of Cohorts in Europe and the United States (CHANCES). *Eur J Epidemiol*. 2016;31(5):455-68.
24. Walker J, Cattaneo M, Badimon L, Agnelli G, Chan AT, Lanus A, et al. Highlights from the 2019 International Aspirin Foundation Scientific Conference, Rome, 28 June 2019: benefits and risks of antithrombotic therapy for cardiovascular disease prevention. *Ecancermedalscience*. 2020;14:998.
 25. Dimovski K, Orho-Melander M, Drake I. A favorable lifestyle lowers the risk of coronary artery disease consistently across strata of non-modifiable risk factors in a population-based cohort. *BMC Public Health*. 2019;19(1):1575.
 26. Collaborators GBDRF. Global, regional, and national comparative risk assessment of 84 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2018;392(10159):1923-94.
 27. Dai H, Much AA, Maor E, Asher E, Younis A, Xu Y, et al. Global, regional, and national burden of ischaemic heart disease and its attributable risk factors, 1990-2017: results from the Global Burden of Disease Study 2017. *Eur Heart J Qual Care Clin Outcomes*. 2022;8(1):50-60.
 28. Jackson CF, Wenger NK. Cardiovascular disease in the elderly. *Rev Esp Cardiol*. 2011;64(8):697-712.
 29. Chainani V, Shaharyar S, Dave K, Choksi V, Ravindranathan S, Hanno R, et al. Objective measures of the frailty syndrome (hand grip strength and gait speed) and cardiovascular mortality: A systematic review. *Int J Cardiol*. 2016;215:487-93.
 30. Higuera-Fresnillo S, Cabanas-Sanchez V, Lopez-Garcia E, Esteban-Cornejo I, Banegas JR, Sadarangani KP, et al. Physical Activity and Association Between Frailty and All-Cause and Cardiovascular Mortality in Older Adults: Population-Based Prospective Cohort Study. *J Am Geriatr Soc*. 2018;66(11):2097-103.
 31. Ekerstad N, Swahn E, Janzon M, Alfredsson J, Lofmark R, Lindenberg M, et al. Frailty is independently associated with short-term outcomes for elderly patients with non-ST-segment elevation myocardial infarction. *Circulation*. 2011;124(22):2397-404.
 32. Müller C. *Arch Intern Med*. 1939;64(4):675-700
 33. Nikpay M, Goel A, Won HH, Hall LM, Willenborg C, Kanoni S, et al. A comprehensive 1,000 Genomes-based genome-wide association meta-analysis of coronary artery disease. *Nat Genet*. 2015;47(10):1121-30.
 34. Torkamani A, Wineinger NE, Topol EJ. The personal and clinical utility of polygenic risk scores. *Nat Rev Genet*. 2018;19(9):581-90.

35. Wand H, Lambert SA, Tamburro C, Iacocca MA, O'Sullivan JW, Sillari C, et al. Improving reporting standards for polygenic scores in risk prediction studies. *Nature*. 2021;591(7849):211-9.
36. Khera AV, Emdin CA, Drake I, Natarajan P, Bick AG, Cook NR, et al. Genetic Risk, Adherence to a Healthy Lifestyle, and Coronary Disease. *N Engl J Med*. 2016;375(24):2349-58.
37. Elliott J, Bodinier B, Bond TA, Chadeau-Hyam M, Evangelou E, Moons KGM, et al. Predictive Accuracy of a Polygenic Risk Score-Enhanced Prediction Model vs a Clinical Risk Score for Coronary Artery Disease. *JAMA*. 2020;323(7):636-45.
38. Tamis-Holland JE, Lu J, Korytkowski M, Magee M, Rogers WJ, Lopes N, et al. Sex differences in presentation and outcome among patients with type 2 diabetes and coronary artery disease treated with contemporary medical therapy with or without prompt revascularization: a report from the BARI 2D Trial (Bypass Angioplasty Revascularization Investigation 2 Diabetes). *J Am Coll Cardiol*. 2013;61(17):1767-76.
39. Davis KB, Chaitman B, Ryan T, Bittner V, Kennedy JW. Comparison of 15-year survival for men and women after initial medical or surgical treatment for coronary artery disease: a CASS registry study. *Coronary Artery Surgery Study*. *J Am Coll Cardiol*. 1995;25(5):1000-9.
40. World Health Organization. Gender and health. https://www.who.int/health-topics/gender#tab=tab_1
41. Mendirichaga R, Jacobs AK. Sex Differences in Ischemic Heart Disease-the Paradox Persists. *JAMA Cardiol*. 2020;5(7):754-6.
42. Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R, Prospective Studies C. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet*. 2002;360(9349):1903-13.
43. Lim SS, Vos T, Flaxman AD, Danaei G, Shibuya K, Adair-Rohani H, et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380(9859):2224-60.
44. Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, Casey DE, Jr., Collins KJ, Dennison Himmelfarb C, et al. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Hypertension*. 2018;71(6):e13-e115.
45. Group SR, Wright JT, Jr., Williamson JD, Whelton PK, Snyder JK, Sink KM, et al. A Randomized Trial of Intensive versus Standard Blood-Pressure Control. *N Engl J Med*. 2015;373(22):2103-16.

46. Barrios V, Escobar C. New Targets in Arterial Hypertension, Are They Justified? *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2018;71(8):608-11.
47. Patel SA, Winkel M, Ali MK, Narayan KM, Mehta NK. Cardiovascular mortality associated with 5 leading risk factors: national and state preventable fractions estimated from survey data. *Ann Intern Med*. 2015;163(4):245-53.
48. [World Health Organization. Data and statistics. The challenge of diabetes. <http://www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/diabetes/data-and-statistics>].
49. Virani SS, Alonso A, Aparicio HJ, Benjamin EJ, Bittencourt MS, Callaway CW, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2021 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2021;143(8):e254-e743.
50. Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, Huang Y, da Rocha Fernandes JD, Ohlrogge AW, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract*. 2018;138:271-81.
51. Prospective Studies C, Asia Pacific Cohort Studies C. Sex-specific relevance of diabetes to occlusive vascular and other mortality: a collaborative meta-analysis of individual data from 980 793 adults from 68 prospective studies. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2018;6(7):538-46.
52. Liu L, Simon B, Shi J, Mallhi AK, Eisen HJ. Impact of diabetes mellitus on risk of cardiovascular disease and all-cause mortality: Evidence on health outcomes and antidiabetic treatment in United States adults. *World J Diabetes*. 2016;7(18):449-61.
53. Disease GBD, Injury I, Prevalence C. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016;388(10053):1545-602.
54. Collaborators GBDRF. Global burden of 87 risk factors in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet*. 2020;396(10258):1223-49.
55. Fernandez-Friera L, Fuster V, Lopez-Melgar B, Oliva B, Garcia-Ruiz JM, Mendiguren J, et al. Normal LDL-Cholesterol Levels Are Associated With Subclinical Atherosclerosis in the Absence of Risk Factors. *J Am Coll Cardiol*. 2017;70(24):2979-91.
56. Zhang Y, Vittinghoff E, Pletcher MJ, Allen NB, Zeki Al Hazzouri A, Yaffe K, et al. Associations of Blood Pressure and Cholesterol Levels During Young Adulthood With Later Cardiovascular Events. *J Am Coll Cardiol*. 2019;74(3):330-41.
57. Expert Panel on Integrated Guidelines for Cardiovascular H, Risk Reduction in C, Adolescents, National Heart L, Blood I. Expert panel on integrated guidelines for

cardiovascular health and risk reduction in children and adolescents: summary report. *Pediatrics*. 2011;128 Suppl 5:S213-56.

58. Yusuf S, Bosch J, Dagenais G, Zhu J, Xavier D, Liu L, et al. Cholesterol Lowering in Intermediate-Risk Persons without Cardiovascular Disease. *N Engl J Med*. 2016;374(21):2021-31.

59. Doll R, Peto R, Boreham J, Sutherland I. Mortality in relation to smoking: 50 years' observations on male British doctors. *BMJ*. 2004;328(7455):1519.

60. Prescott E, Hippe M, Schnohr P, Hein HO, Vestbo J. Smoking and risk of myocardial infarction in women and men: longitudinal population study. *BMJ*. 1998;316(7137):1043-7.

61. Watson M, Dardari Z, Kianoush S, Hall ME, DeFilippis AP, Keith RJ, et al. Relation Between Cigarette Smoking and Heart Failure (from the Multiethnic Study of Atherosclerosis). *Am J Cardiol*. 2019;123(12):1972-7.

62. Duncan MS, Freiberg MS, Greevy RA, Jr., Kundu S, Vasan RS, Tindle HA. Association of Smoking Cessation With Subsequent Risk of Cardiovascular Disease. *JAMA*. 2019;322(7):642-50.

63. Hoffman SJ, Tan C. Overview of systematic reviews on the health-related effects of government tobacco control policies. *BMC Public Health*. 2015;15:744.

64. Meier T, Grafe K, Senn F, Sur P, Stangl GI, Dawczynski C, et al. Cardiovascular mortality attributable to dietary risk factors in 51 countries in the WHO European Region from 1990 to 2016: a systematic analysis of the Global Burden of Disease Study. *Eur J Epidemiol*. 2019;34(1):37-55.

65. de Souza RJ, Mente A, Maroleanu A, Cozma AI, Ha V, Kishibe T, et al. Intake of saturated and trans unsaturated fatty acids and risk of all cause mortality, cardiovascular disease, and type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMJ*. 2015;351:h3978.

66. Jakobsen MU, O'Reilly EJ, Heitmann BL, Pereira MA, Balter K, Fraser GE, et al. Major types of dietary fat and risk of coronary heart disease: a pooled analysis of 11 cohort studies. *Am J Clin Nutr*. 2009;89(5):1425-32.

67. Yang Q, Zhang Z, Gregg EW, Flanders WD, Merritt R, Hu FB. Added sugar intake and cardiovascular diseases mortality among US adults. *JAMA Intern Med*. 2014;174(4):516-24.

68. Walkowska A, Kuczeriszka M, Sadowski J, Olszynski KH, Dobrowolski L, Cervenka L, et al. High salt intake increases blood pressure in normal rats: putative role of 20-HETE and no evidence on changes in renal vascular reactivity. *Kidney Blood Press Res*. 2015;40(3):323-34.

69. Rosato V, Temple NJ, La Vecchia C, Castellan G, Tavani A, Guercio V. Mediterranean diet and cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Eur J Nutr.* 2019;58(1):173-91.
70. Chiavaroli L, Viguiouk E, Nishi SK, Blanco Mejia S, Rahelic D, Kahleova H, et al. DASH Dietary Pattern and Cardiometabolic Outcomes: An Umbrella Review of Systematic Reviews and Meta-Analyses. *Nutrients.* 2019;11(2).
71. Hamer M, O'Donovan G, Murphy M. Physical Inactivity and the Economic and Health Burdens Due to Cardiovascular Disease: Exercise as Medicine. *Adv Exp Med Biol.* 2017;999:3-18.
72. World Health Organization. Physical activity. https://www.who.int/health-topics/physical-activity#tab=tab_1
73. Qiu S, Cai X, Jia L, Sun Z, Wu T, Wendt J, et al. Does objectively measured light-intensity physical activity reduce the risk of cardiovascular mortality? A meta-analysis. *Eur Heart J Qual Care Clin Outcomes.* 2021;7(5):496-504.
74. Artinian NT, Fletcher GF, Mozaffarian D, Kris-Etherton P, Van Horn L, Lichtenstein AH, et al. Interventions to promote physical activity and dietary lifestyle changes for cardiovascular risk factor reduction in adults: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation.* 2010;122(4):406-41.
75. Lee IM, Shiroma EJ, Lobelo F, Puska P, Blair SN, Katzmarzyk PT, et al. Effect of physical inactivity on major non-communicable diseases worldwide: an analysis of burden of disease and life expectancy. *Lancet.* 2012;380(9838):219-29.
76. Hallal PC, Andersen LB, Bull FC, Guthold R, Haskell W, Ekelund U, et al. Global physical activity levels: surveillance progress, pitfalls, and prospects. *Lancet.* 2012;380(9838):247-57.
77. Li J, Siegrist J. Physical activity and risk of cardiovascular disease--a meta-analysis of prospective cohort studies. *Int J Environ Res Public Health.* 2012;9(2):391-407.
78. Collaboration NCDRF. Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128.9 million children, adolescents, and adults. *Lancet.* 2017;390(10113):2627-42.
79. Sun YQ, Burgess S, Staley JR, Wood AM, Bell S, Kaptoge SK, et al. Body mass index and all cause mortality in HUNT and UK Biobank studies: linear and non-linear mendelian randomisation analyses. *BMJ.* 2019;364:l1042.
80. Aune D, Sen A, Prasad M, Norat T, Janszky I, Tonstad S, et al. BMI and all cause mortality: systematic review and non-linear dose-response meta-analysis of 230 cohort studies with 3.74 million deaths among 30.3 million participants. *BMJ.* 2016;353:i2156.

81. Emerging Risk Factors C, Wormser D, Kaptoge S, Di Angelantonio E, Wood AM, Pennells L, et al. Separate and combined associations of body-mass index and abdominal adiposity with cardiovascular disease: collaborative analysis of 58 prospective studies. *Lancet*. 2011;377(9771):1085-95.
82. Chen H, Deng Y, Li S. Relation of Body Mass Index Categories with Risk of Sudden Cardiac Death. *Int Heart J*. 2019;60(3):624-30.
83. Aune D, Sen A, Schlesinger S, Norat T, Janszky I, Romundstad P, et al. Body mass index, abdominal fatness, fat mass and the risk of atrial fibrillation: a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *Eur J Epidemiol*. 2017;32(3):181-92.
84. Ma WQ, Sun XJ, Wang Y, Han XQ, Zhu Y, Liu NF. Does body mass index truly affect mortality and cardiovascular outcomes in patients after coronary revascularization with percutaneous coronary intervention or coronary artery bypass graft? A systematic review and network meta-analysis. *Obes Rev*. 2018;19(9):1236-47.
85. Lamelas PM, Maheer K, Schwalm JD. Body mass index and mortality after acute coronary syndromes: a systematic review and meta-analysis. *Acta Cardiol*. 2017;72(6):655-61.
86. Wilding JPH, Batterham RL, Calanna S, Davies M, Van Gaal LF, Lingvay I, et al. Once-Weekly Semaglutide in Adults with Overweight or Obesity. *N Engl J Med*. 2021;384(11):989-1002.
87. Moussa O, Ardissino M, Heaton T, Tang A, Khan O, Ziprin P, et al. Effect of bariatric surgery on long-term cardiovascular outcomes: a nationwide nested cohort study. *Eur Heart J*. 2020;41(28):2660-7.
88. Kivimaki M, Steptoe A. Effects of stress on the development and progression of cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol*. 2018;15(4):215-29.
89. Albus C, Waller C, Fritzsche K, Gunold H, Haass M, Hamann B, et al. Significance of psychosocial factors in cardiology: update 2018 : Position paper of the German Cardiac Society. *Clin Res Cardiol*. 2019;108(11):1175-96.
90. Rozanski A. Behavioral cardiology: current advances and future directions. *J Am Coll Cardiol*. 2014;64(1):100-10.
91. Schultz WM, Kelli HM, Lisko JC, Varghese T, Shen J, Sandesara P, et al. Socioeconomic Status and Cardiovascular Outcomes: Challenges and Interventions. *Circulation*. 2018;137(20):2166-78.
92. Kivimaki M, Pentti J, Ferrie JE, Batty GD, Nyberg ST, Jokela M, et al. Work stress and risk of death in men and women with and without cardiometabolic disease: a multicohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2018;6(9):705-13.

93. Herrington W, Lacey B, Sherliker P, Armitage J, Lewington S. Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease. *Circ Res.* 2016;118(4):535-46.
94. Singh SS, Pilkerton CS, Shrader CD, Jr., Frisbee SJ. Subclinical atherosclerosis, cardiovascular health, and disease risk: is there a case for the Cardiovascular Health Index in the primary prevention population? *BMC Public Health.* 2018;18(1):429.
95. Torres N, Guevara-Cruz M, Velazquez-Villegas LA, Tovar AR. Nutrition and Atherosclerosis. *Arch Med Res.* 2015;46(5):408-26.
96. Steinberg D. Thematic review series: the pathogenesis of atherosclerosis. An interpretive history of the cholesterol controversy, part V: the discovery of the statins and the end of the controversy. *J Lipid Res.* 2006;47(7):1339-51.
97. Raggi P, Genest J, Giles JT, Rayner KJ, Dwivedi G, Beanlands RS, et al. Role of inflammation in the pathogenesis of atherosclerosis and therapeutic interventions. *Atherosclerosis.* 2018;276:98-108.
98. Kruger-Genge A, Blocki A, Franke RP, Jung F. Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *Int J Mol Sci.* 2019;20(18).
99. Tousoulis D, Charakida M, Stefanadis C. Endothelial function and inflammation in coronary artery disease. *Heart.* 2006;92(4):441-4.
100. Kruth HS. Sequestration of aggregated low-density lipoproteins by macrophages. *Curr Opin Lipidol.* 2002;13(5):483-8.
101. Zhang J, Dai W, Chen Y. Editorial: The Roles of Lipids in Immunometabolism: The Crosstalk Between Lipid Metabolisms and Inflammation. *Front Cardiovasc Med.* 2022;9:938535.
102. Steinberg D. Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nat Med.* 2002;8(11):1211-7.
103. Sheedy FJ, Grebe A, Rayner KJ, Kalantari P, Ramkhalawon B, Carpenter SB, et al. CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating intracellular nucleation of soluble ligands into particulate ligands in sterile inflammation. *Nat Immunol.* 2013;14(8):812-20.
104. Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature.* 2010;464(7293):1357-61.
105. Zheng Y, Gardner SE, Clarke MC. Cell death, damage-associated molecular patterns, and sterile inflammation in cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(12):2781-6.
106. Wolf D, Ley K. Immunity and Inflammation in Atherosclerosis. *Circ Res.* 2019;124(2):315-27.

107. Shankman LS, Gomez D, Cherepanova OA, Salmon M, Alencar GF, Haskins RM, et al. KLF4-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells has a key role in atherosclerotic plaque pathogenesis. *Nat Med*. 2015;21(6):628-37.
108. Gomez D, Owens GK. Smooth muscle cell phenotypic switching in atherosclerosis. *Cardiovasc Res*. 2012;95(2):156-64.
109. Gonzalez L, Trigatti BL. Macrophage Apoptosis and Necrotic Core Development in Atherosclerosis: A Rapidly Advancing Field with Clinical Relevance to Imaging and Therapy. *Can J Cardiol*. 2017;33(3):303-12.
110. Karunakaran D, Geoffrion M, Wei L, Gan W, Richards L, Shangari P, et al. Targeting macrophage necroptosis for therapeutic and diagnostic interventions in atherosclerosis. *Sci Adv*. 2016;2(7):e1600224.
111. Fuster JJ, Walsh K. Somatic Mutations and Clonal Hematopoiesis: Unexpected Potential New Drivers of Age-Related Cardiovascular Disease. *Circ Res*. 2018;122(3):523-32.
112. Bekkering S, Quintin J, Joosten LA, van der Meer JW, Netea MG, Riksen NP. Oxidized low-density lipoprotein induces long-term proinflammatory cytokine production and foam cell formation via epigenetic reprogramming of monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(8):1731-8.
113. Jaiswal S, Natarajan P, Ebert BL. Clonal Hematopoiesis and Atherosclerosis. *N Engl J Med*. 2017;377(14):1401-2.
114. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med*. 2014;371(26):2488-98.
115. Fuster JJ, MacLauchlan S, Zuriaga MA, Polackal MN, Ostriker AC, Chakraborty R, et al. Clonal hematopoiesis associated with TET2 deficiency accelerates atherosclerosis development in mice. *Science*. 2017;355(6327):842-7.
116. Senoner T, Dichtl W. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases: Still a Therapeutic Target? *Nutrients*. 2019;11(9).
117. Martorell L, Martinez-Gonzalez J, Rodriguez C, Gentile M, Calvayrac O, Badimon L. Thrombin and protease-activated receptors (PARs) in atherothrombosis. *Thromb Haemost*. 2008;99(2):305-15.
118. Asada Y, Yamashita A, Sato Y, Hatakeyama K. Thrombus Formation and Propagation in the Onset of Cardiovascular Events. *J Atheroscler Thromb*. 2018;25(8):653-64.
119. Badimon L, Vilahur G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *J Intern Med*. 2014;276(6):618-32.

120. Vilahur G, Gutierrez M, Arzanauskaite M, Mendieta G, Ben-Aicha S, Badimon L. Intracellular platelet signalling as a target for drug development. *Vascul Pharmacol*. 2018;111:22-5.
121. Badimon L, Vilahur G, Rocca B, Patrono C. The key contribution of platelet and vascular arachidonic acid metabolism to the pathophysiology of atherothrombosis. *Cardiovasc Res*. 2021;117(9):2001-15.
122. Collet JP, Thiele H, Barbato E, Barthelémy O, Bauersachs J, Bhatt DL, et al. 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J*. 2021;42(14):1289-367.
123. Meng L, Lv B, Zhang S, Yv B. In vivo optical coherence tomography of experimental thrombosis in a rabbit carotid model. *Heart*. 2008;94(6):777-80.
124. Oh KY, In YN, Kwack CH, Park JS, Min JH, Kang MG, et al. Successful Treatment of Kounis Syndrome Type I Presenting as Cardiac Arrest with ST Elevation. *Chin Med J (Engl)*. 2016;129(5):626-7.
125. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA, et al. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *J Am Coll Cardiol*. 2018;72(18):2231-64.
126. Severino P, D'Amato A, Pucci M, Infusino F, Adamo F, Birtolo LI, et al. Ischemic Heart Disease Pathophysiology Paradigms Overview: From Plaque Activation to Microvascular Dysfunction. *Int J Mol Sci*. 2020;21(21).
127. Fedele F, Severino P, Bruno N, Stio R, Caira C, D'Ambrosi A, et al. Role of ion channels in coronary microcirculation: a review of the literature. *Future Cardiol*. 2013;9(6):897-905.
128. Duncker DJ, Bache RJ. Regulation of coronary blood flow during exercise. *Physiol Rev*. 2008;88(3):1009-86.
129. Puymirat E, Simon T, Cayla G, Cottin Y, Elbaz M, Coste P, et al. Acute Myocardial Infarction: Changes in Patient Characteristics, Management, and 6-Month Outcomes Over a Period of 20 Years in the FAST-MI Program (French Registry of Acute ST-Elevation or Non-ST-Elevation Myocardial Infarction) 1995 to 2015. *Circulation*. 2017;136(20):1908-19.
130. Hilleman DE, Tsikouris JP, Seals AA, Marmur JD. Fibrinolytic agents for the management of ST-segment elevation myocardial infarction. *Pharmacotherapy*. 2007;27(11):1558-70.
131. Perler B. Thrombolytic therapies: the current state of affairs. *J Endovasc Ther*. 2005;12(2):224-32.
132. Indications for fibrinolytic therapy in suspected acute myocardial infarction: collaborative overview of early mortality and major morbidity results from all randomised

trials of more than 1000 patients. Fibrinolytic Therapy Trialists' (FTT) Collaborative Group. *Lancet*. 1994;343(8893):311-22.

133. Ibanez B, James S, Agewall S, Antunes MJ, Bucciarelli-Ducci C, Bueno H, et al. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2018;39(2):119-77.

134. Zijlstra F, Hoorntje JC, de Boer MJ, Reiffers S, Miedema K, Ottervanger JP, et al. Long-term benefit of primary angioplasty as compared with thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 1999;341(19):1413-9.

135. Keeley EC, Boura JA, Grines CL. Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomised trials. *Lancet*. 2003;361(9351):13-20.

136. Andersen HR, Nielsen TT, Rasmussen K, Thuesen L, Kelbaek H, Thayssen P, et al. A comparison of coronary angioplasty with fibrinolytic therapy in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2003;349(8):733-42.

137. Levine GN, Bates ER, Blankenship JC, Bailey SR, Bittl JA, Cercek B, et al. 2015 ACC/AHA/SCAI Focused Update on Primary Percutaneous Coronary Intervention for Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction: An Update of the 2011 ACCF/AHA/SCAI Guideline for Percutaneous Coronary Intervention and the 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of ST-Elevation Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2016;67(10):1235-50.

138. Jneid H, Anderson JL, Wright RS, Adams CD, Bridges CR, Casey DE, Jr., et al. 2012 ACCF/AHA focused update of the guideline for the management of patients with unstable angina/non-ST-elevation myocardial infarction (updating the 2007 guideline and replacing the 2011 focused update): a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2012;60(7):645-81.

139. Scholz KH, Maier SKG, Maier LS, Lengenfelder B, Jacobshagen C, Jung J, et al. Impact of treatment delay on mortality in ST-segment elevation myocardial infarction (STEMI) patients presenting with and without haemodynamic instability: results from the German prospective, multicentre FITT-STEMI trial. *Eur Heart J*. 2018;39(13):1065-74.

140. Chandrashekhara Y, Alexander T, Mullasari A, Kumbhani DJ, Alam S, Alexanderson E, et al. Resource and Infrastructure-Appropriate Management of ST-Segment Elevation Myocardial Infarction in Low- and Middle-Income Countries. *Circulation*. 2020;141(24):2004-25.

141. Puymirat E, Battler A, Birkhead J, Bueno H, Clemmensen P, Cottin Y, et al. Euro Heart Survey 2009 Snapshot: regional variations in presentation and management of patients with AMI in 47 countries. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care*. 2013;2(4):359-70.
142. Vora AN, Holmes DN, Rokos I, Roe MT, Granger CB, French WJ, et al. Fibrinolysis use among patients requiring interhospital transfer for ST-segment elevation myocardial infarction care: a report from the US National Cardiovascular Data Registry. *JAMA Intern Med*. 2015;175(2):207-15.
143. Armstrong PW, Gershlick AH, Goldstein P, Wilcox R, Danays T, Lambert Y, et al. Fibrinolysis or primary PCI in ST-segment elevation myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2013;368(15):1379-87.
144. Morrison LJ, Verbeek PR, McDonald AC, Sawadsky BV, Cook DJ. Mortality and prehospital thrombolysis for acute myocardial infarction: A meta-analysis. *JAMA*. 2000;283(20):2686-92.
145. West RM, Cattle BA, Bouyssie M, Squire I, de Belder M, Fox KA, et al. Impact of hospital proportion and volume on primary percutaneous coronary intervention performance in England and Wales. *Eur Heart J*. 2011;32(6):706-11.
146. Neumann FJ, Sousa-Uva M, Ahlsson A, Alfonso F, Banning AP, Benedetto U, et al. 2018 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization. *Eur Heart J*. 2019;40(2):87-165.
147. Ndrepepa G, Berger PB, Mehilli J, Seyfarth M, Neumann FJ, Schomig A, et al. Periprocedural bleeding and 1-year outcome after percutaneous coronary interventions: appropriateness of including bleeding as a component of a quadruple end point. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51(7):690-7.
148. Sneader W. The discovery of aspirin: a reappraisal. *BMJ*. 2000;321(7276):1591-4.
149. Mekaj YH, Daci FT, Mekaj AY. New insights into the mechanisms of action of aspirin and its use in the prevention and treatment of arterial and venous thromboembolism. *Ther Clin Risk Manag*. 2015;11:1449-56.
150. Baigent C, Patrono C. Selective cyclooxygenase 2 inhibitors, aspirin, and cardiovascular disease: a reappraisal. *Arthritis Rheum*. 2003;48(1):12-20.
151. Awtry EH, Loscalzo J. Aspirin. *Circulation*. 2000;101(10):1206-18.
152. Vane JR, Botting RM. The mechanism of action of aspirin. *Thromb Res*. 2003;110(5-6):255-8.
153. Lei J, Zhou Y, Xie D, Zhang Y. Mechanistic insights into a classic wonder drug--aspirin. *J Am Chem Soc*. 2015;137(1):70-3.
154. Borer JS, Simon LS. Cardiovascular and gastrointestinal effects of COX-2 inhibitors and NSAIDs: achieving a balance. *Arthritis Res Ther*. 2005;7 Suppl 4:S14-22.

155. Undas A, Brummel-Ziedins K, Mann KG. Why does aspirin decrease the risk of venous thromboembolism? On old and novel antithrombotic effects of acetyl salicylic acid. *J Thromb Haemost.* 2014;12(11):1776-87.
156. Maree AO, Fitzgerald DJ. Variable platelet response to aspirin and clopidogrel in atherothrombotic disease. *Circulation.* 2007;115(16):2196-207.
157. Wiviott SD, Braunwald E, McCabe CH, Montalescot G, Ruzyllo W, Gottlieb S, et al. Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 2007;357(20):2001-15.
158. Wallentin L, Becker RC, Budaj A, Cannon CP, Emanuelsson H, Held C, et al. Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 2009;361(11):1045-57.
159. Schupke S, Neumann FJ, Menichelli M, Mayer K, Bernlochner I, Wohrle J, et al. Ticagrelor or Prasugrel in Patients with Acute Coronary Syndromes. *N Engl J Med.* 2019;381(16):1524-34.
160. Navarese EP, Khan SU, Kolodziejczak M, Kubica J, Buccheri S, Cannon CP, et al. Comparative Efficacy and Safety of Oral P2Y₁₂ Inhibitors in Acute Coronary Syndrome: Network Meta-Analysis of 52 816 Patients From 12 Randomized Trials. *Circulation.* 2020;142(2):150-60.
161. Bhatt DL, Lincoff AM, Gibson CM, Stone GW, McNulty S, Montalescot G, et al. Intravenous platelet blockade with cangrelor during PCI. *N Engl J Med.* 2009;361(24):2330-41.
162. Harrington RA, Stone GW, McNulty S, White HD, Lincoff AM, Gibson CM, et al. Platelet inhibition with cangrelor in patients undergoing PCI. *N Engl J Med.* 2009;361(24):2318-29.
163. Steg PG, Bhatt DL, Hamm CW, Stone GW, Gibson CM, Mahaffey KW, et al. Effect of cangrelor on periprocedural outcomes in percutaneous coronary interventions: a pooled analysis of patient-level data. *Lancet.* 2013;382(9909):1981-92.
164. Stone GW, Selker HP, Thiele H, Patel MR, Udelson JE, Ohman EM, et al. Relationship Between Infarct Size and Outcomes Following Primary PCI: Patient-Level Analysis From 10 Randomized Trials. *J Am Coll Cardiol.* 2016;67(14):1674-83.
165. Azevedo PS, Polegato BF, Minicucci MF, Paiva SA, Zornoff LA. Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. *Arq Bras Cardiol.* 2016;106(1):62-9.
166. Hausenloy DJ, Yellon DM. Ischaemic conditioning and reperfusion injury. *Nat Rev Cardiol.* 2016;13(4):193-209.

167. Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Flack HA, Linn H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol.* 1960;70:68-78.
168. Ruiz-Meana M, Garcia-Dorado D. Translational cardiovascular medicine (II). Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury: new therapeutic options for acute myocardial infarction. *Rev Esp Cardiol.* 2009;62(2):199-209.
169. Caricati-Neto A, Errante PR, Menezes-Rodrigues FS. Recent Advances in Pharmacological and Non-Pharmacological Strategies of Cardioprotection. *Int J Mol Sci.* 2019;20(16).
170. Garcia-Dorado D, Theroux P, Duran JM, Solares J, Alonso J, Sanz E, et al. Selective inhibition of the contractile apparatus. A new approach to modification of infarct size, infarct composition, and infarct geometry during coronary artery occlusion and reperfusion. *Circulation.* 1992;85(3):1160-74.
171. Abdallah Y, Gkatzoflia A, Pieper H, Zoga E, Walther S, Kasseckert S, et al. Mechanism of cGMP-mediated protection in a cellular model of myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2005;66(1):123-31.
172. Ruiz-Meana M, Garcia-Dorado D, Gonzalez MA, Barrabes JA, Soler-Soler J. Effect of osmotic stress on sarcolemmal integrity of isolated cardiomyocytes following transient metabolic inhibition. *Cardiovasc Res.* 1995;30(1):64-9.
173. Inserte J, Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Agullo L, Pina P, Soler-Soler J. Ischemic preconditioning attenuates calpain-mediated degradation of structural proteins through a protein kinase A-dependent mechanism. *Cardiovasc Res.* 2004;64(1):105-14.
174. Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, et al. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature.* 2005;434(7033):658-62.
175. Halestrap AP, Brenner C. The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death. *Curr Med Chem.* 2003;10(16):1507-25.
176. Daiber A, Andreadou I, Oelze M, Davidson SM, Hausenloy DJ. Discovery of new therapeutic redox targets for cardioprotection against ischemia/reperfusion injury and heart failure. *Free Radic Biol Med.* 2021;163:325-43.
177. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* 2000;86(5):494-501.
178. Hernandez-Resendiz S, Chinda K, Ong SB, Cabrera-Fuentes H, Zazueta C, Hausenloy DJ. The Role of Redox Dysregulation in the Inflammatory Response to Acute Myocardial Ischaemia-reperfusion Injury - Adding Fuel to the Fire. *Curr Med Chem.* 2018;25(11):1275-93.

179. Zhong CB, Chen X, Zhou XY, Wang XB. The Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma in Mediating Cardioprotection Against Ischemia/Reperfusion Injury. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2018;23(1):46-56.
180. Margaritis M, Antonopoulos AS, Digby J, Lee R, Reilly S, Coutinho P, et al. Interactions between vascular wall and perivascular adipose tissue reveal novel roles for adiponectin in the regulation of endothelial nitric oxide synthase function in human vessels. *Circulation.* 2013;127(22):2209-21.
181. Gunata M, Parlakpınar H. A review of myocardial ischaemia/reperfusion injury: Pathophysiology, experimental models, biomarkers, genetics and pharmacological treatment. *Cell Biochem Funct.* 2021;39(2):190-217.
182. Li X, Liu M, Sun R, Zeng Y, Chen S, Zhang P. Protective approaches against myocardial ischemia reperfusion injury. *Exp Ther Med.* 2016;12(6):3823-9.
183. Heusch G. Myocardial stunning and hibernation revisited. *Nat Rev Cardiol.* 2021;18(7):522-36.
184. Britten MB, Zeiher AM, Schachinger V. Microvascular dysfunction in angiographically normal or mildly diseased coronary arteries predicts adverse cardiovascular long-term outcome. *Coron Artery Dis.* 2004;15(5):259-64.
185. Niccoli G, Scalone G, Lerman A, Crea F. Coronary microvascular obstruction in acute myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2016;37(13):1024-33.
186. Stiermaier T, Thiele H, Eitel I. Coronary Microvascular Obstruction: Key Factor in the Prognosis of ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction. *Circ Cardiovasc Imaging.* 2017;10(6):e006568.
187. Galiuto L, Crea F. No-reflow: a heterogeneous clinical phenomenon with multiple therapeutic strategies. *Curr Pharm Des.* 2006;12(29):3807-15.
188. Sorescu D, Griendling KK. Reactive oxygen species, mitochondria, and NAD(P)H oxidases in the development and progression of heart failure. *Congest Heart Fail.* 2002;8(3):132-40.
189. Pascual F, Coleman RA. Fuel availability and fate in cardiac metabolism: A tale of two substrates. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1861(10):1425-33.
190. Taegtmeyer H, McNulty P, Young ME. Adaptation and maladaptation of the heart in diabetes: Part I: general concepts. *Circulation.* 2002;105(14):1727-33.
191. Leggat J, Bidault G, Vidal-Puig A. Lipotoxicity: a driver of heart failure with preserved ejection fraction? *Clin Sci (Lond).* 2021;135(19):2265-83.
192. Doenst T, Nguyen TD, Abel ED. Cardiac metabolism in heart failure: implications beyond ATP production. *Circ Res.* 2013;113(6):709-24.
193. Lopaschuk GD, Ussher JR, Folmes CD, Jaswal JS, Stanley WC. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev.* 2010;90(1):207-58.

194. D'Souza K, Nzirorera C, Kienesberger PC. Lipid metabolism and signaling in cardiac lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1861(10):1513-24.
195. Drosatos K, Schulze PC. Cardiac lipotoxicity: molecular pathways and therapeutic implications. *Curr Heart Fail Rep*. 2013;10(2):109-21.
196. Huang S, Rutkowski JM, Snodgrass RG, Ono-Moore KD, Schneider DA, Newman JW, et al. Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways. *J Lipid Res*. 2012;53(9):2002-13.
197. Tennant R. *Am J Physiol Leg Content*. 1935;112(2):351-361
198. Verma A, Meris A, Skali H, Ghali JK, Arnold JM, Bourgoun M, et al. Prognostic implications of left ventricular mass and geometry following myocardial infarction: the VALIANT (VALsartan In Acute myocardial iNfarcTion) Echocardiographic Study. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2008;1(5):582-91.
199. Bolognese L, Neskovic AN, Parodi G, Cerisano G, Buonamici P, Santoro GM, et al. Left ventricular remodeling after primary coronary angioplasty: patterns of left ventricular dilation and long-term prognostic implications. *Circulation*. 2002;106(18):2351-7.
200. Disease GBD, Injury I, Prevalence C. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2018;392(10159):1789-858.
201. van Riet EE, Hoes AW, Wagenaar KP, Limburg A, Landman MA, Rutten FH. Epidemiology of heart failure: the prevalence of heart failure and ventricular dysfunction in older adults over time. A systematic review. *Eur J Heart Fail*. 2016;18(3):242-52.
202. Azad N, Lemay G. Management of chronic heart failure in the older population. *J Geriatr Cardiol*. 2014;11(4):329-37.
203. Savarese G, Lund LH. Global Public Health Burden of Heart Failure. *Card Fail Rev*. 2017;3(1):7-11.
204. Gerber Y, Weston SA, Redfield MM, Chamberlain AM, Manemann SM, Jiang R, et al. A contemporary appraisal of the heart failure epidemic in Olmsted County, Minnesota, 2000 to 2010. *JAMA Intern Med*. 2015;175(6):996-1004.
205. McDonagh TA, Metra M, Adamo M, Gardner RS, Baumbach A, Bohm M, et al. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur Heart J*. 2021;42(36):3599-726.
206. Bhatt AS, Ambrosy AP, Velazquez EJ. Adverse Remodeling and Reverse Remodeling After Myocardial Infarction. *Curr Cardiol Rep*. 2017;19(8):71.
207. Savarese G, Stolfo D, Sinagra G, Lund LH. Heart failure with mid-range or mildly reduced ejection fraction. *Nat Rev Cardiol*. 2022;19(2):100-16.

208. Fonarow GC, Peacock WF, Phillips CO, Givertz MM, Lopatin M, Committee ASA, et al. Admission B-type natriuretic peptide levels and in-hospital mortality in acute decompensated heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49(19):1943-50.
209. Humeres C, Frangogiannis NG. Fibroblasts in the Infarcted, Remodeling, and Failing Heart. *JACC Basic Transl Sci*. 2019;4(3):449-67.
210. Torre-Amione G, Kapadia S, Benedict C, Oral H, Young JB, Mann DL. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *J Am Coll Cardiol*. 1996;27(5):1201-6.
211. Testa M, Yeh M, Lee P, Fanelli R, Loperfido F, Berman JW, et al. Circulating levels of cytokines and their endogenous modulators in patients with mild to severe congestive heart failure due to coronary artery disease or hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 1996;28(4):964-71.
212. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation*. 1990;81(4):1161-72.
213. Cleutjens JP, Kandala JC, Guarda E, Guntaka RV, Weber KT. Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 1995;27(6):1281-92.
214. Zannad F, Rossignol P, Iraqi W. Extracellular matrix fibrotic markers in heart failure. *Heart Fail Rev*. 2010;15(4):319-29.
215. Leask A. Getting to the heart of the matter: new insights into cardiac fibrosis. *Circ Res*. 2015;116(7):1269-76.
216. Swynghedauw B. Phenotypic plasticity of adult myocardium: molecular mechanisms. *J Exp Biol*. 2006;209(Pt 12):2320-7.
217. Biomarkers EXGo. Biomarkers in cardiology--part 1--in heart failure and specific cardiomyopathies. *Arq Bras Cardiol*. 2014;103(6):451-9.
218. Santos PP, Oliveira F, Ferreira VC, Polegato BF, Roscani MG, Fernandes AA, et al. The role of lipotoxicity in smoke cardiomyopathy. *PLoS One*. 2014;9(12):e113739.
219. Azevedo PS, Minicucci MF, Santos PP, Paiva SA, Zornoff LA. Energy metabolism in cardiac remodeling and heart failure. *Cardiol Rev*. 2013;21(3):135-40.
220. Sackner-Bernstein JD. The myocardial matrix and the development and progression of ventricular remodeling. *Curr Cardiol Rep*. 2000;2(2):112-9.
221. Maczewski M, Borys M, Kacprzak P, Gdowski T, Kowalewski M, Wojciechowski D. Late ventricular remodeling in non-reperfused acute myocardial infarction in humans is predicted by angiotensin II type 1 receptor density on blood platelets. *Int J Cardiol*. 2008;127(1):57-63.
222. Sigusch HH, Campbell SE, Weber KT. Angiotensin II-induced myocardial fibrosis in rats: role of nitric oxide, prostaglandins and bradykinin. *Cardiovasc Res*. 1996;31(4):546-54.

223. Hartupee J, Mann DL. Neurohormonal activation in heart failure with reduced ejection fraction. *Nat Rev Cardiol*. 2017;14(1):30-8.
224. Abboud A, Januzzi JL. Reverse Cardiac Remodeling and ARNI Therapy. *Curr Heart Fail Rep*. 2021;18(2):71-83.
225. Roig Minguell E. [Clinical use of markers of neurohormonal activation in heart failure]. *Rev Esp Cardiol*. 2004 Apr;57(4):347-56. Spanish. PMID: 15104989.
226. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*. 2007;357(11):1121-35.
227. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986;74(5):1124-36.
228. Tyagi S, Kaur S, Singh N, Jaggi AS. Investigating the role of acute and repeated stress on remote ischemic preconditioning-induced cardioprotection. *Iran J Basic Med Sci*. 2020;23(1):111-6.
229. Garcia-Dorado D, Rodriguez-Sinovas A, Ruiz-Meana M, Inserte J. Protection against myocardial ischemia-reperfusion injury in clinical practice. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2014;67(5):394-404.
230. Yellon DM, Downey JM. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev*. 2003;83(4):1113-51.
231. Heusch G. Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning. *Circ Res*. 2015;116(4):674-99.
232. Hausenloy DJ. Cardioprotection techniques: preconditioning, postconditioning and remote conditioning (basic science). *Curr Pharm Des*. 2013;19(25):4544-63.
233. Hausenloy DJ, Yellon DM. The second window of preconditioning (SWOP) where are we now? *Cardiovasc Drugs Ther*. 2010;24(3):235-54.
234. Walsh SR, Tang TY, Kullar P, Jenkins DP, Dutka DP, Gaunt ME. Ischaemic preconditioning during cardiac surgery: systematic review and meta-analysis of perioperative outcomes in randomised clinical trials. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2008;34(5):985-94.
235. Yellon DM, Alkhulaifi AM, Pugsley WB. Preconditioning the human myocardium. *Lancet*. 1993;342(8866):276-7.
236. Eitel I, Thiele H. Cardioprotection by pre-infarct angina: training the heart to enhance myocardial salvage. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2013;14(11):1115-6.
237. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285(2):H579-88.
238. Shi W, Vinten-Johansen J. Endogenous cardioprotection by ischaemic postconditioning and remote conditioning. *Cardiovasc Res*. 2012;94(2):206-16.

239. Tsang A, Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial postconditioning: reperfusion injury revisited. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289(1):H2-7.
240. Touboul C, Angoulvant D, Mewton N, Ivanov F, Muntean D, Prunier F, et al. Ischaemic postconditioning reduces infarct size: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Cardiovasc Dis*. 2015;108(1):39-49.
241. Favaretto E, Roffi M, Frigo AC, Lee MS, Marra MP, Napodano M, et al. Meta-analysis of randomized trials of postconditioning in ST-elevation myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 2014;114(6):946-52.
242. Hahn JY, Song YB, Kim EK, Yu CW, Bae JW, Chung WY, et al. Ischemic postconditioning during primary percutaneous coronary intervention: the effects of postconditioning on myocardial reperfusion in patients with ST-segment elevation myocardial infarction (POST) randomized trial. *Circulation*. 2013;128(17):1889-96.
243. Heusch G, Botker HE, Przyklenk K, Redington A, Yellon D. Remote ischemic conditioning. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65(2):177-95.
244. Sivaraman V, Pickard JM, Hausenloy DJ. Remote ischaemic conditioning: cardiac protection from afar. *Anaesthesia*. 2015;70(6):732-48.
245. Hausenloy DJ, Yellon DM. Remote ischaemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Cardiovasc Res*. 2008;79(3):377-86.
246. Billah M, Ridiandries A, Allahwala U, Mudaliar H, Dona A, Hunyor S, et al. Circulating mediators of remote ischemic preconditioning: search for the missing link between non-lethal ischemia and cardioprotection. *Oncotarget*. 2019;10(2):216-44.
247. Kerendi F, Kin H, Halkos ME, Jiang R, Zatta AJ, Zhao ZQ, et al. Remote postconditioning. Brief renal ischemia and reperfusion applied before coronary artery reperfusion reduces myocardial infarct size via endogenous activation of adenosine receptors. *Basic Res Cardiol*. 2005;100(5):404-12.
248. Kharbanda RK, Mortensen UM, White PA, Kristiansen SB, Schmidt MR, Hoschtitzky JA, et al. Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo. *Circulation*. 2002;106(23):2881-3.
249. Schmidt MR, Smerup M, Konstantinov IE, Shimizu M, Li J, Cheung M, et al. Intermittent peripheral tissue ischemia during coronary ischemia reduces myocardial infarction through a KATP-dependent mechanism: first demonstration of remote ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292(4):H1883-90.
250. Basalay M, Barsukevich V, Mastitskaya S, Mrochek A, Pernow J, Sjoquist PO, et al. Remote ischaemic pre- and delayed postconditioning - similar degree of cardioprotection but distinct mechanisms. *Exp Physiol*. 2012;97(8):908-17.
251. D'Ascenzo F, Moretti C, Omede P, Cerrato E, Cavallero E, Er F, et al. Cardiac remote ischaemic preconditioning reduces periprocedural myocardial infarction for patients

undergoing percutaneous coronary interventions: a meta-analysis of randomised clinical trials. *EuroIntervention*. 2014;9(12):1463-71.

252. D'Ascenzo F, Cavallero E, Moretti C, Omede P, Sciuto F, Rahman IA, et al. Remote ischaemic preconditioning in coronary artery bypass surgery: a meta-analysis. *Heart*. 2012;98(17):1267-71.

253. Meybohm P, Bein B, Brosteanu O, Cremer J, Gruenewald M, Stoppe C, et al. A Multicenter Trial of Remote Ischemic Preconditioning for Heart Surgery. *N Engl J Med*. 2015;373(15):1397-407.

254. Hoole SP, Heck PM, Sharples L, Khan SN, Duehmke R, Densem CG, et al. Cardiac Remote Ischemic Preconditioning in Coronary Stenting (CRISP Stent) Study: a prospective, randomized control trial. *Circulation*. 2009;119(6):820-7.

255. Hausenloy DJ, Kharbanda RK, Moller UK, Ramlall M, Aaroe J, Butler R, et al. Effect of remote ischaemic conditioning on clinical outcomes in patients with acute myocardial infarction (CONDI-2/ERIC-PPCI): a single-blind randomised controlled trial. *Lancet*. 2019;394(10207):1415-24.

256. Del Olmo-Garcia MI, Merino-Torres JF. GLP-1 Receptor Agonists and Cardiovascular Disease in Patients with Type 2 Diabetes. *J Diabetes Res*. 2018;2018:4020492.

257. Read PA, Hoole SP, White PA, Khan FZ, O'Sullivan M, West NE, et al. A pilot study to assess whether glucagon-like peptide-1 protects the heart from ischemic dysfunction and attenuates stunning after coronary balloon occlusion in humans. *Circ Cardiovasc Interv*. 2011;4(3):266-72.

258. Bose AK, Mocanu MM, Carr RD, Yellon DM. Glucagon like peptide-1 is protective against myocardial ischemia/reperfusion injury when given either as a preconditioning mimetic or at reperfusion in an isolated rat heart model. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2005;19(1):9-11.

259. Giblett JP, Clarke S, Zhao T, McCormick LM, Braganza DM, Densem CG, et al. The role of Glucagon-Like Peptide 1 Loading on periprocedural myocardial infarction During elective PCI (GOLD-PCI study): A randomized, placebo-controlled trial. *Am Heart J*. 2019;215:41-51.

260. Pfeffer MA, Claggett B, Diaz R, Dickstein K, Gerstein HC, Kober LV, et al. Lixisenatide in Patients with Type 2 Diabetes and Acute Coronary Syndrome. *N Engl J Med*. 2015;373(23):2247-57.

261. Bulluck H, Sirker A, Loke YK, Garcia-Dorado D, Hausenloy DJ. Clinical benefit of adenosine as an adjunct to reperfusion in ST-elevation myocardial infarction patients: An updated meta-analysis of randomized controlled trials. *Int J Cardiol*. 2016;202:228-37.

262. Mahaffey KW, Puma JA, Barbagelata NA, DiCarli MF, Leeser MA, Browne KF, et al. Adenosine as an adjunct to thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: results of a multicenter, randomized, placebo-controlled trial: the Acute Myocardial Infarction Study of ADenosine (AMISTAD) trial. *J Am Coll Cardiol*. 1999;34(6):1711-20.
263. Ross AM, Gibbons RJ, Stone GW, Kloner RA, Alexander RW, Investigators A-I. A randomized, double-blinded, placebo-controlled multicenter trial of adenosine as an adjunct to reperfusion in the treatment of acute myocardial infarction (AMISTAD-II). *J Am Coll Cardiol*. 2005;45(11):1775-80.
264. Desmet W, Bogaert J, Dubois C, Sinnaeve P, Adriaenssens T, Pappas C, et al. High-dose intracoronary adenosine for myocardial salvage in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2011;32(7):867-77.
265. Ibanez B, Macaya C, Sanchez-Brunete V, Pizarro G, Fernandez-Friera L, Mateos A, et al. Effect of early metoprolol on infarct size in ST-segment-elevation myocardial infarction patients undergoing primary percutaneous coronary intervention: the Effect of Metoprolol in Cardioprotection During an Acute Myocardial Infarction (METOCARD-CNIC) trial. *Circulation*. 2013;128(14):1495-503.
266. Roolvink V, Ibanez B, Ottervanger JP, Pizarro G, van Royen N, Mateos A, et al. Early Intravenous Beta-Blockers in Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction Before Primary Percutaneous Coronary Intervention. *J Am Coll Cardiol*. 2016;67(23):2705-15.
267. Heusch G, Skyschally A, Gres P, van Caster P, Schilawa D, Schulz R. Improvement of regional myocardial blood flow and function and reduction of infarct size with ivabradine: protection beyond heart rate reduction. *Eur Heart J*. 2008;29(18):2265-75.
268. Steg P, Lopez-de-Sa E, Schiele F, Hamon M, Meinertz T, Goicolea J, et al. Safety of intravenous ivabradine in acute ST-segment elevation myocardial infarction patients treated with primary percutaneous coronary intervention: a randomized, placebo-controlled, double-blind, pilot study. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care*. 2013;2(3):270-9.
269. Piot C, Croisille P, Staat P, Thibault H, Rioufol G, Mewton N, et al. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2008;359(5):473-81.
270. Mewton N, Croisille P, Gahide G, Rioufol G, Bonnefoy E, Sanchez I, et al. Effect of cyclosporine on left ventricular remodeling after reperfused myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55(12):1200-5.
271. Cung TT, Morel O, Cayla G, Rioufol G, Garcia-Dorado D, Angoulvant D, et al. Cyclosporine before PCI in Patients with Acute Myocardial Infarction. *N Engl J Med*. 2015;373(11):1021-31.

272. Botker HE, Cabrera-Fuentes HA, Ruiz-Meana M, Heusch G, Ovize M. Translational issues for mitoprotective agents as adjunct to reperfusion therapy in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *J Cell Mol Med*. 2020;24(5):2717-29.
273. Santini A, Cammarata SM, Capone G, Ianaro A, Tenore GC, Pani L, et al. Nutraceuticals: opening the debate for a regulatory framework. *Br J Clin Pharmacol*. 2018;84(4):659-72.
274. SL. D. *Trends Food Sci Technol*. 1995;6(2):59-61.
275. Witkamp RF, van Norren K. Let thy food be thy medicine....when possible. *Eur J Pharmacol*. 2018;836:102-14.
276. Ronis MJJ, Pedersen KB, Watt J. Adverse Effects of Nutraceuticals and Dietary Supplements. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2018;58:583-601.
277. Helal NA, Eassa HA, Amer AM, Eltokhy MA, Edafiogho I, Nounou MI. Nutraceuticals' Novel Formulations: The Good, the Bad, the Unknown and Patents Involved. *Recent Pat Drug Deliv Formul*. 2019;13(2):105-56.
278. Nutraceuticals Market Growth, Size, Trends and Forecast 2020 to 2025. <https://www.marketdataforecast.com/market-reports/global-nutraceuticals-market>. Accessed 23rd May 2022
279. Carpio LE, Sanz Y, Gozalbes R, Barigye SJ. Computational strategies for the discovery of biological functions of health foods, nutraceuticals and cosmeceuticals: a review. *Mol Divers*. 2021;25(3):1425-38.
280. George Kerry R, Patra JK, Gouda S, Park Y, Shin HS, Das G. Benefaction of probiotics for human health: A review. *J Food Drug Anal*. 2018;26(3):927-39.
281. Volpe R, Sotis G. Nutraceuticals: Definition and Epidemiological Rationale for Their Use in Clinical Practice. *High Blood Press Cardiovasc Prev*. 2015;22(3):199-201.
282. Rivellese AA, Ciciola P, Costabile G, Vetrani C, Vitale M. The Possible Role of Nutraceuticals in the Prevention of Cardiovascular Disease. *High Blood Press Cardiovasc Prev*. 2019;26(2):101-11.
283. Bianconi V, Mannarino MR, Sahebkar A, Cosentino T, Pirro M. Cholesterol-Lowering Nutraceuticals Affecting Vascular Function and Cardiovascular Disease Risk. *Curr Cardiol Rep*. 2018;20(7):53.
284. Sunkara A, Raizner A. Supplemental Vitamins and Minerals for Cardiovascular Disease Prevention and Treatment. *Methodist DeBakey Cardiovasc J*. 2019;15(3):179-84.
285. Aggarwal M, Aggarwal B, Rao J. Integrative Medicine for Cardiovascular Disease and Prevention. *Med Clin North Am*. 2017;101(5):895-923.
286. Rogers TS, Seehusen DA. Omega-3 Fatty Acids and Cardiovascular Disease. *Am Fam Physician*. 2018;97(9):562-4.

287. Fortmann SP, Burda BU, Senger CA, Lin JS, Whitlock EP. Vitamin and mineral supplements in the primary prevention of cardiovascular disease and cancer: An updated systematic evidence review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med.* 2013;159(12):824-34.
288. Barbarawi M, Kheiri B, Zayed Y, Barbarawi O, Dhillon H, Swaid B, et al. Vitamin D Supplementation and Cardiovascular Disease Risks in More Than 83000 Individuals in 21 Randomized Clinical Trials: A Meta-analysis. *JAMA Cardiol.* 2019;4(8):765-76.
289. Schwingshackl L, Boeing H, Stelmach-Mardas M, Gottschald M, Dietrich S, Hoffmann G, et al. Dietary Supplements and Risk of Cause-Specific Death, Cardiovascular Disease, and Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Primary Prevention Trials. *Adv Nutr.* 2017;8(1):27-39.
290. Russell C, Keshavamurthy S, Saha S. Nutraceuticals in the Management of Cardiovascular Risk Factors: Where is the Evidence? *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.* 2021;21(3):150-61.
291. Watanabe Y, Tatsuno I. Prevention of Cardiovascular Events with Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and the Mechanism Involved. *J Atheroscler Thromb.* 2020;27(3):183-98.
292. Makhmudova U, Schulze PC, Lutjohann D, Weingartner O. Phytosterols and Cardiovascular Disease. *Curr Atheroscler Rep.* 2021;23(11):68.
293. Tome-Carneiro J, Visioli F. Polyphenol-based nutraceuticals for the prevention and treatment of cardiovascular disease: Review of human evidence. *Phytomedicine.* 2016;23(11):1145-74.
294. Sachdeva V, Roy A, Bharadvaja N. Current Prospects of Nutraceuticals: A Review. *Curr Pharm Biotechnol.* 2020;21(10):884-96.
295. Mannarino MR, Ministrini S, Pirro M. Nutraceuticals for the treatment of hypercholesterolemia. *Eur J Intern Med.* 2014;25(7):592-9.
296. Amir Shaghaghi M, Abumweis SS, Jones PJH. Cholesterol-lowering efficacy of plant sterols/stanols provided in capsule and tablet formats: results of a systematic review and meta-analysis. *J Acad Nutr Diet.* 2013;113(11):1494-503.
297. Pons P, Rodriguez M, Robaina C, Illnait J, Mas R, Fernandez L, et al. Effects of successive dose increases of policosanol on the lipid profile of patients with type II hypercholesterolaemia and tolerability to treatment. *Int J Clin Pharmacol Res.* 1994;14(1):27-33.
298. Greyling A, De Witt C, Oosthuizen W, Jerling JC. Effects of a policosanol supplement on serum lipid concentrations in hypercholesterolaemic and heterozygous familial hypercholesterolaemic subjects. *Br J Nutr.* 2006;95(5):968-75.

299. Becker DJ, Gordon RY, Halbert SC, French B, Morris PB, Rader DJ. Red yeast rice for dyslipidemia in statin-intolerant patients: a randomized trial. *Ann Intern Med.* 2009;150(12):830-9, W147-9.
300. Cicero AF, Rovati LC, Setnikar I. Eulipidemic effects of berberine administered alone or in combination with other natural cholesterol-lowering agents. A single-blind clinical investigation. *Arzneimittelforschung.* 2007;57(1):26-30.
301. Kong W, Wei J, Abidi P, Lin M, Inaba S, Li C, et al. Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins. *Nat Med.* 2004;10(12):1344-51.
302. Heber D, Yip I, Ashley JM, Elashoff DA, Elashoff RM, Go VL. Cholesterol-lowering effects of a proprietary Chinese red-yeast-rice dietary supplement. *Am J Clin Nutr.* 1999;69(2):231-6.
303. Ho SS, Pal S. Margarine phytosterols decrease the secretion of atherogenic lipoproteins from HepG2 liver and Caco2 intestinal cells. *Atherosclerosis.* 2005;182(1):29-36.
304. Fraga CG, Croft KD, Kennedy DO, Tomas-Barberan FA. The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food Funct.* 2019;10(2):514-28.
305. Davison K, Coates AM, Buckley JD, Howe PR. Effect of cocoa flavanols and exercise on cardiometabolic risk factors in overweight and obese subjects. *Int J Obes (Lond).* 2008;32(8):1289-96.
306. Carrasco-Pozo C, Cires MJ, Gotteland M. Quercetin and Epigallocatechin Gallate in the Prevention and Treatment of Obesity: From Molecular to Clinical Studies. *J Med Food.* 2019;22(8):753-70.
307. Ostadmohammadi V, Milajerdi A, Ayati E, Kolahdooz F, Asemi Z. Effects of quercetin supplementation on glycemic control among patients with metabolic syndrome and related disorders: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Phytother Res.* 2019;33(5):1330-40.
308. Akbari G. Role of Zinc Supplementation on Ischemia/Reperfusion Injury in Various Organs. *Biol Trace Elem Res.* 2020;196(1):1-9.
309. Almeida FM, Battochio AS, Napoli JP, Alves KA, Balbin GS, Oliveira-Junior M, et al. Creatine Supply Attenuates Ischemia-Reperfusion Injury in Lung Transplantation in Rats. *Nutrients.* 2020;12(9).
310. Ohkita M, Hayashi H, Ito K, Shigematsu N, Tanaka R, Tsutsui H, et al. Preventive Effects of Grape Extract on Ischemia/Reperfusion-Induced Acute Kidney Injury in Mice. *Biol Pharm Bull.* 2019;42(11):1883-90.

311. Dong L, Fan Y, Shao X, Chen Z. Vitexin protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in Langendorff-perfused rat hearts by attenuating inflammatory response and apoptosis. *Food Chem Toxicol*. 2011;49(12):3211-6.
312. Zheng J, Mao Z, Zhang J, Jiang L, Wang N. Paeonol Pretreatment Attenuates Anoxia-Reoxygenation Induced Injury in Cardiac Myocytes via a BRCA1 Dependent Pathway. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2020;68(12):1163-9.
313. Zhang X, Huang LF, Hua L, Feng HK, Shen B. Resveratrol protects myocardial apoptosis induced by ischemia-reperfusion in rats with acute myocardial infarction via blocking P13K/Akt/e-NOS pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2019;23(4):1789-96.
314. Li X, Hu X, Wang J, Xu W, Yi C, Ma R, et al. Inhibition of autophagy via activation of PI3K/Akt/mTOR pathway contributes to the protection of hesperidin against myocardial ischemia/reperfusion injury. *Int J Mol Med*. 2018;42(4):1917-24.
315. Chen C, Yu LT, Cheng BR, Xu JL, Cai Y, Jin JL, et al. Promising Therapeutic Candidate for Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury: What Are the Possible Mechanisms and Roles of Phytochemicals? *Front Cardiovasc Med*. 2021;8:792592.
316. Ashrafian H, Czibik G, Bellahcene M, Aksentijevic D, Smith AC, Mitchell SJ, et al. Fumarate is cardioprotective via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. *Cell Metab*. 2012;15(3):361-71.
317. Xu G, Zhao X, Fu J, Wang X. Resveratrol increase myocardial Nrf2 expression in type 2 diabetic rats and alleviate myocardial ischemia/reperfusion injury (MIRI). *Ann Palliat Med*. 2019;8(5):565-75.
318. Xu M, Li X, Song L. Baicalin regulates macrophages polarization and alleviates myocardial ischaemia/reperfusion injury via inhibiting JAK/STAT pathway. *Pharm Biol*. 2020;58(1):655-63.
319. Stephanou A. Role of STAT-1 and STAT-3 in ischaemia/reperfusion injury. *J Cell Mol Med*. 2004;8(4):519-25.
320. Liu Y, Che G, Di Z, Sun W, Tian J, Ren M. Calycosin-7-O-beta-D-glucoside attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by activating JAK2/STAT3 signaling pathway via the regulation of IL-10 secretion in mice. *Mol Cell Biochem*. 2020;463(1-2):175-87.
321. Hou X, Fu M, Cheng B, Kang Y, Xie D. Galanthamine improves myocardial ischemia-reperfusion-induced cardiac dysfunction, endoplasmic reticulum stress-related apoptosis, and myocardial fibrosis by suppressing AMPK/Nrf2 pathway in rats. *Ann Transl Med*. 2019;7(22):634.
322. Liu X, Zhang S, Xu C, Sun Y, Sui S, Zhang Z, et al. The Protective of Baicalin on Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *Curr Pharm Biotechnol*. 2020;21(13):1386-93.

323. Kim SJ, Li M, Jeong CW, Bae HB, Kwak SH, Lee SH, et al. Epigallocatechin-3-gallate, a green tea catechin, protects the heart against regional ischemia-reperfusion injuries through activation of RISK survival pathways in rats. *Arch Pharm Res.* 2014;37(8):1079-85.
324. Zhu N, Li J, Li Y, Zhang Y, Du Q, Hao P, et al. Berberine Protects Against Simulated Ischemia/Reperfusion Injury-Induced H9C2 Cardiomyocytes Apoptosis In Vitro and Myocardial Ischemia/Reperfusion-Induced Apoptosis In Vivo by Regulating the Mitophagy-Mediated HIF-1 α /BNIP3 Pathway. *Front Pharmacol.* 2020;11:367.
325. Sabe AA, Sadek AA, Elmadhun NY, Dalal RS, Robich MP, Bianchi C, et al. Investigating the effects of resveratrol on chronically ischemic myocardium in a swine model of metabolic syndrome: a proteomics analysis. *J Med Food.* 2015;18(1):60-6.
326. Pranav Nayak B, Ganesha KR, Minaz N, Razdan R, Goswami SK. Phloroglucinol, a nutraceutical for IR-induced cardiac damage in diabetic rats. *Animal Model Exp Med.* 2019;2(3):210-6.
327. Rivera K, Salas-Perez F, Echeverria G, Urquiaga I, Dicenta S, Perez D, et al. Red Wine Grape Pomace Attenuates Atherosclerosis and Myocardial Damage and Increases Survival in Association with Improved Plasma Antioxidant Activity in a Murine Model of Lethal Ischemic Heart Disease. *Nutrients.* 2019;11(9).
328. Lescano de Souza Junior A, Mancini Filho J, Pavan Torres R, Irigoyen MC, Curi R. Pretreatment with fish oil attenuates heart ischaemia consequences in rats. *Exp Physiol.* 2017;102(11):1459-73.
329. Calder PC. omega 3 polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *World Rev Nutr Diet.* 2001;88:109-16.
330. Goodfellow J, Bellamy MF, Ramsey MW, Jones CJ, Lewis MJ. Dietary supplementation with marine omega-3 fatty acids improve systemic large artery endothelial function in subjects with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35(2):265-70.
331. Popoff F, Balaciano G, Bardach A, Comande D, Irazola V, Catalano HN, et al. Omega 3 fatty acid supplementation after myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cardiovasc Disord.* 2019;19(1):136.
332. Salehi B, Berkay Yilmaz Y, Antika G, Boyunegmez Tumer T, Fawzi Mahomoodally M, Lobine D, et al. Insights on the Use of alpha-Lipoic Acid for Therapeutic Purposes. *Biomolecules.* 2019;9(8).
333. Wang ZY, Liu YY, Liu GH, Lu HB, Mao CY. L-Carnitine and heart disease. *Life Sci.* 2018;194:88-97.
334. da Silva Guimaraes S, de Souza Cruz W, da Silva L, Maciel G, Huguenin AB, de Carvalho M, et al. Effect of L-Carnitine Supplementation on Reverse Remodeling in Patients with Ischemic Heart Disease Undergoing Coronary Artery Bypass Grafting: A Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Ann Nutr Metab.* 2017;70(2):106-10.

335. Rizos I. Three-year survival of patients with heart failure caused by dilated cardiomyopathy and L-carnitine administration. *Am Heart J*. 2000;139(2 Pt 3):S120-3.
336. Scarabelli TM, Townsend PA, Chen Scarabelli C, Yuan Z, McCauley RB, Di Rezze J, et al. Amino acid supplementation differentially modulates STAT1 and STAT3 activation in the myocardium exposed to ischemia/reperfusion injury. *Am J Cardiol*. 2008;101(11A):63E-8E.
337. Kulthinee S, Wyss JM, Roysommuti S. Taurine supplementation prevents the adverse effect of high sugar intake on arterial pressure control after cardiac ischemia/reperfusion in female rats. *Adv Exp Med Biol*. 2015;803:597-611.
338. Ueshima K. Magnesium and ischemic heart disease: a review of epidemiological, experimental, and clinical evidences. *Magnes Res*. 2005;18(4):275-84.
339. Xu Z, Kim S, Huh J. Zinc plays a critical role in the cardioprotective effect of postconditioning by enhancing the activation of the RISK pathway in rat hearts. *J Mol Cell Cardiol*. 2014;66:12-7.
340. Karagulova G, Yue Y, Moreyra A, Boutjdir M, Korichneva I. Protective role of intracellular zinc in myocardial ischemia/reperfusion is associated with preservation of protein kinase C isoforms. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;321(2):517-25.
341. Bronzato S, Durante A. Dietary Supplements and Cardiovascular Diseases. *Int J Prev Med*. 2018;9:80.
342. Zhang Y, Huang X, Liu N, Liu M, Sun C, Qi B, et al. Discovering the Potential Value of Coenzyme Q10 in Oxidative Stress: Enlightenment From a Synthesis of Clinical Evidence Based on Various Population. *Front Pharmacol*. 2022;13:936233.
343. Hopper I, Connell C, Briffa T, De Pasquale CG, Driscoll A, Kistler PM, et al. Nutraceuticals in Patients With Heart Failure: A Systematic Review. *J Card Fail*. 2020;26(2):166-79.
344. Cicero AFG, Colletti A, von Haehling S, Vinereanu D, Bielecka-Dabrowa A, Sahebkar A, et al. Nutraceutical support in heart failure: a position paper of the International Lipid Expert Panel (ILEP). *Nutr Res Rev*. 2020;33(1):155-79.
345. Spigoni V, Aldigeri R, Antonini M, Micheli MM, Fantuzzi F, Fratter A, et al. Effects of a New Nutraceutical Formulation (Berberine, Red Yeast Rice and Chitosan) on Non-HDL Cholesterol Levels in Individuals with Dyslipidemia: Results from a Randomized, Double Blind, Placebo-Controlled Study. *Int J Mol Sci*. 2017;18(7).
346. Cicero AFG, Fogacci F, Bove M, Veronesi M, Rizzo M, Giovannini M, et al. Short-Term Effects of a Combined Nutraceutical on Lipid Level, Fatty Liver Biomarkers, Hemodynamic Parameters, and Estimated Cardiovascular Disease Risk: A Double-Blind, Placebo-Controlled Randomized Clinical Trial. *Adv Ther*. 2017;34(8):1966-75.

347. Pirro M, Mannarino MR, Ministrini S, Fallarino F, Lupattelli G, Bianconi V, et al. Effects of a nutraceutical combination on lipids, inflammation and endothelial integrity in patients with subclinical inflammation: a randomized clinical trial. *Sci Rep*. 2016;6:23587.
348. Derosa G, Bonaventura A, Bianchi L, Romano D, D'Angelo A, Fogari E, et al. A randomized, placebo-controlled study on the effects of a nutraceutical combination of red yeast rice, silybum marianum and octasonol on lipid profile, endothelial and inflammatory parameters. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2014;28(2):317-24.
349. Freedman JE, Parker C, 3rd, Li L, Perlman JA, Frei B, Ivanov V, et al. Select flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release. *Circulation*. 2001;103(23):2792-8.
350. Pignatelli P, Pulcinelli FM, Celestini A, Lenti L, Ghiselli A, Gazzaniga PP, et al. The flavonoids quercetin and catechin synergistically inhibit platelet function by antagonizing the intracellular production of hydrogen peroxide. *Am J Clin Nutr*. 2000;72(5):1150-5.
351. Demrow HS, Slane PR, Folts JD. Administration of wine and grape juice inhibits in vivo platelet activity and thrombosis in stenosed canine coronary arteries. *Circulation*. 1995;91(4):1182-8.
352. Osman HE, Maalej N, Shanmuganayagam D, Folts JD. Grape juice but not orange or grapefruit juice inhibits platelet activity in dogs and monkeys. *J Nutr*. 1998;128(12):2307-12.
353. Serban MC, Sahebkar A, Dragan S, Stoichescu-Hogea G, Ursoniu S, Andrica F, et al. A systematic review and meta-analysis of the impact of Spirulina supplementation on plasma lipid concentrations. *Clin Nutr*. 2016;35(4):842-51.
354. El-Sheekh MM. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2014;57(1):77-86.
355. Deng R, Chow TJ. Hypolipidemic, antioxidant, and antiinflammatory activities of microalgae Spirulina. *Cardiovasc Ther*. 2010;28(4):e33-45.
356. Szulinska M, Gibas-Dorna M, Miller-Kasprzak E, Suliburska J, Miczke A, Walczak-Galezewska M, et al. Spirulina maxima improves insulin sensitivity, lipid profile, and total antioxidant status in obese patients with well-treated hypertension: a randomized double-blind placebo-controlled study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017;21(10):2473-81.
357. Miczke A, Szulinska M, Hansdorfer-Korzon R, Kregielska-Narozna M, Suliburska J, Walkowiak J, et al. Effects of spirulina consumption on body weight, blood pressure, and endothelial function in overweight hypertensive Caucasians: a double-blind, placebo-controlled, randomized trial. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016;20(1):150-6.
358. Mazokopakis EE, Papadomanolaki MG, Foustieris AA, Kotsiris DA, Lampadakis IM, Ganotakis ES. The hepatoprotective and hypolipidemic effects of Spirulina (*Arthrospira platensis*) supplementation in a Cretan population with non-alcoholic fatty liver disease: a prospective pilot study. *Ann Gastroenterol*. 2014;27(4):387-94.

359. Hassan HA, El-Gharib NE. Obesity and Clinical Riskiness Relationship: Therapeutic Management by Dietary Antioxidant Supplementation--a Review. *Appl Biochem Biotechnol*. 2015;176(3):647-69.
360. Torres-Duran PV, Ferreira-Hermosillo A, Juarez-Oropeza MA. Antihyperlipemic and antihypertensive effects of *Spirulina maxima* in an open sample of Mexican population: a preliminary report. *Lipids Health Dis*. 2007;6:33.
361. Lee EH, Park JE, Choi YJ, Huh KB, Kim WY. A randomized study to establish the effects of spirulina in type 2 diabetes mellitus patients. *Nutr Res Pract*. 2008;2(4):295-300.
362. Soheili M. *Current Nutrition and Food Science*. 2011;7(4):279-85.
363. Parikh P, Mani U, Iyer U. Role of *Spirulina* in the Control of Glycemia and Lipidemia in Type 2 Diabetes Mellitus. *J Med Food*. 2001;4(4):193-9.
364. Nagaoka S, Shimizu K, Kaneko H, Shibayama F, Morikawa K, Kanamaru Y, et al. A novel protein C-phycocyanin plays a crucial role in the hypocholesterolemic action of *Spirulina platensis* concentrate in rats. *J Nutr*. 2005;135(10):2425-30.
365. Cheong SH, Kim MY, Sok DE, Hwang SY, Kim JH, Kim HR, et al. *Spirulina* prevents atherosclerosis by reducing hypercholesterolemia in rabbits fed a high-cholesterol diet. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2010;56(1):34-40.
366. Ngo-Matip ME, Pieme CA, Azabji-Kenfack M, Biapa PC, Germaine N, Heike E, et al. Effects of *Spirulina platensis* supplementation on lipid profile in HIV-infected antiretroviral naive patients in Yaounde-Cameroon: a randomized trial study. *Lipids Health Dis*. 2014;13:191.
367. Khan M, Shobha JC, Mohan IK, Naidu MU, Sundaram C, Singh S, et al. Protective effect of *Spirulina* against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Phytother Res*. 2005;19(12):1030-7.
368. Maurea N QV, Paccone A, De Laurentiis M, Buccolo S, Iovine M. Cytoprotective effects of spirulina extract against doxorubicin-induced cardiotoxicity: Biochemical evidences and translational perspectives in cardio-oncology. *Journal of Clinical Oncology*. 2021;39:15_suppl.
369. Majewski M, Klett-Mingo M, Verdasco-Martin CM, Otero C, Ferrer M. *Spirulina* extract improves age-induced vascular dysfunction. *Pharm Biol*. 2022;60(1):627-37.
370. Rojas-Franco P, Garcia-Pliego E, Vite-Aquino AG, Franco-Colin M, Serrano-Contreras JI, Paniagua-Castro N, et al. The Nutraceutical Antihypertensive Action of C-Phycocyanin in Chronic Kidney Disease Is Related to the Prevention of Endothelial Dysfunction. *Nutrients*. 2022;14(7).
371. Park HJ, Lee YJ, Ryu HK, Kim MH, Chung HW, Kim WY. A randomized double-blind, placebo-controlled study to establish the effects of spirulina in elderly Koreans. *Ann Nutr Metab*. 2008;52(4):322-8.

372. Riss J, Decorde K, Sutra T, Delage M, Baccou JC, Jouy N, et al. Phycobiliprotein C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* is powerfully responsible for reducing oxidative stress and NADPH oxidase expression induced by an atherogenic diet in hamsters. *J Agric Food Chem.* 2007;55(19):7962-7.
373. Bai SK, Lee SJ, Na HJ, Ha KS, Han JA, Lee H, et al. beta-Carotene inhibits inflammatory gene expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages by suppressing redox-based NF-kappaB activation. *Exp Mol Med.* 2005;37(4):323-34.
374. Kim NC, Graf TN, Sparacino CM, Wani MC, Wall ME. Complete isolation and characterization of silybins and isosilybins from milk thistle (*Silybum marianum*). *Org Biomol Chem.* 2003;1(10):1684-9.
375. Chambers CS, Holeckova V, Petraskova L, Biedermann D, Valentova K, Buchta M, et al. The silymarin composition... and why does it matter??? *Food Res Int.* 2017;100(Pt 3):339-53.
376. Camini FC, Costa DC. Silymarin: not just another antioxidant. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2020;31(4).
377. Poruba M, Kazdova L, Oliarynyk O, Malinska H, Matuskova Z, Tozzi di Angelo I, et al. Improvement bioavailability of silymarin ameliorates severe dyslipidemia associated with metabolic syndrome. *Xenobiotica.* 2015;45(9):751-6.
378. Derosa G, Romano D, D'Angelo A, Maffioli P. Berberis aristata/Silybum marianum fixed combination (Berberol((R))) effects on lipid profile in dyslipidemic patients intolerant to statins at high dosages: a randomized, placebo-controlled, clinical trial. *Phytomedicine.* 2015;22(2):231-7.
379. Esmaeil N, Anaraki SB, Gharagozloo M, Moayedi B. Silymarin impacts on immune system as an immunomodulator: One key for many locks. *Int Immunopharmacol.* 2017;50:194-201.
380. Razavi BM, Karimi G. Protective effect of silymarin against chemical-induced cardiotoxicity. *Iran J Basic Med Sci.* 2016;19(9):916-23.
381. Vargas-Mendoza N, Madrigal-Santillan E, Morales-Gonzalez A, Esquivel-Soto J, Esquivel-Chirino C, Garcia-Luna YG-RM, et al. Hepatoprotective effect of silymarin. *World J Hepatol.* 2014;6(3):144-9.
382. Turgut F, Bayrak O, Catal F, Bayrak R, Atmaca AF, Koc A, et al. Antioxidant and protective effects of silymarin on ischemia and reperfusion injury in the kidney tissues of rats. *Int Urol Nephrol.* 2008;40(2):453-60.
383. Di Meo F, Lemaury V, Cornil J, Lazzaroni R, Duroux JL, Olivier Y, et al. Free radical scavenging by natural polyphenols: atom versus electron transfer. *J Phys Chem A.* 2013;117(10):2082-92.

384. Vahabzadeh M, Amiri N, Karimi G. Effects of silymarin on metabolic syndrome: a review. *J Sci Food Agric*. 2018;98(13):4816-23.
385. Matsuda T, Ferreri K, Todorov I, Kuroda Y, Smith CV, Kandeel F, et al. Silymarin protects pancreatic beta-cells against cytokine-mediated toxicity: implication of c-Jun NH2-terminal kinase and janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathways. *Endocrinology*. 2005;146(1):175-85.
386. Voroneanu L, Nistor I, Dumea R, Apetrii M, Covic A. Silymarin in Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J Diabetes Res*. 2016;2016:5147468.
387. Gu M, Zhao P, Huang J, Zhao Y, Wang Y, Li Y, et al. Silymarin Ameliorates Metabolic Dysfunction Associated with Diet-Induced Obesity via Activation of Farnesyl X Receptor. *Front Pharmacol*. 2016;7:345.
388. Hadi A, Pourmasoumi M, Mohammadi H, Symonds M, Miraghajani M. The effects of silymarin supplementation on metabolic status and oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Complement Ther Med*. 2018;41:311-9.
389. Fallahzadeh MK, Dormanesh B, Sagheb MM, Roozbeh J, Vessal G, Pakfetrat M, et al. Effect of addition of silymarin to renin-angiotensin system inhibitors on proteinuria in type 2 diabetic patients with overt nephropathy: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Am J Kidney Dis*. 2012;60(6):896-903.
390. Ebrahimpour-Koujan S, Gargari BP, Mobasser M, Valizadeh H, Asghari-Jafarabadi M. Lower glycemic indices and lipid profile among type 2 diabetes mellitus patients who received novel dose of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (silymarin) extract supplement: A Triple-blinded randomized controlled clinical trial. *Phytomedicine*. 2018;44:39-44.
391. Tuorkey MJ, El-Desouki NI, Kamel RA. Cytoprotective effect of silymarin against diabetes-induced cardiomyocyte apoptosis in diabetic rats. *Biomed Environ Sci*. 2015;28(1):36-43.
392. Alarcon de la Lastra AC, Martin MJ, Motilva V, Jimenez M, La Casa C, Lopez A. Gastroprotection induced by silymarin, the hepatoprotective principle of *Silybum marianum* in ischemia-reperfusion mucosal injury: role of neutrophils. *Planta Med*. 1995;61(2):116-9.
393. Oliveira CP, Lopasso FP, Laurindo FR, Leitao RM, Laudanna AA. Protection against liver ischemia-reperfusion injury in rats by silymarin or verapamil. *Transplant Proc*. 2001;33(6):3010-4.
394. Wang M, Li YJ, Ding Y, Zhang HN, Sun T, Zhang K, et al. Silibinin Prevents Autophagic Cell Death upon Oxidative Stress in Cortical Neurons and Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury. *Mol Neurobiol*. 2016;53(2):932-43.

395. Vilahur G, Casani L, Pena E, Crespo J, Juan-Babot O, Ben-Aicha S, et al. Silybum marianum provides cardioprotection and limits adverse remodeling post-myocardial infarction by mitigating oxidative stress and reactive fibrosis. *Int J Cardiol.* 2018;270:28-35.
396. Martin TP, MacDonald EA, Elbassioni AAM, O'Toole D, Zaeri AAI, Nicklin SA, et al. Preclinical models of myocardial infarction: from mechanism to translation. *Br J Pharmacol.* 2022;179(5):770-91.
397. Sprague W. Arrive Guidelines 2.0. *Vet Clin Pathol.* 2020;49(3):378-9.
398. Flecknell P. Replacement, reduction and refinement. *ALTEX.* 2002;19(2):73-8.
399. Shin HS, Shin HH, Shudo Y. Current Status and Limitations of Myocardial Infarction Large Animal Models in Cardiovascular Translational Research. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021;9:673683.
400. Kumar M, Kasala ER, Bodduluru LN, Dahiya V, Sharma D, Kumar V, et al. Animal models of myocardial infarction: Mainstay in clinical translation. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2016;76:221-30.
401. McCall FC, Telukuntla KS, Karantalis V, Suncion VY, Heldman AW, Mushtaq M, et al. Myocardial infarction and intramyocardial injection models in swine. *Nat Protoc.* 2012;7(8):1479-96.
402. Dondelinger RF, Ghysels MP, Brisbois D, Donkers E, Snaps FR, Saunders J, et al. Relevant radiological anatomy of the pig as a training model in interventional radiology. *Eur Radiol.* 1998;8(7):1254-73.
403. Hearse DJ. Species variation in the coronary collateral circulation during regional myocardial ischaemia: a critical determinant of the rate of evolution and extent of myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2000;45(1):213-9.
404. Crick SJ, Sheppard MN, Ho SY, Gebstein L, Anderson RH. Anatomy of the pig heart: comparisons with normal human cardiac structure. *J Anat.* 1998;193 (Pt 1):105-19.
405. Bikou O, Watanabe S, Hajjar RJ, Ishikawa K. A Pig Model of Myocardial Infarction: Catheter-Based Approaches. *Methods Mol Biol.* 2018;1816:281-94.
406. Haines DE, Verow AF, Sinusas AJ, Wayne JG, DiMarco JP. Intracoronary ethanol ablation in swine: characterization of myocardial injury in target and remote vascular beds. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 1994;5(1):41-9.
407. Weismuller P, Mayer U, Richter P, Heieck F, Kochs M, Hombach V. Chemical ablation by subendocardial injection of ethanol via catheter--preliminary results in the pig heart. *Eur Heart J.* 1991;12(11):1234-9.
408. Eldar M, Ohad D, Bor A, Varda-Bloom N, Swanson DK, Battler A. A closed-chest pig model of sustained ventricular tachycardia. *Pacing Clin Electrophysiol.* 1994;17(10):1603-9.

409. Suzuki M, Asano H, Tanaka H, Usuda S. Development and evaluation of a new canine myocardial infarction model using a closed-chest injection of thrombogenic material. *Jpn Circ J*. 1999;63(11):900-5.
410. Reffelmann T, Sensebat O, Birnbaum Y, Stroemer E, Hanrath P, Uretsky BF, et al. A novel minimal-invasive model of chronic myocardial infarction in swine. *Coron Artery Dis*. 2004;15(1):7-12.
411. Lukacs E, Magyari B, Toth L, Petrasi Z, Repa I, Koller A, et al. Overview of large animal myocardial infarction models (review). *Acta Physiol Hung*. 2012;99(4):365-81.
412. Van de Werf F, Bergmann SR, Fox KA, de Geest H, Hoyng CF, Sobel BE, et al. Coronary thrombolysis with intravenously administered human tissue-type plasminogen activator produced by recombinant DNA technology. *Circulation*. 1984;69(3):605-10.
413. Krombach GA, Kinzel S, Mahnken AH, Gunther RW, Buecker A. Minimally invasive close-chest method for creating reperfused or occlusive myocardial infarction in swine. *Invest Radiol*. 2005;40(1):14-8.
414. Li K, Wagner L, Moctezuma-Ramirez A, Vela D, Perin E. A Robust Percutaneous Myocardial Infarction Model in Pigs and Its Effect on Left Ventricular Function. *J Cardiovasc Transl Res*. 2021;14(6):1075-84.
415. Garcia-Dorado D, Theroux P, Elizaga J, Galinanes M, Solares J, Riesgo M, et al. Myocardial reperfusion in the pig heart model: infarct size and duration of coronary occlusion. *Cardiovasc Res*. 1987;21(7):537-44.
416. Radike M, Sutelman P, Ben-Aicha S, Gutierrez M, Mendieta G, Alcover S, et al. A comprehensive and longitudinal cardiac magnetic resonance imaging study of the impact of coronary ischemia duration on myocardial damage in a highly translatable animal model. *Eur J Clin Invest*. 2023;53(1):e13860.
417. Fujimoto M, Tsuneyama K, Fujimoto T, Selmi C, Gershwin ME, Shimada Y. Spirulina improves non-alcoholic steatohepatitis, visceral fat macrophage aggregation, and serum leptin in a mouse model of metabolic syndrome. *Dig Liver Dis*. 2012;44(9):767-74.
418. Moradi S, Ziaei R, Foshati S, Mohammadi H, Nachvak SM, Rouhani MH. Effects of Spirulina supplementation on obesity: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Complement Ther Med*. 2019;47:102211.
419. Hu J, Li Y, Pakpour S, Wang S, Pan Z, Liu J, et al. Dose Effects of Orally Administered Spirulina Suspension on Colonic Microbiota in Healthy Mice. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019;9:243.
420. Yu T, Wang Y, Chen X, Xiong W, Tang Y, Lin L. Spirulina platensis alleviates chronic inflammation with modulation of gut microbiota and intestinal permeability in rats fed a high-fat diet. *J Cell Mol Med*. 2020;24(15):8603-13.

421. Khan M, Varadharaj S, Shobha JC, Naidu MU, Parinandi NL, Kutala VK, et al. C-phycocyanin ameliorates doxorubicin-induced oxidative stress and apoptosis in adult rat cardiomyocytes. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2006;47(1):9-20.
422. Xi L, Jarrett NC, Hess ML, Kukreja RC. Essential role of inducible nitric oxide synthase in monophosphoryl lipid A-induced late cardioprotection: evidence from pharmacological inhibition and gene knockout mice. *Circulation*. 1999;99(16):2157-63.
423. Bolli R. Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research. *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33(11):1897-918.
424. Lecour S, Suleman N, Deuchar GA, Somers S, Lacerda L, Huisamen B, et al. Pharmacological preconditioning with tumor necrosis factor-alpha activates signal transducer and activator of transcription-3 at reperfusion without involving classic prosurvival kinases (Akt and extracellular signal-regulated kinase). *Circulation*. 2005;112(25):3911-8.
425. Schulz R, Heusch G. Tumor necrosis factor-alpha and its receptors 1 and 2: Yin and Yang in myocardial infarction? *Circulation*. 2009;119(10):1355-7.
426. Vilahur G, Gutierrez M, Casani L, Varela L, Capdevila A, Pons-Llado G, et al. Protective Effects of Ticagrelor on Myocardial Injury After Infarction. *Circulation*. 2016;134(22):1708-19.
427. Kanamori H, Takemura G, Goto K, Maruyama R, Tsujimoto A, Ogino A, et al. The role of autophagy emerging in postinfarction cardiac remodelling. *Cardiovasc Res*. 2011;91(2):330-9.
428. Mendieta G, Ben-Aicha S, Casani L, Badimon L, Sabate M, Vilahur G. Molecular pathways involved in the cardioprotective effects of intravenous statin administration during ischemia. *Basic Res Cardiol*. 2019;115(1):2.
429. Jong WM, Leemans JC, Weber NC, Juffermans NP, Schultz MJ, Hollmann MW, et al. Nlrp3 plays no role in acute cardiac infarction due to low cardiac expression. *Int J Cardiol*. 2014;177(1):41-3.
430. Zhang S, Morris ME. Effects of the flavonoids biochanin A, morin, phloretin, and silymarin on P-glycoprotein-mediated transport. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;304(3):1258-67.
431. Zhang S, Morris ME. Effect of the flavonoids biochanin A and silymarin on the P-glycoprotein-mediated transport of digoxin and vinblastine in human intestinal Caco-2 cells. *Pharm Res*. 2003;20(8):1184-91.
432. Han Y, Guo D, Chen Y, Tan ZR, Zhou HH. Effect of continuous silymarin administration on oral talinolol pharmacokinetics in healthy volunteers. *Xenobiotica*. 2009;39(9):694-9.

433. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(7):3473-8.
434. Vilahur G, Casani L, Juan-Babot O, Guerra JM, Badimon L. Infiltrated cardiac lipids impair myofibroblast-induced healing of the myocardial scar post-myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 2012;224(2):368-76.
435. Ferreira A, Rodrigues M, Meirinho S, Fortuna A, Falcao A, Alves G. Silymarin as a flavonoid-type P-glycoprotein inhibitor with impact on the pharmacokinetics of carbamazepine, oxcarbazepine and phenytoin in rats. *Drug Chem Toxicol*. 2021;44(5):458-69.
436. Goldfarb JW, Arnold S, Roth M, Han J. T1-weighted magnetic resonance imaging shows fatty deposition after myocardial infarction. *Magn Reson Med*. 2007;57(5):828-34.
437. Chen YH, Lin H, Wang Q, Hou JW, Mao ZJ, Li YG. Protective role of silibinin against myocardial ischemia/reperfusion injury-induced cardiac dysfunction. *Int J Biol Sci*. 2020;16(11):1972-88.
438. Kadoglou NPE, Panayiotou C, Vardas M, Balaskas N, Kostomitsopoulos NG, Tsaroucha AK, et al. A Comprehensive Review of the Cardiovascular Protective Properties of Silibinin/Silymarin: A New Kid on the Block. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022;15(5).
439. Taleb A, Ahmad KA, Ihsan AU, Qu J, Lin N, Hezam K, et al. Antioxidant effects and mechanism of silymarin in oxidative stress induced cardiovascular diseases. *Biomed Pharmacother*. 2018;102:689-98.
440. Zhang J, Shi Q, Hu Y, Li X. Silibinin augments the effect of clopidogrel on atherosclerosis in diabetic ApoE deficiency mice. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2022;80(4):353-61.
441. Stocker R, Keaney JF, Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev*. 2004;84(4):1381-478.
442. Surai PF. Silymarin as a Natural Antioxidant: An Overview of the Current Evidence and Perspectives. *Antioxidants (Basel)*. 2015;4(1):204-47.
443. Li Volti G, Salomone S, Sorrenti V, Mangiameli A, Urso V, Siarkos I, et al. Effect of silibinin on endothelial dysfunction and ADMA levels in obese diabetic mice. *Cardiovasc Diabetol*. 2011;10:62.
444. Wang YK, Hong YJ, Huang ZQ. Protective effects of silybin on human umbilical vein endothelial cell injury induced by H₂O₂ in vitro. *Vascul Pharmacol*. 2005;43(4):198-206.
445. Radjablan T. *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics*. 2010; 9(2):63-67
446. Altaei T. Protective effect of silymarin during coronary artery bypass grafting surgery. *Exp Clin Cardiol*. 2012;17(1):34-8.

447. Tacke PJ, Teusink B, Jong MC, Harats D, Havekes LM, van Dijk KW, et al. LDL receptor deficiency unmasks altered VLDL triglyceride metabolism in VLDL receptor transgenic and knockout mice. *J Lipid Res.* 2000;41(12):2055-62.
448. Cal R, Castellano J, Revuelta-Lopez E, Aledo R, Barriga M, Farre J, et al. Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates hypoxia-induced very low density lipoprotein-cholesteryl ester uptake and accumulation in cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 2012;94(3):469-79.
449. Augustus AS, Buchanan J, Park TS, Hirata K, Noh HL, Sun J, et al. Loss of lipoprotein lipase-derived fatty acids leads to increased cardiac glucose metabolism and heart dysfunction. *J Biol Chem.* 2006;281(13):8716-23.
450. Goldberg IJ, Eckel RH, Abumrad NA. Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase- and CD36-mediated pathways. *J Lipid Res.* 2009;50 Suppl:S86-90.
451. Kersten S. Peroxisome proliferator activated receptors and lipoprotein metabolism. *PPAR Res.* 2008;2008:132960.
452. Dopp JM, Moran JJ, Abel NJ, Wiegert NA, Cowgill JB, Olson EB, et al. Influence of intermittent hypoxia on myocardial and hepatic P-glycoprotein expression in a rodent model. *Pharmacotherapy.* 2009;29(4):365-72.
453. Sattler SM, Skibsbjerg L, Linz D, Lubberding AF, Tfelt-Hansen J, Jespersen T. Ventricular Arrhythmias in First Acute Myocardial Infarction: Epidemiology, Mechanisms, and Interventions in Large Animal Models. *Front Cardiovasc Med.* 2019;6:158.
454. Li T, Wei X, Watkins AC, Sanchez PG, Wu ZJ, Griffith BP. Prophylactic amiodarone and lidocaine improve survival in an ovine model of large size myocardial infarction. *J Surg Res.* 2013;185(1):152-8.
455. Chen BP, White CM, Fan C, Kluger J, Chow MS. The effect of amiodarone on the ventricular fibrillation threshold. *Pharmacotherapy.* 1999;19(7):832-7.
456. Sattler SM, Lubberding AF, Skibsbjerg L, Jabbari R, Wakili R, Jespersen T, et al. Amiodarone Treatment in the Early Phase of Acute Myocardial Infarction Protects Against Ventricular Fibrillation in a Porcine Model. *J Cardiovasc Transl Res.* 2019;12(4):321-30.
457. DeBoer LW, Nosta JJ, Kloner RA, Braunwald E. Studies of amiodarone during experimental myocardial infarction: beneficial effects on hemodynamics and infarct size. *Circulation.* 1982;65(3):508-12.
458. Kersten JR, Schmeling TJ, Pagel PS, Gross GJ, Warltier DC. Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of K(ATP) channels: reduction of myocardial infarct size with an acute memory phase. *Anesthesiology.* 1997;87(2):361-70.
459. Hearse DJ, Sutherland FJ. Experimental models for the study of cardiovascular function and disease. *Pharmacol Res.* 2000;41(6):597-603.