

Proyecto: Ablación intramiocárdica del sustrato de las TVMS en un modelo porcino de cicatriz post infarto

Angel Arenal, Javier Fernandez-Portales, Tomas Datino, Pablo Avila, Esther Pérez David, Veronica Crisostomos, Pedro Luis Sanchez, Maria Eugenia Fernandez Santos, Javier Jimenez Candil, José Luis Rubio, María Jesús Ledesma, Francisco Fernández Avilés

Centros Involucrados:

- **Centro de Cirugía de Mínima Invasión de Cáceres**
- **Hospital General Universitario Gregorio Marañón.**

Unidad de Arritmias

Laboratorio de Imagen Cardíaca

Área de Histología del Laboratorio de Órganos y Matrices Bioartificiales.

- **Escuela Técnica Superior de Ingeniería en Telecomunicaciones UPM.**

Índice:

- 1. Antecedentes y justificación del estudio.**
- 2. Hipótesis.**
- 3. Objetivo.**
- 4. Diseño.**
- 5. Población del estudio.**
- 6. Métodos.**
- 7. Estudio de Resonancia Magnética cardíaca con realce tardío.**
- 8. Análisis y postproceso de la imagen de la Resonancia Magnética.**
- 9. Análisis y postproceso de la imagen de la cartografía de voltaje**
- 10. Análisis estadístico.**
- 11. Bibliografía.**

1. ANTECEDENTES

1) La extensión de la cicatriz y concretamente del tejido heterogeneo se ha relacionado con la inducibilidad de TV y con la mortalidad post infarto. El sustrato de las Taquicardias ventriculares se asocia a zonas de tejido heterogéneo dentro de la cicatriz postinfarto que forman la zona de conducción lenta de los circuitos de las taquicardias. Este tejido heterogéneo está formado por miocitos viables, fibroblastos que evolucionan a miofibroblastos y fibras de colágenos. Los miocitos de las cicatrices y los miofibroblastos establecen conexiones tipo gap junction, estas conexiones favorecen la conducción lenta mediante 2 mecanismos: 1) creando puentes de conducción electrotónica donde previamente había bloqueo completo y 2) actuando como un sumidero de la corriente generada por los miocitos.

2) El tejido heterogeneo se pueden detectar de forma no invasiva mediante resonancia magnética. Se ha diseñado una herramienta de tratamiento de las imágenes volumétricas de la resonancia que permite la visualización de del tejido heterogéneo de forma tridimensional y que se puede proyectar sobre el endocardio o el epicardio y que se corresponde fidedignamente con la cartografía de voltaje obtenida con los sistemas de cartografía tridimensional cardiaca.

3) Ciertos datos sugieren que el tejido heterogéneo y la cicatriz avanzan con el tiempo debido a estímulos mecánicos y paracrinos. Los cambios en las cicatrices son debidos a que los cardiomiocitos se dividen después de un infarto de miocardio, los fibroblastos se diferencian en miofibroblastos y aumenta la secreción de fibras de colágeno. Estos cambios evolutivos de las cicatrices podrían en parte explicar las aparición tardía de las TV y su recurrencia post ablación.

4) El DAI no es una opción terapéutica eficaz en la prevención primaria ni secundaria de muerte súbita en pacientes con riesgo arrítmico en periodos próximos al infarto de miocardio ya que las descargas aumentan la mortalidad no arrítmica, por tanto la búsqueda de terapias alternativas es un problema clínico relevante.

5) La terapia celular regenerativa detiene y revierte la progresión de las cicatrices postinfarto. Se ha descrito que hasta un 28% de la masa de la cicatriz puede ser disuelta por la infusión intracoronaria de células derivadas de cardioesferas (Lancet 2012; 379: 895-904).

2. HIPÓTESIS

Ciertas áreas de la cicatriz con una estructura determinada del tejido heterogéneo forman el sustrato de las TVMS, además los cambios evolutivos de la cicatriz secundarios a la división de los miocitos aparición de myofibroblastos y tejido colágeno pueden generar nuevo sustrato de TV. La terapia celular localizada en la cicatriz puede reducir el tamaño de la cicatriz y del tejido heterogéneo al mismo tiempo que limitar los cambios evolutivos del tejido cicatrizal eliminando de esta forma el sustrato de las taquicardias ventriculares.

3. OBJETIVO

El objetivo general de este proyecto es la caracterización de los efecto anatómico-estructurales y electrofisiológicos de la terapia celular en las zonas de cicatriz/tejido heterogéneo relacionadas con el sustrato de las TVMS. Los efectos anatómico-estructurales se analizaran mediante procesado de imágenes de resonancia magnética y estudio inmuno-histoquímicos y los efectos electrofisiológicos mediante estudio electrofisiológico con cartografía electroanatómica

4. METODOS

4.1 MODELO EXPERIMENTAL

Se utilizará un modelo animal de TVMS post infarto de alto rendimiento en el que se ha demostrado previamente la alta inducibilidad de TV, la presencia de tejido heterogéneo y unas características electroanatomicas similares a las de los pacientes con TV post infarto

4.2. POBLACIÓN DE ESTUDIO

30 Cerdos entre 25 y 35 Kgr.

4.3 FASES DEL ESTUDIO

4.3.1. Creación de infarto

4.3.2. RM cardiaca con realce tardío a las 4 semanas.

4.3.3. Análisis y postproceso de las imágenes de RM

4.3.4. Aleatorización entre grupo control y tratamiento terapia celular. En el grupo de tratamiento activo se implantarán células derivadas de cardioesferas en las zonas de la cicatriz .

4.3.5. Repetición de las RM a las 16 semanas. Análisis y postproceso de las imágenes de RM

4.3.6. Estudio electrofisiológico a las 17 semanas con integración de imágenes de RM en sistema de cartografía tridimensional y exploración endo-epicardica con mapas electroanatómicos.

4.3.7. Análisis anatómico macro-microscópico e inmuno-histoquímico de los corazones explantados.

4.3.1 CREACIÓN DE INFARTO. CREACIÓN REPRODUCIBLE DE UN INFARTO DE MIOCARDIO POR PRIVACIÓN DE FLUJO ARTERIAL.

Protocolo de infarto: Interrupción aguda del flujo vascular en la arteria descendente anterior, mediante hinchado ocluser persistente de un balón de angioplastia con el siguiente procedimiento:

- 1) Anestesia general según procedimiento habitual del centro (anexo 1):
- 2) Acceso vascular femoral por técnica de Seldinger.
- 3) Cateterización del tronco común izquierdo mediante cateter guia Judkins Left.
- 4) Colocación de un balón de angioplastia de 2.7 fr. Este se progresará hasta la DA media inmediatamente distal a la salida de la 2ª diagonal.
- 5) Expansión del balón de angioplastia a 4 atm y mantenimiento de la interrupción del flujo vascular durante 150 minutos para crear lesiones transmurales reproducibles.
- 6) Retirada de los dispositivos de cateterización y oclusión vascular.
- 7) Manejo medico postoperatorio con narcóticos y antiinflamatorios no esteroideos como tratamiento analgésico.

4.3.2. ESTUDIOS DE RM CARDIACA CON REALCE TARDÍO A LAS 5 Y 16 SEMANAS (Anexo 2)

Se anestesiará a los animales siguiendo la siguiente pauta anexo 1.

El estudio de resonancia incluye además del estudio estándar con realce tardío, el procesamiento de imágenes para obtener mapas endocárdicos y epicárdicos de intensidad de señal. La cartografía de intensidad de señal consiste en la promediación de la intensidad de señal subendocárdica y subepicárdica y su proyección sobre conchas que reproducen la superficie del endocardio y del epicardio sobre las que se pueden hacer medidas de áreas y longitudes. El estudio de RM con realce tardío y la cartografía de intensidad de señal se realizara a la 4 semana para cuantificar la cicatriz, determinar la estructura de la cicatriz, su extensión endo/epicardica y la presencia de canales de tejido heterogéneo. Este estudio se repetirá a las 16 semanas para analizar los cambios y comparar el grupo tratado con terapia celular y el grupo control.

4.3.4. ALEATORIZACIÓN ENTRE GRUPO CONTROL Y TRATAMIENTO TERAPIA CELULAR (SEMANA 5)

Se anestesiará a los animales siguiendo la siguiente pauta anexo 1.

Aleatorización 1x1 control vs. Terapia celular

Protocolo de Terapia Celular

Se infundirán células derivadas de cardiosferas con la metodología de producción referida en Anexo 3. Con esta línea de producción celular se pueden obtener hasta 50-60 millones de células al mes (suficiente para 2 experimentos mensuales en el grupo de tratamiento activo).

Las células se infundirán mediante un catéter de angioplastia en la arteria relacionada con la cicatriz. Las células se infundirán en 15 min en 3 bolos en una solución salina que contendrá heparina (100U/ml) y nitroglicerina (50µg/ml)

4.3.5 ESTUDIO ELECTROFISIOLÓGICO Y CARTOGRAFÍA ENDO-EPICARDICA CON INTEGRACIÓN DE IMÁGENES DE RESONANCIA OBTENIDAS SEMANA 16.

Se anestesiara a los animales siguiendo la siguiente pauta anexo 1.

Al menos 2 electrocateteres cuadripolares se introducirán por punción percutánea de venas femorales y se colocarán en seno coronario y ápex del ventrículo derecho. El electrodo distal de estos cateteres se utilizará para estimulación y registro y el proximal para registro. Los registros intracardíacos se filtraron ente 30 y 500 Hz y se almacenaron junto con 4 o 6 derivaciones de ECG en polígrafos de registro digital de señales biológicas con para posterior evaluación a velocidades de 100 a 400 mm/seg. La estimulación se realizara mediante un estimulador programable preparado para liberar pulsos rectangulares de 2 ms de duración al doble del umbral de estimulación diastólico. Se utilizaran cateteres especificos para cartografía endocárdica y epicárdica del ventrículo izquierdo.

Fases de la cartografía electroanatómica

1. Reconstrucción cavidades cardiacas y Cartografía endocárdica y epicárdica del ventrículo izquierdo sistemas carto/ensite.
2. Importación de mapas tridimensionales de intensidad de señal de la RM
3. Integración de cartografía de voltaje y de intensidad de señal
4. Identificación en los mapas de voltaje de los CC y de las zonas con electrogramas múltiples y de zonas con componentes tardíos. Cuantificación de áreas de cicatriz, cicatriz densa y extensión de electrogramas con componentes tardío
5. Inducción de arritmias ventriculares con protocolo de estimulación de 4 extraestímulos con tren básico con 3 frecuencias.

5 Análisis anatómico macro-microscópico e inmuno-histoquímico de los corazones explantados. Estos procedimientos se realizarán en el Área de Histología del Laboratorio de Órganos y Matrices Bioartificiales.

Conservación de muestras: Embeber el corazón porcino completo en formaldehido tamponado al 4%.

Preparación de las muestras: Se realizarán secciones transversales y longitudinales del tejido necrótico y borde del infarto (imagen). Se utilizará como control tejido miocárdio bien perfundido. De esta manera obtendremos muestras diferentes de:

- Tejido Sano
- Cicatriz densa
- Tejido heterogéneo
- Tejido heterogéneo relacionado con sustrato de TV
- Zonas de inyección celular
- Zonas de inyección de suero

Objetivos del estudio:

1. Determinar la presencia y cuantificar el grado de proliferación/división de miocitos en zonas mencionadas
2. Determinar la presencia de myofibroblastos en las zonas marcadas
3. Cuantificar el grado de fibrosis en las zonas marcadas

4. Estudios y técnicas histológicas. Anexo 3

5. Análisis estadístico

Las variables continuas se compararán utilizando el test de student y las categóricas con el test exacto de Fisher. Se utilizara la regresión logística para la identificación de predictores de arritmias ventriculares y la creación de modelos de predicción de dichas arritmias. Todos los test serán analizados con 2 colas y un valor de $p \leq 0.05$ indicara que es estadísticamente significativo.

Capacitación para el desarrollo del Proyecto

Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

1) Unidad de Arritmias HGU Gregorio Marañón

1.a) Dotación Personal

Cuatro electrofisiólogos a tiempo completo

Cuatro enfermeras especializadas

Dos técnicos de imagen especializados en control de sistemas de Navegación

2.a) Dotación tecnológica

1) Dos laboratorios con equipos fijos de radiología.

2) Sistemas de navegación tridimensional

3) Sistemas de crioablación y ablación convencional

3.a) Actividad

1) Ablaciones: entre 350 y 400 ablaciones al año, que incluyen procedimientos complejos de fibrilación auricular (90-100 procedimientos año) y Taquicardias ventriculares (40-50 procedimientos año),

2) Implante de dispositivos : 100-120 DAI y 400 marcapasos.

2) Área de Histología del Laboratorio de Órganos y Matrices Bioartificiales.

1.a) Dotación Personal

Dos biólogos especializados a tiempo completo

Cuatro enfermeras especializadas

Técnicos especializados en técnicas de inmuno histoquímica

2.a) Dotación tecnológica

1) Laboratorios con toda dotación tecnológica para la realización de estudios y cultivos celulares

2) Microscopia confocal

Centro de cirugía de mínima invasión de Cáceres

Este centro dispone de:

1) Animalario para mantenimiento y seguimiento de los animales de experimentación

2) Unidad de resonancia magnética de animal grande

3) Laboratorio de radiodiagnóstico y eef

Anexo 1, Anestesia:

Preanestesia: (Ketamina 15 mg/kg + Atropina 0,033 mg/kg) IM. Inducción: Propofol 5 mg/kg IV Mantenimiento: (Propofol 12-20 mg/kg/h + Atracurio 0,2-0,5 mg/kg/h (3-8 µg/kg/min) + Fentanilo 0,03-0,1 mg/kg/h) IV y se les mantendrá con ventilación asistida administrándose una mezcla de gases en proporción 60/40 (60% Protóxido de Nitrógeno - 40% Oxígeno). Se monitorizará la presión arterial de forma invasiva a través de una arteria femoral. Se mantendrá estable la tensión arterial mediante perfusión de Ringer Lactato.

Anexo 2, Estudio de Resonancia magnética y procesamiento de señales.

Los estudios se realizarán con un equipo de 1.5 T (Philips Intera®, Best, The Netherlands) con sistema de gradientes Nova (33 mT/m; 160 mT/m/ms). Se utilizará una antena multicanal de 5 elementos específica para estudios cardíacos. Las imágenes se obtendrán con sincronismo cardíaco basado en vectocardiograma y en apnea.

El estudio de RM incluirá las siguientes adquisiciones:

1. Secuencias en modo cine con estado estacionario de presión libre para analizar la función ventricular (SENSE x 2, TR 2.4 ms, TE 1.2 ms, resolución espacial de 1.6 x 2 mm, 30 fases por ciclo, grosor de corte de 8 mm sin espaciado)
2. Realce tardío de la escara miocárdica (secuencia 3D de eco de gradiente potenciado en T1, inversión-recuperación; retraso del pulso optimizado para la máxima supresión de la señal miocárdica mediante secuencia looklocker; TR 3.4 ms, TE 1.3 ms, resolución espacial 1.4 x 1.7 mm, grosor de corte de 5 mm, tiempo de inversión 200-300 ms).

Tanto las imágenes en modo cine como el realce tardío se obtendrán en los mismos planos: eje corto de VI (10-14 cortes consecutivos, cubriendo ambos ventrículos desde las válvulas auriculo-ventriculares hasta el apex) 4 cámaras, 2 cámaras, 3 cámaras. Las imágenes de realce tardío se obtendrán 6-10' tras la administración de 0.2 mmol/kg de gadobutrol (Gadovist®, Bayer).

Análisis y postproceso de las imágenes de RM obtenidas las semanas 5 y 16:

1. Las imágenes de cine y realce tardío serán analizadas off-line en formato DICOM (Digital Imaging and Communications In Medicine con una aplicación comercial específica, QMass® MR 7.0, (MEDIS, the Netherlands).
2. Se calcularán los volúmenes telediastólico y telesistólico del VI mediante delineación de los bordes endocárdicos en las fases cardiacas correspondientes y se calculará la FEVI. También se calculará la masa del VI sustrayendo el volumen endocárdico del epicárdico en telediástole y multiplicando por la densidad del tejido (1.05 g/mL).
3. Se analizarán las imágenes de realce tardío para la caracterización del infarto y la identificación de canales de miocardio intraescara constituidos por tejido heterogéneo. Para ello se realizará un análisis visual asistido por ordenador. Se emplearán umbrales de intensidad de señal (SI) para delimitar dos zonas dentro del área de escara en las imágenes de eje corto: 1) zona nuclear o core, definida $SI > 3DS$ por encima del miocardio normal y 2) zona gris o heterogénea definida por una SI entre 2 y 3 DS por encima del miocardio normal (9). Mediante software propietario basado en aritmética de imágenes se obtendrá una imagen de sustracción de ambas áreas (aparecerán en un color los píxeles entre 2 y 3 DS y en otro color los píxeles por encima de 3 DS). A partir de ellas se analizarán cortes consecutivos para determinar la continuidad de los canales de tejido heterogéneo y sus conexiones al miocardio sano. Se definirá como canal un corredor de tejido heterogéneo (perteneciente a zona gris) rodeado de escara y conectado con el miocardio sano al menos por dos puntos.
4. Localización y orientación de los canales de tejido heterogéneo: Para definir la localización de los canales, el VI se dividirá en 12 segmentos, que a su vez se dividirán en 3 capas (endocardio, mesocardio y epicardio). Para definir la orientación, los canales se clasificarán como paralelos o perpendiculares al anillo mitral. Se definirán como canales submitrales a los canales rodeados por escara y por el anillo mitral. Para aceptar la presencia de un canal, dos investigadores independientes, en dos observaciones separadas, deberán de estar de acuerdo en su presencia, localización y orientación.
5. Cartografía endocárdica y epicárdica de intensidad de señal a partir de las imágenes de la RM: Se realizará una reconstrucción endocárdica/epicárdica 3D a partir de las imágenes de realce tardío mediante una aplicación informática propietaria desarrollada en el entorno MATLAB (Mathworks, Natick, Massachusetts, USA). Tras

definir manualmente los contornos endocárdicos y epicárdicos en las imágenes de realce tardío en eje corto en la aplicación QMass® MR 7.0 (MEDIS, the Netherlands), dichos contornos son importados a nuestra aplicación, dividiendo la pared miocárdica en dos partes iguales: endocardio y epicardio. La intensidad de señal promedio de la mitad endocárdica se proyectará en una reconstrucción tridimensional endocárdica, codificada en color. La intensidad de señal promedio de la mitad epicardica se proyectará en una reconstrucción tridimensional endocárdica, codificada en color. El interfaz de visualización 3D está implementado en Java (Sun Microsystems, Santa Clara, California, USA) mediante el uso de algoritmos de visualización VTK (Kitware, Clifton Park, New York, USA). En esta reconstrucción endocárdica, se define un canal como un corredor de tejido diferenciado de la escara circundante por una SI más baja, rodeada por dos áreas con SI más alta y conectada al miocardio sano por al menos dos puntos.

6. Parámetros a medir a partir de las imágenes de realce tardío:

A. Cuantificación de la heterogeneidad endocárdica:

Se determinarán las áreas de

1. Area total endocardica
2. Area 1: $SI > 3SD$
3. Area 2: $SI > 2SD$
4. Diferencia entre Area 2-Area 1 (area gris endocárdica)
5. Presencia de canales y localización.

B. Cuantificación de la heterogeneidad epicardica:

Se determinarán las áreas de

1. Area total epicardica
2. Area 1: $SI > 3SD$
3. Area 2: $SI > 2SD$
4. Diferencia entre Area 2-Area 1 (area gris epicárdica)
5. Presencia de canales y localización.

C. Cuantificación de la heterogeneidad total

Se determinarán las masas:

1. Masa total miocárdica
2. Masa 1: $SI > a 3SD$

3. Masa 2: SI> a 2SD

4. Masa 2-Masa 1 (masa de zona gris)

Posteriormente se compararan los paramentros obtenidos en las RM de las semanas 5 y 24

Anexo 3, Estudios Histológicos.

Durante la división de los miocitos se expresan una serie de proteínas relacionadas con la mitosis celular, estas proteínas se pueden identificar por técnicas inmuno-histoquímicas mediante anticuerpos específicos. Los anticuerpos empleados son : 1) anticuerpo del antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) (Invitrogen™) y 2) anticuerpo de la proteína nuclear sintetizada en la fase G1 temprana y en la fase S del ciclo celular, y de la proteína Ki67 (abcam®), asociada con células en proliferación y presente en todas las fases de mitosis celular.

Técnicas histológicas: Sobre estas muestras se realizarán las siguientes técnicas histológicas con los siguientes objetivos:

Técnica	Objetivo
Hematoxilina-eosina	Identificación núcleos y estrías musculares
Tricromo (van Gieson, Masson...)	Identificación nucleos, colágeno, citoplasma, eritrocitos, fibroblastos, fibrina
Inmunohistoquímica	Identificación celular con diferentes anticuerpos (CD 4, CD 8, CD 133, CD 34, CD 45, CD 105, CD90, C-kit ...) expresados por fibroblastos, progenitores cardíacos, progenitores extracardiacos (células hematopoyéticas, células endoteliales)
Inmunofluorescencia	Identificación CD4
Microscopía electrónica	Cambios ultraestructurales en células satélites, nucleos, miofibrillas, discos intercelulares
Microscopía confocal	Identificación y cuantificación de núcleos celulares, colágenos tipo I y IV, fibroblastos

BIBLIOGRAFÍA

1. Sasano T, McDonald AD, Kikuchi K, Donahue JK. Molecular ablation of ventricular tachycardia after myocardial infarction. *Nat. Med.* 2006 Nov;12(11):1256-1258.
2. Sasano T, Kelemen K, Greener ID, Donahue JK. Ventricular tachycardia from the healed myocardial infarction scar: validation of an animal model and utility of gene therapy. *Heart Rhythm.* 2009 Aug;6(8 Suppl):S91-97.
3. Arenal A, Glez-Torrecilla E, Ortiz M, Villacastin J, Fdez-Portales J, Sousa E, del Castillo S, Perez de Isla L, Jimenez J, Almendral J. Ablation of electrograms with an isolated, delayed component as treatment of unmappable monomorphic ventricular tachycardias in patients with structural heart disease. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41:81-92.
4. Bogun F, Good E, Reich S, Elmouchi D, Iqbal P, Lemola K, Tschopp D, Jongnarangsin K, Oral H, Chugh A, Pelosi F, Morady F. Isolated potentials during sinus rhythm and pace-mapping within scars as guides for ablation of post-infarction ventricular tachycardia. *J Am Coll Cardiol.* 2006 May 16;47(10):2013-9.
5. Nakahara S, Tung R, Ramirez RJ, Michowitz Y, MD, Vaseghi M, Buch E, MD, Gima J, Wiener I, Mahajan A, Boyle NG, Shivkumar K. Characterization of the arrhythmogenic substrate in ischemic and nonischemic cardiomyopathy implications for catheter ablation of hemodynamically unstable ventricular tachycardia. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55:2355–65.
6. Arenal A, del Castillo S, Gonzalez-Torrecilla E, Atienza F, Ortiz M, Jimenez J, Puchol A, Garcia J, Almendral J. Tachycardia-related channel in the scar tissue in patients with sustained monomorphic ventricular tachycardias: influence of the voltage scar definition. *Circulation.* 2004; 110:2568-74.
7. Hsia HH, Lin D, Sauer WH, Callans DJ, Marchlinski FE. Anatomic characterization of endocardial substrate for hemodynamically stable reentrant

ventricular tachycardia: identification of endocardial conducting channels. *Heart Rhythm*. 2006;3:503-12.

8. Haqqani HM, Kalman JM, Roberts-Thomson KC, et al. Fundamental differences in electrophysiologic and electroanatomic substrate between ischemic cardiomyopathy patients with and without clinical ventricular tachycardia. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:166 –73.

9. Crawford T; Cowger J, Desjardins B, Kim HM, , Good E, Jongnarangsin K, Oral H, Chugh A, Pelosi F, Morady F, Bogun F. Determinants of Postinfarction Ventricular Tachycardia. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2010;3:624-631.

10 Perez-David E, Arenal Á, Rubio-Guivernau JL, et al. Noninvasive identification of ventricular tachycardia-related conducting channels using contrast-enhanced magnetic resonance imaging in patients with chronic myocardial infarction: comparison of signal intensity scar mapping and endocardial voltage mapping. *J Am Coll Cardiol* 2011; 57:184 –94.

15. Codreanu A, Odille F, Aliot E, Marie PY, Magnin-Poull I, Andronache M, Mandry D, Djaballah W, Régent D, Felblinger J, de Chillou C. Electroanatomic characterization of post-infarct scars comparison with 3-dimensional myocardial scar reconstruction based on magnetic resonance imaging. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52:839-42.

16. Wilber DJ, Zareba W, Hall WJ, et al. Time dependence of mortality risk and defibrillator benefit after myocardial infarction. *Circulation* 2004;109:1082– 4.