

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL

**CONSECUENCIAS DEL DAÑO INTIMAL CORONARIO Y LA
TROMBOSIS NO OCLUSIVA SOBRE EL MIOCARDIO REPERFUNDIDO,
Y SU MODIFICACIÓN POR LA ASPIRINA**

Realizada por José Antonio Barrabés Riu para optar al grado de Doctor en Medicina.

T UAB
5340

Servicio de Cardiología

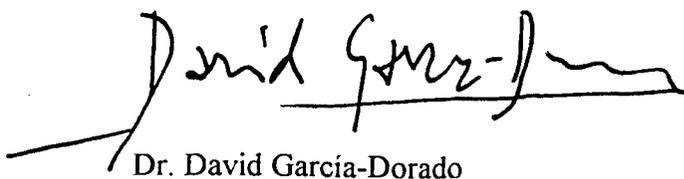
Departament de Medicina

Hospital General Universitari Vall d'Hebron

Barcelona, Junio de 2000

D. David García-Dorado García, Doctor en Medicina y Jefe de Sección del Servicio de Cardiología del Hospital General Universitari Vall d'Hebron de Barcelona, y D^a M^a Pilar Tornos i Mas, Doctora en Medicina, Jefe de Sección del Servicio de Cardiología del Hospital General Universitari Vall d'Hebron de Barcelona y Profesora Titular del Departament de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFICAN: Que la presente Tesis Doctoral “Consecuencias del daño intimal coronario y la trombosis no oclusiva sobre el miocardio reperfundido, y su modificación por la aspirina”, presentada por JOSÉ ANTONIO BARRABÉS RIU para aspirar al grado de Doctor en Medicina, ha sido realizada bajo nuestra dirección.



Dr. David García-Dorado



Dr^a M^a Pilar Tornos i Mas

Barcelona, 13 de Junio de 2000

A mis padres

A Marta

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. David García-Dorado, Jefe del Laboratorio de Cardiología Experimental del Hospital Vall d'Hebron y director de esta tesis, por haberme permitido conocer de cerca el mundo apasionante de la investigación básica, por lo mucho que he aprendido a su lado y por su generosidad, de la que tantas muestras conservo.

A la Dra. M^a Pilar Tornos, por haber aceptado ser co-directora de esta tesis y por su ejemplo de rigor y dedicación profesional.

A todos los compañeros y ex-compañeros del Laboratorio "B" de Cardiología Experimental, sin cuya colaboración este trabajo no habría sido posible. En especial, al Dr. Miguel Ángel González Martín, que puso en marcha la técnica de las microesferas coloreadas, a la Dra. Marisol Ruiz-Meana y Juan Oliveras, que me ayudaron en la realización de los experimentos y en el análisis de los datos, y a Yolanda Puigfel y Lourdes Trobo, por su paciencia y por su eficiente colaboración en el laboratorio y en el procesamiento de las muestras.

A Bernat Soriano, radiofarmacéutico del Servicio de Medicina Nuclear del Hospital Vall d'Hebron, que realizó el marcaje de las plaquetas en los experimentos con plaquetas radioactivas.

A la Dra. Julia Solares, del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital San Pedro de Alcántara de Cáceres, por su minucioso trabajo en los aspectos histológicos de esta tesis doctoral.

A Ana García-Lafuente, de la Unidad de Investigación de Digestivo del Hospital Vall d'Hebron, que diseñó y supervisó los estudios de determinación de mieloperoxidasa.

A Bernardo Poyo, Xavier Gomis y Daniel Chillida, celadores del Área de

Investigación “B” del Hospital Vall d’Hebron a lo largo del periodo de realización de este estudio, por su profesionalidad y por el cuidado dispensado a los animales.

A todos los miembros del Servicio de Cardiología del Hospital Vall d’Hebron, en el que he tenido el honor de formarme como cardiólogo, por todo lo que me han enseñado y, en especial, al Dr. Jordi Soler-Soler, Jefe del Servicio, por su confianza y apoyo a lo largo de estos años.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. CONSECUENCIAS DEL DAÑO INTIMAL CORONARIO	3
1.1. Activación de plaquetas y trombosis.....	3
1.2. Activación y depósito local de leucocitos polimorfonucleares.....	4
1.3. Vasoconstricción	5
1.3.1. Liberación aumentada de sustancias vasoconstrictoras.....	5
1.3.2. Disminución de la producción de sustancias vasodilatadoras.....	6
2. TROMBOSIS CORONARIA EXPERIMENTAL <i>IN SITU</i>: EL MODELO DE FOLTS	6
3. REPERCUSIONES DEL DAÑO INTIMAL Y LA TROMBOSIS CORONARIA NO OCLUSIVA SOBRE EL MIOCARDIO SUBYACENTE	8
3.1. Reducción de la luz arterial.....	8
3.2. Obstrucción microvascular por embolismos de plaquetas.....	8
3.2.1. Embolización en la trombosis coronaria experimental.....	9
3.2.2. Embolización en pacientes con síndrome coronario agudo.....	10
3.3. Efectos de las plaquetas sobre el miocardio	11
3.3.1. Arritmias ventriculares	11
3.3.2. Función miocárdica.....	12
3.3.3. Flujo sanguíneo regional y necrosis miocárdica.....	12
3.4. Efecto tóxico de mediadores químicos y déficit de sustancias protectoras	13
3.5. Daño mediado por leucocitos polimorfonucleares.....	14
4. EFECTO DE LA ASPIRINA SOBRE LA TROMBOSIS CORONARIA NO OCLUSIVA Y SUS REPERCUSIONES SOBRE EL MIOCARDIO	14
4.1. Efecto antiagregante plaquetario de la aspirina	14
4.2. Efectos de la aspirina sobre la trombosis coronaria	15
4.3. Otras acciones de la aspirina	16
4.4. Efectos de la aspirina en el infarto: discrepancias entre los resultados clínicos y experimentales.....	17
HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	19

MATERIAL Y MÉTODOS	22
1. ANIMALES	23
2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL	23
2.1. Procedimiento quirúrgico	23
2.1.1. Anestesia y ventilación	23
2.1.2. Esternotomía y disección de la descendente anterior	24
2.1.3. Cateterismo de la arteria femoral	24
2.1.4. Disección de la carótida	26
2.1.5. Colocación de los cristales piezoeléctricos	26
2.2. Diseño del experimento	26
2.2.1. Grupos y protocolo de estudio	26
2.2.2. Provocación del daño intimal coronario	28
2.2.3. Oclusión coronaria y reperfusión	30
2.3. Monitorización	30
2.3.1. Determinaciones analíticas	30
2.3.2. Electrocardiograma y hemodinámica	30
2.3.3. Contractilidad segmentaria	31
2.3.4. Detección de las reoclusiones	33
3. PARÁMETROS ANALIZADOS EN LA SERIE A	33
3.1. Flujo coronario	33
3.2. Contenido de plaquetas en la descendente anterior y en el miocardio	34
3.2.1. Aislamiento y marcaje de las plaquetas	34
3.2.2. Cuantificación de la actividad	35
3.3. Acumulación miocárdica de leucocitos polimorfonucleares	36
4. PARÁMETROS ANALIZADOS EN LA SERIE B	36
4.1. Tiempo de sangría	36
4.2. Contractilidad segmentaria	37
4.3. Flujo sanguíneo miocárdico regional	38
4.3.1. Técnica de las microesferas coloreadas	38
4.3.2. Inyección de las microesferas	38

4.3.3. <i>Obtención de las muestras de sangre y miocardio</i>	39
4.3.4. <i>Procesado de las muestras</i>	39
4.3.5. <i>Cuantificación del color y cálculo del flujo miocárdico regional</i>	40
4.4. <i>Área en riesgo y tamaño del infarto</i>	40
4.4.1. <i>Extracción del corazón</i>	40
4.4.2. <i>Análisis histoquímico</i>	41
4.4.3. <i>Cálculo del área en riesgo y del tamaño del infarto</i>	43
4.5. <i>Análisis histológico</i>	44
5. EXPERIMENTOS ADICIONALES: MAGNITUD DE LA EMBOLIZACIÓN DE PLAQUETAS AL MIOCARDIO DESDE UN TROMBO MURAL INTRACORONARIO	46
5.1. <i>Instrumentación y monitorización</i>	46
5.2. <i>Grupos y protocolo de estudio</i>	48
5.3. <i>Parámetros analizados</i>	48
5.3.1. <i>Depósito de plaquetas en la descendente anterior y acumulación en el miocardio</i>	48
5.3.2. <i>Cuantificación del contenido de neutrófilos y del tamaño del infarto</i>	50
5.3.3. <i>Análisis histológico</i>	50
6. ESTUDIOS ANGIOGRÁFICOS	51
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	51
RESULTADOS	53
1. EXCLUSIONES	54
2. DETERMINACIONES ANALÍTICAS	55
3. PARÁMETROS HEMODINÁMICOS	57
4. ARRITMIAS VENTRICULARES	57
5. PARÁMETROS ANALIZADOS EN LA SERIE A (30 MINUTOS DE OCLUSIÓN)	59
5.1. <i>Flujo coronario</i>	59
5.2. <i>Depósito de plaquetas en la descendente anterior y acumulación en el miocardio</i>	61
5.3. <i>Acumulación miocárdica de leucocitos polimorfonucleares</i>	61
6. PARÁMETROS ANALIZADOS EN LA SERIE B (48 MINUTOS DE OCLUSIÓN)	62
6.1. <i>Tiempo de sangría</i>	62

6.2. Contractilidad segmentaria.....	62
6.3. Flujo sanguíneo miocárdico regional.....	64
6.4. Área en riesgo y tamaño del infarto.....	66
6.5. Análisis histológico.....	69
7. EXPERIMENTOS ADICIONALES: MAGNITUD DE LA EMBOLIZACIÓN DE PLAQUETAS AL MIOCARDIO DESDE UN TROMBO MURAL INTRACORONARIO.....	76
7.1. Datos hemodinámicos y arritmias ventriculares.....	76
7.2. Depósito de plaquetas en la descendente anterior y acumulación en el miocardio.....	76
7.3. Acumulación miocárdica de leucocitos polimorfonucleares.....	78
7.4. Análisis histoquímico.....	82
7.5. Análisis histológico.....	82
7.6. Estudios angiográficos.....	82
DISCUSIÓN.....	86
1. HALLAZGOS FUNDAMENTALES.....	87
2. EFECTO DEL DAÑO INTIMAL CORONARIO SOBRE LA RESPUESTA HIPERÉMICA TRAS UNA OCLUSIÓN CORONARIA TRANSITORIA.....	88
3. EFECTO DEL DAÑO INTIMAL CORONARIO SOBRE EL FLUJO SANGUÍNEO REGIONAL Y SOBRE EL TAMAÑO DEL INFARTO TRAS UNA OCLUSIÓN CORONARIA PROLONGADA, Y SU MODIFICACIÓN POR LA ASPIRINA.....	89
3.1. Efectos del daño intimal coronario.....	89
3.2. Efectos de la aspirina.....	90
4. MAGNITUD DE LA EMBOLIZACIÓN PLAQUETARIA AL MIOCARDIO SUBSIDIARIO DE UNA ARTERIA CON TROMBOSIS DINÁMICA, Y SU MODIFICACIÓN POR LA ASPIRINA.....	92
5. CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA DEL MODELO.....	94
6. EFECTO DEL DAÑO INTIMAL Y DE LA ASPIRINA SOBRE LA RECLUSIÓN CORONARIA.....	95
7. EFECTO DEL DAÑO INTIMAL Y DE LA ASPIRINA SOBRE LA CONTRACTILIDAD SEGMENTARIA Y LAS ARRITMIAS VENTRICULARES DURANTE LA ISQUEMIA Y LA REPERFUSIÓN.....	96

8. EFECTO DEL DAÑO INTIMAL CORONARIO Y DE LA ASPIRINA SOBRE LA ACUMULACIÓN DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES EN EL MIOCARDIO DESPUÉS DE UNA OCLUSIÓN CORONARIA TRANSITORIA	97
9. MECANISMOS DE LA ACUMULACIÓN DE PLAQUETAS EN EL MIOCARDIO REPERFUNDIDO	98
10. CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS.....	100
CONCLUSIONES	104
BIBLIOGRAFÍA	109

INTRODUCCIÓN

La integridad del endotelio vascular es esencial para mantener el tono vascular y evitar la trombosis¹⁻³. Las consecuencias del daño de la íntima arterial han sido ampliamente investigadas en diferentes modelos experimentales, e incluyen la adhesión, agregación y activación de plaquetas y de leucocitos y la liberación de potentes mediadores químicos, con efectos sobre el tono vascular local y a distancia. La mayoría de los síndromes coronarios agudos en humanos se caracterizan por la formación de un trombo, constituido fundamentalmente por plaquetas y fibrina, sobre una erosión o fractura de la íntima coronaria⁴⁻⁸.

En contraste con la abundante información existente acerca de los mecanismos de producción y el tratamiento de la trombosis mural intracoronaria, sus posibles repercusiones sobre el miocardio subyacente han sido poco investigadas y continúan siendo en gran parte desconocidas, al igual que la posibilidad de modificarlas mediante fármacos. El ácido acetilsalicílico, o aspirina, es un fármaco antiagregante plaquetario efectivo contra la trombosis coronaria cuya administración ha demostrado ser beneficiosa en las diferentes formas de presentación clínica de la cardiopatía isquémica⁹⁻¹⁰. El impacto del tratamiento con aspirina sobre el pronóstico de los pacientes ha sido muy importante en algunas de estas situaciones, como el infarto agudo de miocardio¹¹. Sin embargo, se desconoce si este efecto beneficioso se debe exclusivamente a una disminución del riesgo de reoclusión coronaria o si, por el contrario, otros mecanismos están también implicados.

A continuación, se resume el estado actual de los conocimientos acerca de las principales consecuencias del daño intimal coronario sobre la activación de las plaquetas y los leucocitos y sobre el tono vascular, se describe el modelo de trombosis coronaria *in*

situ más ampliamente utilizado en investigación experimental, y se discuten las posibles repercusiones del daño intimal y la trombosis coronaria no oclusiva sobre el miocardio subyacente, así como la posible influencia de la aspirina sobre estas repercusiones.

1. CONSECUENCIAS DEL DAÑO INTIMAL CORONARIO

1.1. Activación de plaquetas y trombosis

La pérdida de la integridad del endotelio arterial permite el contacto entre las plaquetas y algunos componentes de la íntima, como el colágeno, el factor von Willebrand o la fibronectina, que son poderosos inductores de la adhesión y agregación de las plaquetas, un proceso en el que intervienen diferentes glicoproteínas de la membrana¹²⁻¹³. Una erosión intimal superficial favorece la adhesión de una delgada capa de plaquetas, mientras que una lesión profunda determina habitualmente la formación de un trombo de mayor tamaño¹⁴⁻¹⁷. Sin embargo, como ilustra la frecuencia no despreciable de trombosis coronaria oclusiva sobre una erosión endotelial^{7,18}, otros factores, además de la profundidad de la lesión, modulan la magnitud de la respuesta trombótica a la agresión intimal^{4-6,8}. Entre ellos, destacan las condiciones hemodinámicas locales¹⁹⁻²², la composición del material que se pone en contacto con la sangre circulante²³⁻²⁵, y factores sistémicos^{6,26}. Además, las plaquetas activadas depositadas sobre la pared vascular dañada liberan potentes mediadores químicos²⁷⁻²⁹ que potencian el reclutamiento y la agregación de nuevas plaquetas, un fenómeno en el que participan también activamente los leucocitos polimorfonucleares³⁰.

El daño de la íntima arterial, además de estimular la activación local de las plaquetas sobre la pared del vaso lesionado, también puede inducir su activación

sistémica. En situaciones clínicas caracterizadas por la existencia de daño intimal o trombosis coronaria, se ha descrito una producción aumentada de tromboxano A_2^{31} y una mayor capacidad de agregación de las plaquetas circulantes³²⁻³⁴, y se han identificado agregados de plaquetas³⁵ o de plaquetas y leucocitos^{36,37} en el torrente sanguíneo. Algunos hallazgos descritos en pacientes con síndrome coronario agudo podrían haber contribuido a esta hiperagregabilidad de las plaquetas. En primer lugar, la expresión de receptores de superficie por las plaquetas está aumentada en estos pacientes^{38,39}. En segundo lugar, las plaquetas de los pacientes con síndrome coronario agudo producen menores cantidades de óxido nítrico⁴⁰. Finalmente, en el plasma de estos pacientes se han descrito concentraciones elevadas de sustancias que favorecen la agregación de las plaquetas o su interacción con los leucocitos, como el factor von Willebrand⁴¹ o la P-selectina soluble⁴².

1.2. Activación y depósito local de leucocitos polimorfonucleares

En diversas situaciones caracterizadas por un daño intimal arterial extenso, como la angioplastia, tanto en pacientes como en animales de experimentación⁴³⁻⁴⁷, o la angina inestable⁴⁸, se ha demostrado la existencia de una activación sistémica de los leucocitos polimorfonucleares. Además, el daño de la íntima arterial favorece el depósito de los leucocitos polimorfonucleares sobre la pared lesionada⁴⁹⁻⁵¹ y, al igual que ocurre con las plaquetas, la magnitud de este depósito es proporcional a la severidad de la lesión intimal⁵¹ y está modulada por factores hemodinámicos locales⁴⁹. Se ha comprobado la existencia de una interacción entre los leucocitos polimorfonucleares y las plaquetas en la trombosis arterial aguda, ya que para que se produzca la adhesión de los primeros a la superficie intimal dañada es necesaria la presencia de plaquetas⁴⁹. Por otro lado, en la trombosis experimental se ha demostrado que los leucocitos polimorfonucleares también

se acumulan en el interior del trombo³⁰, y esta acumulación depende de un proceso activo que puede interferirse mediante el bloqueo de la P-selectina³⁰, una proteína que se expresa en la superficie de las plaquetas y que interacciona con una glicoproteína de la pared de los leucocitos⁵². Aunque las relaciones entre las plaquetas y los leucocitos polimorfonucleares dependen de muchos factores⁵³, la presencia de los últimos en el trombo podría contribuir a la activación de las plaquetas⁵⁴ y a la organización del trombo³⁰.

1.3. Vasoconstricción

Está ampliamente demostrado que el daño de la íntima arterial y la trombosis consiguiente se acompañan de vasoconstricción local y a distancia⁵⁵⁻⁵⁹. Este aumento del tono vascular se debe tanto a la liberación, fundamentalmente por las plaquetas activadas, de sustancias vasoconstrictoras como a una producción disminuida de sustancias con efecto vasodilatador. La vasoconstricción es directamente proporcional a la severidad del daño intimal⁵¹, y también está modulada por los leucocitos polimorfonucleares depositados sobre la pared vascular dañada^{60,61}.

1.3.1. Liberación aumentada de sustancias vasoconstrictoras

En la trombosis experimental *in situ* inducida por el daño de la íntima arterial, las plaquetas activadas liberan grandes cantidades de tromboxano A₂ y serotonina, que contribuyen al crecimiento del trombo²⁷⁻²⁹ y a la vasoconstricción⁵⁶. El antagonismo de dichas moléculas ha sido eficaz para disminuir tanto la trombosis como la vasoconstricción en estos modelos experimentales⁵⁷. Estos hallazgos han tenido una confirmación clínica, ya que en pacientes sometidos a angioplastia coronaria se ha descrito una producción aumentada de tromboxano A₂⁶² y serotonina⁶³, y se ha

comprobado el potente efecto vasoconstrictor de estas sustancias sobre el lecho arterial distal^{58,63-66}.

Por otra parte, tanto en animales de experimentación como en pacientes sometidos a angioplastia, se ha comprobado que el daño de la íntima arterial se acompaña de una producción aumentada por diferentes estirpes celulares de endotelina-1^{17,67-69}. Además de su potente acción vasoconstrictora, la endotelina-1 favorece la perpetuación de la trombosis⁶⁸, estando estos efectos mediados en parte por la liberación de tromboxano A₂⁷⁰.

1.3.2. Disminución de la producción de sustancias vasodilatadoras

El daño de la íntima arterial se acompaña de una producción disminuida de óxido nítrico y de prostaciclina^{71,72}. Estas sustancias, además de tener un efecto antitrombótico^{53,73-75} y de disminuir la adhesión de los leucocitos al endotelio vascular, especialmente después de la isquemia^{60,76-80}, producen vasodilatación y aumento del flujo arterial, mientras que su antagonismo tiene un efecto vasoconstrictor^{60,73,81,82}.

2. TROMBOSIS CORONARIA EXPERIMENTAL *IN SITU*: EL MODELO DE FOLTS

El desarrollo de un trombo plaquetario como consecuencia del daño de la íntima arterial fue descrito hace más de un siglo, y desde entonces se han desarrollado diferentes técnicas para producir experimentalmente la trombosis arterial⁸³. En la década de los 70, Folts *et al.*¹⁹ describieron, en perros anestesiados, un modelo de trombosis coronaria *in situ* que ha sido extensamente utilizado desde entonces en investigaciones acerca de la fisiopatología o el tratamiento de esta entidad. Este modelo consiste en la realización de

daño intimal coronario asociado a la provocación de una estenosis fija de la arteria mediante un constrictor externo, lo que desencadena la aparición de unos cambios característicos en el flujo sanguíneo coronario, consistentes en reducciones progresivas, con frecuencia hasta valores próximos a 0, seguidas de abruptas recuperaciones del flujo¹⁹.

Estas reducciones cíclicas del flujo se han atribuido al crecimiento progresivo de un trombo plaquetario, seguido de su fragmentación o desprendimiento periódico, con embolización de los fragmentos. En estudios posteriores se ha demostrado la reproducibilidad del modelo, lo que lo hace muy útil en investigaciones terapéuticas^{4,21}. Además, se ha confirmado que el substrato de estos cambios del flujo consiste en la estimulación de la agregación plaquetaria y el desarrollo de una trombosis dinámica, cuya existencia se ha comprobado mediante estudios histológicos^{4,19} y angiográficos⁸⁴. Diferentes fármacos antitrombóticos son capaces de disminuir el número de reducciones cíclicas del flujo o de abolirlas por completo^{19,21}. Por contraste, las intervenciones que estimulan la activación plaquetaria y la trombosis, como el aumento de los niveles de catecolaminas, de la severidad del daño intimal o del grado de estenosis, pueden hacerlas reaparecer²¹. Además de los fármacos antitrombóticos, la infusión de nitroglicerina también es capaz de disminuir las reducciones cíclicas del flujo, pero este efecto ha sido atribuido a sus propiedades antiagregantes plaquetarias⁸⁵.

A pesar de que no tiene en cuenta el substrato ateromatoso presente en la mayoría de los pacientes con trombosis coronaria^{86,87}, el modelo de Folts reproduce los elementos fundamentales de la fisiopatología del síndrome coronario agudo⁸⁸. Así, se ha comprobado que las reducciones cíclicas del flujo se acompañan de desviaciones transitorias del segmento ST en el electrocardiograma y de un riesgo de arritmias o de infarto similar al de los pacientes con enfermedad coronaria inestable⁸⁹, y se ha descrito la

existencia de variaciones clínicas del flujo en pacientes antes y después de la angioplastia coronaria^{90,91}.

3. REPERCUSIONES DEL DAÑO INTIMAL Y LA TROMBOSIS CORONARIA NO OCLUSIVA SOBRE EL MIOCARDIO SUBYACENTE

3.1. Reducción de la luz arterial

Una de las consecuencias más evidentes de la trombosis coronaria es la reducción del calibre de la luz arterial^{21,84} que, si llega a la oclusión completa, acarrea la necrosis del miocardio subyacente a no ser que se realice una reperfusión precoz o exista una circulación colateral suficiente. Hay indicios de que una reducción crítica de la luz arterial podría ser también perjudicial para el miocardio aun sin progresar hasta la oclusión del vaso. En primer lugar, la existencia de una estenosis coronaria significativa impide que el flujo aumente de forma adecuada en respuesta a un incremento de las necesidades metabólicas del miocardio^{19,21}. En segundo lugar, en estudios realizados en perros sometidos a una oclusión coronaria transitoria, la reperfusión a través de una arteria con una estenosis residual se ha acompañado de un menor flujo sanguíneo miocárdico regional^{92,93} o de un mayor tamaño del infarto^{93,94}. Además, en uno de estos estudios⁹⁴ se observó que la influencia deletérea de la estenosis coronaria sobre la necrosis miocárdica no existía en animales en los que se había inducido previamente trombocitopenia, lo que sugiere que las plaquetas están implicadas en este efecto.

3.2. Obstrucción microvascular por embolismos de plaquetas

La embolización miocárdica por pequeños agregados de material trombótico

desprendidos de una lesión coronaria inestable podría ser un mecanismo relevante de daño del miocardio en pacientes con cardiopatía isquémica^{95,96}. De hecho, el desarrollo de una trombosis dinámica con embolismos repetidos al miocardio podría haber contribuido al efecto deletéreo de la estenosis coronaria crítica sobre el miocardio descrito en el apartado anterior, aunque en esos estudios no se analizó la existencia o la magnitud de la microembolización coronaria⁹²⁻⁹⁴. Tanto en modelos de trombosis coronaria experimental como en pacientes con síndrome coronario agudo, se han realizado observaciones que apoyan la existencia de microembolismos al miocardio.

3.2.1. Embolización en la trombosis coronaria experimental

Se ha observado que la trombosis coronaria experimental se acompaña de un empeoramiento del flujo sanguíneo endocárdico en el territorio subyacente⁹⁷. Recientemente, se ha demostrado en el modelo canino, mediante el control de la presión intracoronaria por debajo de un segmento arterial con daño intimal y constreñido por una estenosis fija, que la trombosis coronaria mural con reducciones cíclicas del flujo causa un incremento en la resistencia vascular distal^{98,99}. Estos hallazgos son compatibles con la existencia de una obstrucción significativa del lecho vascular distal debida a un fenómeno repetido de embolización desde el trombo en la arteria epicárdica.

No hay duda de que los abruptos incrementos del flujo que ocurren durante la trombosis experimental con reducciones cíclicas del flujo son debidos a un brusco aumento de la luz del vaso causado por la migración o fragmentación del trombo⁸⁴. Sin embargo, no se ha demostrado si el destino del material trombótico desprendido es su impacto en los pequeños vasos miocárdicos o se produce, por el contrario, una rápida desagregación de las plaquetas que les permite atravesar el lecho capilar⁸³. Existen algunas evidencias indirectas en contra de una embolización masiva y sostenida de

material trombótico al miocardio en este modelo. Por ejemplo, en un estudio en el que se indujeron reducciones cíclicas del flujo coronario mediante la constricción externa de la arteria antes de una oclusión prolongada, con liberación de la estenosis tras la reperfusión, esta intervención no fue perjudicial para el miocardio, e incluso remedó el efecto protector del preconditionamiento isquémico sobre la necrosis¹⁰⁰.

3.2.2. Embolización en pacientes con síndrome coronario agudo

En estudios necrópsicos de pacientes fallecidos poco tiempo después de haber sido sometidos a una angioplastia coronaria, la presencia en los pequeños vasos miocárdicos de microtrombos con cristales de colesterol en su interior constituye una prueba inequívoca de embolización⁹⁵. Sin embargo, no está claramente establecido si la microembolización miocárdica es un fenómeno relevante en los pacientes con síndromes coronarios agudos no sometidos a manipulaciones de las arterias coronarias.

Varios estudios han demostrado la presencia de agregados de plaquetas en los pequeños vasos miocárdicos, frecuentemente en relación con microinfartos, en pacientes con cardiopatía isquémica fallecidos súbitamente¹⁰¹⁻¹⁰⁴. Es difícil discriminar si estos agregados son microémbolos desprendidos de un trombo coronario, como se ha sugerido en algunos de estos estudios^{101,103,104}, o si, por el contrario, son el resultado de una agregación local de las plaquetas en la microvasculatura, como se ha interpretado en otros¹⁰². Su hallazgo con frecuencia similar en diferentes cardiopatías, algunas de ellas sin trombosis coronaria, y en pacientes con distintos tiempos de evolución de los síntomas, sugiere esta última posibilidad¹⁰². Por el contrario, en los pacientes con cardiopatía isquémica, su distribución predominante en zonas de miocardio dependientes de una arteria con trombosis activa^{103,104}, y su asociación con la angina reciente¹⁰⁴ sugieren un origen embólico. Sin embargo, teniendo en cuenta que la isquemia transitoria determina

la acumulación de plaquetas en el miocardio¹⁰⁵⁻¹¹², estos últimos hallazgos son también compatibles con un depósito local de las plaquetas estimulado por los episodios transitorios de isquemia propios de la trombosis coronaria dinámica.

Sea cual sea el origen de estos agregados, la trascendencia clínica de la embolización coronaria en los síndromes coronarios agudos no está claramente establecida. El hallazgo de que la angina previa reciente, una situación clínica muy sugestiva de la presencia de un trombo mural coronario, podría conferir un mejor pronóstico a los pacientes con infarto agudo de miocardio por un fenómeno de preconditionamiento¹¹³, también sugiere indirectamente que la trombosis mural no ocasiona una obstrucción microvascular extensa por émbolos plaquetarios.

3.3. Efectos de las plaquetas sobre el miocardio

La activación de las plaquetas, en especial después de la isquemia, puede tener consecuencias deletéreas para el miocardio, que en parte pueden ser debidas a la obstrucción de pequeños vasos miocárdicos y en parte ser consecuencia de un efecto tóxico directo¹¹⁴.

3.3.1. Arritmias ventriculares

En algunos de los estudios reseñados en el epígrafe anterior^{101,104}, se ha sugerido que la oclusión de pequeños vasos miocárdicos por microémbolos de plaquetas podría haber desencadenado la aparición de arritmias ventriculares malignas y la muerte de los pacientes. El potencial arritmogénico de las plaquetas ha sido demostrado en diferentes estudios. En corazones aislados, la infusión de plaquetas después de la isquemia provoca alteraciones en las propiedades eléctricas del miocardio y favorece la aparición de arritmias ventriculares^{115,116}. En el corazón *in situ*, se ha descrito que la trombosis

coronaria con variaciones cíclicas del flujo disminuye el umbral de la fibrilación ventricular¹¹⁷, y en algunos estudios¹¹⁸⁻¹²⁰, aunque no en otros¹²¹, el antagonismo de la función plaquetaria ha reducido la frecuencia de arritmias ventriculares.

3.3.2. *Función miocárdica*

Los efectos de las plaquetas sobre la función ventricular después de la isquemia son controvertidos. En algunos estudios, la infusión de plaquetas en corazones aislados sometidos a isquemia transitoria se ha acompañado de una peor recuperación funcional^{122,123}, mientras que en otros ha tenido el efecto opuesto¹²⁴. Es posible que estas discrepancias dependan del momento de la infusión o de la activación de las plaquetas al ser manipuladas, aunque también podrían deberse a una disparidad de los efectos de estas células sobre el miocardio. En este sentido, se ha descrito que la adhesión de las plaquetas al endotelio microvascular durante la isquemia empeora la recuperación funcional, mientras que las sustancias que producen podrían ser beneficiosas¹²⁵. Finalmente, el efecto de las plaquetas sobre la función miocárdica también puede depender de la presencia de leucocitos polimorfonucleares en el medio¹²³.

3.3.3. *Flujo sanguíneo regional y necrosis miocárdica*

Aparte de la posibilidad de que los embolismos plaquetarios produzcan microinfartos^{103,104}, los efectos de las plaquetas sobre el flujo sanguíneo miocárdico regional y sobre la viabilidad del miocardio después de la isquemia son poco conocidos. Múltiples estudios han comprobado que durante la reperfusión se produce una acumulación de plaquetas en el miocardio, tanto después de la isquemia regional debida a una oclusión coronaria^{94,105,107,109,112} como después de la isquemia global^{106,108,110,111}. Esta acumulación se produce preferentemente en las zonas en que el flujo sanguíneo

miocárdico regional es menor¹⁰⁷ y en las zonas de necrosis miocárdica^{105,107,112}. La asociación entre la acumulación de plaquetas y la severidad del daño miocárdico isquémico no implica necesariamente una relación causa-efecto, ya que los intentos de reducir el tamaño del infarto mediante la depleción de plaquetas han obtenido resultados negativos^{126,127}.

3.4. Efecto tóxico de mediadores químicos y déficit de sustancias protectoras

La producción aumentada de sustancias vasoconstrictoras y la disminución en la producción de sustancias protectoras como consecuencia del daño intimal y la trombosis coronaria también podrían tener ser efectos nocivos para el miocardio subyacente.

En este sentido, en varios estudios, la inhibición de la producción de tromboxano A₂ por las plaquetas¹²⁸⁻¹³⁰ o el antagonismo de los receptores del tromboxano A₂^{130,131-133} han sido capaces de disminuir la infiltración por leucocitos y el tamaño del infarto después de la isquemia transitoria, aunque este beneficio no ha sido observado en otros estudios^{120,134}. La vasoconstricción secundaria a la liberación de serotonina, más acentuada en los segmentos distales del árbol arterial coronario⁶⁶, también podría contribuir a la isquemia miocárdica. Finalmente, la liberación de endotelina-1 a la circulación coronaria es otra fuente potencial de toxicidad para el miocardio, ya que, además de su efecto vasoconstrictor y proagregante, promueve la adhesión de los leucocitos polimorfonucleares al endotelio^{135,136} y la infiltración inflamatoria del miocardio¹³⁵. En un estudio, el antagonismo del receptor de la endotelina-1 redujo el tamaño del infarto después de una oclusión coronaria transitoria en perros¹³⁷.

Por otra parte, múltiples estudios han demostrado efectos beneficiosos del óxido nítrico o de sus precursores sobre la recuperación funcional, la infiltración miocárdica por leucocitos polimorfonucleares o el tamaño de la necrosis después de la anoxia o isquemia

transitorias^{60,77,138-141}. Una menor producción de óxido nítrico y de otras sustancias vasodilatadoras inducida por un daño intimal extenso podría, por tanto, tener también repercusiones sobre el miocardio.

3.5. Daño mediado por leucocitos polimorfonucleares

Los leucocitos polimorfonucleares poseen una gran capacidad de destrucción tisular, y la infiltración miocárdica por dichas células se asocia con una deficiente perfusión microvascular y con un daño severo después de la isquemia¹⁴²⁻¹⁴⁴. Dado que la lesión intimal y la trombosis coronaria determinan la activación sistémica de los leucocitos polimorfonucleares⁴³⁻⁴⁸, éste podría ser un mecanismo adicional de daño miocárdico. Sin embargo, no se ha demostrado que la activación de los leucocitos por la trombosis coronaria favorezca su acumulación en el miocardio, y existen algunos argumentos en contra de esta hipótesis. Por un lado, no se ha confirmado que esta activación se origine por contacto con la pared arterial lesionada o en el trombo coronario, sino que probablemente tiene lugar en la microcirculación, como resultado de los episodios de isquemia miocárdica¹⁴⁵. Por otro lado, los leucocitos polimorfonucleares liberan al activarse algunas de sus proteínas de adhesión³⁶, lo que disminuye considerablemente su capacidad para adherirse al endotelio microvascular^{52,146,147}.

4. EFECTO DE LA ASPIRINA SOBRE LA TROMBOSIS CORONARIA NO OCLUSIVA Y SUS REPERCUSIONES SOBRE EL MIOCARDIO

4.1. Efecto antiagregante plaquetario de la aspirina

La aspirina produce la acetilación irreversible de la ciclooxigenasa, una enzima

presente en muchas estirpes celulares que cataliza la síntesis de prostaglandina H_2 a partir del ácido araquidónico. Como resultado de esta acción, en las plaquetas se bloquea la síntesis de tromboxano A_2 , y en otras células la síntesis de prostaciclina y otros prostanoides cíclicos. Aunque el tromboxano A_2 y la prostaciclina tienen acciones antagónicas, el efecto neto de la aspirina es claramente antiagregante, ya que la inhibición de la síntesis de tromboxano A_2 por las plaquetas es irreversible, mientras que las células endoteliales son capaces de sintetizar nueva ciclooxigenasa y seguir produciendo prostaciclina¹⁰. Además de la inhibición de la síntesis de tromboxano A_2 , otros mecanismos, como la estimulación de la síntesis de óxido nítrico por los neutrófilos⁵³ y por las células endoteliales¹⁴⁸, pueden estar involucrados en el efecto antiagregante plaquetario de la aspirina.

4.2. Efectos de la aspirina sobre la trombosis coronaria

Existen múltiples evidencias, obtenidas tanto en modelos experimentales como en la clínica, del beneficio de la aspirina en la trombosis coronaria. Folts *et al.*, en la descripción inicial de su modelo, comunicaron que la administración endovenosa de 35 mg/kg de aspirina era capaz de suprimir las reducciones cíclicas y normalizar el flujo coronario¹⁹. Con posterioridad, estos mismos y otros investigadores han confirmado la capacidad de dicho fármaco para reducir la magnitud del depósito de plaquetas inducido por el daño de la íntima arterial^{55,61,62,149-151}, la vasoconstricción derivada de dicho depósito^{55,58,61,152,153} y la formación y crecimiento del trombo^{22,84,150,151}. Aunque dosis de aspirina tan bajas como 1 mg/kg son capaces de disminuir el depósito de plaquetas tras la lesión intimal⁵⁵, los resultados de algunos de estos estudios sugieren que son necesarias dosis mayores para evitar la trombosis experimental^{150,154}.

A pesar de las limitaciones que tiene la aspirina como antiagregante plaquetario, al

no interferir varias de las vías de activación de las plaquetas⁸⁸, su efectividad a diferentes dosis en el tratamiento y en la profilaxis de la trombosis coronaria en humanos ha sido ampliamente demostrada^{9,10}. El beneficio de la aspirina ha sido manifiesto tanto en la angina inestable¹⁵⁵⁻¹⁵⁸ como en el infarto agudo de miocardio^{11,159,160}. Además, la aspirina reduce la incidencia de nuevos infartos después de un síndrome coronario agudo o de la revascularización miocárdica^{9,10,161,162}, y también es efectiva en la prevención primaria^{163,164}.

4.3. Otras acciones de la aspirina

Aparte de su acción antitrombótica debida a la inhibición de la ciclooxigenasa plaquetaria, la aspirina tiene otros efectos que igualmente podrían ser beneficiosos. Así, se ha descrito que mejora la disfunción endotelial en pacientes con aterosclerosis¹⁶⁵, y que reduce la producción de citokinas proinflamatorias en los pacientes con cardiopatía isquémica crónica¹⁶⁶ y la disfunción endotelial inducida por citokinas¹⁶⁷. Además, la aspirina y su metabolito, el ácido salicílico, inhiben la activación del factor nuclear κ B, un importante modulador de la función de las células endoteliales y de la expresión de mediadores inflamatorios¹⁶⁸. Estos efectos podrían ayudar a explicar el hallazgo de un beneficio de la aspirina en prevención primaria especialmente acusado en sujetos con marcadores de actividad inflamatoria alterados¹⁶⁹.

En situaciones agudas, se ha demostrado que la aspirina, además del depósito de plaquetas y la liberación de sustancias vasoactivas, reduce el depósito de leucocitos polimorfonucleares sobre la pared arterial después del daño intimal, así como la vasoconstricción dependiente de dicho depósito¹⁷⁰. También se ha sugerido que podría disminuir la producción de radicales libres del oxígeno¹⁷¹ y proteger contra el daño oxidativo¹⁷². Finalmente, la aspirina podría tener efectos beneficiosos sobre la perfusión

microvascular en las zonas de necrosis miocárdica y limitar la expansión del infarto¹⁷³.

4.4. Efectos de la aspirina en el infarto: discrepancias entre los resultados clínicos y experimentales

En el estudio ISIS-2, la administración diaria de 160 mg de aspirina por vía oral, comenzando en las primeras horas de evolución de un infarto agudo de miocardio, se acompañó de una reducción muy significativa del 23% en la mortalidad cardiovascular, un beneficio de similar magnitud que el obtenido por el tratamiento trombolítico con estreptokinasa¹¹. Además, en este estudio, los efectos de la aspirina y del tratamiento trombolítico sobre la mortalidad fueron aditivos. Este beneficio puede explicarse en parte por el efecto antitrombótico de la aspirina sobre la lesión culpable del infarto, demostrado por una reducción significativa en la incidencia de reinfartos¹¹. Sin embargo, la magnitud del beneficio y la baja incidencia absoluta de reinfartos en este estudio sugieren que este mecanismo no explica por sí solo la disminución de la mortalidad a corto plazo obtenida en los pacientes tratados con aspirina.

Este acusado efecto beneficioso de la aspirina en pacientes con infarto agudo de miocardio, tratados o no con terapia de reperfusión, contrasta con su ausencia de efecto en modelos experimentales de isquemia permanente^{174,175} o de isquemia y reperfusión, en los que la aspirina, o bien no ha sido beneficiosa^{131,134,176}, o bien ha impedido el efecto favorable de otras intervenciones terapéuticas sobre el tamaño del infarto^{128,129,177}.

Esta discrepancia entre el efecto de la aspirina sobre las consecuencias de la oclusión coronaria aguda en pacientes y en animales de experimentación podría ser debida a que los modelos experimentales que se han utilizado en estos estudios no reflejaran fielmente lo que sucede en los pacientes con infarto agudo de miocardio. Los animales de experimentación tienen habitualmente arterias coronarias normales, mientras

que en los pacientes la reperfusión tiene lugar con frecuencia a través de arterias extensamente enfermas, con áreas de daño intimal, trombosis residual y estenosis⁸⁶. Sin embargo, la posible influencia del daño intimal coronario sobre la magnitud del daño miocárdico después de la reperfusión no se ha investigado. Del mismo modo, el efecto de la aspirina sobre la necrosis miocárdica secundaria a una oclusión coronaria transitoria en presencia de daño intimal extenso tampoco ha sido estudiada en animales.

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

La hipótesis de trabajo del presente estudio es que la existencia de una trombosis coronaria no oclusiva, bien sea mediante la embolización de material trombótico o mediante la producción de sustancias tóxicas, tiene efectos deletéreos sobre el miocardio subyacente, que pueden determinar un aumento de la necrosis tras una oclusión coronaria transitoria y que podrían ser contrarrestados por la aspirina.

Para someter a prueba esta hipótesis se realizó una lesión intimal en una arteria coronaria epicárdica mediante un catéter intracoronario, con el fin de favorecer la formación de un trombo plaquetario, y se definieron los siguientes objetivos:

- Determinar el efecto del daño intimal sobre la hiperemia reactiva tras una oclusión coronaria transitoria.
- Establecer el efecto del daño intimal sobre el flujo sanguíneo regional y sobre el tamaño de la necrosis miocárdica tras una oclusión coronaria prolongada, así como su modificación por el tratamiento con aspirina.
- Determinar la magnitud de la embolización de plaquetas al miocardio subsidiario de una arteria con trombosis dinámica, y su modificación por la aspirina.

Como objetivos secundarios, se establecieron los siguientes:

- Caracterizar mediante estudios histológicos la severidad del daño intimal coronario que se produce en este modelo.
- Determinar el efecto del daño intimal coronario y del tratamiento con aspirina sobre la incidencia de reclusión tras una ligadura coronaria transitoria.
- Averiguar el efecto del daño intimal coronario y de la aspirina sobre la contractilidad segmentaria y las arritmias ventriculares durante la isquemia y

la reperfusión.

- Determinar el efecto del daño intimal coronario sobre la acumulación miocárdica de leucocitos polimorfonucleares tras una oclusión coronaria transitoria.
- Explorar algunos de los posibles mecanismos de la acumulación de plaquetas en el miocardio reperfundido.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. ANIMALES

Se incluyeron en el estudio 69 cerdos de raza "Large White" (44 machos y 25 hembras) de 28.5 ± 5.2 kg de peso.

2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

2.1. Procedimiento quirúrgico

2.1.1. Anestesia y ventilación

Los animales permanecieron en ayunas durante las 12 horas previas a la cirugía. Fueron sedados con 10 mg/kg de azaperona (Stresnil, Janssen Pharmaceutica) por vía intramuscular, y 30 minutos después fueron transportados al quirófano. Se canalizó una vena de la oreja con una cánula 21G (Abbott, Sligo, Irlanda), por la que se administraron 10 mg/kg de tiopental sódico (Tiobarbital, Laboratorios Pálex). Dicha vía se mantuvo posteriormente perfundida con suero Ringer lactato.

Se realizó intubación orotraqueal con un laringoscopio de pala recta y un tubo de 7 mm de diámetro (Portex, Hythe, Gran Bretaña), que se conectó a un respirador volumétrico (Monaghan 228, Littleton, Colorado) ajustado para proporcionar 6 litros de aire ambiente por minuto. El flujo se modificó en los casos necesarios, según los resultados de gasometrías arteriales seriadas, para mantener valores de pH entre 7.37 y 7.44 y de pCO₂ entre 37 y 44 mmHg.

Con un catéter Abbocath 20G (Abbott) se canalizó una vena mamaria, por la que se administró una infusión de tiopental a una velocidad inicial de 2 mg/min, que se ajustó

para mantener una anestesia adecuada a lo largo del experimento. Se administraron dosis adicionales de 100 - 200 mg de tiopental lentamente por vía endovenosa si el animal realizaba algún movimiento o respiración espontánea.

2.1.2. Esternotomía y disección de la descendente anterior

Se practicó una incisión cutánea desde la horquilla esternal al apéndice xifoides con la ayuda de un bisturí eléctrico (BCE-90, ST Electromedicina, Barcelona). Se realizó una esternotomía media con un cincel de Lebsche, y se colocó un separador tras proteger los bordes óseos con cera y gasas estériles. Se seccionó el pericardio, quedando ampliamente expuesta la superficie anterior del corazón.

Se disecó un segmento de unos 5 mm de longitud de la arteria coronaria descendente anterior en su punto medio. Dicho segmento fue rodeado con un hilo de seda de 2/0 (B Braun-Dexon, Barcelona), cuyos extremos se hicieron pasar por el interior de un fragmento de tubo de Kehr de 25 mm de longitud, con bordes romos, para formar un lazo con el que ocluir la arteria (Figura 1).

2.1.3. Cateterismo de la arteria femoral

Se realizó una incisión longitudinal en la región inguinal derecha, se separaron los planos musculares y se disecó un segmento de la arteria femoral, cuyo extremo distal se ligó con seda de 3/0. Se canalizó la arteria con un Abbocath 20G, por el que se introdujo una guía que permitió su sustitución por un introductor valvulado 5F (Cordis, Roden, Holanda), el cual se fijó a la arteria con seda de 3/0. La vía arterial se conectó con un sistema de monitorización de presión y sirvió para las extracciones de gasometrías y otras determinaciones analíticas.

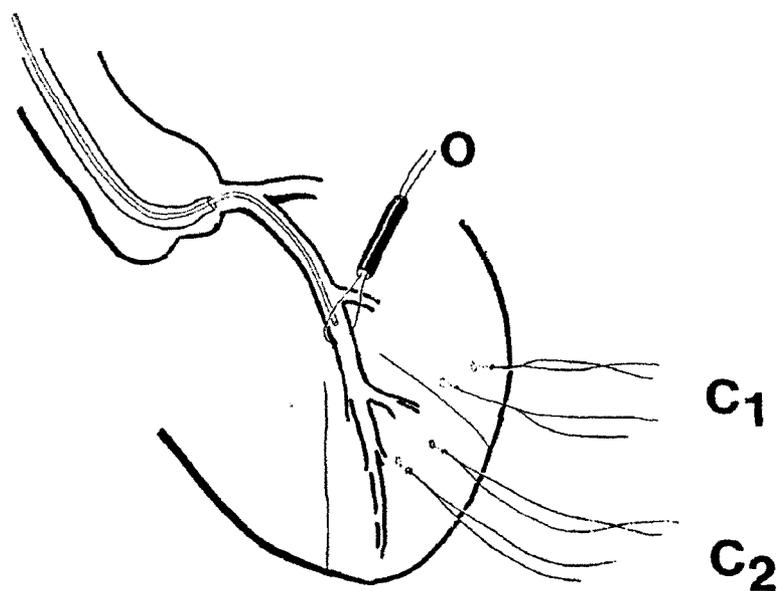


Figura 1. Representación esquemática de la preparación experimental. Se muestran los catéteres guía e intracoronario, el lazo ocluidor (O) y las dos parejas de cristales piezoeléctricos implantados en el territorio control (C1) y en el territorio dependiente de la arteria descendente anterior (C2).

2.1.4. Disección de la carótida

Se realizó una incisión cutánea paralela a la tráquea unos 5 cm a la derecha de la línea media, se separaron los planos musculares y se disecó un segmento de unos 4 cm de la arteria carótida común, tras lo que se cubrió el campo con gasas estériles humedecidas.

2.1.5. Colocación de los cristales piezoeléctricos

A través de pequeñas incisiones epicárdicas se introdujeron en el miocardio dos parejas de cristales piezoeléctricos (Triton Technology, San Diego, California) de 1 mm de diámetro (6 MHz), separados 1 - 2 cm, enfrentados entre sí y orientados perpendicularmente al eje largo del ventrículo izquierdo. Una pareja se implantó en el territorio dependiente de la descendente anterior y la otra en la pared lateral del ventrículo izquierdo.

2.2. Diseño del experimento

2.2.1. Grupos y protocolo de estudio

Se realizaron dos series de experimentos (Figura 2). La serie A estaba formada por 17 animales, que fueron asignados a la provocación de daño intimal de la descendente anterior o a no intervención, e inmediatamente después fueron sometidos a una oclusión coronaria durante 30 minutos, un periodo de isquemia que en este modelo no provoca una necrosis miocárdica detectable macroscópicamente¹⁷⁸, seguida de cinco horas de perfusión. En esta serie se analizó el efecto del daño intimal sobre el flujo coronario después de una isquemia transitoria, así como la acumulación de plaquetas y de leucocitos polimorfonucleares en el miocardio reperfundido en ausencia de infarto.

En la serie B, formada por 52 animales, se utilizó un diseño factorial 2 x 2. Estos animales fueron aleatorizados a recibir por vía endovenosa una solución preparada en el Departamento de Farmacia cuyo contenido, desconocido por los investigadores, consistía en

Serie A

Serie B

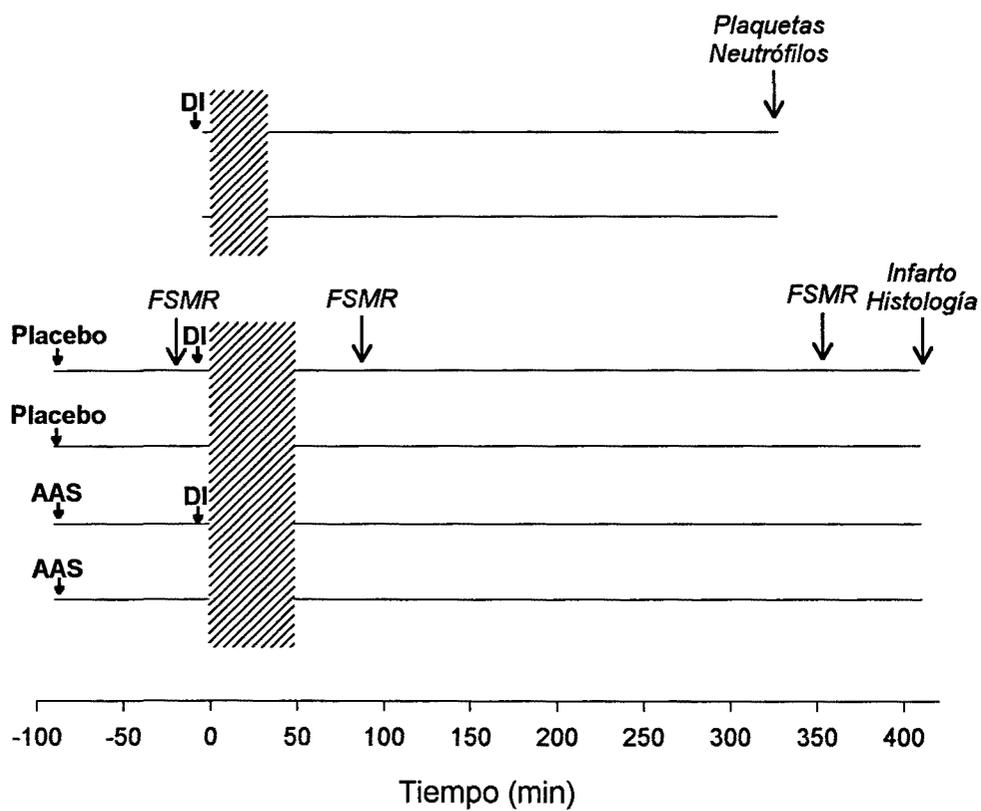


Figura 2. Diseño de los experimentos en las series A y B. DI, daño intimal coronario; AAS, aspirina; FSMR, flujo sanguíneo miocárdico regional. El periodo de isquemia se muestra sombreado.

450 mg de acetilsalicilato de lisina (Inyesprin, Andrómaco), equivalentes a 250 mg (10.0 ± 0.4 mg/kg) de aspirina, o bien 5 ml de suero salino, y 90 minutos después fueron aleatorizados de nuevo a la provocación de daño intimal coronario o a no intervención. Esta dosis de aspirina había mostrado previamente ser capaz de inhibir la agregación plaquetaria *ex vivo* inducida por colágeno en el mismo modelo¹⁷⁹. Inmediatamente después, los animales de esta serie fueron sometidos a 48 minutos de oclusión coronaria, un periodo de isquemia que suele producir en este modelo una necrosis miocárdica incompleta, que no abarca toda el área en riesgo¹⁷⁸, seguida de seis horas de reperfusión. En esta serie se analizó la influencia del daño intimal sobre el flujo sanguíneo regional y sobre el tamaño de la necrosis miocárdica tras la reperfusión, y la modificación de esta influencia por la aspirina.

2.2.2. Provocación del daño intimal coronario

En los animales asignados a daño intimal coronario se introdujo en la carótida, con la ayuda de un introductor vascular (Becton Dickinson, Rutherford, New Jersey), un catéter guía Judkins 8F de coronaria derecha (Cordis, Miami). Dicho catéter estaba purgado con heparina al 0.01% y estaba conectado a una llave hemostática, a través de la cual se había introducido un catéter de infusión Cordis 2.5F purgado con heparina al 1%. Se introdujo el catéter guía hasta la raíz aórtica y se cateterizó el ostium coronario izquierdo según una técnica descrita previamente¹⁸⁰. Entonces se avanzó el catéter intracoronario hasta que su extremo alcanzó el segmento distal de la descendente anterior, y se realizaron varios movimientos de avance y retroceso mientras se tiraba suavemente del lazo oclisor para producir el daño intimal (Figura 3).

Durante las maniobras de cateterización coronaria se vigiló estrechamente la aparición de isquemia miocárdica, cuya expresión más precoz era la alteración de la *contracción segmentaria*^{180,181}, en cuyo caso se retiraba rápidamente el catéter del ostium

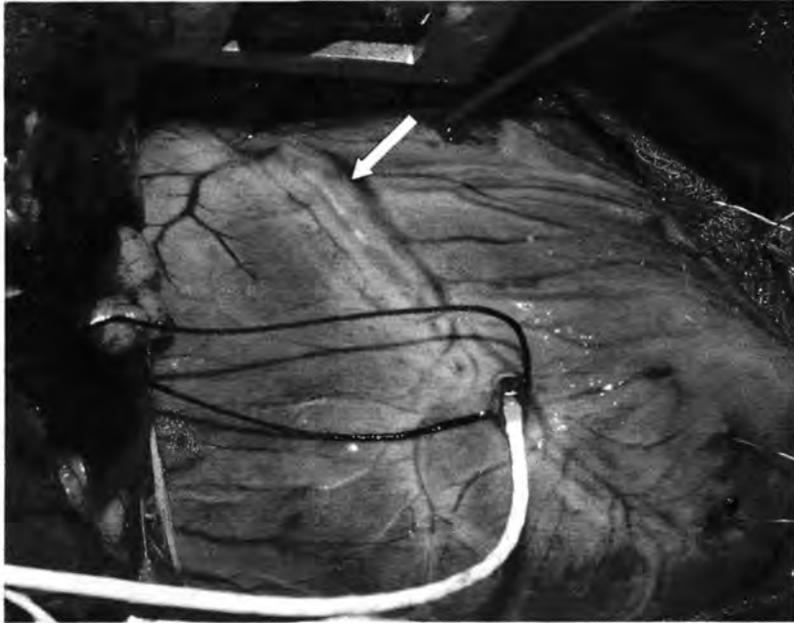


Figura 3. Aspecto real de la preparación experimental. Puede verse el lazo oclusor y el medidor de flujo alrededor del segmento medio de la descendente anterior, así como las dos parejas de cristales piezoeléctricos intramiocárdicos en el apex y en la pared lateral del ventrículo izquierdo. Por el interior de la arteria se aprecia el avance del catéter (flecha) que provocará el daño intimal.

coronario izquierdo. Ningún animal recibió heparina ni otros fármacos antitrombóticos, con excepción de la aspirina en los casos en que correspondió por aleatorización.

2.2.3. Oclusión coronaria y reperfusión

Se administró 1.5 mg/kg de lidocaína (Lincaina, Laboratorios Palex) por vía endovenosa y se ocluyó la descendente anterior al tensar el lazo que la rodeaba mediante la presión con una pinza sobre el tubo de goma. Se comprobó que el segmento de la arteria distal a la oclusión quedaba inmediatamente exangüe y que el miocardio subyacente adquiría una tonalidad violácea. En los animales asignados a daño intimal se extrajo inmediatamente el catéter guía, con el catéter intracoronario en su interior, cuidando de que la arteria permaneciera ocluida, y se realizó una ligadura de la carótida proximal al punto de introducción.

Al final del periodo de oclusión, la apertura de la pinza y la retirada del ocluidor permitieron la reperfusión miocárdica. Se comprobó que el segmento distal de la arteria se llenaba de sangre y que el miocardio recuperaba rápidamente una coloración sonrosada.

2.3. Monitorización

2.3.1. Determinaciones analíticas

Además de las gasometrías arteriales, se realizaron determinaciones de hemograma, bioquímica y pruebas de coagulación tras canalizar la arteria femoral y al final del experimento.

2.3.2. Electrocardiograma y hemodinámica

Se monitorizó continuamente la derivación II del electrocardiograma de superficie. Cuando se produjo fibrilación ventricular, ésta se revirtió eléctricamente mediante descargas

internas de 10 ó 20 J. No se administraron dosis adicionales de lidocaína ni otros antiarrítmicos.

Se conectó la línea femoral a un transductor de cuarzo (Micron Instruments, Simi Valley, California), con el que se monitorizó continuamente la presión arterial, tras calibración de 0 y 100 mmHg.

2.3.3. Contractilidad segmentaria

Las dos señales de longitud segmentaria fueron analizadas en un sistema de dimensión ultrasónica (System 6/200, Triton Technology) y monitorizadas en un osciloscopio (HM 205.3, Hameg Instruments, Frankfurt am Main, Alemania). Se obtuvieron también las señales del electrograma bipolar local proporcionadas por cada pareja de cristales.

Estas señales, junto con las del electrocardiograma y la presión arterial, fueron amplificadas en un sistema de instrumentación modular (Coulbourn Instruments, Lehigh Valley, Pennsylvania), digitalizadas (tarjeta Tecfen ISC-16E/CR, RC Electronics, Goleta, California) con una frecuencia de muestreo de 100 Hz por canal, y visualizadas continuamente en una pantalla. Además, se realizaron grabaciones, siempre en ritmo sinusal, en situación basal, a los 5, 15, 30 y, en la serie B, 48 minutos de oclusión, en el momento de recuperación del ritmo sinusal tras la reperfusión, y a los 15, 30 minutos y cada hora después de la reperfusión. Estas grabaciones se almacenaron en el disco duro. Las señales también se registraron continuamente en un polígrafo de impresión térmica MT-9500 (Astro-Med, West Warwick, Rhode Island), a una velocidad de 25 mm/min hasta el minuto 30 de reperfusión y de 3 mm/min en adelante. Además, se hicieron registros a 25 mm/s en los mismos momentos que las grabaciones (Figura 4).

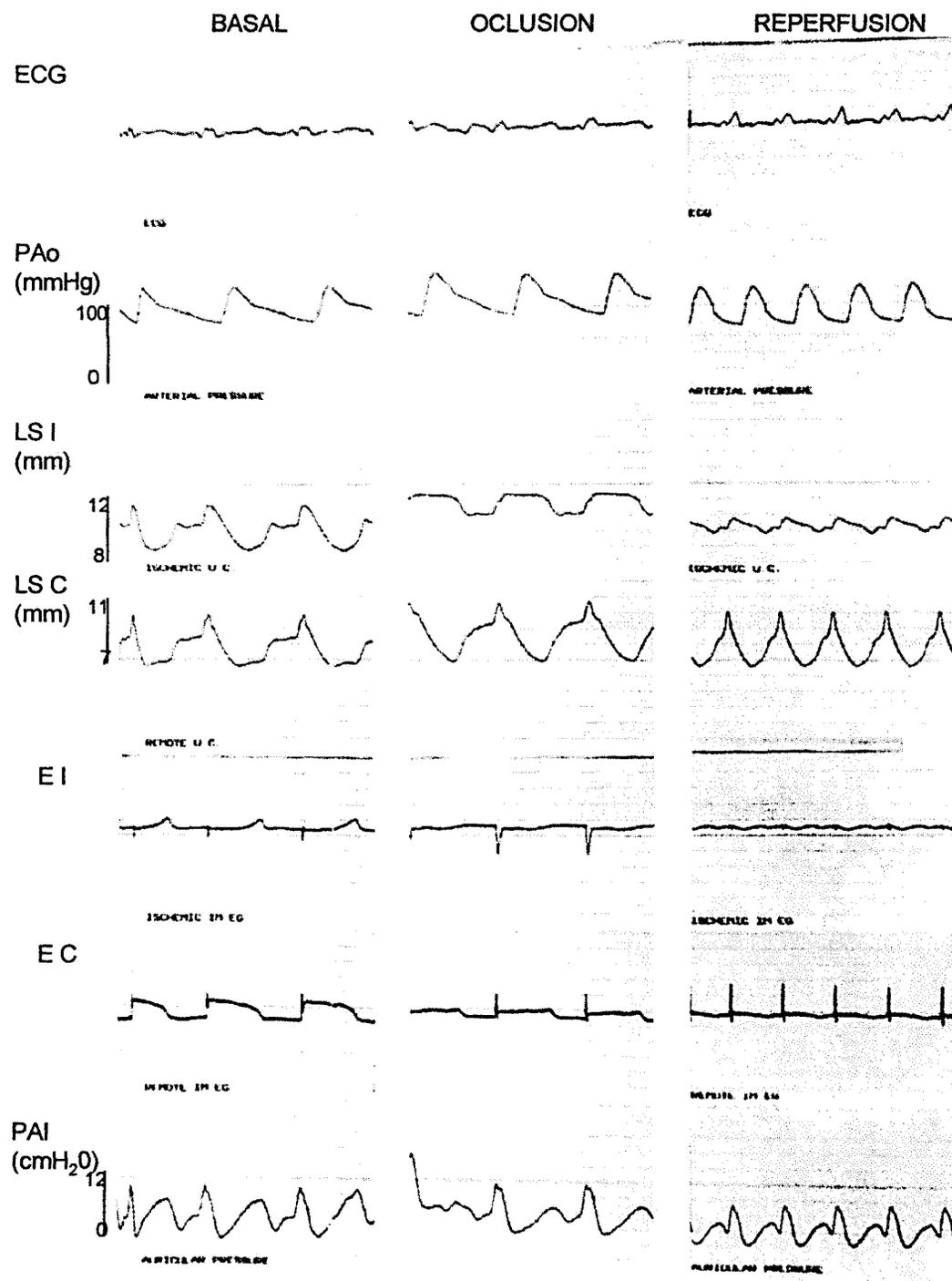


Figura 4. Ejemplo de los parámetros monitorizados en un animal de la serie B. ECG, electrocardiograma; PAo, presión aórtica; LS I, longitud segmento isquémico; LS C, longitud segmento control; EI, electrograma local segmento isquémico, EC, electrograma local segmento control; PAI, presión en la aurícula izquierda.

2.3.4. Detección de las reoclusiones

Durante la reperfusión se vigiló estrechamente la aparición de reoclusión coronaria. La reoclusión se identificó por el colapso de la arteria distal al punto de oclusión, acompañado de la adopción de una coloración violácea por el miocardio subyacente, del ensanchamiento del electrograma local y, en algunos casos, de un deterioro del acortamiento sistólico en el territorio reperfundido. Además, en todos los casos se comprobó al final del experimento la permeabilidad de la arteria mediante análisis histológico.

Los animales que presentaron reoclusión coronaria no sufrieron manipulaciones de la arteria para intentar restablecer su permeabilidad y fueron excluidos del análisis. En la serie B, los tratamientos asignados a los animales con reoclusión se reintrodujeron en la matriz de aleatorización, para que al final del estudio los cuatro grupos de tratamiento estuvieran equilibrados, cada uno con nueve animales sin reoclusión.

3. PARAMETROS ANALIZADOS EN LA SERIE A

3.1. Flujo coronario

En los animales de la serie A se colocó un sensor de flujo electromagnético de 2.5 mm de diámetro (MDL 1401, Skalar, Holanda) alrededor del segmento medio de la descendente anterior y se realizaron mediciones, siempre en ritmo sinusal, en situación basal y en varios momentos del periodo de reperfusión: al recuperar el ritmo sinusal y a los 15, 30 minutos y cada hora tras la liberación de la oclusión coronaria. Las señales obtenidas por el medidor de flujo se amplificaron, registraron y grabaron del mismo modo que las del electrocardiograma, presión arterial y contractilidad segmentaria.

3.2. Contenido de plaquetas en la descendente anterior y en el miocardio

En esta serie se cuantificó el depósito de plaquetas en el lugar de la oclusión coronaria y su acumulación en el miocardio reperfundido mediante el uso de plaquetas autólogas marcadas con Tc^{99m} -HMPAO¹⁸².

3.2.1. Aislamiento y marcaje de las plaquetas

El día previo, los animales fueron anestesiados, intubados y ventilados tal y como se ha descrito. Se cateterizó percutáneamente la vena femoral derecha con un introductor valvulado 5F, a través del que se extrajeron lentamente 51 ml de sangre con una jeringa que contenía 9 ml de dextrosa ácida citratada (Sigma). Se centrifugó la sangre a 150 g durante 10 minutos y el sobrenadante durante otros cinco minutos para separar los hematíes y leucocitos. El plasma rico en plaquetas fue acidificado con dextrosa ácida citratada hasta obtener un pH 6.5, y centrifugado a 650 g durante 10 minutos para separar las plaquetas. Se resuspendió el botón plaquetario en 1 ml de plasma pobre en plaquetas, se incubó con la actividad requerida de Tc^{99m} -HMPAO durante 30 minutos a 37°C, y se volvió a centrifugar a 650 g durante 10 minutos para separar el Tc^{99m} -HMPAO no ligado a las plaquetas¹⁸². Se resuspendió el botón de plaquetas marcadas en 6 ml de plasma pobre en plaquetas, y esta suspensión fue reinyectada lentamente al animal por la vena femoral. La eficiencia del marcaje de plaquetas con Tc^{99m} -HMPAO ([actividad del botón plaquetario / actividad utilizada en la incubación] x 100) fue del 55 ± 3 %. A cada animal se le inyectaron en promedio 12.8 ± 1.5 mCi de Tc^{99m} -HMPAO, sin diferencias entre los grupos (12.2 ± 2.2 y 13.4 ± 2.2 mCi en los animales que serían sometidos o no a daño intimal, respectivamente).

Tras la inyección de las plaquetas marcadas se interrumpió la anestesia, se retiró el introductor femoral y se realizó una compresión manual sobre el punto de punción hasta

obtener hemostasia. Cuando el animal despertó y recuperó una respiración espontánea sostenida se extrajo el tubo orotraqueal y fue devuelto al establo hasta el día siguiente.

3.2.2. Cuantificación de la actividad

Al final del periodo de reperfusión se seccionaron los grandes vasos y se extrajo el corazón, que se sumergió en suero salino a 4°C. Se seccionó un segmento de 1 cm de longitud de la descendente anterior que incluía el punto de oclusión. Dicho segmento fue abierto longitudinalmente, lavado por su superficie intimal con suero salino, pesado en una balanza de precisión AJ50 (Metler Instruments, Greifensee, Suiza) y almacenado en un tubo con formol al 10%.

Se cortó el corazón en rodajas de 5 - 7 mm de grosor, que se incubaron, excepto la cuarta contando desde el apex, con clorhidrato de trifeniltetrazolio al 1% tamponado a pH 7.4 durante 5 - 10 minutos a 37°C, para comprobar la ausencia de necrosis miocárdica¹⁸³. De la cuarta loncha se obtuvieron dos fragmentos transmurales de 1.3 ± 0.1 g, uno del área en riesgo y otro del miocardio control. Estos fragmentos fueron pesados, introducidos en tubos de vidrio y congelados inmediatamente por inmersión en nitrógeno líquido, para evitar la activación post-mortem de la enzima mieloperoxidasa.

Inmediatamente, se transportaron los tubos en un recipiente con hielo picado hasta un contador gamma (1282 Compugamma, Wallac Oy, Turku, Finlandia), en el que se cuantificó la radioactividad de los fragmentos de la arteria y de miocardio durante 20 segundos. Se calculó en cada animal el cociente entre la radioactividad específica ([actividad de la muestra - actividad de fondo] / g de tejido) en la descendente anterior o en el miocardio del área en riesgo y la radioactividad específica en el miocardio control.

3.3. Acumulación miocárdica de leucocitos polimorfonucleares

Se cuantificó el contenido de neutrófilos en el miocardio mediante el análisis de la actividad de la enzima mieloperoxidasa¹⁸⁴ en las mismas muestras en las que se midió el contenido de plaquetas. Inmediatamente tras el contaje, los tubos con las muestras fueron almacenados en un ultracongelador (Forma Scientific, Marietta, Ohio) a -80°C hasta su análisis. En un recipiente rodeado de hielo picado, las muestras fueron trituradas en tres ciclos de 15 segundos cada uno con una trituradora TM 985-370 (Biospec Products, Dremel, Wisconsin). Se centrifugó el homogeneizado durante 20 minutos a 1900 g y 4°C. El botón tisular fue disuelto en 50 mmol/l de tampón fosfato potásico a pH 6.0 con 0.5% de bromuro de hexadeciltrimetil amonio (HTAB, Sigma), triturado de nuevo tres veces durante 15 segundos cada una, e introducido durante 1 - 2 minutos en un baño de ultrasonidos (Labsonic 2000, B Braun-Biotech, Melsulgen AG, Alemania). El homogeneizado fue centrifugado de nuevo y se determinó la actividad de la mieloperoxidasa en el sobrenadante mediante una modificación de un método descrito previamente¹⁸⁵. El sobrenadante fue añadido a una mezcla de dihidrocloruro de *O*-dianisidina y peróxido de hidrógeno en 50 mmol/l de tampón fosfato a pH 6.0, y se midió por espectrofotometría (Shimadzu UV 160A, Kyoto, Japón) la variación en la absorbancia de la mezcla a 460 nm de longitud de onda. La actividad de la mieloperoxidasa se expresó en unidades definidas como la cantidad de enzima capaz de degradar 1 μ mol de peróxido/l/min a 25°C.

4. PARAMETROS ANALIZADOS EN LA SERIE B

4.1. Tiempo de sangría

El efecto antiagregante plaquetario de la dosis de aspirina utilizada en los animales

de la serie B se estimó indirectamente mediante la medición del tiempo de sangría antes y 90 minutos después de la administración de la aspirina o el placebo, según una modificación de una técnica descrita previamente¹⁸⁶. Se humedeció una oreja del animal con gasas empapadas en suero salino a 37°C y se presionó su superficie dorsal con la punta de un bisturí del número 11 hasta producir una incisión de 4 mm de profundidad. Se eliminó el exceso de sangre con papel absorbente sin tocar la incisión y se anotó el tiempo hasta que cesó el sangrado. Se realizaron dos determinaciones consecutivas en cada ocasión y se calculó su media aritmética.

4.2. Contractilidad segmentaria

Las señales digitales de las curvas de longitud segmentaria y presión arterial almacenadas en el disco duro fueron analizadas de forma semiautomática con la ayuda de un programa informático (Enhanced Graphics Acquisition and Analysis, RC Electronics). Todas las mediciones se realizaron en registros a 25 mm/s y en ritmo sinusal, a partir de una escala de referencia. Siguiendo un método utilizado previamente^{180,181}, en el trazado del segmento control se identificó la telediástole como el punto de inicio del acortamiento durante la contracción isovolumétrica inmediatamente después del final de la onda A, y la telesístole como una ruptura en la curva de acortamiento sistólico, que se corresponde con el inicio de la relajación isovolumétrica. Los valores de la longitud telediastólica a lo largo del experimento se expresaron como porcentaje de los valores basales. La fracción de acortamiento sistólico se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula: Fracción de acortamiento (%) = (longitud telediastólica - longitud telesistólica) x 100 / longitud telediastólica. El abombamiento sistólico durante la oclusión coronaria se definió de acuerdo con la siguiente fórmula: Abombamiento sistólico (%) = (máxima separación sistólica - longitud telediastólica) x 100 / longitud telediastólica.

4.3. Flujo sanguíneo miocárdico regional

4.3.1. Técnica de las microesferas coloreadas

En 25 animales se analizó el flujo sanguíneo miocárdico regional con microesferas coloreadas^{187,188}. Este método se basa en la inyección en la circulación sistémica de microesferas de poliestireno, que se distribuyen por todo el organismo e impactan en los capilares. Después se cuantifica la concentración de microesferas en el miocardio y se relaciona con su concentración en una muestra de referencia con flujo conocido (habitualmente sangre) extraída en el momento de la inyección. La inyección seriada de microesferas de diferentes colores permite estimar el flujo regional en distintos momentos del experimento. La inyección de microesferas, incluso en cantidades mucho mayores que las utilizadas en este estudio, no afecta los parámetros hemodinámicos ni produce isquemia miocárdica¹⁸⁹.

4.3.2. Inyección de las microesferas

Se cateterizó la aurícula izquierda con un catéter Abbocath 20G, que se suturó a la pared auricular con poliéster 5/0 (Ethicon, Gran Bretaña) y se conectó a un transductor de presión. Por este catéter se inyectaron microesferas Dye-Trak (Triton Technology) de $15 \pm 0.2 \mu\text{m}$ de diámetro: 1.8×10^6 microesferas amarillas antes de la oclusión coronaria, 3.6×10^6 microesferas azules 30 minutos después de la reperusión, y 3.6×10^6 microesferas rojas cinco horas después de la reperusión. Antes de cada inyección, las microesferas se diluyeron en 5 ml de suero salino con Tween 80 al 0.02%, se agitaron y se introdujeron durante 1 - 2 minutos en un baño de ultrasonidos. Para evitar su adhesión a las paredes del catéter, éste se lavó antes y después de cada inyección con 5 ml de suero salino con Tween 80 al 0.02%.

4.3.3. Obtención de las muestras de sangre y miocardio

Antes de cada inyección se avanzó hasta la aorta descendente, a través del introductor femoral, un catéter Medicut de 1.69 mm de diámetro (Sherwood Medical, Petit-Rechain, Bélgica), que se conectó a una bomba de infusión Harvard 2400-003 (Harvard Apparatus, Southnatick, Massachussets). Durante los 10 segundos previos y los 100 segundos siguientes a cada inyección de microesferas se aspiró sangre a una velocidad de 12 ml/min, que se almacenó en cuatro tubos de vidrio con EDTA (Becton Dickinson, Francia) y se congeló. Al final del experimento se extrajeron cuatro muestras miocárdicas de 1.08 ± 0.01 g de la cuarta loncha. Se obtuvieron dos muestras, una subendocárdica y la otra subepicárdica, del área en riesgo, que se identificó mediante la iluminación de la loncha con luz ultravioleta, y otras dos del miocardio control. Las muestras fueron almacenadas en tubos de vidrio y congeladas.

4.3.4. Procesado de las muestras

Las muestras se descongelaron en un baño a 37°C. Las de sangre se dividieron en fracciones de 2.5 ml, y cada fracción se lavó con 1 ml de suero salino con Tween 80 al 2% y se trató con 1.1 ml de KOH 16 molar y 0.5 ml de suero salino con Tween 80 al 20%. Las muestras sólidas se trataron con 7 ml de KOH 4 molar con Tween 80 al 2%. Para completar la digestión de las muestras, se incubaron en una estufa a 72°C durante 4 - 6 horas.

Una vez digeridas, las muestras se agitaron y se vertieron en una bureta, que se introdujo en una cámara de filtración al vacío. Cada una de ellas fue lavada sucesivamente con Tween 80 al 2% y etanol al 70%, y se hizo pasar varias veces a través de filtros de poliéster de 25 mm de diámetro, con poros de 8 μ m de diámetro. Los filtros se introdujeron en tubos Ependorf y se procesaron con 100 - 300 μ l, según el tipo y volumen de las muestras origen, de dimetilformamida (Sigma) para extraer el colorante.

4.3.5. Cuantificación del color y cálculo del flujo miocárdico regional

En un espectrofotómetro Shimadzu CPS 240A se midió el espectro de absorción fotométrica a 448, 530 y 672 nm de longitud de onda de cantidades conocidas de microesferas, aisladas y en combinación de varios colores, que sirvieron de referencia. Después se determinó, a las mismas longitudes de onda, la absorción fotométrica de las soluciones de dimetilformamida con los colorantes extraídos de las muestras.

El flujo sanguíneo miocárdico regional se calculó a partir de la siguiente ecuación (UA = unidad de absorción fotométrica):

$$\frac{\text{UA/g en la muestra}}{\text{Flujo a la muestra (ml/min)}} = \frac{\text{UA/g en la sangre de referencia}}{\text{Velocidad de extracción de la sangre (ml/min)}}$$

de donde:

$$\text{Flujo a la muestra (ml/min)} = \frac{[\text{UA/g en la muestra}] \times [\text{Velocidad de extracción de la sangre (ml/min)}]}{[\text{UA/g en la sangre de referencia}]}$$

El flujo se corrigió por el peso de las muestras y se expresó en ml/min/g de tejido húmedo.

4.4. Área en riesgo y tamaño del infarto

4.4.1. Extracción del corazón

Al final del experimento se reocluyó la descendente anterior en el punto de la oclusión previa, y se inyectaron 5 ml de fluoresceína sódica al 20% en la aurícula izquierda para delimitar el área en riesgo. Tras comprobar la diseminación sistémica de la fluoresceína se seccionaron los grandes vasos y se extrajo el corazón, que se sumergió en suero salino a

4°C. Se seccionaron y desecharon las aurículas y los grandes vasos.

4.4.2. Análisis histoquímico

El corazón fue suspendido en un recipiente cilíndrico de plástico, sujeto con hilos de seda por su base a las paredes y por el apex al fondo del mismo. Se vertieron 20 ml de Alcopol s-616/R-11 activado con 20 ml de metildifenilisocianato (Repsol Química, Madrid) en el interior del recipiente y en ambos ventrículos, formándose una espuma de poliuretano que solidificó rápidamente y en la que quedó incluido el corazón¹⁹⁰. El cilindro de espuma fue extraído del frasco y cortado en secciones transversales de 5 - 7 mm, del apex a la base, con una sierra circular Philips HR 2680.

Las rodajas miocárdicas fueron pesadas e iluminadas por su superficie basal (en lugar de la cuarta loncha, reservada para el análisis del flujo regional, se iluminó la quinta por su superficie apical) con luz ultravioleta de 356 nm. De esta forma se delimitó el área en riesgo, de color violáceo, en contraste con el resto del miocardio, intensamente teñido de amarillo verdoso por la fluoresceína (Figura 5). Las lonchas así iluminadas se filmaron con una cámara de vídeo Sony TR 705E Hi8, y las imágenes fueron digitalizadas con una tarjeta Matrox IP8 (Matrox Electronic Systems, Dorval, Canadá) en imágenes de 768 x 576 pixels, que se almacenaron en el disco duro.

Seguidamente, las lonchas se incubaron con clorhidrato de trifeniltetrazolio al 1%, para delimitar el miocardio necrosado. Este adquirió un color rosa pálido, en contraste con el miocardio viable, que al conservar los sistemas enzimáticos necesarios para reducir el trifeniltetrazolio adquirió un color rojo oscuro¹⁸³. Las secciones fueron filmadas de nuevo con luz blanca y digitalizadas. También se filmó y digitalizó en cada experimento una escala de referencia.

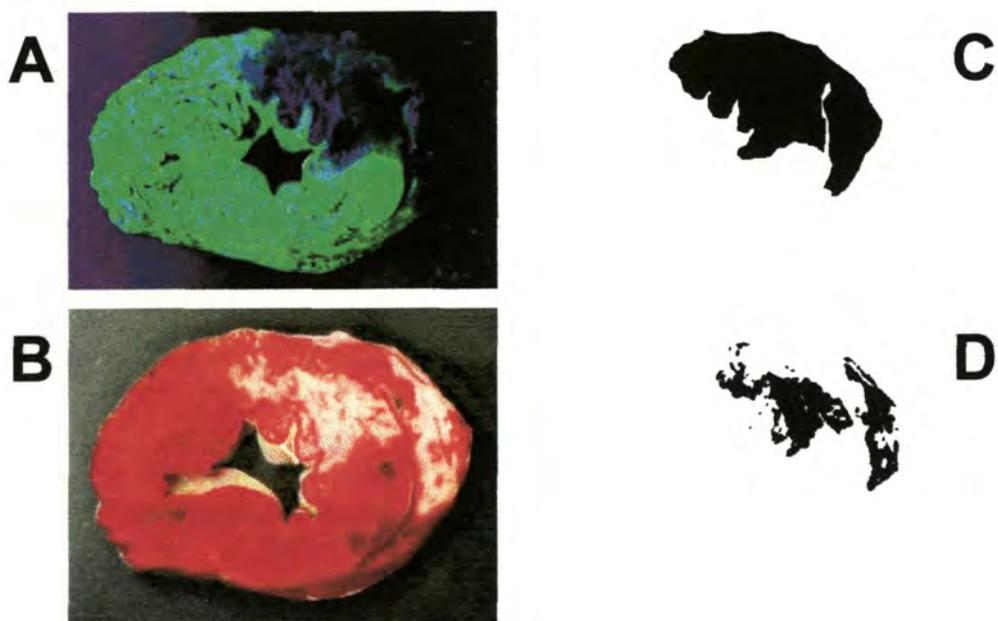


Figura 5. A) Imagen fotográfica de una loncha miocárdica vista por su cara basal tras ser iluminada con luz ultravioleta para delimitar el área en riesgo, no teñida por la fluoresceína. B) La misma loncha tras ser incubada con clorhidrato de trifeniltetrazolio para delimitar el área de necrosis, de color más pálido que el miocardio viable. C) y D) Superficies del área en riesgo y del área de necrosis, respectivamente, obtenidas mediante planimetría semiautomática.

4.4.3. Cálculo del área en riesgo y del tamaño del infarto

Con la ayuda de un programa informático (Image Pro-Plus, Media Cybernetics, Silver Springs, Maryland) se planimetró, de forma semiautomática, el área total, el área en riesgo y el área de necrosis en las imágenes digitales de cada loncha. A partir de estas mediciones y del peso de las lonchas se calculó la masa de miocardio en riesgo en gramos y en porcentaje respecto de la masa ventricular total, y el tamaño del infarto en gramos, en porcentaje de la masa ventricular y en porcentaje del área en riesgo. Todas las mediciones se realizaron de forma ciega respecto al tratamiento asignado:

$$\begin{aligned} \text{Peso AR (g)} &= \sum \frac{AR_n + AR_{n-1}}{2} \times \frac{2}{AT_n + AT_{n-1}} \times \text{peso}_n = \\ &= \sum \frac{AR_n + AR_{n-1}}{AT_n + AT_{n-1}} \times \text{peso}_n \end{aligned}$$

$$\text{Peso AR (\% del PVT)} = \frac{\text{Peso AR (g)}}{\text{PVT (g)}} \times 100,$$

donde Peso AR es el peso total del área en riesgo, n es el número de lonchas, AR_n es la superficie del área en riesgo planimetrada en la cara basal de la loncha n, AT_n es la superficie total de la loncha n, peso_n es el peso de la loncha n y PVT es el peso ventricular total.

$$\begin{aligned} \text{Peso AN (g)} &= \sum \frac{AN_n + AN_{n-1}}{2} \times \frac{2}{AT_n + AT_{n-1}} \times \text{peso}_n = \\ &= \sum \frac{AN_n + AN_{n-1}}{AT_n + AT_{n-1}} \times \text{peso}_n \end{aligned}$$

$$\text{Peso AN (\% del PVT)} = \frac{\text{Peso AN (g)}}{\text{PVT (g)}} \times 100,$$

donde Peso AN es el peso total del infarto, AN_n es la superficie del área de necrosis planimetrada en la cara basal de la loncha n, AT_n es la superficie total de la loncha n, $peso_n$ es el peso de la loncha n y PVT es el peso ventricular total.

$$\text{Peso AN (\% del Peso AR)} = \frac{\text{Peso AN (g)}}{\text{Peso AR (g)}} \times 100$$

4.5. Análisis histológico

En todos los animales se realizó un estudio histológico de la descendente anterior y del miocardio. Además de examinar el punto de oclusión coronaria para confirmar las reoclusiones permanentes, se analizó el estado de la arteria en la sección incluida en la quinta loncha, distal al lugar de la oclusión, con el objeto de comprobar el daño de la íntima producido por el catéter intracoronario. El estudio del miocardio se realizó en la tercera loncha y se dirigió a cuantificar el contenido de leucocitos y plaquetas, la hemorragia y el edema.

Tras extraer el corazón se seccionó un segmento de 1 cm de longitud de la descendente anterior que incluía el punto de oclusión, y otro de la arteria circunfleja, que sirvió como control, y ambos se fijaron en formol al 10%. Las lonchas miocárdicas también se fijaron en formol una vez filmadas y digitalizadas, y la tercera y la quinta fueron deshidratadas con alcohol e incluidas en parafina. Se realizaron secciones transversales de 4 μm de grosor de las muestras arteriales y secciones completas de ambas lonchas con un microtomo Polycut (Reichert Jung Cambridge Instruments, Heidelberg, Alemania). Los cortes se tiñeron con hematoxilina/eosina, ácido periódico de Schiff y tricrómico de Masson, y los de la quinta loncha se tiñeron además con la técnica de Van Gieson para evaluar el estado de la lámina elástica interna arterial. Todos los cortes fueron examinados a varios aumentos con un microscopio binocular SZ 111 (Olympus Optical, Japón).

El examen de las secciones arteriales incluidas en la quinta loncha se centró en los siguientes parámetros, que fueron puntuados de acuerdo con una escala semicuantitativa: a) denudación endotelial: 0, sin denudación, 1, denudación de menos del 50% de la circunferencia endotelial, 2, denudación de más del 50% de la circunferencia endotelial; b) estado de la lámina elástica interna: 0, intacta, 1, rotura focal, 2, rotura extensa; c) trombosis: 0, sin trombosis, 1, agregados plaquetarios sin estrechamiento de la luz, 2, trombo que ocupa un tercio de la luz, 3, trombo que ocupa dos tercios de la luz, 4, trombo oclusivo; d) contenido subendotelial de leucocitos polimorfonucleares: 0, ausentes, 1, escasos, 2, abundantes, 3, infiltración masiva.

El examen del miocardio se realizó sistemáticamente en las áreas subendocárdica, medioventricular y lateral del área en riesgo y en el miocardio control de la tercera loncha, y se centró en los siguientes parámetros, que también se cuantificaron de forma semicuantitativa: a) contenido de leucocitos polimorfonucleares: 0, ausentes, 1, algunos dispersos en la luz de los pequeños vasos, 2, presentes formando "tapones" intravasculares, 3, presentes en el espacio intersticial; b) contenido de células redondas, según la misma puntuación; c) contenido de plaquetas: 0, ausentes, 1, algunos agregados plaquetarios intravasculares, 2, trombos plaquetarios no oclusivos, 3, trombos oclusivos, 4, trombos oclusivos con extravasación de plaquetas. Además, se cuantificaron semicuantitativamente la hemorragia y el edema en el área en riesgo, con puntuaciones de 0 a 4.

El análisis histológico fue realizado sin conocimiento de los resultados histoquímicos y del tratamiento administrado. El examen del miocardio se realizó sin conocimiento de los cambios patológicos en la descendente anterior.

5. EXPERIMENTOS ADICIONALES: MAGNITUD DE LA EMBOLIZACIÓN DE PLAQUETAS AL MIOCARDIO DESDE UN TROMBO MURAL INTRACORONARIO

En 32 animales adicionales (35 ± 1 kg) se investigó la contribución de la embolización coronaria y del depósito microvascular local a la acumulación miocárdica de plaquetas que se produce tras una oclusión coronaria transitoria. Estos animales fueron sometidos a daño intimal coronario para inducir una trombosis dinámica, seguido o no de una oclusión coronaria transitoria de duración variable. Posteriormente se cuantificó el contenido miocárdico de plaquetas, y se investigó su modificación por la aspirina y su asociación con el contenido de leucocitos polimorfonucleares y con el tamaño del infarto.

5.1. Instrumentación y monitorización

Se utilizó la misma preparación quirúrgica que en las series previas, pero en estos animales se monitorizó continuamente el flujo en la descendente anterior media con un sensor de flujo ultrasónico T106 (Transonic Systems, Ithaca, New York), no se monitorizó la contractilidad regional y no se utilizó lidocaína.

Todos los animales fueron sometidos a un daño intimal severo de la descendente anterior mediante un catéter intracoronario. La mayoría de los animales desarrolló tras esta intervención una trombosis dinámica, que se puso de manifiesto por la aparición de reducciones cíclicas del flujo coronario^{19,21} (Figura 6). En cinco animales (tres del grupo sin oclusión coronaria y dos del grupo con 48 minutos de oclusión y tratamiento con aspirina) que no desarrollaron espontáneamente reducciones cíclicas, se provocó una constricción parcial de la arteria mediante una ligadura a su alrededor y una aguja de 20G para favorecer la trombosis. Si en algún caso se produjo durante el experimento una oclusión total de la arteria, se realizó una suave compresión manual para facilitar la recuperación del flujo²¹.

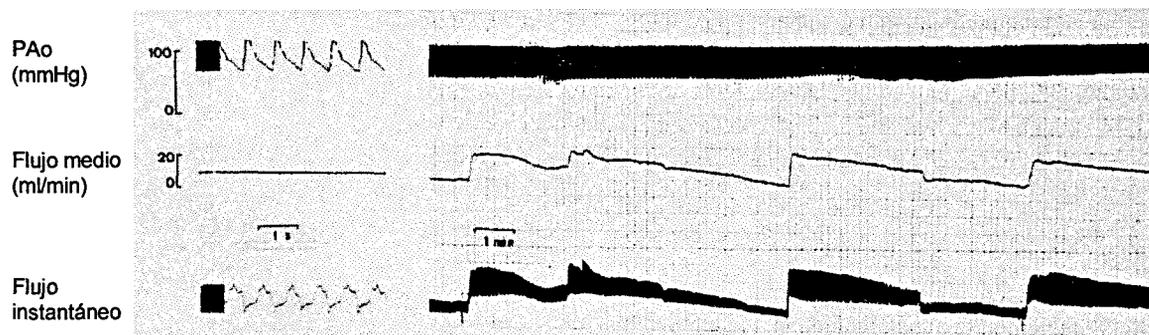


Figura 6. Ejemplo representativo de variaciones cíclicas del flujo coronario en la arteria descendente anterior, indicativas de la presencia de una trombosis coronaria dinámica provocada por el daño de la íntima en un animal de la serie adicional. Se aprecian las típicas reducciones progresivas del flujo, hasta valores cercanos a 0, seguidas de bruscas recuperaciones del flujo, atribuidas, respectivamente, al crecimiento del trombo y a su fragmentación y migración. PAo, presión aórtica media.

5.2. Grupos y protocolo de estudio

Inmediatamente tras el daño intimal coronario, los animales fueron asignados a no oclusión coronaria o a la ligadura de la descendente anterior media durante 25 ó 48 minutos (Figura 7). Los animales sometidos a 48 minutos de oclusión coronaria fueron aleatorizados a recibir, 90 minutos antes de la oclusión y de forma ciega para los investigadores, 250 mg de aspirina en 5 ml de suero salino por vía endovenosa o un volumen equivalente de suero salino. Dos horas después del daño intimal en los animales sin oclusión coronaria, o de la reperusión en los restantes, se extrajo el corazón.

Se excluyeron seis animales debido a razones técnicas (dos animales), reclusión coronaria (dos animales), fibrilación ventricular refractaria (un animal) e hipotensión severa (un animal). Por tanto, 26 experimentos fueron considerados válidos en esta serie, seis sin oclusión coronaria, seis con una oclusión de 25 minutos, seis con una oclusión de 48 minutos sin aspirina, y ocho con una oclusión de 48 minutos precedida de la administración de aspirina.

5.3. Parámetros analizados

5.3.1. Depósito de plaquetas en la descendente anterior y acumulación en el miocardio

Se cuantificó la magnitud del depósito de plaquetas en el segmento dañado de la descendente anterior y de su acumulación en el miocardio distal mediante el uso de plaquetas autólogas marcadas el día previo con Tc^{99m} -HMPAO, tal como se ha descrito. La eficiencia del marcaje fue en esta serie del $55 \pm 2\%$, y cada animal recibió 6.7 ± 0.3 mCi de plaquetas marcadas con Tc^{99m} . Tras extraer el corazón, se canuló la raíz aórtica y se infundió una solución de albúmina al 0.5% en suero Ringer a una presión de 120 mmHg durante unos cinco minutos para lavar la sangre atrapada en los vasos coronarios. Se extrajo un segmento

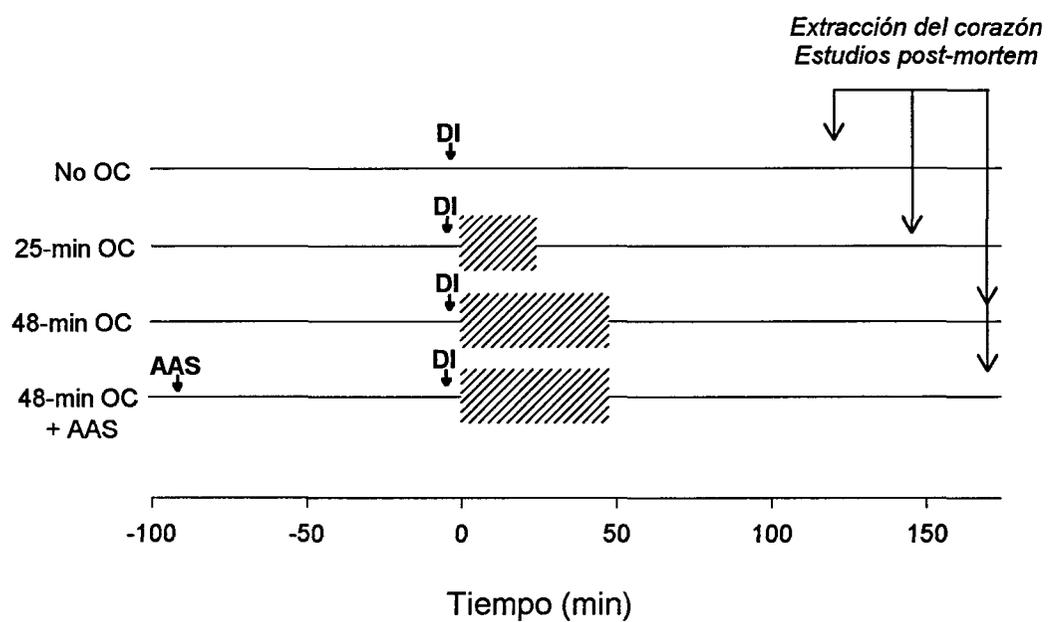


Figura 7. Diseño de los experimentos de la serie adicional. OC, oclusión coronaria; DI, daño intimal coronario; AAS, aspirina.

de 10 mm de longitud de la descendente anterior y otro de la coronaria derecha, se cortó el corazón en lonchas y se obtuvieron muestras miocárdicas transmurales en la tercera y cuarta lonchas, tanto de la zona anteroseptal dependiente de la descendente anterior (2.2 ± 0.2 g) como de la zona inferior (2.4 ± 0.2 g). Se realizó el contaje de la actividad en estas muestras y en 1 ml de sangre extraída al final del experimento. Se calculó la actividad específica en la descendente anterior y en el miocardio dependiente de la misma, y se estimó el contenido de plaquetas en las muestras a partir de la actividad y el recuento de plaquetas en la sangre.

5.3.2. Cuantificación del contenido de neutrófilos y del tamaño del infarto

En 16 animales (cinco con una oclusión coronaria de 25 minutos, cuatro con una oclusión de 48 minutos sin aspirina, y siete con una oclusión de 48 minutos con aspirina), se extrajeron muestras miocárdicas transmurales (0.81 ± 0.06 g) del territorio dependiente de la descendente anterior y del territorio control en la tercera loncha, en las que se determinó la actividad de la mieloperoxidasa, tal como se ha descrito previamente.

En los animales sometidos a 48 minutos de oclusión coronaria, se incubaron las lonchas con clorhidrato de trifeniltetrazolio y se cuantificó el tamaño del infarto, según se ha descrito previamente.

5.3.3. Análisis histológico

En los animales sometidos a 48 minutos de oclusión coronaria se escogieron dos lonchas distales al punto de oclusión y se procesaron para su análisis histológico. En la arteria descendente anterior se investigó la presencia de trombosis, y en el tejido miocárdico la presencia y la distribución de las plaquetas en los pequeños vasos, así como la existencia de hemorragia. Se consideraron como microémbolos los agregados fibrinoplaquetarios arteriolares de diámetro superior a $50 \mu\text{m}$ ^{103,104}.

6. ESTUDIOS ANGIOGRÁFICOS

Finalmente, en siete animales adicionales, anestesiados e instrumentados como se ha descrito, se investigó la existencia de embolización coronaria macroscópica mediante la realización de una angiografía durante las variaciones cíclicas del flujo. Se cateterizó la arteria coronaria izquierda bajo control fluoroscópico (intensificador de imágenes ARCOsi, ATS, Pedrengo, Italia) con un catéter Judkins 7F introducido percutáneamente por una arteria femoral o carótida. Se seleccionó una proyección en la que la descendente anterior distal y sus ramas estuvieran desplegadas, se inyectaron 10 ml de iopamidol y se realizó una angiografía basal. Se provocó un daño mecánico de la descendente anterior media hasta que aparecieron reducciones cíclicas del flujo, y se realizaron nuevas angiografías en los momentos de caída del flujo e inmediatamente después de las bruscas recuperaciones del flujo típicas de este modelo. Las angiografías fueron examinadas cuidadosamente para detectar la aparición de amputaciones de ramas arteriales coincidiendo con las recuperaciones del flujo.

Todos los procedimientos experimentales se realizaron en conformidad con los "Guiding Principles for Research Involving Animals and Human Beings"¹⁹¹ y fueron aprobados por la Comisión de Investigación del Hospital General Universitari Vall d'Hebron.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico fue realizado con la ayuda del programa informático SPSS (versión 6.0). Se realizó una estadística descriptiva de todas las variables. Las variaciones en los parámetros fisiológicos dentro de un mismo animal se estimaron mediante pruebas *t* de

Student para datos apareados o por el análisis de la variancia de tres vías. Las comparaciones entre grupos con variables cuantitativas se realizaron mediante el análisis de variancia de dos vías, tras comprobar la normalidad de la distribución de los datos. Se realizaron comparaciones individuales por medio del test de Duncan si se rechazó la homogeneidad en el análisis de variancia. En caso de variables no distribuidas normalmente, como las puntuaciones obtenidas en el análisis histológico, se usaron tests no paramétricos. Las comparaciones entre datos categóricos se realizaron mediante pruebas de chi-cuadrado o con la prueba exacta de Fisher. Los efectos del daño intimal coronario y la aspirina sobre el tamaño del infarto se analizaron mediante el análisis de la variancia de dos vías. En todos los tests se consideró como significativo un valor de P bilateral de 0.05. Todos los valores se expresan como media \pm error estándar de la media.

RESULTADOS

Los resultados que se muestran a continuación han sido publicados en forma de artículos, uno con los principales resultados de las series A y B (*Barrabés et al., Pflügers Arch-Eur J Physiol 1996;432:663-670*) y otro con los de la serie adicional (*Barrabés et al., Cardiovasc Res 2000 [en prensa]*). Además, con los datos recogidos en los experimentos del presente estudio se han realizado análisis adicionales, que también han sido publicados, sobre la geometría del infarto (*Solares et al., Virchows Arch 1995;426:393-399*), la relación entre los cambios en la longitud segmentaria durante la reperfusión y el tamaño del infarto (*Barrabés et al., Pflügers Arch-Eur J Physiol 1996;431:519-526*), y la asociación entre la expansión isquémica regional, la fibrilación ventricular y la reoclusión coronaria (*Barrabés et al., Am J Physiol 1998;274:H1767-H1775*).

1. EXCLUSIONES

En la Tabla 1 se resumen los animales no incluidos y excluidos en el estudio (series A y B). Se utilizaron 79 animales, de los cuales 10 no fueron incluidos por los siguientes motivos: cuatro por problemas en la ventilación, cuatro por sangrado, rotura u oclusión de la descendente anterior durante la disección, uno por rotura de la aurícula izquierda y uno por pericarditis. Cuatro de los 69 animales inicialmente incluidos fueron excluidos por las siguientes causas: maniobras de cateterismo de la descendente anterior prolongadas, que provocaron isquemia miocárdica, rotura de la arteria en el momento de la oclusión, oclusión del tronco común de la coronaria izquierda, e imposibilidad de medir el área en riesgo por un error en la inyección de la fluoresceína.

En 14 animales se detectó reoclusión de la descendente anterior, que fue transitoria

en siete y persistente en los restantes. La reoclusión se produjo en ocho animales durante la primera hora de reperfusión, en cinco durante la segunda hora y en uno después de cuatro horas. La asignación a daño intimal coronario no se relacionó significativamente con la incidencia de reoclusión (26%, vs. 17% en los animales sin daño intimal, $P = \text{NS}$). En la serie B, el tratamiento con aspirina se asoció con una menor incidencia de reoclusión (10%, vs. 36% en los animales que recibieron placebo, $P = 0.04$), y ninguno de los animales tratados con aspirina presentó reoclusión permanente. Los animales con reoclusión coronaria fueron excluidos del análisis.

Tabla 1. Animales utilizados en el estudio

	Total	No incluidos	Excluidos	Reoclusión	Válidos
Serie A (30 min)	17	0	0	2	15
Serie B (48 min)	62	10	4	12	36
Total	79	10	4	14	51

De este modo, los experimentos válidos fueron 15 en la serie A, ocho con daño intimal coronario y siete sin daño intimal, y 36 en la serie B, distribuidos en cuatro grupos de nueve animales cada uno, con los siguientes tratamientos: placebo con daño intimal coronario, placebo sin daño intimal, aspirina con daño intimal coronario y aspirina sin daño intimal.

2. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

La Tabla 2 muestra los resultados de los análisis de sangre. Los valores basales estaban dentro de los límites normales y fueron similares en los distintos grupos de

tratamiento. Los parámetros bioquímicos y los hematológicos referidos a la serie roja no se modificaron durante el experimento. Al final, se observó en ambas series un descenso del recuento leucocitario, que afectó de forma similar a los leucocitos polimorfonucleares y a los linfocitos, y en la serie B un descenso del recuento de plaquetas, en ambos casos sin diferencias entre los grupos de tratamiento.

Tabla 2. Resultados de las determinaciones hematológicas y bioquímicas

	Serie A (30 min)		Serie B (48 min)	
	Inicial	Final	Inicial	Final
Hematíes (x 10 ⁶ /μl)	4.8 ± 0.1	5.0 ± 0.1	4.2 ± 0.3	3.6 ± 0.5
Hemoglobina (g/dl)	8.4 ± 0.2	8.6 ± 0.2	8.6 ± 0.1	7.6 ± 0.6
Hematocrito (%)	24 ± 1	24 ± 1	21 ± 1	20 ± 2
Leucocitos (x 10 ³ /μl)	21.3 ± 1.7	16.5 ± 1.2 *	17.8 ± 0.7	13.7 ± 1.7 *
Neutrófilos (x 10 ³ /μl)	7.1 ± 0.8	6.5 ± 0.9	-----	-----
Linfocitos (x 10 ³ /μl)	11.2 ± 1.0	9.1 ± 1.2	-----	-----
Monocitos (x 10 ³ /μl)	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1	-----	-----
Plaquetas (x 10 ³ /μl)	507 ± 26	464 ± 27	399 ± 15	293 ± 23 †
TTP (s)	23.1 ± 1.3	20.1 ± 1.5	18.2 ± 1.4	24.5 ± 8.0
Glucosa (mg/dl)	105 ± 5	108 ± 3	103 ± 5	89 ± 5
Creatinina (mg/dl)	1.3 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.3
Sodio (mEq/l)	141 ± 1	141 ± 1	141 ± 1	137 ± 4
Potasio (mEq/l)	3.4 ± 0.1	4.1 ± 0.1	3.2 ± 0.1	4.0 ± 0.2

*P = 0.02 y †P <0.001 respecto a los valores iniciales. TTP, tiempo de tromboplastina parcial activado. No se dispone de la fórmula leucocitaria de los animales de la serie B.

3. PARAMETROS HEMODINÁMICOS

La Tabla 3 muestra los valores de la frecuencia cardíaca y la presión arterial media en las dos series. No hubo diferencias entre los grupos de tratamiento en la evolución de ambos parámetros a lo largo del experimento.

En los animales de la serie A, la frecuencia cardíaca basal era 57 ± 3 latidos por minuto y no se modificó significativamente a lo largo del experimento (62 ± 3 latidos por minuto al final del periodo de oclusión y 64 ± 4 latidos por minuto al final del experimento). La presión aórtica media era 70 ± 2 mmHg antes de la oclusión, 71 ± 3 mmHg al final del periodo de oclusión ($P = \text{NS}$ respecto al valor basal) y 93 ± 4 mmHg al final del experimento ($P < 0.001$ respecto al valor previo a la reperfusión).

En los animales de la serie B, la frecuencia cardíaca basal era 66 ± 2 latidos por minuto, aumentó tras la oclusión coronaria (79 ± 4 latidos por minuto a los 48 minutos, $P < 0.001$ respecto al valor basal) y permaneció estable durante el periodo de reperfusión (81 ± 4 latidos por minuto a las cinco horas ($P = \text{NS}$ respecto al valor previo a la reperfusión). La presión aórtica media basal era 79 ± 3 mmHg, y no se modificó durante el experimento (78 ± 3 mmHg al final de periodo de oclusión y 77 ± 3 mmHg a las cinco horas de reperfusión, $P = \text{NS}$).

4. ARRITMIAS VENTRICULARES

En la serie A, ningún animal presentó fibrilación ventricular durante el periodo de oclusión. Tras la apertura de la arteria aparecieron en todos los casos rachas de ritmo idioventricular acelerado, y 11 animales, cinco (62%) con daño intimal coronario y seis (86%) sin daño intimal ($P = \text{NS}$), presentaron fibrilación ventricular en los primeros minutos de la reperfusión.

En la serie B, cinco animales presentaron fibrilación ventricular durante el periodo de

Tabla 3. Parámetros hemodinámicos durante la oclusión coronaria y la reperfusión

	Oclusión coronaria										Reperusión					
	Basal	5 min	15 min	30 min	48 min	3 min	15 min	30 min	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h		
Serie A (30 min)																
Daño intimal																
FC (lpm)	57±4	60±4	63±4	64±5	---	60±5	60±5	60±3	59±4	59±4	58±5	59±5	60±6	---		
PAM (mmHg)	72±3	71±3	72±5	71±5	---	74±4	78±4	78±4	79±5	88±5	86±6	89±5	89±6	---		
No intervención																
FC (lpm)	57±4	61±4	59±4	61±5	---	72±8	63±5	65±5	64±5	62±5	61±6	63±6	68±6	---		
PAM (mmHg)	68±3	66±3	68±3	70±4	---	78±6	73±4	78±5	82±4	89±6	90±7	95±8	97±6	---		
Serie B (48 min)																
Placebo/daño intimal																
FC (lpm)	66±6	79±8	79±8	81±8	84±7	94±7	81±5	77±5	85±7	84±6	88±7	88±7	90±8	90±8		
PAM (mmHg)	80±8	78±6	82±6	80±6	85±7	81±7	82±6	87±6	85±6	88±7	90±6	85±7	82±6	78±8		
Placebo/no intervención																
FC (lpm)	69±5	75±7	75±7	76±6	71±4	86±5	72±3	71±5	75±5	68±3	70±4	71±8	70±7	73±5		
PAM (mmHg)	79±4	75±4	78±4	78±5	76±5	69±6	67±3	74±5	76±4	71±3	73±4	76±6	63±5	67±5		
AAS/daño intimal																
FC (lpm)	68±4	73±7	76±7	84±8	77±8	91±12	85±8	84±7	85±6	85±7	84±7	80±6	82±9	77±8		
PAM (mmHg)	74±5	75±6	76±5	80±5	78±6	77±5	81±5	85±4	87±5	90±4	88±3	87±4	79±4	77±5		
AAS/no intervención																
FC (lpm)	63±4	71±6	68±5	70±7	81±10	87±11	87±11	89±8	85±7	84±6	78±6	82±5	83±5	83±8		
PAM (mmHg)	82±4	85±4	85±4	85±5	86±4	81±5	88±4	87±4	86±4	91±5	88±5	87±6	81±4	74±5		

FC, frecuencia cardiaca; lpm, latidos por minuto; PAM, presión aórtica media; AAS, aspirina.

isquemia, 28 ± 3 minutos después de la oclusión coronaria. La incidencia de fibrilación ventricular isquémica de los animales sometidos a daño intimal coronario fue similar a la de aquellos sin daño intimal (11 vs. 17%, respectivamente, $P = \text{NS}$), y la de los animales tratados con aspirina similar a la de los que recibieron placebo (17 vs. 11%, respectivamente, $P = \text{NS}$). En los minutos siguientes a la reperfusión, todos los animales presentaron también ritmo idioventricular acelerado, y 16 fibrilación ventricular. La incidencia de fibrilación ventricular durante la reperfusión tampoco se relacionó con la asignación a daño intimal o a no intervención (39 vs. 50%, respectivamente, $P = \text{NS}$), ni a aspirina o placebo (44 vs. 44%, respectivamente, $P = \text{NS}$).

Ninguno de los animales incluidos en el estudio presentó fibrilación ventricular más allá de los primeros minutos tras la reperfusión.

5. PARÁMETROS ANALIZADOS EN LA SERIE A (30 MINUTOS DE OCLUSIÓN)

5.1. Flujo coronario

Antes de la oclusión coronaria, el flujo sanguíneo en la arteria descendente anterior media era de 30.0 ± 2.1 ml/min, sin diferencias entre los grupos (28.8 ± 1.2 vs. 31.7 ± 4.8 ml/min en los animales que recibirían o no daño intimal, respectivamente, $P = \text{NS}$). Después de la reperfusión se produjo una respuesta hiperémica, cuyo valor máximo se registró en el minuto cinco (50.1 ± 7.2 ml/min). Esta respuesta hiperémica estuvo significativamente amortiguada en los animales sometidos a daño intimal coronario (Figura 8). Así, a los cinco minutos de la reperfusión el flujo medio en la descendente anterior era en estos animales 42.7 ± 6.3 ml/min, y en aquellos sin daño coronario 62.6 ± 15.1 ml/min. A las cinco horas, el flujo medio había disminuido hasta 26.3 ± 3.6 y 35.5 ± 3.5 ml/min, respectivamente.

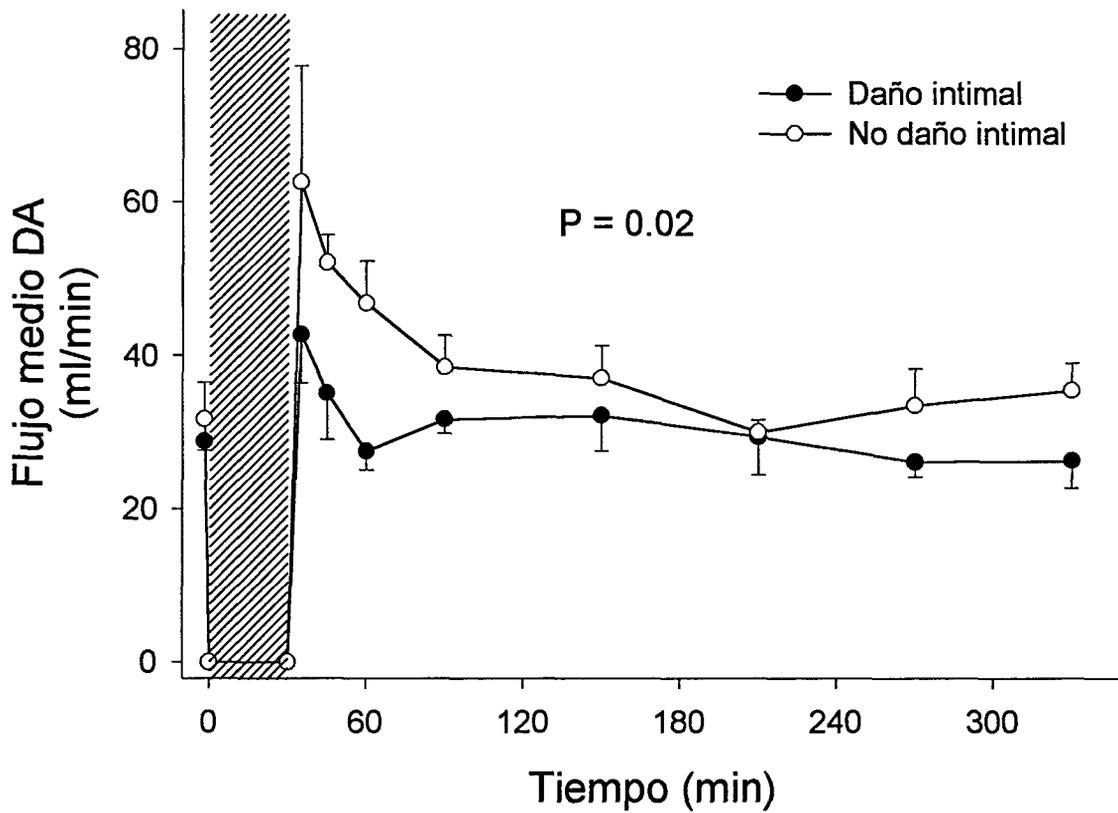


Figura 8. Evolución del flujo sanguíneo medio en la arteria descendente anterior (DA) en los animales de la serie A. La respuesta hiperémica tras 30 minutos de oclusión coronaria estuvo amortiguada en los animales sometidos a daño intimal coronario. El periodo de isquemia aparece sombreado.

5.2. Depósito de plaquetas en la descendente anterior y acumulación en el miocardio

Al final del experimento, la radioactividad específica en la descendente anterior, indicativa del depósito de plaquetas, era 17 ± 6 veces mayor que en la arteria circunfleja ($P = 0.006$). Este depósito de plaquetas estaba acentuado en los animales con daño intimal, en los que el cociente entre la radioactividad específica en la descendente anterior y en el miocardio control era 57 ± 20 , mientras que en los animales sin daño intimal era 19 ± 7 ($P = 0.05$). También se comprobó un incremento en el contenido de plaquetas en el miocardio reperfundido, cuya magnitud fue semejante en los animales con daño intimal coronario y en el resto (radioactividad específica en el área en riesgo 197 ± 71 y $240 \pm 89\%$ del valor en la zona control, respectivamente, $P = \text{NS}$). El contenido de plaquetas en el miocardio reperfundido no se correlacionó con la magnitud del depósito de plaquetas en la descendente anterior.

5.3. Acumulación miocárdica de leucocitos polimorfonucleares

En el miocardio control, la actividad de la mieloperoxidasa era similar en los animales con daño intimal coronario y en aquéllos sin daño intimal (0.37 ± 0.08 y 0.29 ± 0.10 U/g de tejido húmedo, respectivamente, $P = \text{NS}$). En el miocardio reperfundido, la actividad de la mieloperoxidasa no estaba aumentada respecto a la zona control, y también era similar en los animales sometidos a daño intimal coronario y en el resto (0.32 ± 0.10 y 0.46 ± 0.08 U/g, respectivamente, $P = \text{NS}$). La actividad de la mieloperoxidasa en el área en riesgo no se correlacionó significativamente con la radioactividad específica en la misma zona, expresada en porcentaje del valor en la región control.

6. PARÁMETROS ANALIZADOS EN LA SERIE B (48 MINUTOS DE OCLUSIÓN)

6.1. Tiempo de sangría

Inmediatamente antes de la administración del tratamiento, el tiempo de sangría era comparable en los animales que recibirían placebo o aspirina (127 ± 7 y 129 ± 10 segundos, respectivamente, $P = \text{NS}$). Noventa minutos después, el tiempo de sangría en los animales del grupo placebo fue similar al basal (154 ± 14 segundos, $P = \text{NS}$), mientras que en los animales tratados con aspirina aumentó hasta 226 ± 19 segundos ($P = 0.002$).

6.2. Contractilidad segmentaria

En el territorio control, la fracción de acortamiento sistólico antes de la oclusión coronaria era del $21.6 \pm 1.1\%$. Ni la longitud telediastólica ni la fracción de acortamiento sistólico en la zona control se modificaron significativamente durante el periodo de oclusión ($99.5 \pm 1.1\%$ y $97.0 \pm 2.8\%$ de los valores basales, respectivamente, a los 48 minutos, $P = \text{NS}$) o después de la reperfusión (99.2 ± 1.2 y $93.7 \pm 3.3\%$, respectivamente, una hora tras la reperfusión, $P = \text{NS}$), aunque ambos parámetros decayeron ligeramente al final del experimento ($95.9 \pm 1.5\%$ y $77.8 \pm 3.4\%$, respectivamente, ambas $P < 0.05$).

En el territorio dependiente de la descendente anterior, antes de la oclusión coronaria la fracción de acortamiento sistólico era del $28.6 \pm 1.1\%$. Tras la oclusión coronaria se produjo en todos los animales un incremento de la longitud telediastólica y un abrupto descenso de la fracción de acortamiento sistólico (110.4 ± 0.8 y $9.2 \pm 2.3\%$ de los valores basales, respectivamente, cinco minutos tras la oclusión, ambas $P < 0.001$ respecto a los valores basales), sin diferencias entre los grupos de tratamiento (Figura 9). La reperfusión se acompañó de una rápida reducción de la expansión del área isquémica (la longitud telediastólica 30 minutos tras la reapertura de la arteria era $101.1 \pm 1.6\%$ de los valores

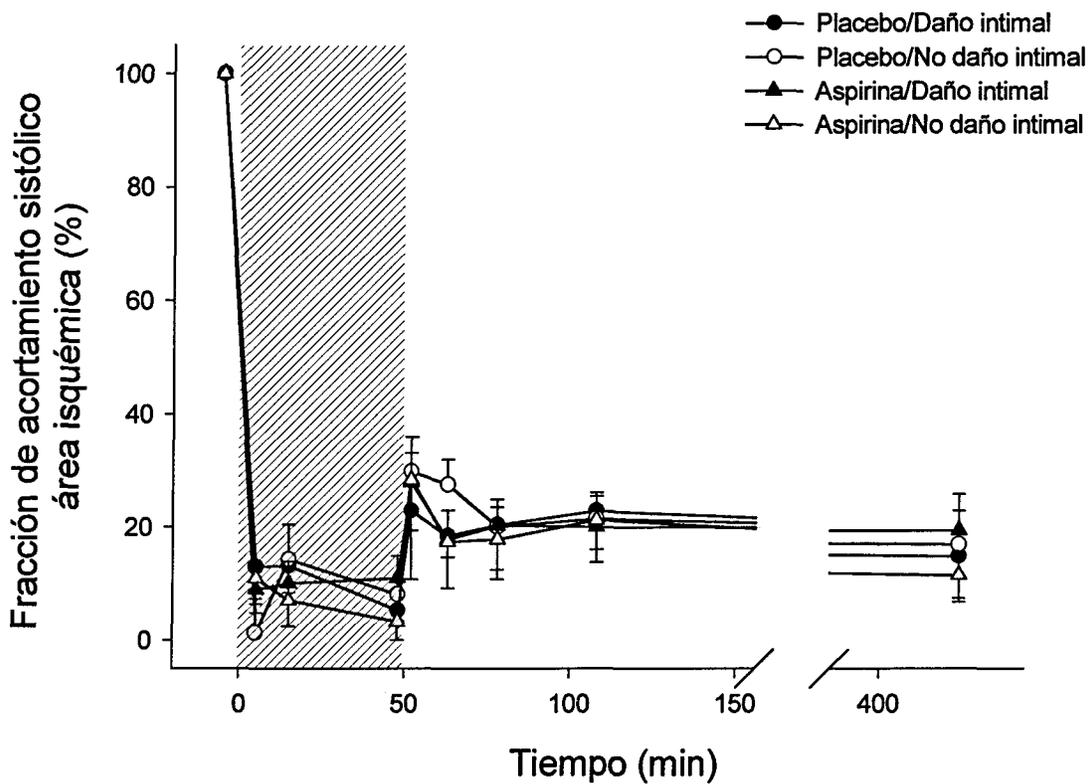
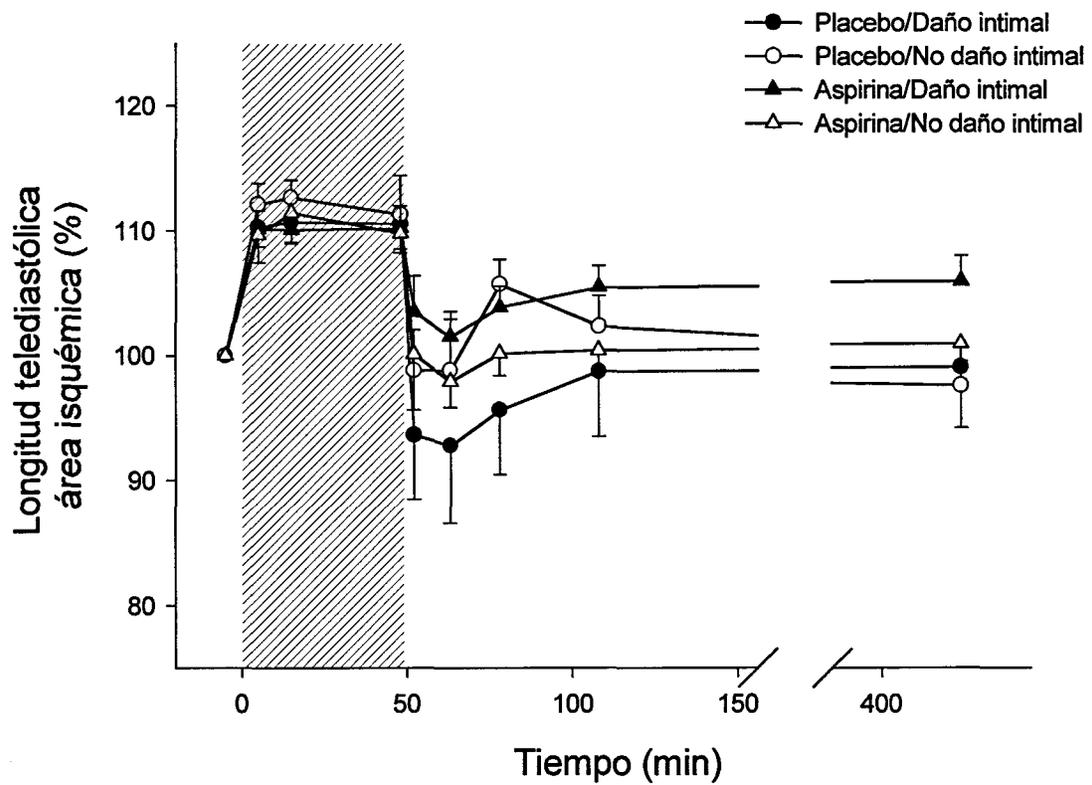


Figura 9. Evolución de la longitud telediastólica (gráfico superior) y de la fracción de acortamiento sistólico (gráfico inferior) en el territorio dependiente de la descendente anterior, expresadas como porcentaje de los valores previos a la oclusión coronaria, en los cuatro grupos de tratamiento de la serie B. El periodo de isquemia aparece sombreado.

basales, $P < 0.001$ respecto a los valores al final de la oclusión), así como de una ligera recuperación de la fracción de acortamiento sistólico (30 minutos después de la reperfusión ésta era $19.6 \pm 2.8\%$ de los valores basales, $P < 0.001$ respecto a los valores al final de la oclusión), sin diferencias entre los grupos de tratamiento. Posteriormente, ambos parámetros se mantuvieron estables hasta el final del experimento.

6.3. Flujo sanguíneo miocárdico regional

Se midió el flujo sanguíneo miocárdico regional en 21 experimentos válidos. Antes de la oclusión coronaria, el flujo sanguíneo regional era similar en el miocardio dependiente de la descendente anterior y en el territorio control (1.25 ± 0.12 y 1.37 ± 0.17 ml/min/g, respectivamente, $P = \text{NS}$), y no había diferencias entre los grupos de tratamiento. En el territorio control, el flujo sanguíneo regional se mantuvo estable a lo largo del experimento (1.28 ± 0.12 ml/min/g a los 30 minutos y 1.20 ± 0.09 ml/min/g a las cinco horas de reperfusión). En el área en riesgo, el flujo sanguíneo miocárdico regional a los 30 minutos de reperfusión era 2.26 ± 0.21 ml/min/g, lo que suponía un incremento medio del $89 \pm 25\%$ sobre el valor basal ($P = 0.004$), mientras que a las cinco horas se había reducido hasta 1.27 ± 0.11 ml/min/g ($P = \text{NS}$ respecto al valor basal).

La Figura 10 muestra los valores medios del flujo sanguíneo miocárdico regional en el área en riesgo en los distintos grupos de tratamiento. Entre los animales que recibieron placebo, el daño intimal coronario se acompañó de una reducción no significativa del flujo sanguíneo regional a los 30 minutos de reperfusión respecto a los animales sin daño intimal (1.69 ± 0.22 vs. 2.12 ± 0.16 ml/min/g, respectivamente, $P = 0.18$). En el conjunto de los animales, los valores del flujo sanguíneo regional a los 30 minutos de reperfusión fueron más elevados en los animales tratados con aspirina que en los que recibieron placebo (2.77 ± 0.37 ml/min/g vs. 1.86 ± 0.15 ml/min/g, respectivamente, $P = 0.03$). A las cinco horas de la

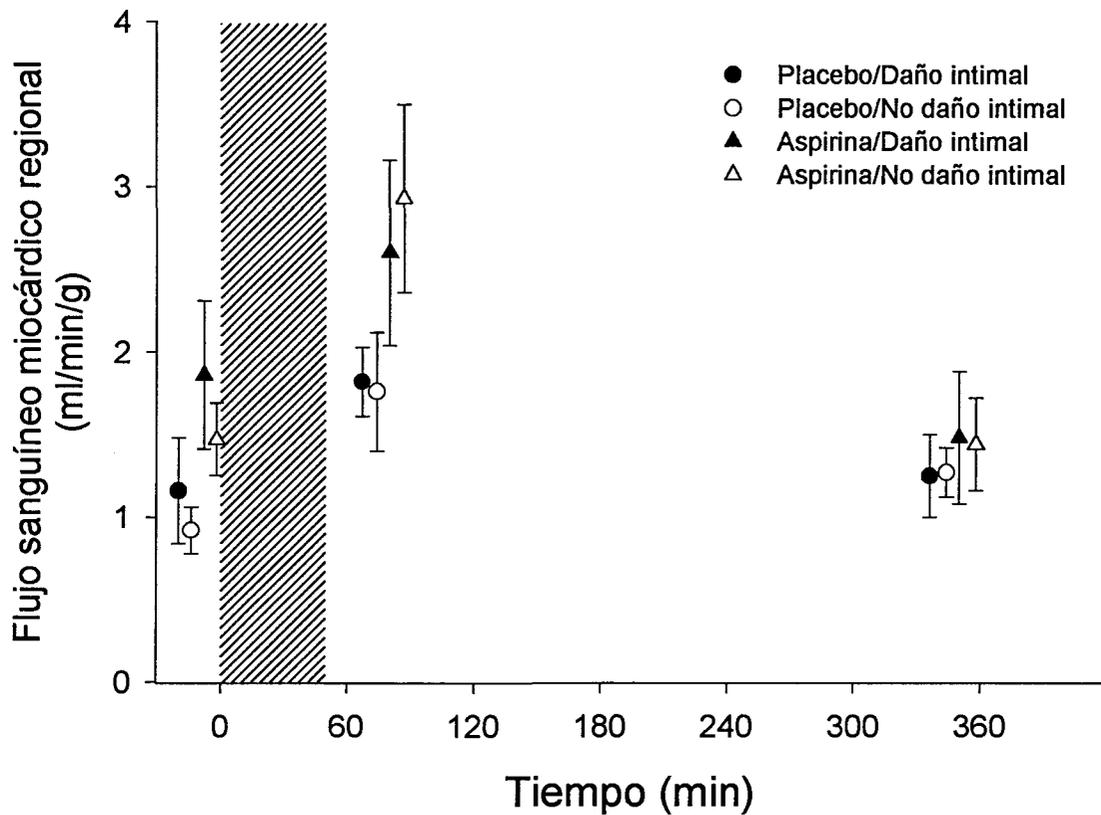


Figura 10. Valores medios del flujo sanguíneo miocárdico regional en el territorio dependiente de la arteria descendente anterior en los cuatro grupos de tratamiento de la serie B. El daño intimal coronario se acompañó de una tendencia a una amortiguación de la respuesta hiperémica tras 48 minutos de oclusión coronaria, mientras que el tratamiento con aspirina se asoció de forma significativa ($P = 0.03$) a una mayor hiperemia a los 30 min de reperusión. El periodo de isquemia aparece sombreado.

reperusión, el flujo sanguíneo miocárdico regional en el área en riesgo era similar en todos los grupos de tratamiento.

6.4. Área en riesgo y tamaño del infarto

La Tabla 4 muestra los valores individuales del tamaño del área en riesgo y del infarto. El peso medio del área en riesgo fue de 14.2 ± 0.7 g, sin diferencias entre los grupos de tratamiento (15.2 ± 1.2 , 13.1 ± 1.1 , 14.0 ± 1.5 y 14.4 ± 1.6 g, respectivamente, en los grupos placebo con daño intimal, placebo sin daño intimal, aspirina con daño intimal y aspirina sin daño intimal, $P = \text{NS}$). Expresado en porcentaje de la masa ventricular, el tamaño del área en riesgo fue en promedio del $10.4 \pm 0.6\%$, también sin diferencias entre los grupos de tratamiento (Figura 11).

El peso medio del área de necrosis fue de 3.4 ± 0.6 g, lo que suponía un $22.3 \pm 3.3\%$ del área en riesgo. El análisis de la variancia demostró la existencia de una interacción significativa ($P = 0.035$) entre el daño intimal coronario y la aspirina con respecto a su relación con el tamaño de la necrosis. Entre los animales que recibieron placebo, aquellos sometidos a daño intimal coronario tuvieron infartos de mayor tamaño que los animales sin daño intimal (36.2 ± 7.0 vs. $10.8 \pm 3.9\%$ del área en riesgo, respectivamente, $P = 0.006$). Sin embargo, en los animales tratados con aspirina el daño intimal coronario no se asoció a infartos de mayor tamaño ($20.3 \pm 6.5\%$ del área en riesgo vs. $21.7 \pm 6.5\%$ en los animales sin daño intimal, $P = \text{NS}$). Por otra parte, el tratamiento con aspirina se asoció con una tendencia a un menor tamaño del infarto en los animales con daño intimal coronario ($20.3 \pm 6.5\%$ del área en riesgo vs. $36.2 \pm 7.0\%$ en los animales que recibieron placebo, $P = 0.12$), y con una tendencia a un mayor tamaño de la necrosis en los animales sin daño intimal (21.7 ± 6.5 vs. $10.8 \pm 3.9\%$, respectivamente, $P = 0.17$). Estas diferencias se observaron también cuando el tamaño del infarto se expresó en gramos o en porcentaje del peso ventricular total.

Tabla 4. Valores individuales del tamaño del área en riesgo y del infarto en los cuatro grupos de tratamiento (serie B)

Grupo	PVT (g)	AR (g)	AR/PVT (%)	AN (g)	AN/PVT (%)	AN/AR (%)
Placebo/DI	187.6	14.1	7.5	3.1	1.7	22.1
“	150.1	19.5	13.0	11.4	7.6	58.3
“	163.0	14.6	9.0	5.8	3.5	39.4
“	117.3	11.6	9.9	3.2	2.8	27.8
“	158.3	17.4	11.0	10.3	6.5	59.4
“	123.6	10.7	8.7	4.9	4.0	45.7
“	119.6	12.0	10.0	0.3	0.3	2.6
“	115.6	15.0	13.0	8.7	7.5	58.1
“	105.1	21.8	20.7	2.7	2.6	12.5
Placebo/No DI	174.2	11.4	6.6	0.0	0.0	0.0
“	149.0	7.1	4.8	0.0	0.0	0.0
“	123.9	12.1	9.8	0.7	0.6	5.8
“	174.8	18.1	10.3	5.9	3.4	32.6
“	114.4	13.1	11.4	0.0	0.0	0.0
“	140.2	16.8	12.0	1.9	1.4	11.6
“	126.7	14.0	11.0	3.6	2.8	25.7
“	124.0	11.7	9.4	1.5	1.2	13.1
“	129.0	13.9	10.8	1.2	0.9	8.6
AAS/DI	151.3	10.3	6.8	2.5	1.6	24.0
“	143.2	11.9	8.3	6.2	4.4	52.4
“	130.0	16.4	12.6	1.4	1.0	8.3
“	176.2	10.9	6.2	4.5	2.5	41.1
“	193.1	23.7	12.3	9.1	4.7	38.3
“	147.4	16.8	11.4	2.0	1.4	11.8
“	128.7	10.0	7.7	0.7	0.5	6.6
“	116.5	16.2	13.9	0.1	0.1	0.7
“	84.1	10.1	12.0	0.0	0.0	0.0
AAS/No DI	139.2	10.7	7.7	2.7	1.9	25.1
“	215.9	11.1	5.1	0.6	0.3	5.8
“	138.3	13.2	9.6	0.0	0.0	0.0
“	184.4	8.6	4.7	1.3	0.7	15.0
“	159.9	18.3	11.4	11.4	7.1	62.1
“	137.8	13.5	9.8	3.0	2.2	22.0
“	126.2	24.7	19.6	8.8	7.0	35.6
“	116.4	12.5	10.8	3.5	3.0	28.0
“	124.2	17.2	13.8	0.3	0.2	1.8

PVT, peso ventricular total; AR, área en riesgo; AN, área de necrosis; DI, Daño intimal coronario; AAS, aspirina.

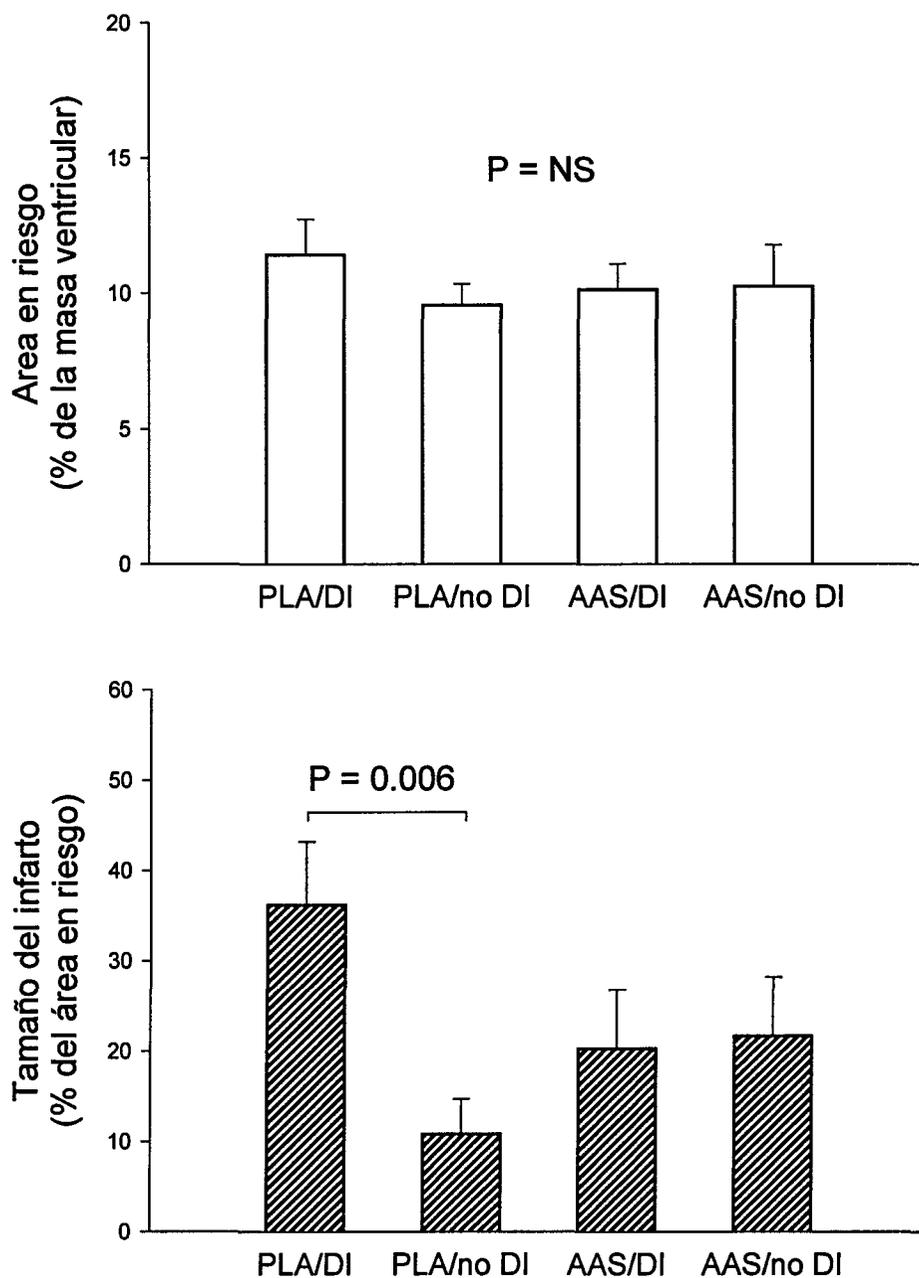


Figura 11. Valores medios del tamaño del área en riesgo, expresado en porcentaje de la masa ventricular (gráfico superior), y del tamaño del infarto, expresado en porcentaje del área en riesgo (gráfico inferior) en los cuatro grupos de tratamiento. PLA, placebo; DI, daño intimal coronario; AAS, aspirina.

6.5. Análisis histológico

El examen de la descendente anterior en la zona de la ligadura mostró la existencia de denudación endotelial y rotura de la lámina elástica interna en todos los animales, y confirmó la presencia de trombosis oclusiva en los animales con reoclusión permanente (Figura 12).

El análisis del segmento de la descendente anterior incluido en la quinta loncha confirmó en los animales sometidos a cateterismo intracoronario la presencia de un importante daño de la íntima, mientras que en los restantes animales la apariencia de la arteria era normal (Figuras 13 y 14). La severidad de las lesiones en la arteria descendente anterior no se asoció con el tratamiento con aspirina o placebo (Tabla 5).

El examen histológico del miocardio en la tercera loncha mostró la presencia de un escaso número de leucocitos polimorfonucleares (puntuación media 0.2 ± 0.2), linfocitos (0.1 ± 0.1) y plaquetas (0.1 ± 0.1) en los pequeños vasos miocárdicos de la región control, sin diferencias entre los grupos de tratamiento, así como la ausencia de hemorragia o edema. En el área en riesgo se observó un contenido aumentado de plaquetas y de leucocitos (Figura 15) y cierto grado de hemorragia y edema. La magnitud de la acumulación de leucocitos polimorfonucleares y la hemorragia fueron mayores en los animales sometidos a daño intimal coronario que en los animales sin daño intimal, mientras que no se observaron diferencias en el contenido de plaquetas ni en los otros parámetros analizados (Tabla 6). Los hallazgos del análisis histológico en el área en riesgo fueron similares en los animales tratados con aspirina que en los que recibieron placebo.

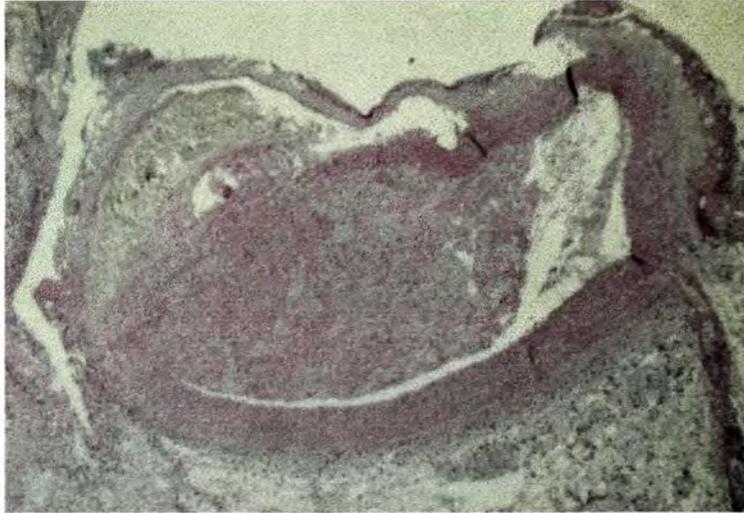


Figura 12. Apariencia histológica de la arteria descendente anterior en el lugar de la ligadura coronaria en un animal que presentó reoclusión durante el periodo de reperfusión. Un trombo fibrinoplaquetario ocupa la luz del vaso. Hematoxilina y eosina, x25.

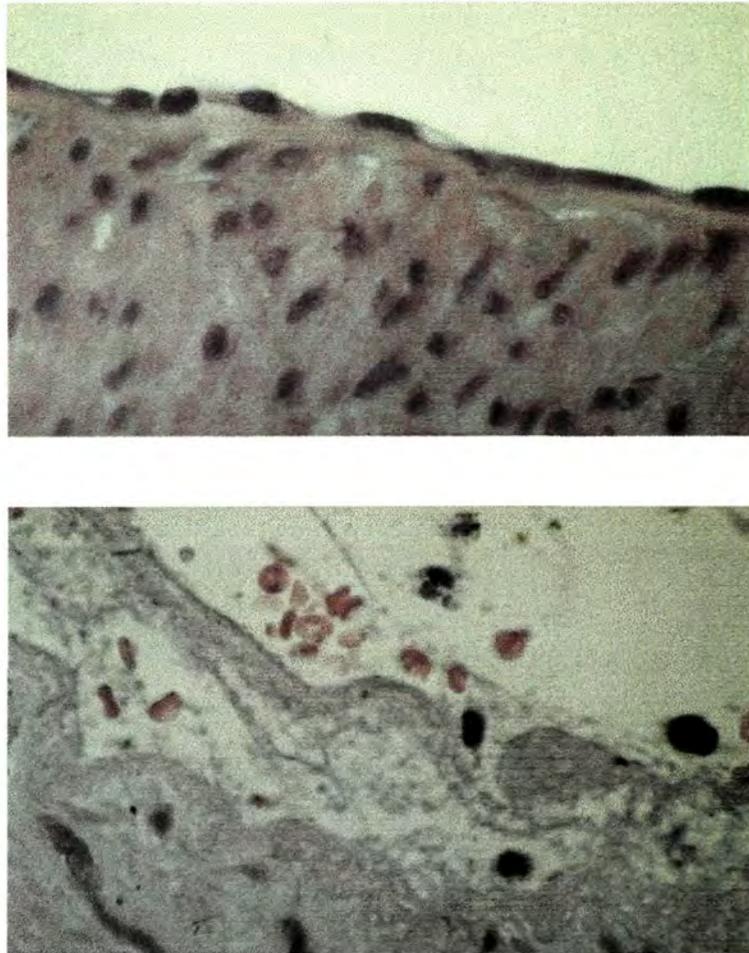


Figura 13. Ejemplos representativos del aspecto de la arteria descendente anterior en un punto distal a la oclusión en dos animales de la serie B. Arriba, animal sin cateterismo intracoronario, en el que el endotelio está intacto. Abajo, animal sometido a daño intimal, en el que el endotelio ha desaparecido y existe un depósito de fibrina, plaquetas y otras células sanguíneas sobre la íntima dañada. Hematoxilina y eosina, x400.

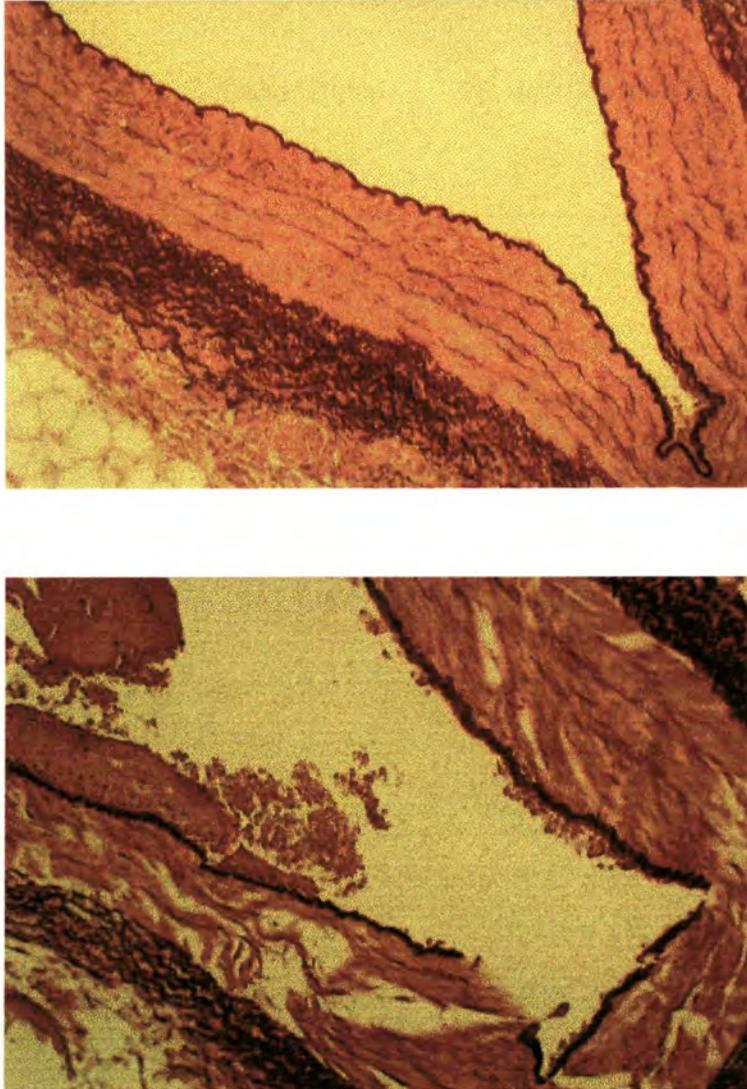


Figura 14. Ejemplos representativos del aspecto de la arteria descendente anterior en un punto distal a la oclusión en dos animales de la serie B. Arriba, animal sin cateterismo intracoronario, en el que la lámina elástica interna está íntegra. Abajo, animal con daño intimal, en el que se observan varias zonas de rotura de dicha lámina, así como trombosis mural. Tinción de Van Gieson, x50.

Tabla 5. Estimación histológica semicuantitativa del daño intimal en la descendente anterior distal al lugar de la ligadura coronaria (serie B)

		Daño intimal (n = 18)	No daño intimal (n = 18)	Total (n = 36)
Placebo (n = 18)	DE =	2.0 ± 0.0 *	0.0 ± 0.0	1.0 ± 0.3
	DEI =	1.0 ± 0.3 †	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.2
	TRO =	1.1 ± 0.4 †	0.0 ± 0.0	0.6 ± 0.2
	PMN =	0.9 ± 0.3 *	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.2
Aspirina (n = 18)	DE =	1.8 ± 0.2 *	0.1 ± 0.1	0.9 ± 0.2
	DEI =	1.0 ± 0.3 †	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.2
	TRO =	1.6 ± 0.4 †	0.1 ± 0.1	0.8 ± 0.3
	PMN =	1.1 ± 0.2 *	0.1 ± 0.2	0.6 ± 0.2
Total (n = 36)	DE =	1.9 ± 0.1 *	0.1 ± 0.1	1.0 ± 0.2
	DEI =	1.0 ± 0.2 *	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.1
	TRO =	1.4 ± 0.3 *	0.1 ± 0.1	0.7 ± 0.2
	PMN =	1.0 ± 0.2 *	0.1 ± 0.1	0.5 ± 0.1

DE, denudación endotelial (escala 0 – 2); DEI, daño de la lámina elástica interna (escala 0 – 2); TRO, trombosis (escala 0 – 3); PMN, deposición subendotelial de leucocitos polimorfonucleares (escala 0 – 3). *P < 0.001 y † P < 0.01 con respecto a los animales sin daño intimal. Aunque las puntuaciones se expresan como media ± error estándar por motivos descriptivos, todas las comparaciones se han efectuado con tests no paramétricos (prueba U de Mann-Whitney).

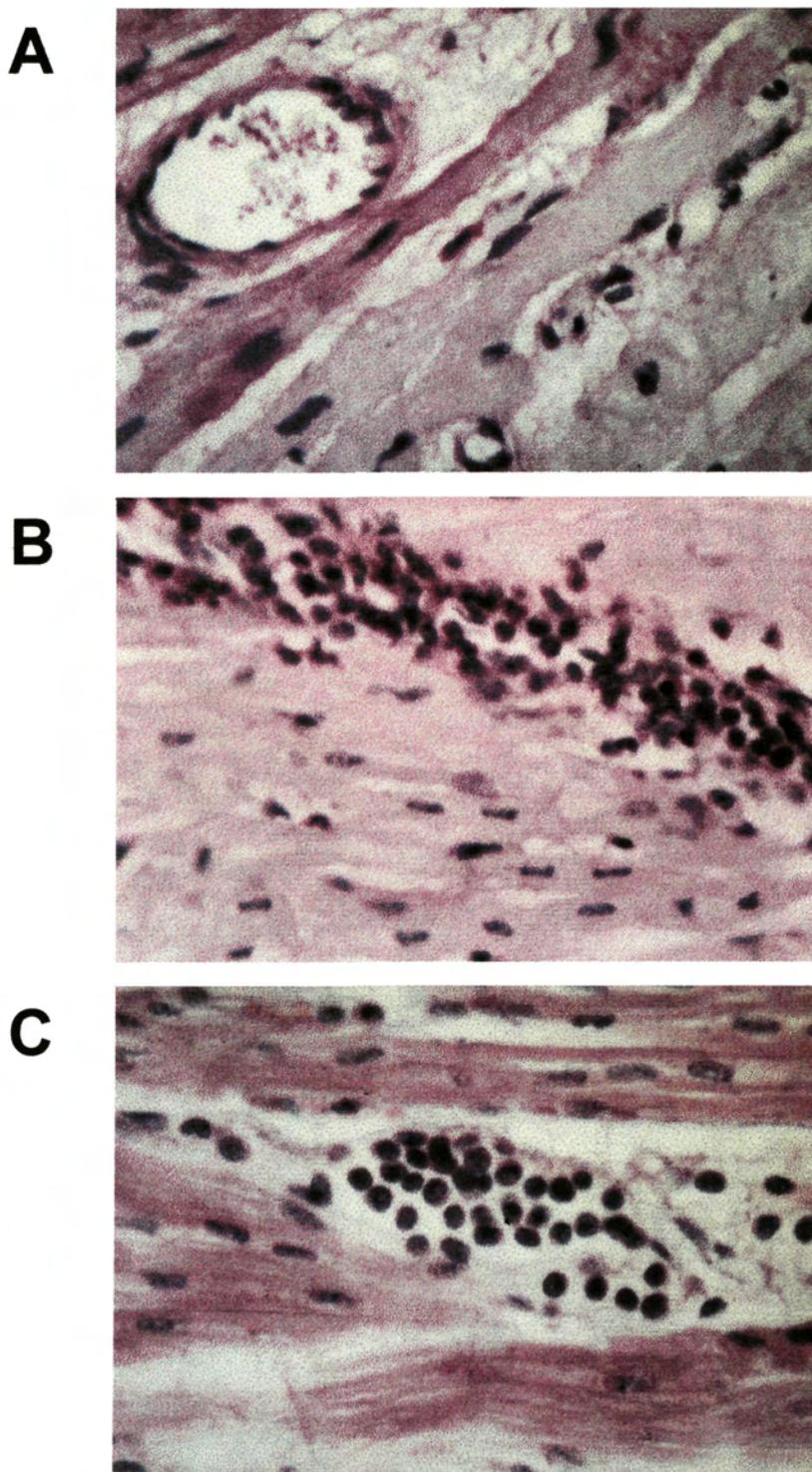


Figura 15. Hallazgos del examen histológico del miocardio tras 48 minutos de oclusión coronaria y 6 horas de reperfusión (serie B). A, plaquetas en el interior de una arteriola, en una zona con necrosis miocárdica en bandas de contracción (PAS, x100). B, capilar cuya luz está ocupada por un gran número de leucocitos polimorfonucleares (PAS, x100). C, abundantes linfocitos en el interior de un capilar en un borde lateral del área en riesgo (hematoxilina y eosina, x100).

Tabla 6. Resultado del análisis histológico semicuantitativo en la tercera loncha miocárdica en los cuatro grupos de tratamiento (serie B)

		Daño intimal (n = 18)	No daño intimal (n = 18)	Total (n = 36)
Placebo (n = 18)	PMNs =	1.4 ± 0.3	1.1 ± 0.3	1.3 ± 0.2
	Linfocitos =	0.8 ± 0.3	0.6 ± 0.2	0.7 ± 0.2
	Plaquetas =	0.6 ± 0.3	1.1 ± 0.5	0.9 ± 0.3
	Hemorragia =	0.7 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.5 ± 0.1
	Edema =	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.1
Aspirina (n = 18)	PMNs =	1.8 ± 0.3 *	0.9 ± 0.3	1.3 ± 0.2
	Linfocitos =	1.0 ± 0.2	1.2 ± 0.3	1.1 ± 0.2
	Plaquetas =	1.2 ± 0.5	0.6 ± 0.2	0.8 ± 0.3
	Hemorragia =	1.1 ± 0.2 *	0.5 ± 0.2	0.8 ± 0.1
	Edema =	1.0 ± 0.2	0.8 ± 0.2	0.9 ± 0.1
Total (n = 36)	PMNs =	1.6 ± 0.2 *	1.0 ± 0.2	1.3 ± 0.2
	Linfocitos =	0.9 ± 0.2	0.9 ± 0.2	0.9 ± 0.1
	Plaquetas =	0.9 ± 0.3	0.8 ± 0.3	0.8 ± 0.2
	Hemorragia =	0.9 ± 0.1 *	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.1
	Edema =	0.9 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.1

PMNs, leucocitos polimorfonucleares. El contenido de PMNs y linfocitos se valoró con una escala de 0 a 3, y el contenido de plaquetas, la hemorragia y el edema con una escala de 0 a 4. *P < 0.05 con respecto a los animales sin daño intimal. Aunque las puntuaciones se expresan como media ± error estándar por motivos descriptivos, todas las comparaciones se han efectuado con tests no paramétricos (prueba U de Mann-Whitney).

7. EXPERIMENTOS ADICIONALES: MAGNITUD DE LA EMBOLIZACIÓN DE PLAQUETAS AL MIOCARDIO DESDE UN TROMBO MURAL INTRACORONARIO

7.1. Datos hemodinámicos y arritmias ventriculares

Los datos hemodinámicos en los animales de esta serie se resumen en la Tabla 7. La frecuencia cardiaca aumentó ligeramente después de la oclusión coronaria, y se mantuvo estable durante el periodo de reperfusión. La presión aórtica no se modificó significativamente durante el experimento. Al iniciar el experimento, el flujo sanguíneo medio en la descendente anterior era 13 ± 1 ml/min. Tras el daño intimal, 24 animales desarrollaron un promedio de 12 ± 1 variaciones cíclicas del flujo en la arteria descendente anterior. El número medio de variaciones cíclicas del flujo en cada grupo fue de 9 ± 2 en los animales sin oclusión coronaria, 17 ± 3 en los animales con 25 min de oclusión, 14 ± 2 en los animales con 48 min de oclusión sin aspirina, y 7 ± 2 en aquellos con 48 min de oclusión coronaria con aspirina ($P < 0.05$ para la comparación entre este grupo y el resto de grupos con oclusión coronaria). Seis de los animales en los que se ligó la descendente anterior presentaron fibrilación ventricular durante el periodo de oclusión coronaria, 30 ± 4 min tras la oclusión, y 11 durante los minutos iniciales de la reperfusión.

7.2. Depósito de plaquetas en la descendente anterior y acumulación en el miocardio

El recuento de plaquetas en sangre al final del experimento fue en promedio de $404 \pm 23 \times 10^9$ plaquetas/l, sin diferencias entre los grupos de tratamiento. En todos los animales se detectó un contenido aumentado de plaquetas depositadas en la arteria descendente anterior con respecto a la coronaria derecha (1847 ± 626 vs. $23 \pm 5 \times 10^3$ plaquetas/cm², respectivamente, $P = 0.009$). En la Figura 16 se resumen los resultados de la cuantificación

Tabla 7. Datos hemodinámicos en la serie adicional

	Basal		15 min OC		48 min OC		15 min reperusión		2 h reperusión	
	FC (l.p.m.)	PAo media (mmHg)	FC (l.p.m.)	PAo media (mmHg)	FC (l.p.m.)	PAo media (mmHg)	FC (l.p.m.)	PAo media (mmHg)	FC (l.p.m.)	PAo media (mmHg)
No OC (n=6)	75±2	101±3 *	--	--	--	--	80±5	90±5	102±13	93±5
25 min OC (n=6)	76±6	73±7 †	77±17	75±10	--	--	68±16	70±9	103±14	74±16
48 min OC (n=6)	85±10	92±7	75±8	87±7	92±20	89±10	83±17	90±3	84±14	87±4
48 min OC+AAS (n=8)	88±7	77±6	91±8	86±7	96±7	86±4	91±6	86±4	98±7	90±6
Total (n=26)	82±3	85±4	83±6	84±4	95±8	88±4	83±4	86±3	97±6	88±4

*P<0.05 con respecto a los grupos con 25 minutos de OC y 48 minutos de OC+AAS; †P<0.05 con respecto al grupo con 48 minutos de OC. OC, oclusión coronaria; PAo, presión aórtica; AAS, aspirina. En el primer grupo, las dos últimas mediciones fueron tomadas 15 minutos y 2 horas después del daño intimal coronario, respectivamente.

del contenido miocárdico de plaquetas. En el territorio control, el contenido de plaquetas fue en promedio de $13.0 \pm 1.2 \times 10^6$ plaquetas/g, sin diferencias entre los grupos. En el territorio dependiente de la descendente anterior, el contenido de plaquetas fue similar al de la región control ($129 \pm 19\%$, $P = \text{NS}$) en los animales que no fueron sometidos a oclusión coronaria, pero estuvo significativamente aumentado en los restantes, y este incremento fue directamente proporcional a la duración de la oclusión ($172 \pm 20\%$ en los animales con 25 minutos de oclusión y $312 \pm 71\%$ en aquellos con 48 minutos de oclusión sin aspirina, $P < 0.05$ con respecto a los grupos previos). En los animales tratados con aspirina, el contenido de plaquetas en el miocardio reperfundido representó un $483 \pm 148\%$ del valor en el territorio control ($P = \text{NS}$ con respecto a los animales con 48 minutos de oclusión coronaria que no recibieron aspirina). El contenido de plaquetas en el miocardio dependiente de la descendente anterior no se correlacionó con la magnitud del depósito de plaquetas en la arteria ni con el número de variaciones cíclicas del flujo (Figura 17).

7.3. Acumulación miocárdica de leucocitos polimorfonucleares

La actividad de la mieloperoxidasa en la región control fue en promedio $14 \pm 3 \times 10^{-3}$ UI/g (7 ± 2 , 21 ± 8 , y $16 \pm 4 \times 10^{-3}$ UI/g, respectivamente, en los animales sometidos a 25 minutos de oclusión coronaria, 48 minutos de oclusión sin aspirina, y 48 minutos de oclusión con aspirina, $P = \text{NS}$). En el miocardio reperfundido, la actividad de la mieloperoxidasa fue en promedio de $54 \pm 2 \times 10^{-3}$ UI/g ($P = 0.03$ con respecto al valor en el miocardio control), sin diferencias significativas entre los grupos (25 ± 15 , 34 ± 10 y $92 \pm 36 \times 10^{-3}$ IU/g, respectivamente, $P = \text{NS}$). La actividad de la mieloperoxidasa en el miocardio reperfundido no se correlacionó con la magnitud del depósito de plaquetas en la descendente anterior ni con el número de variaciones cíclicas del flujo, pero se correlacionó estrechamente con la radioactividad específica en el miocardio reperfundido (Figura 18).

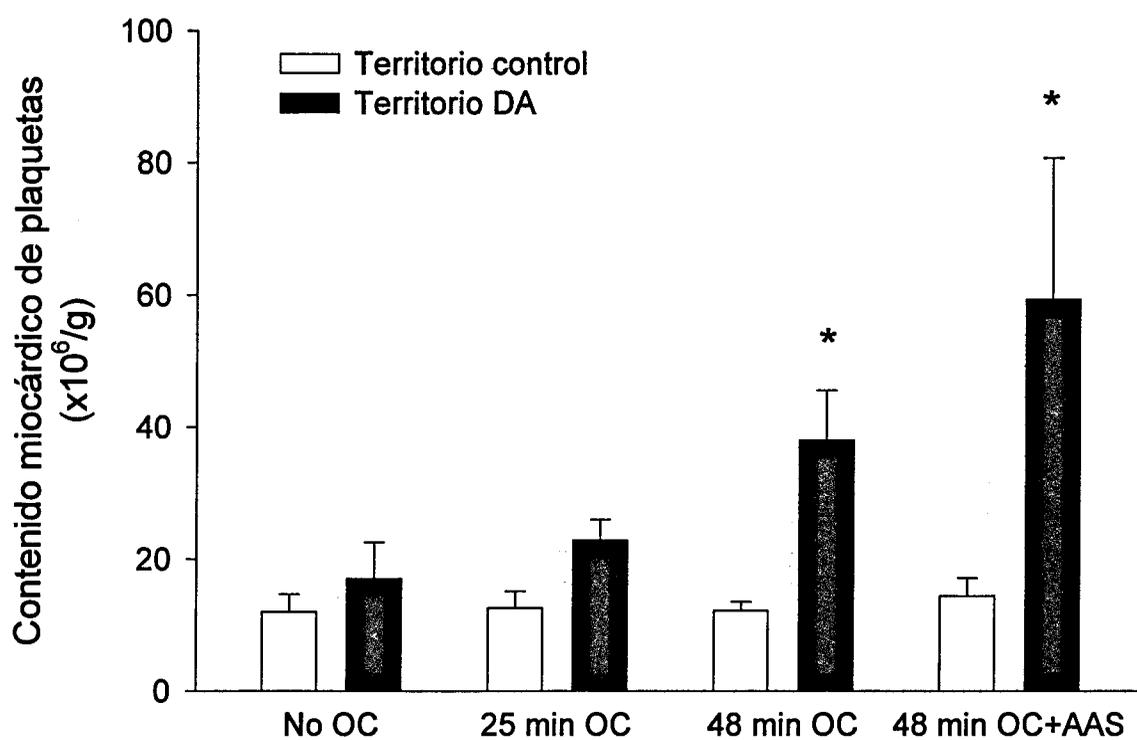


Figura 16. Contenido de plaquetas en el miocardio dependiente de la descendente anterior (DA) y en el miocardio control en los cuatro grupos de tratamiento. OC, oclusión coronaria, AAS, aspirina. *P < 0.05 con respecto a los primeros dos grupos.

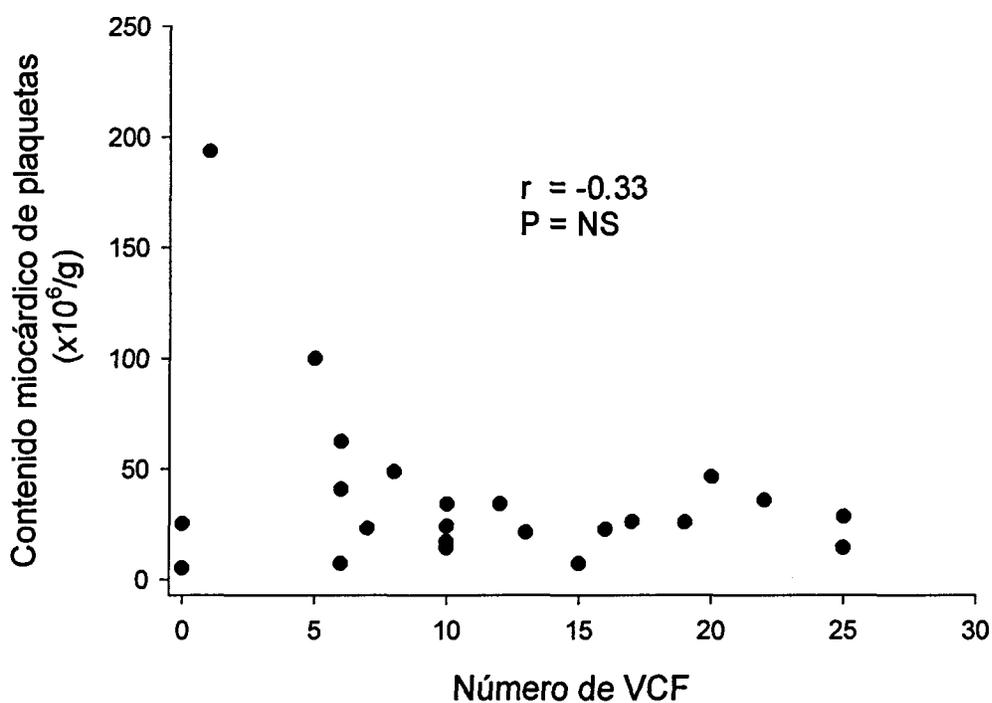
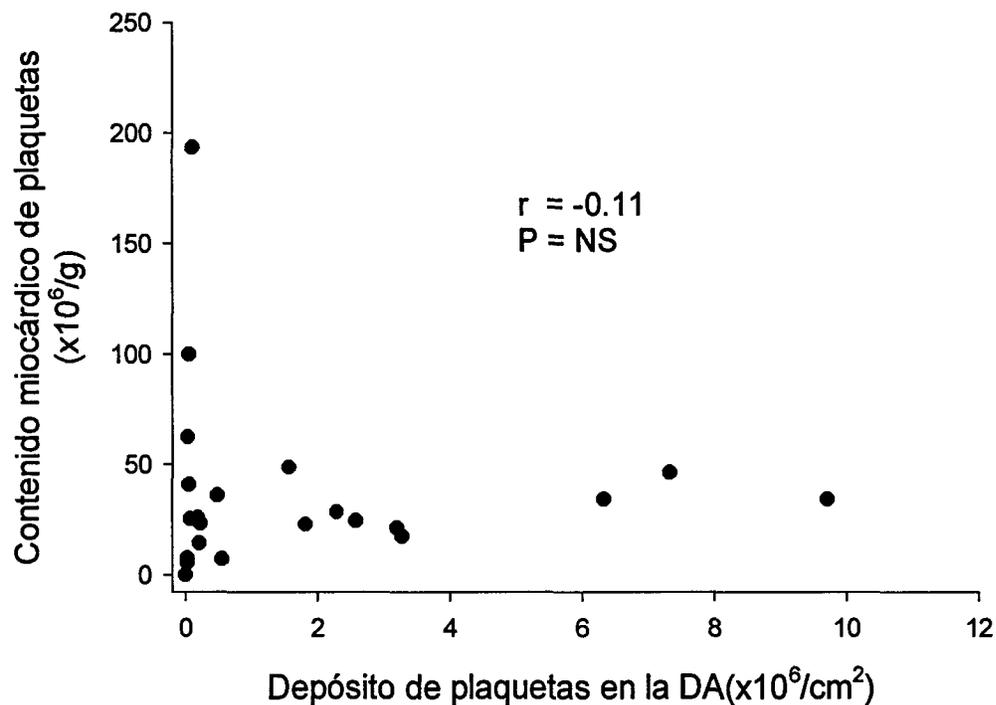


Figura 17. Representación de los valores individuales del contenido miocárdico de plaquetas en función de la magnitud del depósito de plaquetas en la descendente anterior (DA, gráfico superior) y del número de variaciones cíclicas del flujo (VCF, gráfico inferior). La acumulación miocárdica de plaquetas no se correlacionó con ninguno de estos parámetros.

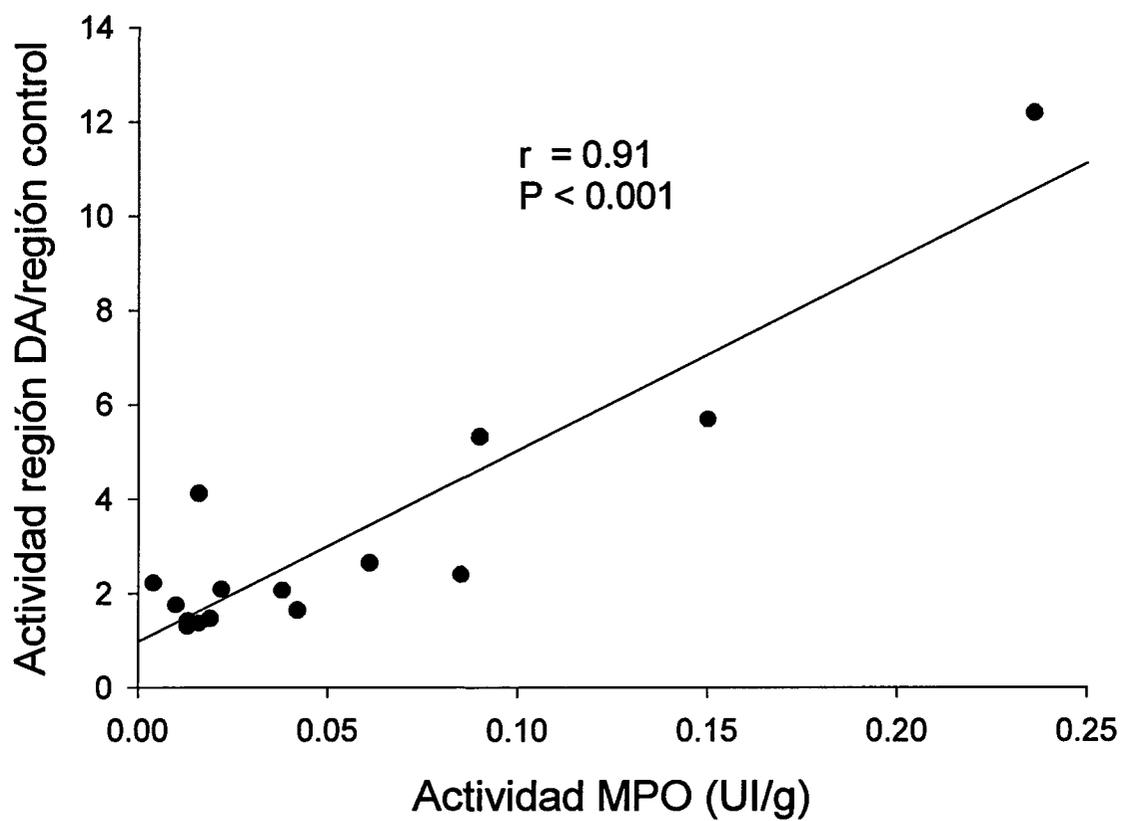


Figura 18. Correlación entre la actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO) y la radioactividad específica en el miocardio dependiente de la descendente anterior (DA), indicativas del contenido de leucocitos polimorfonucleares y plaquetas, respectivamente.

7.4. Análisis histoquímico

En los animales sometidos a 48 minutos de oclusión coronaria, el tamaño del infarto fue en promedio 3.1 ± 1.7 g ($2.3 \pm 1.1\%$ de la masa ventricular) en aquellos que no recibieron aspirina y 7.2 ± 2.2 g ($5.3 \pm 1.7\%$) en los que recibieron dicho fármaco ($P = NS$). En la tercera loncha, el tamaño del infarto se correlacionó significativamente con la radioactividad específica ($r = 0.52$, $P = 0.05$) y con la actividad de la mieloperoxidasa ($r = 0.70$, $P = 0.04$).

7.5. Análisis histológico

La arteria descendente anterior en su porción distal se hallaba permeable en 12 de los 14 animales sometidos a 48-minutos de oclusión coronaria. En los dos restantes, la luz del vaso estaba severamente estrechada por un trombo rico en plaquetas, fibrina y eritrocitos. En el examen histológico del miocardio no se observaron agregados plaquetarios, leucocitos polimorfonucleares o focos de hemorragia en el territorio control. En el miocardio reperfundido, el análisis histológico mostró la presencia de ocasionales microémbolos arteriolares sólo en dos animales (14%), aquéllos con una trombosis coronaria extensa que afectaba la porción distal de la descendente anterior, y un microémbolo en otro animal (Figura 19). En 10 animales, sin embargo, se observó la presencia de abundantes plaquetas, en ocasiones formando pequeños agregados con leucocitos polimorfonucleares, adheridas a las paredes de los pequeños vasos (Figura 20), cuya luz ocluían en ocasiones. Estas células se localizaban de forma predominante en áreas de necrosis miocárdica. Sólo en tres animales se observó una extravasación significativa de hematíes.

7.6. Estudios angiográficos

La apariencia angiográfica de la arteria descendente anterior al inicio del

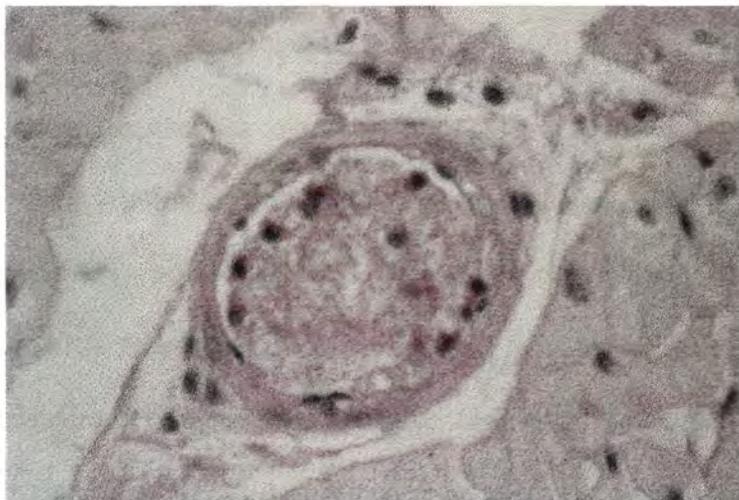


Figura 19. Microtrombo formado por plaquetas, fibrina y algunos leucocitos polimorfonucleares que ocluye totalmente la luz de una arteriola del área en riesgo en uno de los animales con trombosis coronaria extensa, cuyo origen se interpretó como embólico. Hematoxilina y eosina, x100.

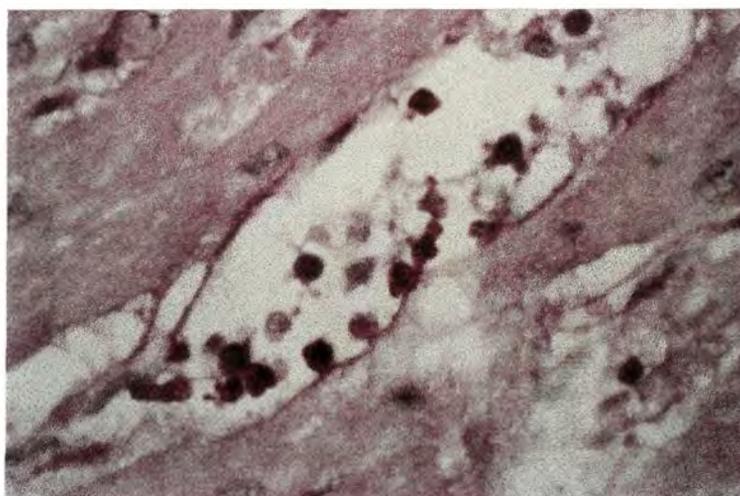


Figura 20. Microfotografía obtenida en área en riesgo tras 48 minutos de oclusión coronaria y dos horas de reperfusión. Se observa un capilar con edema subendotelial, y leucocitos polimorfonucleares y plaquetas en relación con su superficie endotelial. PAS, x100.

experimento era normal en todos los casos. En el nadir de las variaciones cíclicas del flujo, la angiografía coronaria mostró una estenosis severa en el lugar del daño intimal, con llenado lento del vaso distal, o una oclusión subtotal. Inmediatamente después de la recuperación del flujo, la angiografía mostró una estenosis residual de severidad variable, en ocasiones con imagen sugestiva de trombo intracoronario, y un llenado del vaso distal mejorado o totalmente normalizado (Figura 21). En ningún caso estas inyecciones realizadas tras las recuperaciones cíclicas del flujo demostraron la obstrucción aguda de alguna rama distal de la descendente anterior sugestiva de embolización.

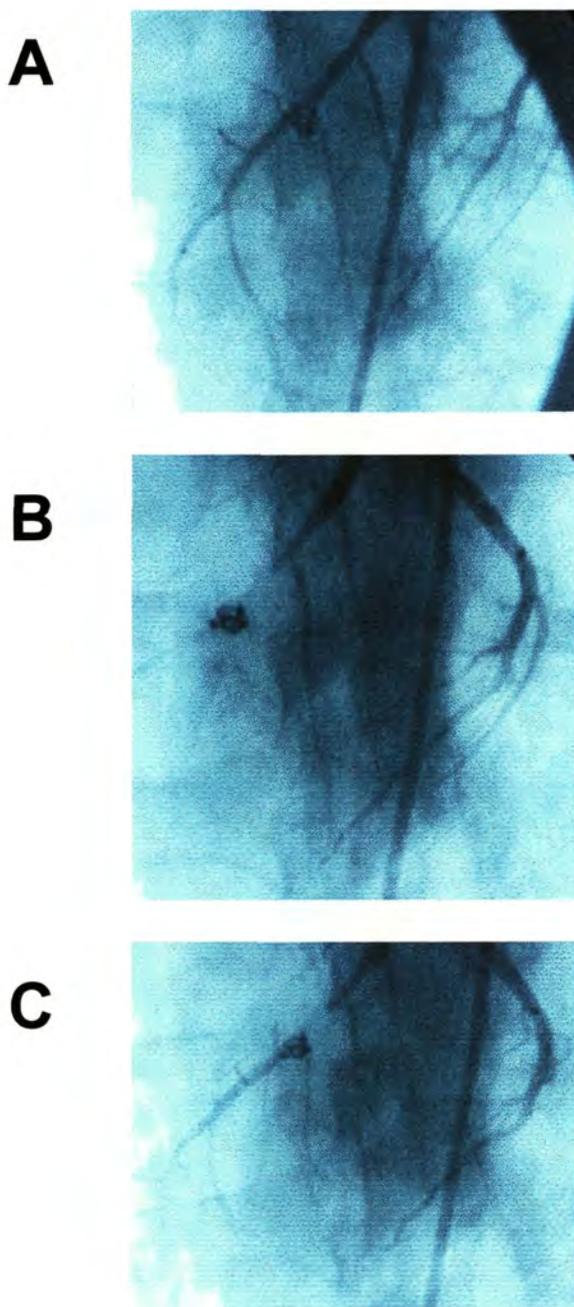


Figura 21. Ejemplo representativo de un experimento con angiografía coronaria durante las variaciones cíclicas del flujo. A) Antes del daño intimal, el aspecto angiográfico y el llenado de la arteria descendente anterior son normales. B) En el nadir del flujo, la arteria está prácticamente ocluida en su porción media. C) Inmediatamente después de una de las bruscas recuperaciones del flujo queda una estenosis residual severa, pero el llenado del vaso distal es normal y no se observan amputaciones de sus ramas. En las tres fotografías puede verse el medidor de flujo alrededor de la arteria.

DISCUSIÓN

1. HALLAZGOS FUNDAMENTALES

En este estudio se investigaron las repercusiones que una trombosis coronaria no oclusiva, inducida mediante cateterismo intracoronario y daño de la íntima arterial, tiene sobre el miocardio subyacente. Se analizó el efecto del daño intimal sobre la magnitud de la hiperemia tras una oclusión coronaria de breve duración, y sus consecuencias sobre el tamaño del infarto después de una oclusión prolongada, así como la modificación de esta influencia por la aspirina. Finalmente, se cuantificó la magnitud de la embolización de plaquetas al miocardio desde una lesión coronaria con trombosis dinámica y reducciones cíclicas del flujo.

El daño intimal coronario produjo una atenuación de la respuesta hiperémica después de 30 minutos de oclusión coronaria, y se asoció con una tendencia a un menor flujo sanguíneo regional y con una necrosis miocárdica de mayor tamaño después de 48 minutos de oclusión. El tratamiento con aspirina se acompañó de un mayor flujo sanguíneo miocárdico regional tras la reperfusión y neutralizó la influencia deletérea del daño intimal coronario sobre el tamaño del infarto, si bien no redujo la necrosis en los animales sin daño intimal. La trombosis coronaria dinámica con reducciones cíclicas del flujo no se acompañó de una embolización significativa de microtrombos plaquetarios al miocardio distal. Por contraste, la reperfusión después de una ligadura coronaria transitoria sí indujo una acumulación de plaquetas en el miocardio, y la magnitud de esta acumulación fue proporcional a la duración de la isquemia, se asoció con el contenido de leucocitos polimorfonucleares y con el tamaño del infarto y no se modificó por la administración de aspirina.

Estos resultados demuestran que la trombosis coronaria no oclusiva tiene una

influencia deletérea sobre el miocardio subyacente, que puede contribuir a un mayor tamaño de la necrosis tras la reperfusión y que puede ser contrarrestada por la aspirina. Además, los resultados muestran que estos efectos de la trombosis coronaria sobre el miocardio no dependen de una obstrucción significativa del lecho vascular distal por múltiples émbolos de plaquetas.

2. EFECTO DEL DAÑO INTIMAL CORONARIO SOBRE LA RESPUESTA HIPERÉMICA TRAS UNA OCLUSIÓN CORONARIA TRANSITORIA

El daño intimal coronario indujo una amortiguación significativa de la respuesta hiperémica después de una oclusión coronaria de 30 minutos de duración, que fue evidente ya desde los primeros minutos tras la liberación de la oclusión y que se mantuvo a lo largo de las cinco horas del periodo de reperfusión. Este efecto concuerda con los hallazgos previamente descritos de un flujo endocárdico disminuido⁹⁷ y una resistencia vascular aumentada^{98,99} distalmente a un trombo mural coronario.

La atenuación de la respuesta hiperémica en los animales con daño intimal puede explicarse por varios mecanismos. En primer lugar, en estos animales la presencia de un trombo mural podría causar una disminución del calibre de la luz arterial, que si alcanzara un valor crítico limitaría las posibilidades de incremento del flujo^{19,21,92-94}. En segundo lugar, el daño intimal podría haber inducido una obstrucción del lecho vascular distal por embolismos repetidos de material trombótico. Finalmente, el daño intimal podría haber desencadenado cambios importantes en el tono vascular coronario, mediante la liberación de sustancias vasoconstrictoras^{17,27,29,56,57,63,67-69} o la disminución en la producción de sustancias vasodilatadoras^{60,71}, favoreciendo la vasoconstricción en la zona adyacente y en el lecho distal⁵⁵⁻⁵⁹. Además, el depósito local de leucocitos polimorfonucleares

inducido por el daño intimal⁴⁹⁻⁵¹ podría haber contribuido a la vasoconstricción coronaria^{51,61,192,193}.

Existen varios argumentos que sugieren indirectamente que, en el presente estudio, la vasoconstricción puede haber desempeñado un papel prominente como causa del menor incremento del flujo coronario en los animales con daño intimal. Por un lado, el hecho de que la atenuación de la hiperemia fuera ya manifiesta desde los primeros minutos del periodo de reperfusión va en contra de que esté causada por una estenosis crítica o una embolización masiva de plaquetas al miocardio. Por otro lado, la observación de un contenido miocárdico de plaquetas similar en los animales con daño intimal que en aquéllos no sometidos a cateterismo intracoronario sugiere que no existió una obstrucción sostenida del lecho vascular distal por émbolos plaquetarios. La falta de asociación, en la serie adicional, entre el contenido miocárdico de plaquetas y la severidad de la trombosis en la arteria epicárdica, así como los resultados del análisis histológico, refuerzan esta interpretación.

3. EFECTO DEL DAÑO INTIMAL CORONARIO SOBRE EL FLUJO SANGUÍNEO REGIONAL Y SOBRE EL TAMAÑO DEL INFARTO TRAS UNA OCLUSIÓN CORONARIA PROLONGADA, Y SU MODIFICACIÓN POR LA ASPIRINA

3.1. Efectos del daño intimal coronario

Antes de la oclusión coronaria, los valores del flujo sanguíneo miocárdico regional en los animales de la serie B estaban dentro del rango normal^{187,188}. En los animales que recibieron placebo, el daño intimal indujo una atenuación no significativa de la respuesta

hiperémica y un aumento significativo del tamaño del infarto después de 48 minutos de oclusión coronaria.

Las consideraciones expresadas en el apartado anterior respecto a los posibles mecanismos del efecto perjudicial del daño intimal sobre la hiperemia reactiva son aplicables en relación a su influencia sobre el flujo sanguíneo miocárdico regional y el tamaño del infarto. Además, después de una isquemia prolongada como la que se produjo en esta serie, debe tenerse también en cuenta la posible contribución de una respuesta inflamatoria aumentada a los efectos deletéreos del daño intimal¹⁴²⁻¹⁴⁴. Sin embargo, y aunque el contenido miocárdico de leucocitos polimorfonucleares estimado mediante el análisis histológico en la serie B fue mayor en los animales sometidos a daño intimal coronario, no puede descartarse que esta respuesta inflamatoria aumentada sea meramente una consecuencia de una necrosis miocárdica más extensa en estos animales, como se discutirá más adelante (apartado 8).

3.2. Efectos de la aspirina

El tratamiento con aspirina 90 minutos antes de la oclusión coronaria se acompañó de un flujo sanguíneo miocárdico regional más elevado tras la reperfusión, y neutralizó significativamente la influencia perjudicial del daño intimal sobre el tamaño del infarto. Entre los animales con daño intimal coronario, aquéllos tratados con aspirina tuvieron infartos más pequeños, mientras que entre los animales sin daño intimal, el tratamiento con aspirina se asoció con infartos de mayor tamaño, aunque estas diferencias no alcanzaron la significación estadística.

Teniendo en cuenta los resultados de los experimentos con plaquetas marcadas, es muy poco probable que el efecto favorable de la aspirina en los animales con daño intimal haya sido debido a una menor embolización o agregación microvascular de plaquetas. El

beneficio de la aspirina no puede explicarse tampoco por su efecto sobre la reoclusión coronaria, dado que los animales en los que se identificó reoclusión fueron excluidos del estudio. Sin embargo, la acción antitrombótica de la aspirina sobre la arteria epicárdica puede haber sido beneficiosa incluso en los animales sin reoclusión, ya que este fármaco es capaz de disminuir el depósito de plaquetas sobre la íntima lesionada^{55,61,149-151}, la producción de sustancias tóxicas por las plaquetas activadas⁶², y la vasoconstricción resultante de dicha activación^{55,58,61,152,170}, así como la adhesión a la pared arterial lesionada y la activación de los leucocitos polimorfonucleares¹⁷⁰.

En la serie adicional, se observó una tendencia a un mayor tamaño del infarto en los animales tratados con aspirina, lo que parece contradecir los resultados de la serie B. Esta aparente discrepancia podría explicarse, en parte, por el periodo de reperfusión más prolongado en la serie B (6 horas vs. 2 horas en la serie adicional), que podría ser necesario para que se manifestaran los efectos beneficiosos de la aspirina sobre el infarto. Sin embargo, los resultados sobre el tamaño del infarto en la serie adicional deben ser interpretados con cautela, al no estar corregidos por el tamaño del área en riesgo.

La ausencia de efecto beneficioso de la aspirina en los animales sin daño intimal concuerda con los resultados de estudios previos en diferentes modelos experimentales de isquemia y reperfusión^{128,129,131,134,176,177}. Las consecuencias que la modificación de la función plaquetaria puede tener sobre el tamaño del infarto han sido poco estudiadas en presencia de daño intimal o de trombosis coronaria mural. Sin embargo, se ha observado que la trombocitopenia⁹⁴ y el ibuprofén¹⁰⁵ son beneficiosos en presencia de una estenosis coronaria residual, un escenario que favorece la trombosis. Recientemente, Libersan *et al.*¹⁹⁴ analizaron el efecto de varias dosis de aspirina en perros sometidos a 90 minutos de oclusión coronaria y seis horas de reperfusión a través de una estenosis residual crítica, y observaron que dicho fármaco no modificó significativamente el tamaño del infarto. Sin

embargo, en ese estudio la aspirina se administró justo antes de la reperfusión, y una dosis de 12 mg/kg, similar a la utilizada en nuestro estudio, se acompañó de una tendencia a un menor tamaño del infarto ($29 \pm 5\%$ del área en riesgo vs. $44 \pm 6\%$ en el grupo placebo)¹⁹⁴.

Considerados en conjunto, estos resultados sugieren que la aspirina podría tener efectos contrapuestos sobre el miocardio reperfundido, dependiendo de la presencia y la extensión del daño intimal y de la trombosis en la arteria epicárdica. En ausencia de trombosis, la inhibición de la ciclooxigenasa endotelial podría ser perjudicial para el miocardio, debido a una menor producción de sustancias protectoras^{128,129,177} y a una síntesis aumentada de sustancias tóxicas, como los leucotrienos¹⁹⁵. Por el contrario, en presencia de daño intimal y trombosis, este efecto perjudicial estaría ampliamente contrarrestado por las consecuencias beneficiosas del antagonismo de la ciclooxigenasa plaquetaria.

4. MAGNITUD DE LA EMBOLIZACIÓN PLAQUETARIA AL MIOCARDIO SUBSIDIARIO DE UNA ARTERIA CON TROMBOSIS DINÁMICA, Y SU MODIFICACIÓN POR LA ASPIRINA

En la serie A, la acumulación de plaquetas en el miocardio después de 30 minutos de oclusión coronaria fue de magnitud similar en los animales con daño intimal coronario que en aquéllos sin daño intimal. En la serie adicional, el daño intimal coronario con reducciones cíclicas del flujo tampoco se acompañó de un aumento significativo del contenido de plaquetas en el miocardio subyacente. El contenido miocárdico de plaquetas estaba aumentado después de una oclusión coronaria transitoria, pero no se correlacionó con la magnitud del depósito de plaquetas en la arteria lesionada ni con el número de variaciones cíclicas del flujo, y no se redujo por el tratamiento con aspirina, a pesar de que dicho

fármaco disminuyó significativamente el número de variaciones cíclicas del flujo. Además, en el análisis histológico apenas se observaron microtrombos plaquetarios en las arteriolas miocárdicas sugestivos de tener un origen embólico, y en los experimentos con angiografía coronaria no se detectaron oclusiones de ramas de la descendente anterior que hicieran pensar en una embolización macroscópica.

La posible relevancia de la microembolización coronaria a partir de un trombo mural ha sido sugerida por el hallazgo de microtrombos fibrinoplaquetarios en los pequeños vasos miocárdicos en pacientes con enfermedad coronaria fallecidos súbitamente¹⁰¹⁻¹⁰⁴. Sin embargo, el mecanismo de producción de estos microtrombos es difícil de establecer, y en estos mismos estudios han sido atribuidos tanto a agregación local en los pequeños vasos como a embolización. No puede descartarse que el 29% de aumento en el contenido de plaquetas en el miocardio dependiente de la descendente anterior sobre el contenido en el territorio control observado en el presente estudio en los animales sin oclusión coronaria pudiera haber alcanzado la significación estadística con un mayor número de animales. Sin embargo, la pequeña magnitud de este aumento sugiere que la embolización desde un trombo coronario mural no es una causa relevante de obstrucción extensa y mantenida de los pequeños vasos miocárdicos situados aguas abajo del trombo. Esta aseveración se apoya también en los resultados de la serie A, en la que el daño intimal tampoco se asoció con un contenido miocárdico aumentado de plaquetas tras 30 minutos de oclusión coronaria y cinco horas de perfusión, en la falta de asociación entre el contenido miocárdico de plaquetas y la severidad de la trombosis coronaria, y en los resultados del análisis histológico y de los estudios angiográficos, estos últimos coincidentes con una observación previa realizada en el modelo canino⁸⁴. El hecho de que la aspirina no haya disminuido el contenido miocárdico de plaquetas a pesar de su eficacia sobre las reducciones cíclicas del flujo también sugiere que ambos

fenómenos son independientes. Teniendo en cuenta que las reducciones cíclicas del flujo se producen como resultado de una trombosis coronaria dinámica^{4,19,21,84}, la ausencia de una acumulación de plaquetas en el miocardio subyacente sugiere la existencia de una rápida desagregación de las plaquetas una vez que se han desprendido del trombo coronario, lo que les permitiría pasar a través del lecho capilar y alcanzar la circulación sistémica.

5. CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA DEL MODELO

El análisis histológico de un segmento de la arteria descendente anterior distal al lugar de la ligadura coronaria en los animales sometidos a 48 minutos de oclusión coronaria ha permitido validar el método de daño intimal coronario utilizado en el presente estudio. En todos los animales sometidos a cateterismo intracoronario se confirmó la existencia de denudación coronaria extensa, rotura de la lámina elástica interna y trombosis mural de mayor o menor severidad.

En la serie adicional, en la mitad de los animales en los que no se realizó una oclusión coronaria tuvo que aplicarse una constricción externa de la arteria para facilitar el desarrollo de reducciones cíclicas del flujo. Por contraste, en ausencia de tratamiento con aspirina, todos los animales sometidos a la ligadura de la descendente anterior desarrollaron reducciones cíclicas del flujo de forma espontánea después de la reperusión. Además, el número de reducciones cíclicas del flujo fue superior en estos animales que en aquéllos sin oclusión coronaria y que en los tratados con aspirina. Esta aparentemente mayor propensión de los animales con ligadura coronaria transitoria a desarrollar trombosis con variaciones cíclicas del flujo puede deberse en parte a que dicha intervención es capaz de distorsionar la forma del vaso y determinar cierto grado de

estenosis residual tras la reperfusión, y quizá también porque estos animales podrían tener un daño intimal más severo que el resto. En este sentido, tiene interés la observación de que, en el lugar de la ligadura, todos los animales tenían un daño de la íntima que, aunque poco extenso, era profundo, con rotura focal de la lámina elástica interna, lo que constituye un poderoso estímulo para la adhesión de plaquetas y la trombosis^{4,6,15}.

6. EFECTO DEL DAÑO INTIMAL Y DE LA ASPIRINA SOBRE LA REOCLUSIÓN CORONARIA

El 21.5% de los animales del presente estudio (series A y B) presentó reoclusión coronaria. Aunque la frecuencia de reoclusión fue ligeramente superior en los animales sometidos a cateterismo coronario y daño intimal que en los restantes animales, esta diferencia no alcanzó la significación estadística. El hecho de que en el lugar de la ligadura todos los animales tuvieran un daño profundo de la íntima puede explicar la falta de una relación más estrecha entre la asignación a daño intimal y la reoclusión coronaria.

En estudios previos realizados en diferentes modelos animales se ha demostrado el efecto protector de la aspirina contra la trombosis coronaria^{4,19,21,55,61,62,150,151}. Además, existe una amplia información sobre el beneficio de la aspirina contra la oclusión coronaria aguda en las más variadas situaciones clínicas^{9-11,155-164}. En el presente estudio, la administración endovenosa de aspirina 90 minutos antes de la oclusión disminuyó significativamente la incidencia de reoclusión coronaria y evitó por completo las reoclusiones permanentes en los animales de la serie B, y disminuyó el número de reducciones cíclicas del flujo en los animales de la serie adicional, lo que concuerda con esos estudios previos.

7. EFECTO DEL DAÑO INTIMAL Y DE LA ASPIRINA SOBRE LA CONTRACTILIDAD SEGMENTARIA Y LAS ARRITMIAS VENTRICULARES DURANTE LA ISQUEMIA Y LA REPERFUSIÓN

En los animales sometidos a 48 minutos de oclusión coronaria (serie B), los cambios que se produjeron en la longitud telediastólica y en la fracción de acortamiento sistólico en el territorio dependiente de la descendente anterior durante la oclusión coronaria y la reperfusión son los habituales en este modelo^{180,181,190}, y no fueron influidos de forma significativa por la provocación de daño intimal coronario ni por la administración de aspirina. Esta ausencia de modificación de la contractilidad segmentaria por la aspirina contradice en parte los resultados de algunos estudios previos en modelos más básicos, como en preparaciones musculares o en el corazón aislado de rata sometido a isquemia global, en los que la aspirina y otros antiinflamatorios no esteroideos habían mostrado un efecto inotrópico positivo^{196,197}. En comparación con los restantes animales, en el grupo que recibió placebo y daño intimal se observó durante los primeros 30 minutos de reperfusión una tendencia a una menor longitud telediastólica en el territorio reperfundido, que alcanzó valores claramente por debajo de los previos a la oclusión coronaria, y que podría reflejar una mayor densidad de miocitos hipercontraídos y de bandas de contracción y estar relacionada con el mayor tamaño del infarto en este grupo¹⁹⁸.

La incidencia de fibrilación ventricular tampoco se modificó por el daño intimal coronario o por el tratamiento con aspirina. En estudios previos en los que se ha analizado el efecto de la aspirina y de otros fármacos antiagregantes plaquetarios sobre las arritmias ventriculares durante la isquemia y la reperfusión miocárdicas se han obtenido resultados contrapuestos^{118,120,121}. Se ha descrito que la trombosis coronaria con reducciones cíclicas del flujo acarrea un riesgo de arritmias ventriculares, especialmente en el modelo

porcino²¹, y que los fármacos antiagregantes plaquetarios podrían reducir este riesgo¹¹⁷. En la serie adicional de nuestro estudio, sin embargo, ningún animal presentó arritmias ventriculares severas fuera del periodo de oclusión o de la reperusión inmediata, a pesar de la existencia de abundantes reducciones cíclicas del flujo coronario.

8. EFECTO DEL DAÑO INTIMAL CORONARIO Y DE LA ASPIRINA SOBRE LA ACUMULACIÓN DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES EN EL MIOCARDIO DESPUÉS DE UNA OCLUSIÓN CORONARIA TRANSITORIA

El daño intimal de la descendente anterior antes de la oclusión coronaria indujo el depósito de leucocitos polimorfonucleares en la pared arterial, lo que concuerda con observaciones previas⁴⁹⁻⁵¹. En ausencia de infarto, el daño intimal no favoreció la acumulación de leucocitos en el miocardio distal, según demostró el análisis de la mieloperoxidasa en los animales sometidos a 30 minutos de oclusión (serie A). De hecho, el contenido de leucocitos polimorfonucleares en el miocardio reperfundido no estaba aumentado con respecto al valor en el territorio control en ninguno de los dos grupos de esta serie, lo que puede explicarse por la breve duración de la oclusión coronaria¹⁴³.

Entre los animales con 48 minutos de oclusión (serie B), el contenido miocárdico de leucocitos polimorfonucleares estaba aumentado en los animales que habían sido sometidos a daño intimal coronario. La falta de demostración de que la activación de los leucocitos que se produce como consecuencia del daño intimal y la trombosis coronaria⁴³⁻⁴⁸ favorezca su acumulación en el miocardio subyacente, y los argumentos en contra de esta hipótesis citados previamente^{36,145}, junto con los resultados del análisis de la mieloperoxidasa en la serie A, sugieren que esta infiltración miocárdica por células inflamatorias no fue una consecuencia directa del daño intimal coronario. Por el contrario,

dado que después de una oclusión coronaria prolongada, como la que tuvo lugar en la serie B, se produce sistemáticamente una acumulación de leucocitos polimorfonucleares en el miocardio, cuya magnitud es proporcional al daño producido por la isquemia^{142,143,199-205}, es probable que el mayor contenido de neutrófilos en los animales con daño intimal se deba a que tenían infartos más extensos que los animales sin daño intimal. En este sentido, en la serie adicional se demostró la existencia de una correlación significativa entre la actividad de la mieloperoxidasa y el tamaño del infarto.

El tratamiento con aspirina no modificó de forma significativa el contenido miocárdico de leucocitos, tanto en la serie B como en la serie adicional, lo cual está de acuerdo con la falta de efecto de la aspirina o de otros inhibidores de la ciclooxigenasa sobre la respuesta inflamatoria que se produce durante la reperfusión observada en estudios previos^{128,173,201}.

9. MECANISMOS DE LA ACUMULACIÓN DE PLAQUETAS EN EL MIOCARDIO REPERFUNDIDO

En contraste con la falta de efecto del daño intimal coronario sobre el depósito microvascular de plaquetas, la reperfusión después de una ligadura coronaria transitoria sí se acompañó de una acumulación miocárdica de plaquetas marcadas. Además, la magnitud de esta acumulación fue proporcional a la duración de la isquemia y se correlacionó con el contenido de leucocitos polimorfonucleares y con el tamaño del infarto, lo que concuerda con observaciones previas^{105-109,111,112,194}. El análisis histológico confirmó estos hallazgos y mostró un extenso depósito de plaquetas, frecuentemente junto con neutrófilos, en los pequeños vasos del miocardio reperfundido, especialmente en las áreas de infarto.

Se ha demostrado que la adhesividad del endotelio microvascular está aumentada

después de la isquemia^{70,76,206}, pero ni los mecanismos del depósito de plaquetas en la microvasculatura del miocardio reperfundido ni sus consecuencias sobre la viabilidad de los miocitos se conocen con exactitud. Se han explorado diferentes estrategias para reducir la acumulación miocárdica de plaquetas durante la reperfusión o para modificar sus efectos, con resultados dispares^{105,106,108,109-112,123,126,127,194}.

En el presente estudio, el tratamiento con aspirina no redujo la magnitud de esta acumulación, e incluso los animales que recibieron aspirina mostraron una tendencia a un mayor contenido miocárdico de plaquetas, lo cual podría ser debido al azar, o estar relacionado con la tenencia a un mayor tamaño del infarto en estos animales. No es probable que la falta de efecto de la aspirina sobre el depósito microvascular de plaquetas sea debida a una dosis insuficiente, ya que la dosis que se administró es capaz de inhibir la agregación plaquetaria *in vitro* en este modelo¹⁷⁹, y en el presente estudio prolongó el tiempo de sangría y redujo las variaciones cíclicas del flujo coronario. En estudios previos realizados en perros, ni el ibuprofén¹⁰⁵ ni la aspirina a dosis de 2 a 12 mg/kg¹⁹⁴ disminuyeron la magnitud de la acumulación miocárdica de plaquetas durante la reperfusión, aunque en ninguno de estos estudios se determinó la existencia de reducciones cíclicas del flujo.

Esta falta de efecto de la aspirina sobre el depósito microvascular de plaquetas sugiere que otros mediadores distintos del tromboxano A₂ están involucrados. Se ha sugerido que la administración de abciximab, un antagonista de la glicoproteína IIb/IIIa, responsable en último término de la agregación plaquetaria, podría mejorar la perfusión microvascular después de la reperfusión en el infarto agudo de miocardio^{207,208}, pero las evidencias experimentales en este sentido son contradictorias. El antagonismo de la glicoproteína IIb/IIIa ha sido capaz de reducir la acumulación de plaquetas y el infarto cerebral después de una oclusión arterial cerebral transitoria en ratas²⁰⁹, pero no disminuyó la acumulación miocárdica de plaquetas o de neutrófilos ni el tamaño del infarto en un estudio

realizado recientemente en nuestro laboratorio en un modelo similar al utilizado en el presente estudio²¹⁰. Es posible que estas divergencias sean debidas, al menos en parte, al fármaco utilizado en cada uno de estos estudios, ya que algunos de los antagonistas de la glicoproteína IIb/IIIa bloquean también otros receptores que intervienen en la adhesión de plaquetas y leucocitos al endotelio reperfundido, como el receptor de la vitronectina^{211,212} o el receptor Mac-1^{213,214}.

La relación observada en el presente estudio entre la acumulación miocárdica de plaquetas y la actividad de la mieloperoxidasa sugiere que la primera podría estar influida por la presencia de leucocitos activados en la microcirculación. En este sentido, existen abundantes evidencias de una cooperación activa entre los leucocitos y las plaquetas durante la isquemia y la reperfusión miocárdicas, tanto en la sangre circulante^{36,215}, como en el trombo arterial^{30,49,170,216} o en la propia microcirculación^{109,112,123,217}.

10. CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS

Este estudio ha sido realizado en el modelo porcino, prácticamente carente de circulación colateral coronaria nativa²¹⁸, por lo que las diferencias que se han observado entre los diferentes grupos en el flujo miocárdico, el depósito de plaquetas y de leucocitos en el miocardio y el tamaño del infarto no pueden ser atribuidas a diferencias en la densidad de colaterales.

La determinación de la actividad de la mieloperoxidasa no permite estimar el número de leucocitos polimorfonucleares que han liberado su contenido intracelular antes del procesamiento de las muestras^{185,219}. Sin embargo, este método ha sido, y continúa siendo, extensamente utilizado para la cuantificación de la infiltración miocárdica por leucocitos polimorfonucleares^{112,123,194}.

El tamaño del infarto se midió mediante la reacción histoquímica del trifeniltetrazolio. Este método ha demostrado correlacionarse bien con la extensión de la necrosis estimada mediante el estudio histológico¹⁸³. De hecho, en un estudio realizado en nuestro laboratorio, en el que se incluyó una gran parte de los animales de la serie B, la cuantificación histoquímica del tamaño del infarto en una loncha miocárdica guardó una buena correlación ($r = 0.90$) con el área de necrosis en bandas de contracción estimada en el análisis histológico, con una tendencia a obtener valores algo menores¹⁹⁸. Esta tendencia podría sugerir que la hipercontractura precede a la necrosis, o ser consecuencia de la aparición por artefacto de bandas de contracción debido a las manipulaciones en la obtención y fijación de las muestras²²⁰.

Se ha descrito que la lidocaína puede modificar las propiedades adhesivas de los leucocitos y, posiblemente, tener un efecto beneficioso sobre el tamaño del infarto o desempeñar un papel permisivo en el efecto beneficioso obtenido por otros fármacos^{221,222}. Aunque en las series A y B los animales recibieron lidocaína al inicio del experimento, el hecho de que todos los animales recibieran la misma dosis hace improbable que el uso de este fármaco haya contribuido a los resultados observados.

En los animales sometidos a 48 minutos de oclusión (serie B) no se colocó un medidor del flujo alrededor de la arteria descendente anterior durante el periodo de reperfusión, con el fin de manipular lo menos posible la arteria y para evitar que el propio medidor la distorsionara y favoreciera la trombosis. Esto impidió monitorizar el flujo coronario en esta serie, y constituye una limitación a la hora de identificar los animales con reclusión. Sin embargo, debido a la ausencia de colaterales en el modelo porcino, fue relativamente fácil detectar los episodios de reclusión mediante la observación cuidadosa y continua de la apariencia de la arteria descendente anterior y de la pared ventricular dependiente de dicha arteria. Los cambios en el electrograma local ayudaron a identificar las

reclusiones, que se confirmaron al final del experimento mediante el análisis histológico. En el momento de realizar los experimentos de la serie adicional, disponíamos de un medidor de flujo de pequeño tamaño y muy poco traumático, que se utilizó sin problemas.

El tiopental y otros barbitúricos pueden afectar al funcionalismo plaquetario *in vitro* y *ex vivo*^{223,224}. Sin embargo, es poco probable que este anestésico haya tenido un efecto antiagregante plaquetario significativo en el presente estudio, ya que la mayoría de los animales de la serie adicional desarrollaron espontáneamente reducciones cíclicas del flujo, indicativas de la presencia de una trombosis coronaria dinámica.

Si en lugar de determinar el contenido de plaquetas marcadas en muestras seleccionadas del miocardio se hubiera realizado un muestreo más exhaustivo de toda el área en riesgo, las posibilidades de no detectar microémbolos plaquetarios habrían sido menores. Sin embargo, la estrategia que se utilizó permitió analizar una proporción considerable del área en riesgo, probablemente suficiente para descartar una embolización significativa al miocardio desde el trombo coronario, y además posibilitó el análisis histológico en dos lonchas miocárdicas adicionales.

En la serie adicional, se realizó una perfusión aórtica retrógrada del corazón para evitar que el secuestro de sangre en los vasos miocárdicos pudiera distorsionar los resultados. Si esta perfusión no se hubiera realizado correctamente, el impacto de las reducciones cíclicas del flujo sobre el contenido miocárdico de plaquetas podría haber sido enmascarado, bien por una actividad de fondo aumentada o por arrastre de los microémbolos por el líquido de lavado. Sin embargo, es poco probable que esto haya ocurrido, ya que se han utilizado métodos de perfusión similares, o incluso con presiones mayores, en estudios que han demostrado la presencia de microtrombos plaquetarios en los pequeños vasos miocárdicos^{94,102-104,112}. Además, el contenido estimado de plaquetas en la zona control fue prácticamente idéntico en todos los grupos, y apenas se detectaron émbolos

de plaquetas o hemorragia en el examen histológico.

Finalmente, también en la serie adicional, si los experimentos se hubieran prolongado durante más de dos horas se habría podido detectar un mayor número de microémbolos. Se seleccionó esta duración del periodo de reperfusión porque, a la vez que permitía el desarrollo de un número relativamente grande de reducciones cíclicas del flujo, evitaba que un eventual efecto de la embolización coronaria sobre el contenido miocárdico de plaquetas pudiera verse enmascarado por la acumulación progresiva de plaquetas que se produce sistemáticamente durante la reperfusión¹⁰⁷.

CONCLUSIONES

En el modelo de daño intimal inducido por cateterismo intracoronario en el corazón porcino *in situ* utilizado en este trabajo:

1. El daño intimal coronario indujo una atenuación significativa de la respuesta hiperémica después de 30 minutos de oclusión coronaria. Esta atenuación fue ya evidente en los primeros minutos después de la reperusión.
2. Después de 48 minutos de oclusión coronaria, el daño intimal se asoció con una tendencia a un menor flujo sanguíneo miocárdico regional y con un mayor tamaño del infarto, medido a las seis horas de reperusión ($36.2 \pm 7.0\%$ del área en riesgo, *vs.* $10.8 \pm 3.9\%$ en los animales sin daño intimal, $P = 0.006$).
3. La administración endovenosa de aspirina (10.0 ± 0.4 mg/kg) 90 minutos antes de la oclusión coronaria se acompañó de un mayor flujo sanguíneo miocárdico regional después de la reperusión y neutralizó significativamente ($P = 0.035$) la influencia deletérea del daño intimal sobre el tamaño del infarto (20.3 ± 6.5 *vs.* $21.7 \pm 6.5\%$ del área en riesgo en los animales tratados con aspirina que fueron sometidos o no a daño intimal coronario, respectivamente, $P = \text{NS}$). Entre los animales sin daño intimal coronario, la aspirina no fue beneficiosa, e incluso se asoció con una tendencia no significativa a infartos de mayor tamaño.
4. La trombosis coronaria dinámica inducida mediante el daño intimal no se acompañó de una embolización significativa de plaquetas al miocardio subyacente. El contenido miocárdico de plaquetas dos horas después del daño intimal fue similar al contenido en el territorio control ($129 \pm 19\%$, $P = \text{NS}$), a pesar de la existencia de repetidas reducciones cíclicas del flujo, y no se

correlacionó con el depósito de plaquetas en la arteria epicárdica lesionada ni con el número de reducciones cíclicas del flujo. El análisis histológico confirmó la rareza del hallazgo de microémbolos plaquetarios en las arteriolas miocárdicas.

5. El cateterismo intracoronario utilizado en el presente estudio provocó un daño intimal coronario extenso, que se confirmó mediante el análisis histológico, con denudación endotelial, rotura de la lámina elástica interna y trombosis. La oclusión coronaria mediante ligadura externa indujo un daño intimal localizado, pero profundo.
6. El daño intimal coronario no aumentó significativamente la incidencia de reoclusión coronaria después de la reperfusión. El tratamiento con aspirina disminuyó de forma significativa el número de reducciones cíclicas del flujo y la incidencia de reoclusión.
7. Ni el daño intimal coronario ni el tratamiento con aspirina modificaron significativamente la contractilidad segmentaria ni las arritmias ventriculares durante la isquemia y la reperfusión.
8. Ni el daño intimal coronario ni el tratamiento con aspirina modificaron el contenido miocárdico de leucocitos polimorfonucleares después de una oclusión coronaria transitoria. Entre los animales con 48 minutos de oclusión coronaria, el contenido de neutrófilos en el miocardio reperfundido estaba aumentado en aquéllos sometidos a daño intimal coronario, pero este aumento puede deberse a la estrecha relación existente entre el contenido de leucocitos y el tamaño del infarto.
9. Después de una oclusión coronaria transitoria se produjo una acumulación de plaquetas en el miocardio reperfundido. La magnitud de esta acumulación fue

proporcional a la duración de la oclusión ($172 \pm 20\%$ del contenido en el territorio control después de 25 minutos de oclusión y $312 \pm 71\%$ después de 48 minutos de oclusión) y no fue disminuida por el tratamiento previo con aspirina ($483 \pm 148\%$ del contenido en el territorio control, $P = NS$ respecto a los animales con 48 minutos de oclusión que no recibieron aspirina). El contenido miocárdico de plaquetas se correlacionó significativamente con el contenido de leucocitos polimorfonucleares y con el tamaño del infarto.

10. Las reducciones cíclicas del flujo se acompañaron de la demostración angiográfica de una trombosis coronaria parcialmente oclusiva y de variaciones en la perfusión del vaso distal, pero no se observaron amputaciones de ramas arteriales sugestivas de embolización macroscópica de material trombótico.

En resumen, los resultados de este estudio indican que el daño intimal y la trombosis coronaria no oclusiva pueden tener un efecto perjudicial sobre el miocardio subyacente después de una oclusión coronaria transitoria, por mecanismos independientes de la reclusión coronaria, y que este efecto puede ser contrarrestado por la aspirina. Estos resultados podrían ayudar a explicar la discrepancia existente entre el importante efecto beneficioso de la aspirina en los pacientes con infarto agudo de miocardio y la tendencia a un efecto perjudicial en distintos modelos animales de oclusión coronaria transitoria, y sugieren que los modelos animales de ligadura coronaria externa sin un daño intimal extenso no reproducen adecuadamente algunos aspectos fisiopatológicos de la reperfusión en pacientes con infarto agudo de miocardio. Finalmente, los resultados sugieren que la influencia deletérea de la trombosis coronaria no oclusiva sobre el miocardio subyacente no se debe a una obstrucción significativa de los pequeños vasos

miocárdicos por múltiples émbolos plaquetarios, y que la acumulación miocárdica de plaquetas durante la reperfusión se produce fundamentalmente por depósito local en la microvasculatura, aun en presencia de una trombosis coronaria activa en la arteria responsable.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hearse DJ, Maxwell L, Saldanha C, Gavin JB. The myocardial vasculature during ischemia and reperfusion: a target for injury and protection. *J Mol Cell Cardiol* 1993;25:759-800.
2. Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation* 1995;91:2844-2850.
3. Anderson TJ. Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *J Am Coll Cardiol* 1999;34:631-638.
4. Willerson JT, Golino P, Eidt J, Campbell WB, Buja LM. Specific platelet mediators and unstable coronary artery lesions: experimental evidence and potential clinical implications. *Circulation* 1989;80:198-205.
5. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (first of two parts). *N Engl J Med* 1992;326:242-250.
6. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (second of two parts). *N Engl J Med* 1992;326:310-318.
7. van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation* 1994;89:36-44.
8. Théroux P, Fuster V. Acute coronary syndromes: unstable angina and non-Q-wave myocardial infarction. *Circulation* 1998;97:1195-1206.
9. Fuster V, Dyken ML, Vokonas PS, Hennekens C. Aspirin as a therapeutic agent in cardiovascular disease. *Circulation* 1993;87:659-675.
10. Awtry EH, Loscalzo J. Aspirin. *Circulation* 2000;101:1206-1218.
11. ISIS-2 (Second International Study of Infarct Survival) Collaborative Group. Randomised trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither among 17187 cases of suspected acute myocardial infarction: ISIS-2. *Lancet* 1988;2:349-360.
12. Charo IF, Kieffer N, Phillips DR. Platelet membrane glycoproteins. En: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, editores. *Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice* (3rd ed). Philadelphia: Lippincott Company, 1994:489-503.
13. Anónimo. Platelet activation and arterial thrombosis. *Lancet* 1994;344:991-995.
14. Steele PM, Chesebro JH, Stanson AW, Holmes DR Jr, Dewanjee MK, Badimon L, Fuster V. Balloon angioplasty: natural history of the pathophysiological response to injury in a pig model. *Circ Res* 1985;57:105-112.

15. Lam JYT, Chesebro JH, Steele PM, Dewanjee MK, Badimon L, Fuster V, Byrne JM, Lamb HB, Wendland BI. Deep arterial injury during experimental angioplasty: relation to a positive indium-111-labeled platelet scintigram, quantitative platelet deposition and mural thrombosis. *J Am Coll Cardiol* 1986;8:1380-1386.
16. Heras M, Chesebro JH, Penny WJ, Bailey KR, Badimon L, Fuster V. Effects of thrombin inhibition on the development of acute platelet-thrombus deposition during angioplasty in pigs: heparin versus recombinant hirudin, a specific thrombin inhibitor. *Circulation* 1989;79:657-665.
17. Borries M, Heins M, Fischer Y, Stiegler H, Peters A, Reinauer H, Schoebel FC, Strauer BE, Leschke M. Changes of hemostasis, endogenous fibrinolysis, platelet activation and endothelins after percutaneous transluminal coronary angioplasty in patients with stable angina. *J Am Coll Cardiol* 1999;34:486-493.
18. Farb A, Burke AP, Tang AL, Liang TY, Mannan P, Smialek J, Virmani R. Coronary plaque erosion without rupture into a lipid core: a frequent cause of coronary thrombosis in sudden coronary death. *Circulation* 1996;93:1354-1363.
19. Folts JD, Crowell EB Jr, Rowe GG. Platelet aggregation in partially obstructed vessels and its elimination with aspirin. *Circulation* 1976;54:365-370.
20. Lassila R, Badimon JJ, Vallabhajosula S, Badimon L. Dynamic monitoring of platelet deposition on severely damaged vessel wall in flowing blood: effects of different stenoses on thrombus growth. *Arteriosclerosis* 1990;10:306-315.
21. Folts J. An in vivo model of experimental arterial stenosis, intimal damage, and periodic thrombosis. *Circulation* 1991;83(suppl IV):IV-3-IV-14.
22. Maalej N, Folts JD. Increased shear stress overcomes the antithrombotic platelet inhibitory effect of aspirin in stenosed dog coronary arteries. *Circulation* 1996;93:1201-1205.
23. Fernández-Ortiz A, Badimon JJ, Falk E, Fuster V, Meyer B, Mailhac A, Weng D, Shah PK, Badimon L. Characterization of the relative thrombogenicity of atherosclerotic plaque components: implications for consequences of plaque rupture. *J Am Coll Cardiol* 1994;23:1562-1569.
24. Pawashe AB, Golino P, Ambrosio G, Migliaccio F, Ragni M, Pascucci I, Chiariello M, Bach R, Garen A, Konigsberg WK, Ezekowitz MD. A monoclonal antibody against rabbit tissue factor inhibits thrombus formation in stenotic injured rabbit carotid arteries. *Circ Res* 1994;74:56-63.
25. Badimon JJ, Lettino M, Toschi V, Fuster V, Berrozpe M, Chesebro JH, Badimon L. Local

- inhibition of tissue factor reduces the thrombogenicity of disrupted human atherosclerotic plaques: effects of tissue factor pathway inhibitor on plaque thrombogenicity under flow conditions. *Circulation* 1999;99:1780-1787.
26. Badimon L, Martinez-Gonzalez J, Royo T, Lassila R, Badimon JJ. A sudden increase in plasma epinephrine levels transiently enhances platelet deposition on severely damaged arterial wall: studies in a porcine model. *Thromb Haemost* 1999;82:1736-1742.
 27. Ashton JH, Schmitz JM, Campbell WB, Ogletree ML, Raheja S, Taylor AL, Fitzgerald C, Buja LM, Willerson JT. Inhibition of cyclic flow variations in stenosed canine coronary arteries by thromboxane A₂/prostaglandin H₂ receptor antagonists. *Circ Res* 1986;59:568-578.
 28. Ashton JH, Benedict CR, Fitzgerald C, Raheja S, Taylor A, Campbell WB, Buja LM, Willerson JT. Serotonin as a mediator of cyclic flow variations in stenosed canine coronary arteries. *Circulation* 1986;73:572-578.
 29. Ashton JH, Ogletree ML, Michel IM, Golino P, McNatt JM, Taylor AL, Raheja S, Schmitz J, Buja LM, Campbell WB, Willerson JT. Cooperative mediation by serotonin S₂ and thromboxane A₂/prostaglandin H₂ receptor activation of cyclic flow variations in dogs with severe coronary artery stenoses. *Circulation* 1987;76:952-959.
 30. Palabrica T, Lobb R, Furie BC, Aronovitz M, Benjamin C, Hsu Y-M, Sajer SA, Furie B. Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated *in vivo* by P-selectin on adherent platelets. *Nature* 1992;359:848-851.
 31. Fitzgerald DJ, Roy L, Catella F, FitzGerald GA. Platelet activation in unstable coronary disease. *N Engl J Med* 1986;315:983-989.
 32. Ware JA, Horak JK, Bolli R, Mathur VS, Massumi GA, Solis RT. Intravascular microaggregation and *in vitro* platelet aggregation in coronary artery disease. *Thromb Res* 1984;34:9-18.
 33. Gasperetti CM, Gonias SL, Gimple LW, Powers ER. Platelet activation during coronary angioplasty in humans. *Circulation* 1993;88:2728-2734.
 34. Gurbel PA, Serebruany VL, Komjathy SF, Collins ME, Sane DC, Scott HJ, Schlossberg ML, Herzog WR. Regional and systemic platelet function is altered by myocardial ischemia-reperfusion. *J Thromb Thrombolys* 1995;1:187-194.
 35. Fuchs J, Weinberger I, Rotnberg Z, Joshua H, Almozlino A, Agmon J. Circulating aggregated platelets in coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1987;60:534-537.

36. Ott I, Neumann F-J, Gawaz M, Schmitt M, Schömig A. Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina. *Circulation* 1996;94:1239-1246.
37. Furman MI, Benoit SE, Barnard MR, Valeri CR, Borbone ML, Becker RC, Hechtman HB, Michelson AD. Increased platelet reactivity and circulating monocyte-platelet aggregates in patients with stable coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:352-358.
38. Dorn GW II, Liel N, Trask JL, Mais DE, Assey ME, Haluska PV. Increased platelet thromboxane A₂/prostaglandin H₂ receptors in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 1990;81:212-218.
39. Ault KA, Cannon CP, Mitchell J, McCahan J, Tracy RP, Novotny WF, Reimann JD, Braunwald E. Platelet activation in patients after an acute coronary syndrome: results from the TIMI-12 trial: Thrombolysis in Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol* 1999;33:634-639.
40. Freedman JE, Ting B, Hankin B, Loscalzo J, Keaney JF, Vita JA. Impaired platelet production of nitric oxide predicts presence of acute coronary syndromes. *Circulation* 1998;98:1481-1486.
41. Goto S, Sakai H, Goto M, Ono M, Ikeda Y, Handa S, Ruggieri ZM. Enhanced shear-induced platelet aggregation in acute myocardial infarction. *Circulation* 1999;99:608-613.
42. Ikeda H, Takajo Y, Ichiki K, Ueno T, Maki S, Noda T, Sugi K, Imaizumi T. Increased soluble form of P-selectin in patients with unstable angina. *Circulation* 1995;92:1693-1696.
43. Tanaka H, Sukhova GK, Swanson SJ, Clinton SK, Ganz P, Cybulsky MI, Libby P. Sustained activation of vascular cells and leukocytes in the rabbit aorta after balloon injury. *Circulation* 1993;88(part 1):1788-1803.
44. Ikeda H, Nakayama H, Oda T, Kuwano K, Yamaga A, Ueno T, Yoh M, Hiyamuta K, Koga Y, Toshima H. Neutrophil activation after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am Heart J* 1994;128:1091-1098.
45. Inoue T, Sakai Y, Morooka S, Hayashi T, Takayanagi K, Takabatake Y. Expression of polymorphonuclear leukocyte adhesion molecules and its clinical significance in patients treated with percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1996;28:1127-1133.
46. Neumann F-J, Ott I, Gawaz M, Puchner G, Schömig A. Neutrophil and platelet activation at balloon-injured coronary artery plaque in patients undergoing angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1996;27:819-824.
47. Ott I, Neumann F-J, Kennigott S, Gawaz M, Schömig A. Procoagulant inflammatory responses of monocytes after direct balloon angioplasty in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1998;82:938-

- 942.
48. Mazzone A, De Servi S, Ricevuti G, Mazzucchelli I, Fossati G, Pasotti D, Bramucci E, Angoli L, Marsico F, Specchia G, Notario A. Increased expression of neutrophil and monocyte adhesion molecules in unstable coronary artery disease. *Circulation* 1993;88:358-363.
 49. Merhi Y, Lam JYT, Lacoste LL, Latour J-G, Guidoin R, Waters D. Effects of thrombocytopenia and shear rate on neutrophil and platelet deposition on endothelial and medial arterial surfaces. *Arterioscler Thromb* 1993;13:951-957.
 50. Golino P, Ambrosio G, Ragni M, Pascucci I, Triggiani M, Oriente A, McNatt J, Buja LM, Condorelli M, Chiariello M, Willerson JT. Short-term and long-term role of platelet activating factor as a mediator of in vivo platelet aggregation. *Circulation* 1993;88:1205-1214.
 51. Merhi Y, Guidoin R, Provost P, Leung T-K, Lam JYT. Increase of neutrophil adhesion and vasoconstriction with platelet deposition after deep arterial injury by angioplasty. *Am Heart J* 1995;129:445-451.
 52. Lefer AM, Weyrich AS, Buerke M. Role of selectins, a new family of adhesion molecules, in ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1994;28:289-294.
 53. López-Farré A, Caramelo C, Esteban A, Alberola ML, Millás I, Montón M, Casado S. Effects of aspirin on platelet-neutrophil interactions: role of nitric oxide and endothelin-1. *Circulation* 1995;91:2080-2088.
 54. Dinerman JL, Mehta JL, Saldeen TGP, Emerson S, Wallin R, Davda R, Davidson A. Increased neutrophil elastase release in unstable angina pectoris and acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1990;15:1559-1563.
 55. Lam JYT, Chesebro JH, Steele PM, Badimon L, Fuster V. Is vasospasm related to platelet deposition? *Circulation* 1987;75(1):243-248.
 56. Golino P, Ashton JH, Buja LM, Rosolowsky M, Taylor AL, McNatt J, Campbell WB, Willerson JT. Local platelet activation causes vasoconstriction of large epicardial canine arteries in vivo: thromboxane A₂ and serotonin are possible mediators. *Circulation* 1989;79:154-166.
 57. Golino P, Buja LM, Sheng-Kun Y, McNatt J, Willerson JT. Failure of nitroglycerin and diltiazem to reduce platelet-mediated vasoconstriction in dogs with coronary artery stenosis and endothelial injury: further evidence for thromboxane A₂ and serotonin as mediators of coronary artery vasoconstriction in vivo. *J Am Coll Cardiol* 1990;15:718-726.

58. Kuga T, Ohara Y, Hata H, Hirakawa Y, Tomoike H, Takeshita A. Inhibitory effects of heparin, aspirin and ketanserin on coronary artery vasoconstriction after arterial balloon injury in hypercholesterolemic miniature pigs. *J Am Coll Cardiol* 1993;22:291-295.
59. Eguchi H, Ikeda H, Murohara T, Yasukawa H, Haramaki N, Sakisaka S, Imaizumi T. Endothelial injuries of coronary arteries distal to thrombotic sites: role of adhesive interaction between endothelial P-selectin and leukocyte Sialyl Lewis^x. *Circ Res* 1999;84:525-535.
60. Lefer DJ, Nakanishi K, Johnston WE, Vinten-Johansen J. Antineutrophil and myocardial protecting actions of a novel nitric oxide donor after acute myocardial ischemia and reperfusion in dogs. *Circulation* 1993;88:2337-2350.
61. Merhi Y, Lacoste LL, Lam JYT. Neutrophil implications in platelet deposition and vasoconstriction after deep arterial injury by angioplasty in pigs. *Circulation* 1994;90:997-1002.
62. Ciabattoni G, Ujang S, Sritara P, Andreotti F, Davies G, Simonetti BM, Patrono C, Maseri A. Aspirin, but not heparin, suppresses the transient increase in thromboxane biosynthesis associated with cardiac catheterization or coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1993;21:1377-1381.
63. Golino P, Piscione F, Benedict CR, Anderson HV, Cappelli-Bigazzi M, Indolfi C, Condorelli M, Chiariello M, Willerson JT. Local effect of serotonin released during coronary angioplasty. *N Engl J Med* 1994;330:523-528.
64. Golino P, Piscione F, Willerson JT, Cappelli-Bigazzi M, Focaccio A, Villari B, Indolfi C, Russolillo E, Condorelli M, Chiariello M. Divergent effects of serotonin on coronary-artery dimensions and blood flow in patients with coronary atherosclerosis and control patients. *N Engl J Med* 1991;324:641-648.
65. McFadden E, Clarke JG, Davies GJ, Kaski JC, Haider AW, Maseri A. Effect of intracoronary serotonin on coronary vessels in patients with stable angina and patients with variant angina. *N Engl J Med* 1991;324:648-654.
66. McFadden E, Bauters C, Lablanche J-M, Quandalle P, Leroy F, Bertrand ME. Response of human coronary arteries to serotonin after injury by coronary angioplasty. *Circulation* 1993;88:2076-2085.
67. Malatino LS, Grassi R, Stancanelli B, Polizzi G, Leonardi C, Tamburino C, Tamburino G. Release of immunoreactive endothelin from the heart during percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am Heart J* 1993;126:700-702.
68. Fujise K, Stacy L, Beck P, Yeh ETH, Chuang A, Brock TA, Willerson JT. Differential effects of

- endothelin receptor activation on cyclic flow variations in rat mesenteric arteries. *Circulation* 1997;96:3641-3646.
69. Hasdai D, Holmes DR Jr, Garratt KN, Edwards WD, Lerman A. Mechanical pressure and stretch release endothelin-1 from human atherosclerotic coronary arteries in vivo. *Circulation* 1997;95:357-362.
70. Zaugg CE, Hornstein PS, Zhu P, Simper D, Lüscher TF, Allegrini PR, Buser PT. Endothelin-1-induced release of thromboxane A₂ increases the vasoconstrictor effect of endothelin-1 in postischemic reperfused rat hearts. *Circulation* 1996;94:742-747.
71. Saroyan RM, Roberts MP, Light JT Jr, Chen I-L, Vaccarella MY, Bang DJ, Kvamme P, Singh S, Scalia SV, Kerstein MD, Kadowitz PJ, McNamara DB. Differential recovery of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor after vascular injury. *Am J Physiol* 1992;262:H1449-H1457.
72. González-Fernández F, López-Farré A, Rodríguez-Feo JA, Farré J, Guerra J, Fortes J, Millás I, García-Durán M, Rico L, Mata P, Sánchez de Miguel L, Casado S. Expression of inducible nitric oxide synthase after endothelial denudation of the rat carotid artery: role of platelets. *Circ Res* 1998;83:1080-1087.
73. Yao S-K, Ober JC, Krishnaswami A, Ferguson JJ, Anderson HV, Golino P, Buja LM, Willerson JT. Endogenous nitric oxide protects against platelet aggregation and cyclic flow variations in stenosed and endothelium-injured arteries. *Circulation* 1992;86:1302-1309.
74. Adams MR, Forsyth CJ, Jessup W, Robinson J, Celermajer DS. Oral L-arginine inhibits platelet aggregation but does not enhance endothelium-dependent dilation in healthy young men. *J Am Coll Cardiol* 1995;26:1054-1061.
75. Michelson AD, Benoit SE, Furman MI, Breckwoldt WL, Rohrer MJ, Barnard MR, Loscalzo J. Effects of nitric oxide/EDRF on platelet surface glycoproteins. *Am J Physiol* 1996;270:H1640-H1648.
76. Ma X, Weyrich AS, Lefer DJ, Lefer AM. Diminished basal nitric oxide release after myocardial ischemia and reperfusion promotes neutrophil adherence to coronary endothelium. *Circ Res* 1993;72:403-412.
77. Kurose I, Anderson DC, Miyasaka M, Tamatani T, Paulson JC, Todd RF, Rusche JR, Granger DN. Molecular determinants of reperfusion-induced leukocyte adhesion and vascular protein leakage. *Circ Res* 1994;74:336-343.
78. Sato H, Zhao Z-Q, Vinten-Johansen J. L-arginine inhibits neutrophil adherence and coronary artery

- dysfunction. *Cardiovasc Res* 1996;31:63-72.
79. Adams MR, Jessup W, Hailstones D, Celermajer DS. L-arginine reduces human monocyte adhesion to vascular endothelium and endothelial expression of cell adhesion molecules. *Circulation* 1997;95:662-668.
 80. Armstread VE, Minchenko AG, Schuhl RA, Hayward R, Nossuli TO, Lefer AM. Regulation of P-selectin expression in human endothelial cells by nitric oxide. *Am J Physiol* 1997;273:H740-H746.
 81. Jones CJH, Kuo L, Davis MJ, DeFily DV, Chilian WM. Role of nitric oxide in the coronary microvascular responses to adenosine and increased metabolic demand. *Circulation* 1995;91:1807-1813.
 82. Hansen PR, Haunso S. Effects of nitric oxide synthase inhibition on myocardial capillary permeability and reactive hyperaemic response. *Cardiovasc Res* 1995;29:862-866.
 83. Folts JD. Deleterious hemodynamic effects of thrombotic/embolic materials on the distal myocardial vasculature. *Cardiovasc Res* 1999;42:6-8.
 84. Folts JD, Gallagher K, Rowe G. Blood flow reductions in stenosed canine coronary arteries: vasospasm or platelet aggregation? *Circulation* 1982;65:248-255.
 85. Folts JD, Stamler J, Loscalzo J. Intravenous nitroglycerin infusion inhibits cyclic blood flow responses caused by periodic platelet thrombus formation in stenosed canine coronary arteries. *Circulation* 1991;83:2122-2127.
 86. Davies MJ. A macro and micro view of coronary vascular insult in ischemic heart disease. *Circulation* 1990;82(Suppl II):II-38-II-46.
 87. Davies MJ. The role of plaque pathology in coronary thrombosis. *Clin Cardiol* 1997;20(suppl I):I-2-I-7.
 88. Folts JD, Schafer AI, Loscalzo J, Willerson JT, Muller JE. A perspective on the potential problems with aspirin as an antithrombotic agent: a comparison of studies in an animal model with clinical trials. *J Am Coll Cardiol* 1999;33:295-303.
 89. Ikeda H, Koga Y, Kuwano K, Nakayama H, Ueno T, Yoshida N, Adachi K, Park IS, Toshima H. Cyclic flow variations in a conscious dog model of coronary artery stenoses and endothelial injury correlate with acute ischemic heart disease syndromes in humans. *J Am Coll Cardiol* 1993;21:1008-1017.
 90. Eichhorn EJ, Grayburn PA, Willard JE, Anderson HV, Bedotto JB, Carry M, Kahn JK, Willerson

- JT. Spontaneous alterations in coronary blood flow velocity before and after coronary angioplasty in patients with severe angina. *J Am Coll Cardiol* 1991;17:43-52.
91. Anderson HV, Kirkeeide RL, Krishnaswami A, Weigelt LA, Revana M, Weisman HF, Willerson JT. Cyclic flow variations after coronary angioplasty in humans: clinical and angiographic characteristics and elimination with 7E3 monoclonal antiplatelet antibody. *J Am Coll Cardiol* 1994;23:1031-1037.
 92. Lefkowitz CA, Pace DP, Gallagher KP, Buda AJ. The effects of a critical stenosis on myocardial blood flow, ventricular function, and infarct size after coronary reperfusion. *Circulation* 1988;77:915-926.
 93. Myears DW, Nohara R, Abendschein DR, Saffitz JE, Sobel BE, Bergmann SR. Compromise of beneficial effects of reperfusion on myocardium supplied by vessels with critical residual stenosis. *J Am Coll Cardiol* 1988;11:1078-1086.
 94. Rousseau G, Hébert D, Libersan D, Khalil A, St-Jean G, Latour J-G. Importance of platelets in myocardial injury after reperfusion in the presence of residual coronary stenosis in dogs. *Am Heart J* 1993;125:1553-1563.
 95. Saber RS, Edwards WD, Bailey KR, McGovern TW, Schwartz RS, Holmes DR Jr. Coronary embolization after balloon angioplasty or thrombolytic therapy: an autopsy study of 32 cases. *J Am Coll Cardiol* 1993;22:1283-1288.
 96. Topol EJ, Yadav JS. Recognition of the importance of embolization in atherosclerotic vascular disease. *Circulation* 2000;101:570-580.
 97. Gewirtz H, Sasken H, Steiner M, Most AS. Impaired arteriolar vasodilation by thrombosis of a coronary arterial stenosis. *Am J Physiol* 1985;249:H1154-H1166.
 98. Belcher PR, Vergoesen I, Drake-Holland AJ, Noble MIM. The pressure-flow relation in the canine coronary artery: combined effects of critical stenosis and intracoronary thrombosis. *Cardiovasc Res* 1995;30:807-814.
 99. Mansaray M, Belcher PR, Vergoesen I, Wright ZM, Hynd JW, Drake-Holland AJ, Noble MIM. Downstream resistance effects of intracoronary thrombosis in the stenosed canine coronary artery. *Cardiovasc Res* 1999;42:193-200.
 100. Ovize M, Kloner RA, Hale SL, Przyklenk K. Coronary cyclic flow variations "precondition" ischemic myocardium. *Circulation* 1992;85:779-789.

101. Haerem JW. Platelet aggregates in intramyocardial vessels of patients dying suddenly and unexpectedly of coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1972;15:199-213.
102. El-Maraghi N, Genton E. The relevance of platelet and fibrin thromboembolism of the coronary microcirculation, with special reference to sudden cardiac death. *Circulation* 1980;62:936-944.
103. Falk E. Unstable angina with fatal outcome: dynamic coronary thrombosis leading to infarction and/or sudden death. *Circulation* 1985;71:699-708.
104. Davies MJ, Thomas AC, Knapman PA, Hangartner JR. Intramyocardial platelet aggregation in patients with unstable angina suffering sudden ischemic cardiac death. *Circulation* 1986;73:418-427.
105. Romson JL, Hook BG, Rigot VH, Schork MA, Swanson DP, Lucchesi BR. The effect of ibuprofen on accumulation of indium-111-labeled platelets and leukocytes in experimental myocardial infarction. *Circulation* 1982;66:1002-1011.
106. Feinberg H, Rosenbaum DS, Levitsky S, Silverman NA, Kohler J, LeBreton G. Platelet deposition after surgically induced myocardial ischemia. An etiologic factor for reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1982;84:815-822.
107. Laws KH, Clanton JA, Starnes VA, Lupinetti FM, Collins JC, Oates JA, Hammon JW Jr. Kinetics and imaging of indium-111-labeled autologous platelets in experimental myocardial infarction. *Circulation* 1983;67:110-116.
108. Rosenbaum D, Levitsky S, Silverman N, Kohler J, Lipowski J, LeBreton G, Feinberg H. Cardioplegia does not prevent reperfusion injury induced by intracoronary platelet deposition. *Circulation* 1983;68(suppl II):II-102-II-106.
109. Bednar M, Smith B, Pinto A, Mullane KM. Neutrophil depletion suppresses ¹¹¹In-labeled platelet accumulation in infarcted myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol* 1985;7:906-912.
110. Aherne T, Price DC, Yee ES, Hsieh WR, Ebert PA. Prevention of ischemia-induced myocardial platelet deposition by exogenous prostacyclin. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1986;92:99-104.
111. Teoh KH, Christakis GT, Weisel RD, Mullen JC, Madonik M, Ivanov J, Henderson MJ, Warbick-Cerone A, Johnston LG, Mee AV, Wong P-Y, Reilly PA, Glynn FX. Prevention of myocardial platelet deposition and thromboxane release with dipyridamole. *Circulation* 1986;74(suppl III):III-145-III-152.
112. Libersan D, Khalil A, Dagenais P, Quan E, Delorme F, Uzan A, Latour J-G. The low molecular weight

- heparin, enoxaparin, limits infarct size at reperfusion in the dog. *Cardiovasc Res* 1998;37:656-666.
113. Kloner RA, Shook T, Przyklenk K, Davis VG, Junio L, Matthews RV, Burstein S, Gibson CM, Poole WK, Cannon CP, McCabe CH, Braunwald E, for the TIMI 4 Investigators. Previous angina alters in-hospital outcome in TIMI 4: a clinical correlate to preconditioning? *Circulation* 1995;91:37-47.
 114. Flores NA, Sheridan DJ. The pathophysiological role of platelets during myocardial ischaemia. *Cardiovasc Res* 1994;28:295-302.
 115. Montrucchio G, Alloatti G, Tetta C, De Luca R, Saunders RN, Emanuelli G, Camusi G. Release of platelet-activating factor from ischemic-reperfused rabbit heart. *Am J Physiol* 1989;256:H1236-H1246.
 116. Flores NA, Goulielmos NV, Seghatchian MJ, Sheridan DJ. Myocardial ischaemia induces platelet activation with adverse electrophysiological and arrhythmogenic effects. *Cardiovasc Res* 1994;28:1662-1671.
 117. Kowey PR, Verrier RL, Lown B, Handin RI. Influence of intracoronary platelet aggregation on ventricular electrical properties during partial coronary artery stenosis. *Am J Cardiol* 1983;51:596-602.
 118. Moschos CB, Haider B, DeLa Cruz C Jr, Lyons MM, Regan TJ. Antiarrhythmic effects of aspirin during nonthrombotic coronary occlusion. *Circulation* 1978;57:681-684.
 119. Johnson GJ, Heckel R, Leis LA, Franciosa J. Effect of inhibition of platelet function with carbenicilin or aspirin on experimental canine sudden death. *J Lab Clin Med* 1981;98:660-672.
 120. Sato N, Endo T, Kiuchi K, Hayakawa H. Effects of a thromboxane synthetase inhibitor, Y-20811, on infarct size, neutrophil accumulation, and arrhythmias after coronary artery occlusion and reperfusion in dogs. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993;21:353-361.
 121. Wainwright CL, Parratt JR. Failure of cyclo-oxygenase inhibition to protect against arrhythmias induced by ischaemia and reperfusion: implications for the role of prostaglandins as endogenous myocardial protective substances. *Cardiovasc Res* 1991;25:93-100.
 122. Rösen R, Dausch W, Beck E, Klaus W. Platelet induced aggravation of acute ischaemia in an isolated rabbit heart model. *Cardiovasc Res* 1987;21:293-298.
 123. Lefler AM, Campbell B, Scalia R, Lefler DJ. Synergism between platelets and neutrophils in provoking cardiac dysfunction after ischemia and reperfusion: role of selectins. *Circulation* 1998;98:1322-1328.

124. Yang BC, Virmani R, Nichols WW, Mehta JL. Platelets protect against myocardial dysfunction and injury induced by ischemia and reperfusion in isolated rat hearts. *Circ Res* 1993;72:1181-1190.
125. Heindl B, Zahler S, Welsch U, Becker BF. Disparate effects of adhesion and degranulation of platelets on myocardial and coronary function in postischemic hearts. *Cardiovasc Res* 1998;38:383-394.
126. Jolly SR, Schumacher WA, Kunkel SL, Abrams GD, Liddicoat J, Lucchesi BR. Platelet depletion in experimental myocardial infarction. *Bas Res Cardiol* 1985;80:269-279.
127. Mullane KM, McGiff JC. Platelet depletion and infarct size in an occlusion-reperfusion model of myocardial ischemia in anesthetized dogs. *J Cardiovasc Pharmacol* 1985;7:733-738.
128. Mullane KM, Fornabaio D. Thromboxane synthetase inhibitors reduce infarct size by a platelet-dependent, aspirin-sensitive mechanism. *Circ Res* 1988;62:668-678.
129. Golino P, Ambrosio G, Villari B, Ragni M, Focaccio A, Pace L, De Clerk F, Condorelli M, Chiariello M. Endogenous prostaglandin endoperoxides may alter infarct size in the presence of thromboxane synthase inhibition: studies in a rabbit model of coronary artery occlusion-reperfusion. *J Am Coll Cardiol* 1993;21:493-501.
130. Vandeplassche G, Hermans C, Somers Y, Van de Werf F, de Clerck F. Combined thromboxane A₂ synthase inhibition and prostaglandin endoperoxide receptor antagonism limits myocardial infarct size after mechanical coronary occlusion and reperfusion at doses enhancing coronary thrombolysis by streptokinase. *J Am Coll Cardiol* 1993;21:1269-1279.
131. Grover GJ, Schumacher WA. Effect of the thromboxane A₂ receptor antagonist SQ 30741 on ultimate myocardial infarct size, reperfusion injury and coronary flow reserve. *J Pharmacol Exp Ther* 1989;248:484-491.
132. Schumacher WA, Grover GJ. The thromboxane receptor antagonist SQ 30741 reduces myocardial infarct size in monkeys when given during reperfusion at a threshold dose for improving reflow during thrombolysis. *J Am Coll Cardiol* 1990;15:883-889.
133. Grover GJ, Schumacher WA. The cardioprotective effects of the thromboxane receptor antagonist SQ 30741 are not reversed by aspirin. *Bas Res Cardiol* 1991;86:99-106.
134. Shi Y, Zalewski A, Walinsky P, Goldberg S. Does antiplatelet therapy enhance myocardial salvage after coronary reperfusion? *J Am Coll Cardiol* 1990;15:1662-1666.
135. López Farré A, Riesco A, Espinosa G, Digiumi E, Cernadas MR, Alvarez V, Montón M, Rivas F,

- Gallego MJ, Egido J, Casado S, Caramelo C. Effect of endothelin-1 on neutrophil adhesion to endothelial cells and perfused heart. *Circulation* 1993;88:1166-1171.
136. Sanz M-J, Johnston B, Issekutz A, Kubes P. Endothelin-1 causes P-selectin-dependent leukocyte rolling and adhesion within rat mesenteric microvessels. *Am J Physiol* 1999;277:H1823-H1830.
137. Grover GJ, Dzwonczyk S, Parham CS. The endothelin-1 receptor antagonist BQ-123 reduces infarct size in a canine model of coronary occlusion and reperfusion. *Cardiovasc Res* 1993;27:1613-1618.
138. Nakanishi K, Vinten-Johansen J, Lefer DJ, Zhao Z, Fowler WC III, MgGee DS, Johnston WE. Intracoronary L-arginine during reperfusion improves endothelial function and reduces infarct size. *Am J Physiol* 1992;263:H1650-H1658.
139. Fukuda H, Sawa Y, Kadoba K, Taniguchi K, Shimazaki Y, Matsuda H. Supplement of nitric oxide attenuates neutrophil-mediated reperfusion injury. *Circulation* 1995;92(Suppl II):II-413-II-416.
140. Agulló L, García-Dorado D, Inserte J, Paniagua A, Pyrhonen P, Llevadot J, Soler-Soler J. L-arginine limits myocardial cell death secondary to hypoxia-reoxygenation by a cGMP-dependent mechanism. *Am J Physiol* 1999;276:H1574-H1580.
141. Vinten-Johansen J, Zhao ZQ, Nakamura M, Jordan JE, Ronson RS, Thourani VH, Guyton RA. Nitric oxide and the vascular endothelium in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Ann N Y Acad Sci* 1999;874:354-370.
142. Engler RL, Schmid-Schönbein GW, Pavelec RS. Leukocyte capillary plugging in myocardial ischemia and reperfusion in the dog. *Am J Pathol* 1983;111:98-111.
143. Go LO, Murry CE, Richard VJ, Weischedel GR, Jennings RB, Reimer KA. Myocardial neutrophil accumulation during reperfusion after reversible or irreversible ischemic injury. *Am J Physiol* 1988;255:H1188-H1198.
144. Hansen PR. Role of neutrophils in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation* 1995;91:1872-1885.
145. De Servi S, Mazzone A, Ricevuti G, Mazzucchelli I, Fossati G, Angoli L, Valentini P, Boschetti E, Specchia G. Expression of neutrophil and monocyte CD11B/CD18 adhesion molecules at different sites of the coronary tree in unstable angina pectoris. *Am J Cardiol* 1996;78:564-568.
146. Ma X, Weyrich AS, Lefer DJ, Buerke M, Albertine KH, Kishimoto TK, Lefer AM. Monoclonal antibody to L-selectin attenuates neutrophil accumulation and protects ischemic reperfused cat myocardium. *Circulation* 1993;88:649-658.

147. Buerke M, Weyrich AS, Murohara T, Queen C, Klingbeil CK, Co MS, Lefer AM. Humanized monoclonal antibody DREG-200 directed against L-selectin protects in feline myocardial reperfusion injury. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;271:134-142.
148. Bolz SS, Pohl U. Indomethacin enhances endothelial NO release: evidence for a role of PGI₂ in the autocrine control of calcium-dependent autacoid production. *Cardiovasc Res* 1997;36:437-444.
149. Ratnatunga CP, Edmondson SF, Rees GM, Kovacs IB. High-dose aspirin inhibits shear-induced platelet reaction involving thrombin generation. *Circulation* 1992;85:1077-1082.
150. Mickelson JK, Hoff PT, Homeister JW, Fantone JC, Lucchesi BR. High dose intravenous aspirin, not low dose intravenous or oral aspirin, inhibits thrombus formation and stabilizes blood flow in experimental coronary vascular injury. *J Am Coll Cardiol* 1993;21:502-510.
151. Yao S-K, Ober JC, Garfinkel LI, Hagay Y, Ezov N, Ferguson JJ, Anderson HV, Panet A, Gorecki M, Buja LM, Willerson JT. Blockade of platelet membrane glycoprotein Ib receptors delays intracoronary thrombogenesis, enhances thrombolysis, and delays coronary artery reocclusion in dogs. *Circulation* 1994;89:2822-2828.
152. Raymenants E, Yang B, Nicolini F, Behrens P, Lawson D, Mehta JL. Verapamil and aspirin modulate platelet-mediated vasomotion in arterial segments with intact or disrupted endothelium. *J Am Coll Cardiol* 1993;22:684-689.
153. Bax WA, Renzenbrink GJ, van der Linden EA, Zijlstra FJ, van Heuven-Nolsen D, Fekkes D, Bos E, Saxena PR. Low-dose aspirin inhibits platelet-induced contraction of the human isolated coronary artery: a role for additional 5-hydroxytryptamine receptor antagonism against coronary vasospasm? *Circulation* 1994;89:623-629.
154. Morishima Y, Tanaka T, Watanabe K, Igarashi T, Yasuoka M, Shibano T. Prevention by DV-7028, a selective 5-HT₂ receptor antagonist, of the formation of coronary thrombi in dogs. *Cardiovasc Res* 1991;25:727-730.
155. Lewis HD Jr, Davis JW, Archibald DG, Steinke WE, Smitherman TC, Doherty JE 3d, Schnaper HW, LeWinter MM, Linares E, Pouget JM, Sabharwal SC, Chesler E, DeMots H. Protective effects of aspirin against acute myocardial infarction and death in men with unstable angina: results of a Veterans Administration Cooperative Study. *N Engl J Med* 1983;309:396-403.
156. Cairns JA, Gent M, Singer J, Finnie KJ, Froggatt GM, Holder DA, Jablonsky G, Kostuk WJ, Melendez LJ, Myers MG, Sackett DL, Sealey BJ, Tanser PH. Aspirin, sulfinpyrazone, or both in

- unstable angina: results of a Canadian multicenter trial. *N Engl J Med* 1985;313:1369-1375.
157. Thérioux P, Ouimet H, McCans J, Latour JG, Joly P, Lévy G, Pelletier E, Juneau M, Stasiak J, deGuise P, Pelletier GB, Rinzler D, Waters DD. Aspirin, heparin, or both to treat acute unstable angina. *N Engl J Med* 1988;319:1105-1011.
 158. The RISC Group. Risk of myocardial infarction and death during treatment with low dose aspirin and intravenous heparin in men with unstable coronary disease. *Lancet* 1990;336:827-830.
 159. Roux S, Christeller S, Lüdin E. Effects of aspirin on coronary reocclusion and recurrent ischemia after thrombolysis: a meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 1992;19:671-677.
 160. Garcia-Dorado D, Thérioux P, Tornos P, Sambola A, Oliveras J, Santos M, Soler Soler J. Previous aspirin use may attenuate the severity of the manifestation of acute ischemic syndromes. *Circulation* 1995;92:1743-1748.
 161. Sanz G, Pajaron A, Alegria E, Coello I, Cardona M, Fournier JA, Gomez-Recio M, Ruano J, Hidalgo R, Medina A, Oller G, Colman T, Malpartida F, Bosch X, and the Grupo Español para el Seguimiento del Injerto Coronario (GESIC). Prevention of early aortocoronary bypass occlusion by low-dose aspirin and dipyridamole: Grupo Español para el Seguimiento del Injerto Coronario. *Circulation* 1990;82:765-773.
 162. Antiplatelet Trialists' Collaboration. Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy, I: prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. *BMJ* 1994;308:81-106.
 163. Steering Committee of the Physicians' Health Study Research Group. Final Report on the aspirin component of the ongoing Physicians' Health Study. *N Engl J Med* 1989;321:129-135.
 164. The Medical Research Council's General Practice Research Framework. Thrombosis prevention trial: randomised trial of low-intensity oral anticoagulation with warfarin and low-dose aspirin in the primary prevention of ischaemic heart disease in men at increased risk. *Lancet* 1998;351:233-241.
 165. Husain S, Andrews NP, Mulcahy D, Panza JA, Quyyumi AA. Aspirin improves endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 1998;97:716-720.
 166. Ikonomidis I, Andreotti F, Economou E, Stefanadis C, Toutouzias P, Nihoyannopoulos P. Increased proinflammatory cytokines in patients with chronic stable angina and their reduction by aspirin. *Circulation* 1999;100:793-798.
 167. Bhagat K, Vallance P. Inflammatory cytokines impair endothelium-dependent dilatation in human veins

- in vivo. *Circulation* 1997;96:3042-3047.
168. Bayón Y, Alonso A, Sánchez Crespo M. 4-trifluoromethyl derivatives of salicylate, trifusal and its main metabolite 2-hydroxy-4-trifluoromethylbenzoic acid, are potent inhibitors of nuclear factor κ B activation. *Br J Pharmacol* 1999;126:1359-1366.
 169. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1997;336:973-979.
 170. Merhi Y, Provost P, Guidoin R, Latour J-G. Importance of platelets in neutrophil adhesion and vasoconstriction after deep carotid arterial injury by angioplasty in pigs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1185-1191.
 171. Speir E, Yu Z-X, Ferrans VJ, Huang E-S, Epstein SE. Aspirin attenuates cytomegalovirus infectivity and gene expression mediated by cyclooxygenase-2 in coronary artery smooth muscle cells. *Circ Res* 1998;83:210-216.
 172. Oberle S, Polte T, Abate A, Podhaisky H-P, Schröder H. Aspirin increases ferritin synthesis in endothelial cells: a novel antioxidant pathway. *Circ Res* 1998;82:1016-1020.
 173. Alhaddad IA, Tkaczewski L, Siddiqui F, Mir R, Brown EJ Jr. Aspirin enhances the benefits of late reperfusion on infarct shape: a possible mechanism of the beneficial effects of aspirin on survival after acute myocardial infarction. *Circulation* 1995;91:2819-2823.
 174. Bonow RO, Lipson LC, Sheehan FH, Capurro NL, Isner JM, Roberts WC, Goldstein RE, Epstein SE. Lack of benefit of aspirin on myocardial infarct size in the dog. *Am J Cardiol* 1981;47:258-264.
 175. Flynn PJ, Becker WK, Vercellotti GM, Weisdorf DJ, Craddock PR, Hammerschmidt DE, Lillehei RC, Jacob HS. Ibuprofen inhibits granulocyte responses to inflammatory mediators: a proposed mechanism for reduction of experimental myocardial infarct size. *Inflammation* 1984;8:33-44.
 176. Möbert J, Becker BF. Cyclooxygenase inhibition aggravates ischemia-reperfusion injury in the perfused guinea pig heart: involvement of isoprostanes. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:1687-1694.
 177. Sullivan AT, Baker DJ, Drew GM. Effect of calcium channel blocking agents on infarct size after ischaemia-reperfusion in anaesthetised pigs: relationship between cardioprotection and cardiodepression. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991;17:707-717.
 178. Garcia-Dorado D, Théroux P, Elizaga J, Galifanes M, Solares J, Riesgo M, Gomez MJ, Garcia-Dorado A, Fernandez Aviles F. Myocardial reperfusion in the pig heart model: infarct size and duration of coronary occlusion. *Cardiovasc Res* 1987;21:537-544.

179. Barrabés JA, Garcia-Dorado D, Oliveras J, González MA, Ruiz-Meana M, Solares J, García Burillo A, Lidón R-M, Antolín M, Castell J, Soler-Soler J. Intimal injury in a transiently occluded coronary artery increases myocardial necrosis: effect of aspirin. *Pflügers Arch* 1996;432:663-670.
180. Garcia-Dorado D, Théroux P, Duran JM, Solares J, Alonso J, Sanz E, Munoz R, Elizaga J, Botas J, Fernandez-Avilés F, Soriano J, Esteban E. 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;85:1160-1174.
181. Theroux P, Franklin D, Ross J Jr, Kemper WS. Regional myocardial function during acute coronary artery occlusion and its modification by pharmacologic agents in the dog. *Circ Res* 1974;35:896-908.
182. Danpure HJ, Osman S. Investigations to determine the optimum conditions for radiolabelling human platelets with $^{99}\text{Tc}^m$ -hexamethyl propylene amine oxime ($^{99}\text{Tc}^m$ -HM-PAO). *Nucl Med Commun* 1988;9:267-272.
183. Fishbein MC, Meerbaum S, Rit J, Lando U, Kanmatsuse K, Mercier JC, Corday E, Ganz W. Early phase acute myocardial infarct size quantification: validation of the triphenyl tetrazolium chloride tissue enzyme staining technique. *Am Heart J* 1981;101:593-600.
184. Griswold DE, Hillegass LM, Hill DE, Egan JW, Smith EF 3d. Method for quantification of myocardial infarction and inflammatory cell infiltration in rat cardiac tissue. *J Pharmacol Methods* 1988;20:225-235.
185. Bradley PP, Priebe DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 1982;78:206-209.
186. Groves PH, Lewis MJ, Cheadle HA, Penny WJ. SIN-1 reduces platelet adhesion and platelet thrombus formation in a porcine model of balloon angioplasty. *Circulation* 1993;87:590-597.
187. Hale SL, Alker KJ, Kloner RA. Evaluation of nonradioactive, colored microspheres for measurement of regional myocardial blood flow in dogs. *Circulation* 1988;78:428-434.
188. Kowallik P, Schulz R, Guth BD, Schade A, Paffhausen W, Gross R, Heusch G. Measurement of regional myocardial blood flow with multiple colored microspheres. *Circulation* 1991;83:974-982.
189. Kobayashi N, Kobayashi K, Kouno K, Horinaka S, Yagi S. Effects of intra-atrial injection of colored microspheres on systemic hemodynamics and regional blood flow in rats. *Am J Physiol* 1994;266:H1910-H1917.

190. Sanz E, García Dorado D, Oliveras J, Barrabés JA, Gonzalez MA, Ruiz-Meana M, Solares J, Carreras MJ, García-Lafente A, Desco M, Soler-Soler J. Dissociation between anti-infarct effect and anti-edema effect of ischemic preconditioning. *Am J Physiol* 1995;268:H233-H241.
191. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication n° 85-23. US National Institutes of Health, Bethesda, 1996.
192. Liu JJ, Chen JR, Wiley J, Johnston CC, Buxton BF. Inhibition by a stable factor derived from neutrophils of endothelium-dependent relaxation in rat aorta. *Am J Physiol* 1993;265:H1454-H1459.
193. Hart-Favaloro JL, Woodman OL. Rabbit polymorphonuclear leukocytes release a factor that causes constriction of the coronary vasculature. *Am J Physiol* 1998;275:H1322-H1328.
194. Libersan D, Quan E, Merhi Y, Uzan A, Laperrière L, Latour J-G. Intravenous aspirin at reperfusion does not reduce infarct size in the dog with a residual critical stenosis. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999;34:575-583.
195. Brezinski DA, Nesto RW, Serhan CN. Angioplasty triggers intracoronary leukotrienes and lipoxin A4: impact of aspirin therapy. *Circulation* 1992;86:56-63.
196. Karmazyn M. Contribution of prostaglandins to reperfusion-induced ventricular failure in isolated rat hearts. *Am J Physiol* 1986;251:H133-H140.
197. Molderings GH, Schümann H-J. Influence of cyclooxygenase inhibitors and of lithium on the positive inotropic effect mediated by α_1 -adrenoceptors in guinea-pig left atrium. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1987;336:403-408.
198. Barrabés JA, Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Piper HM, Solares J, González MA, Oliveras J, Herrejón MP, Soler Soler J. Myocardial segment shrinkage during coronary reperfusion in situ: relation to hypercontracture and myocardial necrosis. *Pflügers Arch* 1996;431:519-526.
199. Chatelain P, Latour J-G, Tran D, de Lorgeril M, Dupras G, Bourassa M. Neutrophil accumulation in experimental myocardial infarcts: relation with extent of injury and effect of reperfusion. *Circulation* 1987;75:1083-1090.
200. Kloner RA, Alker K, Campbell C, Figures G, Eisenhauer A, Hale S. Does tissue-type plasminogen activator have direct beneficial effects on the myocardium independent of its ability to lyse intracoronary thrombi? *Circulation* 1989;79:1125-1136.
201. Mehta JL, Nichols WW, Donnelly WH, Lawson DL, Saldeen TGP. Impaired canine coronary

- vasodilator response to acetylcholine and bradykinin after occlusion-reperfusion. *Circ Res* 1989;64:43-54.
202. de Lorgeril M, Rousseau G, Basmadjian A, St-Jean G, Tran DC, Latour JG. Spatial and temporal profiles of neutrophil accumulation in the reperfused ischemic myocardium. *Am J Cardiovasc Pathol* 1990;3:143-154.
203. Dreyer WJ, Michael LH, West MS, Smith CW, Rothlein R, Rossen RD, Anderson DC, Entman ML. Neutrophil accumulation in ischemic canine myocardium: insights into time course, distribution, and mechanism of localization during early reperfusion. *Circulation* 1991;84:400-411.
204. Hale SL, Kloner RA. Time course of infiltration and distribution of neutrophils following coronary artery reperfusion in the rat. *Coron Art Dis* 1991;2:373-378.
205. Sheridan FM, Cole PG, Ramage D. Leukocyte adhesion to the coronary microvasculature during ischemia and reperfusion in an in vivo canine model. *Circulation* 1996;93:1784-1787.
206. Golino P, Ragni M, Cirillo P, Avvedimento VE, Feliciello A, Esposito N, Scognamiglio A, Trimarco B, Iaccarino G, Condorelli M, Chiariello M, Ambrosio G. Effects of tissue factor induced by oxygen free radicals on coronary flow during reperfusion. *Nat Med* 1996;2:35-40.
207. Neumann F-J, Blasini R, Schmitt C, Alt E, Dirschinger J, Gawaz M, Kastrati A, Schömig A. Effect of glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade on recovery of coronary flow and left ventricular function after the placement of coronary-artery stents in acute myocardial infarction. *Circulation* 1998;98:2695-2701.
208. de Lemos JA, Antman EM, Gibson CM, McCabe CH, Giugliano RP, Murphy SA, Coulter SA, Anderson K, Scherer J, Frey MJ, Van der Wieken R, Van de Werf F, Braunwald E, for the TIMI 14 Investigators. Abciximab improves both epicardial flow and myocardial reperfusion in ST-elevation myocardial infarction: observations from the TIMI 14 Trial. *Circulation* 2000;101:239-243.
209. Choudri TF, Hoh BL, Zerwes HG, Prestigiacomo CJ, Kim SC, Connolly ES Jr, Kottirsch G, Pinsky DJ. Reduced microvascular thrombosis and improved outcome in acute murine stroke by inhibiting GP IIb/IIIa receptor-mediated platelet aggregation. *J Clin Invest* 1998;102:1301-1310.
210. Barrabés JA, Garcia-Dorado D, Puigfel Y, Blanco J, Ruiz-Meana M, Lidón RM, Soriano B, Théroux P, Soler-Soler J. GP IIb/IIIa blockade does not reduce myocardial platelet accumulation or infarct size after transient ischaemia in pigs (abstract). *Eur Heart J* 2000 (en prensa).
211. Murphy JF, Bordet JC, Wyler B, Rissoan MC, Chomarot P, Defrance T, Miossec P, McGregor JL. The vitronectin receptor ($\alpha_v\beta_3$) is implicated, in cooperation with P-selectin and platelet activating

- factor, in the adhesion of monocytes to activated endothelial cells. *Biochem J* 1994;304:537-542.
212. Gawaz M, Neumann F-J, Dickfeld T, Reininger A, Adelsberger H, Gebhardt A, Schömig A. Vitronectin receptor ($\alpha_v\beta_3$) mediates platelet adhesion to the luminal aspect of endothelial cells: implications for reperfusion in acute myocardial infarction. *Circulation* 1997;96:1809-1818.
213. Simon DI, Xu H, Ortlepp S, Rogers C, Rao NK. 7E3 monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa cross-reacts with the leukocyte integrin Mac-1 and blocks adhesion to fibrinogen and ICAM-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:528-535.
214. Mickelson JK, Ali MN, Kleiman NS, Lakkis NM, Chow TW, Hughes BJ, Smith CW. Chimeric 7E3 Fab (ReoPro) decreases detectable CD11b on neutrophils from patients undergoing coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1999;33:97-106.
215. Spagnuolo PJ, Ellner JJ, Hassid A, Dunn MJ. Thromboxane A_2 mediates augmented polymorphonuclear leukocyte adhesiveness. *J Clin Invest* 1980;66:406-414.
216. Merhi Y, Provost P, Chauvet P, Theoret JF, Phillips ML, Latour J-G. Selectin blockade reduces neutrophil interaction with platelets at the site of deep arterial injury by angioplasty in pigs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:372-377.
217. Weyrich AS, Ma X-Y, Lefer DJ, Albertine KH, Lefer AM. In vivo neutralization of P-selectin protects feline heart and endothelium in myocardial ischemia and reperfusion injury. *J Clin Invest* 1993;91:2620-2629.
218. Fujiwara H, Ashraf M, Sato S, Millard RW. Transmural cellular damage and blood flow distribution in early ischemia in pig hearts. *Circ Res* 1982;51:683-693.
219. Mullane KM, Kraemer R, Smith B. Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. *J Pharmacol Methods* 1985;14:157-167.
220. Karch SB, Billingham ME. Myocardial contraction band revisited. *Hum Pathol* 1986;17:9-13.
221. Lesnefsky EJ, VanBenthuyzen KM, McMurtry IF, Shikes RH, Johnston RB Jr, Horwitz LD. Lidocaine reduces infarct size and decreases release of a lipid peroxidation product. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989;13:895-901.
222. Homeister JW, Hoff PT, Fletcher DD, Lucchesi BR. Combined adenosine and lidocaine administration limits myocardial reperfusion injury. *Circulation* 1990;82:595-608.
223. O'Rourke ST, Folts JD, Albrecht RM. Inhibition of canine platelet aggregation by barbiturates. *J Lab Clin Med* 1986;108:206-212.

224. Parolari A, Guarnieri D, Alamanni F, Toscano T, Tantalò V, Gherli T, Colli S, Foini F, Franze V, Stanghellini M, Gianotti GA, Biglioli P, Tremoli E. Platelet function and anesthetics in cardiac surgery: an in vitro and ex vivo study. *Anesth Analg* 1999;89:26-31.



Servei de Biblioteques

Reg. 1100764230

Sig. TVAB 15340

Ref. 12500

