

Artículo original

Infusión intracoronaria de tioflavina-S para el estudio de la obstrucción microvascular en un modelo de infarto de miocardio



Arantxa Hervás^a, Elena de Dios^a, María J. Forteza^a, Gema Miñana^a, Julio Nuñez^b, Amparo Ruiz-Sauri^c, Clara Bonanad^b, Nerea Perez-Sole^a, Francisco J. Chorro^b y Vicente Bodi^{b,*}

^a Instituto de Investigación Sanitaria, INCLIVA, Valencia, España

^b Servicio de Cardiología, Hospital Clínico Universitario, Universitat de València, INCLIVA, Valencia, España

^c Universitat de València, INCLIVA, Valencia, España

Historia del artículo:

Recibido el 23 de enero de 2015

Aceptado el 21 de abril de 2015

On-line el 5 de agosto de 2015

Palabras clave:

Infarto de miocardio

Microcirculación

Modelo porcino

RESUMEN

Introducción y objetivos: La obstrucción microvascular produce efectos nocivos después del infarto de miocardio. Con objeto de esclarecer el papel de la lesión por isquemia-reperusión en la aparición y la dinámica de la obstrucción microvascular, se llevó a cabo un estudio metodológico preliminar para definir con exactitud este proceso en un modelo *in vivo*.

Métodos: Se indujo un infarto de miocardio en cerdos mediante una oclusión de 90 min en la parte media de la arteria coronaria descendente anterior izquierda empleando balones de angioplastia. Se aplicó una infusión intracoronaria de tioflavina-S y se comparó con la instilación tradicional intraaórtica o intraventricular. Se cuantificó el área perfundida por la arteria coronaria descendente anterior izquierda y la obstrucción microvascular en los grupos sin reperusión (administración de tioflavina-S a través de la luz de un balón hinchado montado sobre la guía) y con reperusión de 1 min, 1 semana y 1 mes (administración de tioflavina-S mediante el catéter intracoronario después de deshinchar el balón).

Resultados: En comparación con la administración intraaórtica e intraventricular, la infusión intracoronaria de tioflavina-S permitió una evaluación mucho más clara del área perfundida por la arteria coronaria descendente anterior izquierda y de la obstrucción microvascular. La lesión por isquemia-reperusión tuvo un papel decisivo en la aparición y la dinámica de la obstrucción microvascular. El grupo sin reperusión presentó una perfusión completamente preservada. Con la misma duración de la oclusión coronaria, la obstrucción microvascular se detectó ya en el grupo de reperusión de 1 min ($14 \pm 7\%$), alcanzó un máximo en el grupo de reperusión de 1 semana ($21 \pm 7\%$) y se redujo significativamente en el grupo de reperusión de 1 mes ($4 \pm 3\%$; $p < 0,001$).

Conclusiones: Se presenta una prueba de concepto del papel crucial que desempeña la lesión por isquemia-reperusión en la aparición y la dinámica de la obstrucción microvascular. El modelo de cerdo descrito, que emplea inyección intracoronaria de tioflavina-S, permite una caracterización exacta de la obstrucción microvascular después del infarto de miocardio.

© 2015 Sociedad Española de Cardiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Intracoronary Infusion of Thioflavin-S to Study Microvascular Obstruction in a Model of Myocardial Infarction

ABSTRACT

Introduction and objectives: Microvascular obstruction exerts deleterious effects after myocardial infarction. To elucidate the role of ischemia-reperfusion injury on the occurrence and dynamics of microvascular obstruction, we performed a preliminary methodological study to accurately define this process in an *in vivo* model.

Methods: Myocardial infarction was induced in swine by means of 90-min of occlusion of the mid left anterior descending coronary artery using angioplasty balloons. Intracoronary infusion of thioflavin-S was applied and compared with traditional intra-aortic or intraventricular instillation. The left anterior descending coronary artery perfused area and microvascular obstruction were quantified in groups with no reperfusion (thioflavin-S administered through the lumen of an inflated over-the-wire balloon) and with 1-min, 1-week, and 1-month reperfusion (thioflavin-S administered from the intracoronary catheter after balloon deflation).

Keywords:

Myocardial infarction

Microcirculation

Swine model

VÉASE CONTENIDO RELACIONADO:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.recesp.2015.06.023>, Rev Esp Cardiol. 2015;68:919–20.

* Autor para correspondencia: Servicio de Cardiología, Hospital Clínico Universitario, Universitat de València, INCLIVA, Blasco Ibáñez 17, 46010 Valencia, España. Correo electrónico: vicente.bodi@uv.es (V. Bodi).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.recesp.2015.04.016>

0300-8932/© 2015 Sociedad Española de Cardiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Results: In comparison with intra-aortic and intraventricular administration, intracoronary infusion of thioflavin-S permitted a much clearer assessment of the left anterior descending coronary artery perfused area and of microvascular obstruction. Ischemia-reperfusion injury exerted a decisive role on the occurrence and dynamics of microvascular obstruction. The no-reperfusion group displayed completely preserved perfusion. With the same duration of coronary occlusion, microvascular obstruction was already detected in the 1-min reperfusion group ($14\% \pm 7\%$), peaked in the 1-week reperfusion group ($21\% \pm 7\%$), and significantly decreased in the 1-month reperfusion group ($4\% \pm 3\%$; $P < .001$).

Conclusions: We present proof-of-concept evidence on the crucial role of ischemia-reperfusion injury on the occurrence and dynamics of microvascular obstruction. The described porcine model using intracoronary injection of thioflavin-S permits accurate characterization of microvascular obstruction after myocardial infarction.

Full English text available from: www.revespcardiol.org/en

© 2015 Sociedad Española de Cardiología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Abreviaturas

DAI: arteria coronaria descendente anterior izquierda
IAM: infarto agudo de miocardio
OMV: obstrucción microvascular
T-S: tioflavina-S
VD: ventrículo derecho
VI: ventrículo izquierdo

INTRODUCCIÓN

El restablecimiento rápido y completo de la permeabilidad del vaso del infarto es el objetivo principal en los pacientes con infarto agudo de miocardio (IAM)¹. No obstante, este enfoque no asegura una perfusión adecuada a nivel microvascular, y el deterioro de la perfusión persiste en un número considerable de pacientes². Este fenómeno se denomina obstrucción microvascular (OMV) y tiene una profunda repercusión negativa después de un IAM³⁻⁵.

La lesión por isquemia-reperusión se ha estudiado ampliamente en el IAM^{6,7} y podría producir efectos nocivos para la integridad microvascular^{2,3}. No obstante, no hay evidencia definitiva de una asociación directa entre la lesión por reperusión y la aparición de una OMV en muestras de miocardio obtenidas inmediatamente después del restablecimiento del flujo coronario. Hay una urgente necesidad de modelos animales *in vivo* y exactos que simulen la dinámica de la OMV existente en el ser humano. Tales modelos permitirían conocer mejor la fisiopatología y la evolución temporal de este proceso y, a su vez, la exploración de nuevas posibilidades terapéuticas en unas condiciones controladas.

El presente estudio tiene como objetivo aportar evidencia como prueba de concepto del papel crucial que desempeña la lesión por isquemia-reperusión en la aparición de la OMV y la dinámica de este proceso. Hasta el momento, los medios de contraste utilizados para el estudio de la perfusión en muestras miocárdicas obtenidas en modelos animales *in vivo* se han infundido en la aurícula izquierda⁸, el ventrículo izquierdo (VI)⁹ o por vía intravenosa¹⁰. Con objeto de estudiar de manera efectiva la OMV, se llevó a cabo un estudio metodológico preliminar, que consistió en investigar la mejor vía para la administración de tioflavina-S (T-S) para definir con exactitud la OMV.

MÉTODOS

Estudio experimental

Se utilizaron 31 cerdos domésticos de corta edad, que pesaban entre 25 y 30 kg. El protocolo del estudio fue aprobado por el

comité de ética de experimentación animal y se atiene a lo establecido en la reglamentación actual de España (Real Decreto 53/2013 de 1 de febrero) y en la Directiva Europea 2010/63/EC.

Puede consultarse información adicional detallada respecto al protocolo de estudio en otras publicaciones^{11,12}. De forma resumida, los cerdos recibieron un tratamiento previo por vía intravenosa con amiodarona (300 mg) y lidocaína (30 mg) con objeto de reducir las arritmias que pudieran comportar un peligro para la vida. Se introdujo una vaina de calibre 7 Fr en la arteria femoral derecha para el registro de la presión arterial y el acceso a la arteria coronaria descendente anterior izquierda (DAI). Se utilizó un catéter Amplatz Izquierdo 0,75 de 7 Fr para colocarlo selectivamente en la parte proximal de la DAI, y se introdujo una guía de angioplastia hidrófila estándar que se colocó en la parte distal de la DAI. Se hinchó un balón de angioplastia de $2,5 \times 15$ mm a una presión de 6 atm en la parte media de la DAI, distal a la primera rama diagonal. Se confirmó la oclusión de la arteria coronaria mediante la inyección de medio de contraste y por la elevación del segmento ST en el electrocardiograma.

Se llevaron a cabo tres grupos de experimentos con reperusión. Se deshinchó el balón después de 90 min de oclusión coronaria y se documentó mediante angiografía el restablecimiento de un flujo coronario normal. En el grupo de reperusión durante 1 min ($n = 5$), se realizó una infusión selectiva de 20 ml de una solución de T-S al 4% en la parte proximal de la DAI a través del catéter Amplatz Izquierdo 0,75 1 min después de deshinchar el balón, y se provocó una parada cardiaca con cloruro potásico, tras lo cual se extrajo el corazón (figura 1). En los animales de los grupos de reperusión durante 1 semana y durante 1 mes, se permitió la recuperación y, al cabo de 1 semana ($n = 5$) o de 1 mes ($n = 5$) respectivamente, se siguió el mismo protocolo de estudio y se infundieron selectivamente 20 ml de solución de T-S al 4% en la parte proximal de la DAI a través del catéter Amplatz Izquierdo 0,75. Se provocó la parada cardiaca con cloruro potásico y se extrajo el corazón.

Posteriormente, con objeto de evaluar el papel que desempeña la lesión por reperusión en la aparición de la OMV, se comparó el grupo de reperusión durante 1 min con un grupo sin reperusión ($n = 5$) al que se aplicó un periodo de isquemia idéntico de 90 min, pero sin reperusión posterior. En este grupo de experimentación, no se deshinchó el balón y los 20 ml de solución de T-S al 4% se infundieron selectivamente en la parte media de la DAI después de la primera rama diagonal a través de la luz de un balón montado sobre la guía (figura 1). Inmediatamente después de la administración de T-S, se provocó la parada cardiaca con cloruro potásico y se extrajo el corazón.

Formaron el grupo de control cinco experimentos. En ese grupo se utilizó el mismo protocolo de estudio descrito, pero no se hinchó el balón de angioplastia y, por lo tanto, no se provocó isquemia e infarto. Se realizó una infusión de 20 ml de la solución de T-S al 4% selectivamente en la parte proximal de la DAI, a través del catéter

Amplatz Izquierdo 0,75. Se provocó la parada cardiaca con cloruro potásico y se extrajo el corazón.

Se llevó a cabo una serie preliminar de experimentos para comparar la instilación intraventricular e intraaórtica transcáteter con la metodología utilizada en el presente estudio (infusión intracoronaria de T-S). Se utilizó el protocolo ya descrito para la inducción del IAM en 6 cerdos. A continuación, se retiró el balón de angioplastia y se dejó que los cerdos se recuperaran. Una semana después del infarto, se colocó el catéter Amplatz Izquierdo 0,75 en el VI ($n = 3$) o en la aorta ($n = 3$), y se perfundieron allí 20 ml de la solución de T-S al 4%. Se provocó la parada cardiaca con cloruro potásico y se extrajo el corazón. Se comparó la precisión de la infusión intraaórtica e intraventricular de T-S con la de la infusión intracoronaria para evaluar el área perfundida por la DAI y la OMV (figura 1).

Además, con objeto de determinar cuál era el mejor método de administración de T-S para diferenciar el área de OMV y el área perfundida por la DAI, se cuantificó el cociente de intensidad de señal del área de OMV respecto al área perfundida por la DAI que era negativa para OMV, en muestras obtenidas tras las infusiones intraventricular, intraaórtica e intracoronaria, mediante el programa informático MATLAB 6.5 (The Mathworks, Inc.; Natick,

Massachusetts, Estados Unidos). Este parámetro se definió como el cociente entre la señal obtenida en las áreas perfundidas por la DAI que eran negativas para OMV y la señal obtenida en las áreas que presentaban OMV. Los valores más altos indicaban una mejor diferenciación entre esas regiones y, por lo tanto, mejor capacidad de distinguir y cuantificar el área de OMV.

Estudio macroscópico de muestras de miocardio

Inmediatamente después de la extirpación, se examinó el corazón completo bajo luz ultravioleta y se fotografió. A continuación, se realizaron cortes de 5 mm de grosor siguiendo el eje corto. Para evaluar la perfusión miocárdica en el VI, cada corte se examinó bajo luz ultravioleta y se fotografió (figura 1). El área perfundida por la DAI se definió como el porcentaje de volumen del miocardio que mostraba tinción con T-S. Las zonas azul oscuro eran las no perfundidas por la DAI, mientras que las zonas de azul claro eran las perfundidas por la DAI. Se interpretó como OMV la falta de tinción de T-S en la parte central del área perfundida por la DAI (figura 2), y ello se expresa como porcentaje del área perfundida por la DAI.

A continuación, los cortes se incubaron en una solución de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio al 2% durante 20 min a 37 °C. Por último, se examinaron bajo luz ambiental y se fotografiaron. Se definió como tejido infartado el área del miocardio que no se teñía

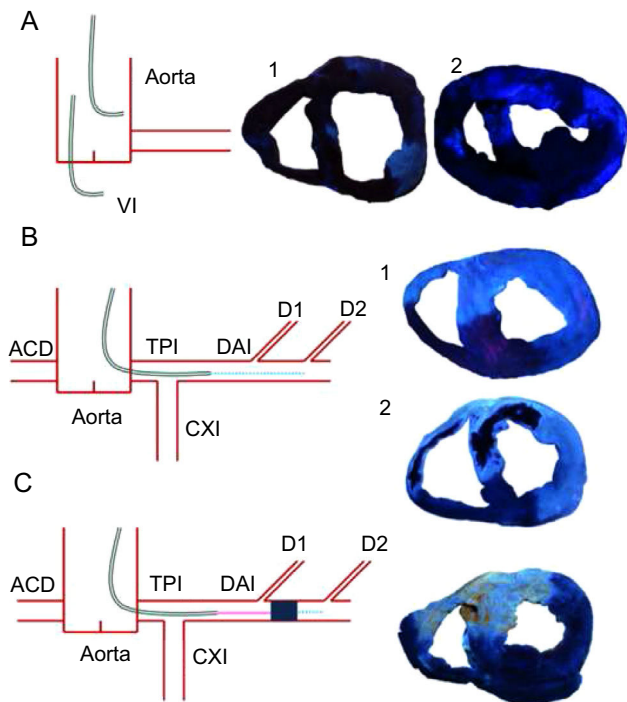


Figura 1. Metodología utilizada para la infusión de tioflavina-S. Izquierda: los diagramas resumen los diferentes métodos utilizados para la infusión de tioflavina-S. Derecha: imágenes obtenidas bajo iluminación con azul ultravioleta. A: la infusión en la aorta (1) o en el ventrículo izquierdo (2) produjo una mala definición del área perfundida por la arteria coronaria descendente anterior izquierda y de la obstrucción microvascular. B: la infusión a través del catéter introducido en la parte proximal de la arteria coronaria descendente anterior izquierda proporcionó una definición perfecta del área perfundida por la arteria coronaria descendente anterior izquierda y de la obstrucción microvascular; este método se utilizó en el grupo de control (1) y en los grupos de reperusión de 1 min, 1 semana (2) y 1 mes; los puntos azul claro corresponden al lugar de infusión de tioflavina-S. C: la infusión en la parte media de la arteria coronaria descendente anterior izquierda a través de la luz del balón de angioplastia montado sobre la guía, que se mantuvo hinchado durante todo el experimento, produjo una definición perfecta del área perfundida por la arteria coronaria descendente anterior izquierda; este método se utilizó en el grupo sin reperusión. ACD: arteria coronaria derecha; CXI: arteria circunfleja izquierda; D: diagonal; DAI: arteria coronaria descendente anterior izquierda; TPI: tronco principal izquierdo; VI: ventrículo izquierdo. Esta figura se muestra a todo color solo en la versión electrónica del artículo.

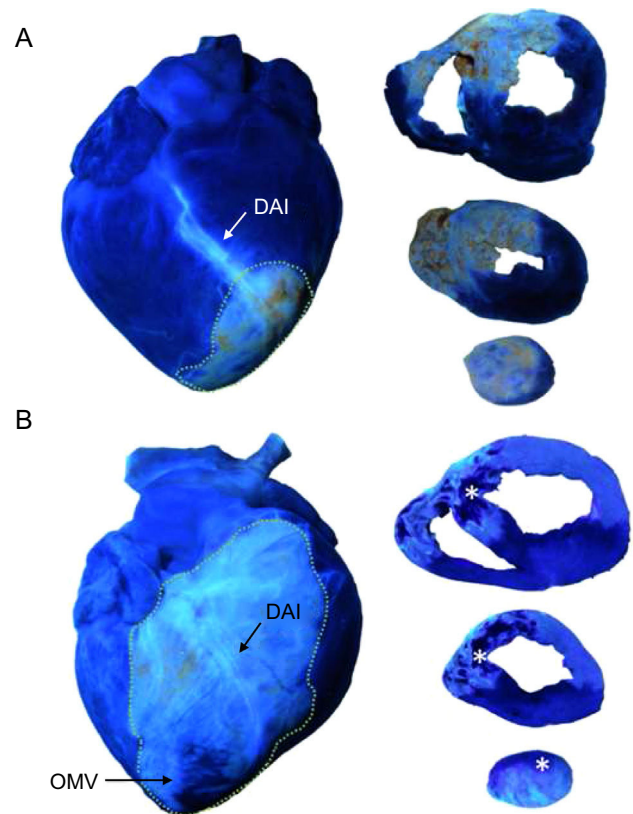


Figura 2. Efecto de la lesión por isquemia-reperusión en la aparición de la obstrucción microvascular. Las imágenes muestran que, en iguales condiciones y duración de la oclusión coronaria, la perfusión se preservó en el grupo sin reperusión, mientras que se detectó obstrucción microvascular después de tan solo 1 min de reperusión. Los asteriscos indican el área de obstrucción microvascular. Los puntos delimitan el área perfundida por la arteria coronaria descendente anterior izquierda. A: un ejemplo del corazón completo y los cortes en el grupo sin reperusión. B: un ejemplo del corazón completo y los cortes en el grupo de reperusión de 1 min. DAI: arteria coronaria descendente anterior izquierda; OMV: obstrucción microvascular.

con el cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio y se expresó como porcentaje del área de perfusión de la DAI.

Se cuantificó el grosor de la pared del miocardio de las zonas de OMV, infarto, área adyacente y área remota en las imágenes obtenidas con luz ultravioleta. Se definió como área de infarto el área que no se teñía con el cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio y era negativa para OMV; se definió como área adyacente el área perfundida por la DAI no infartada (con tinción de T-S y de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio), y se definió el área remota como el miocardio no perfundido por la DAI (sin tinción de T-S).

Se llevó a cabo un subanálisis por separado del área perfundida por la DAI, la OMV, el tejido infartado y el grosor de la pared del ventrículo derecho (VD) utilizando la misma metodología que se empleó para esos parámetros en el VI.

Se digitalizaron las imágenes y más tarde un evaluador experimentado que no conocía el protocolo aplicado en cada experimento realizó una cuantificación manual de todos los cortes obtenidos en el eje corto en un laboratorio especializado (Unidad de Técnicas de Imagen Cardíaca, INCLIVA, Valencia, España). Se utilizó el programa informático MATLAB 6.5. En todas las imágenes se fotografió junto a los cortes de miocardio una regla de medición, que se utilizó como referencia para todas las mediciones. Esto, junto con el grosor de corte predefinido (5 mm), permitió el cálculo de los volúmenes de miocardio del VI y el VD.

Análisis estadístico

Los datos de variables continuas se expresan mediante la media \pm desviación estándar y se compararon con pruebas de la t de Student para datos no apareados. Los porcentajes se compararon con la prueba de la χ^2 ; se utilizó la prueba exacta de Fisher cuando resultó apropiado. Se consideró estadísticamente significativo un valor de p bilateral $< 0,05$. En todos los análisis se utilizó el programa SPSS 22.0 (SPSS Inc.; Chicago, Illinois, Estados Unidos).

RESULTADOS

Tres de los experimentos no se completaron: dos de ellos a causa de una fibrilación ventricular refractaria y uno por problemas técnicos en el equipo de radiología. Fue necesaria la desfibrilación ventricular eléctrica en 7 cerdos durante la oclusión de la DAI y en 8 durante la reperusión. No se registraron complicaciones significativas a lo largo del periodo de reperusión.

Metodología utilizada para la infusión de tioflavina-S

La infusión intracoronaria de T-S, ya fuera mediante el catéter colocado en la parte proximal de la DAI (en los grupos de reperusión), ya por la luz del balón montado sobre la guía y colocado en la parte media de la DAI (en el grupo sin reperusión), produjo una definición mucho más clara del área perfundida por la DAI y de la OMV que la obtenida con la inyección intraventricular o intraaórtica (figura 1). Según lo indicado por estas observaciones, el cociente de intensidad de señal (que comparaba la intensidad del área de OMV y la del área perfundida por la DAI que era negativa para OMV) mostró unos valores más altos en las muestras obtenidas después de la infusión intracoronaria de T-S ($5 \pm 1,9$) que en las obtenidas después de la infusión intraaórtica ($1 \pm 0,5$) o intraventricular ($1 \pm 0,3$) de T-S.

Dinámica de la obstrucción microvascular

Se detectó una OMV en las muestras de miocardio del VI de todos los experimentos en los que se utilizó reperusión. La

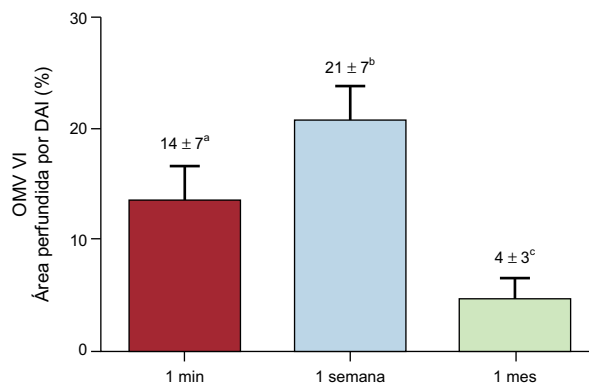


Figura 3. Dinámica de la obstrucción microvascular en el ventrículo izquierdo. El grado de obstrucción microvascular se expresa mediante el porcentaje del área perfundida por la arteria coronaria descendente anterior izquierda. La obstrucción microvascular se detectó ya en el grupo de 1 min de reperusión, alcanzó un máximo en el grupo de 1 semana y se resolvió en parte en el grupo de 1 mes de reperusión. DAI: arteria coronaria descendente anterior izquierda; OMV: obstrucción microvascular; VI: ventrículo izquierdo.

^ap < 0,01 frente al grupo de control.

^bp < 0,001 frente al grupo de control.

^cp < 0,001 frente al grupo de 1 semana de reperusión.

obstrucción microvascular se detectó ya 1 min después del inicio de la reperusión, alcanzó un máximo al cabo de 1 semana y se redujo al llegar a 1 mes. El grado de OMV detectado en el grupo de reperusión de 1 mes fue significativamente inferior al observado en el grupo de reperusión de 1 semana (figura 3 y tabla). Se obtuvieron resultados similares por lo que respecta a la dinámica de la OMV en el VD (figura 1 y tabla 1 del material suplementario).

Evidencia que es una prueba de concepto del efecto de la lesión por isquemia-reperusión en la obstrucción microvascular

En los experimentos realizados en las mismas condiciones controladas y con la misma duración de la oclusión coronaria, la OMV se produjo tan solo en las muestras de miocardio obtenidas de animales a los que se aplicó reperusión. En la figura 2 se muestra el papel crucial de la lesión por reperusión en la aparición de la OMV. Mientras que la perfusión miocárdica se preservó por completo en las muestras de miocardio obtenidas en todos los

Tabla

Área perfundida por la arteria coronaria descendente anterior izquierda, obstrucción microvascular, área de infarto y grosor de la pared miocárdica en el ventrículo izquierdo en las tres series de experimentos

VI	1 min	1 semana	1 mes
Área perfundida por la DAI (% del VI)	65 ± 6	76 ± 8	66 ± 13
OMV (% del área perfundida por la DAI)	14 ± 7 ^a	21 ± 7 ^b	4 ± 3 ^c
Área de infarto (% del área perfundida por la DAI)	0 ± 0	34 ± 13 ^b	26 ± 11 ^b
Grosor de la pared del miocardio (mm)			
Área de OMV	10 ± 2,3	9 ± 2,7	7 ± 2,7
Área de infarto		10 ± 2,8	10 ± 2,7 ^d
Área adyacente	11 ± 2,4	11 ± 2,7	11 ± 3,8 ^d
Área remota	12 ± 2,6	11 ± 3,0	13 ± 4,2 ^d

DAI: arteria coronaria descendente anterior izquierda; OMV: obstrucción microvascular; VI: ventrículo izquierdo.

^a p < 0,01 frente a los controles.

^b p < 0,001 frente a los controles.

^c p < 0,001 frente a 1 semana.

^d p < 0,001 frente al área de obstrucción microvascular.

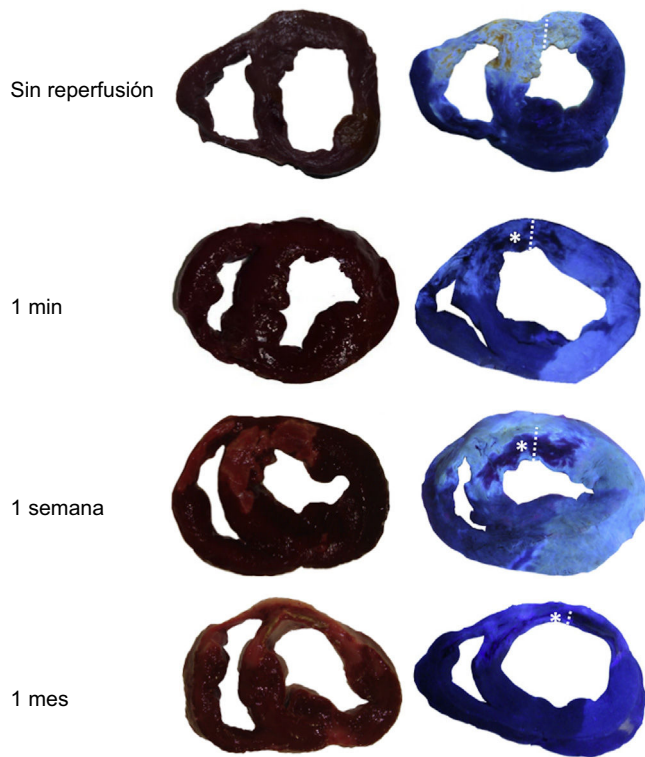


Figura 4. Consecuencias de la obstrucción microvascular en el grosor de la pared del miocardio del ventrículo izquierdo. Cortes de los grupos sin perfusión y con perfusión de 1 min, 1 semana y 1 mes, teñidos con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (paneles izquierdos) y con tioflavina-S (paneles derechos). Los asteriscos indican el área de obstrucción microvascular en los grupos con reperfundición. Los puntos delimitan el grosor de la pared del ventrículo izquierdo en el área de obstrucción microvascular. Se produjo un adelgazamiento significativo de la pared del ventrículo izquierdo en el área de obstrucción microvascular 1 mes después del inicio de la reperfundición.

experimentos del grupo sin reperfundición, se detectó OMV en todos los experimentos del grupo de reperfundición de 1 min.

Consecuencias estructurales de la obstrucción microvascular

Se detectó tejido infartado (según lo indicado por la tinción de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio) en todos los casos de los grupos de reperfundición de 1 semana y de 1 mes (tabla).

La pared del miocardio del VI tenía menor grosor en el área de OMV en el grupo de reperfundición de 1 mes, en comparación con las áreas de infarto, adyacente y remota en el mismo momento de valoración (tabla) y en comparación con el área de OMV del grupo de reperfundición de 1 semana (figura 4).

Se observó una tendencia similar por lo que respecta a la extensión del área de infarto y hubo asociación de la OMV con adelgazamiento progresivo de la pared del VD (figura 2 y tabla 1 del material suplementario).

DISCUSIÓN

La principal aportación de este estudio es la descripción del efecto crucial que ejerce la lesión por isquemia-reperfundición en la aparición y la dinámica de la OMV. Con objeto de realizar una caracterización precisa de la OMV en muestras de miocardio, se definió un modelo experimental del IAM de cara anterior basado en la infusión intracoronaria de T-S.

Metodología utilizada para la infusión de tioflavina-S

Los modelos animales permiten recrear la enfermedad humana y son una herramienta esencial para comprender mejor los mecanismos que subyacen a ella. En la actualidad, debido a los similares tamaño y fisiología cardiaca de los corazones porcino y humano, el cerdo es la especie preferida para los estudios experimentales, no solo para la lesión por isquemia-reperfundición, sino también en otras enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis¹³⁻¹⁵. Aunque los modelos porcinos de IAM están bien definidos y se han utilizado ampliamente, no se ha desarrollado una metodología dirigida específicamente a la caracterización de la OMV después de un IAM.

Se utilizó T-S, un colorante que tiñe el endotelio perfundido, para realizar mediciones cuantitativas de la OMV. Anteriormente se había descrito la infusión intraauricular⁸, intraventricular⁹ e intravenosa¹⁰ de diversos medios de contraste para distintos fines, como el análisis de la perfusión, el área en riesgo o la OMV (tabla 2 del material suplementario). Sin embargo, hasta donde se sabe, no se ha explorado con una descripción metodológica específica la administración intracoronaria del colorante. En una experiencia previa con el empleo de ecocardiografía con contraste intracoronario, se averiguó que esta vía es la que aporta la máxima definición de la perfusión miocárdica¹⁶. Estas observaciones previas sirvieron de inspiración para emprender el presente estudio. En el modelo porcino descrito para el IAM de cara anterior, la infusión intracoronaria de T-S permitió una excelente delimitación del área perfundida por la DAI y de la OMV en las muestras de miocardio obtenidas inmediatamente después de haber sacrificado a los animales. Por el contrario, la infusión de T-S por vía intraaórtica o intraventricular produjo una definición mucho peor de la perfusión miocárdica. Esta observación fue evidente tanto en el análisis visual de las imágenes como tras la cuantificación del cociente de intensidad.

La infusión intracoronaria de T-S se llevó a cabo mediante el catéter introducido en la DAI proximal (una vez deshinchado y retirado el balón de angioplastia) o a través de la luz de un balón montado sobre la guía y colocado en la parte media de la DAI (que se mantuvo hinchado durante todo el experimento). La primera de estas estrategias resultó útil para evaluar la dinámica de la OMV en diferentes momentos de valoración del proceso de isquemia-reperfundición. El segundo modelo permitió la exploración del estado de la microcirculación después de un largo periodo de isquemia, pero inmediatamente antes de los posibles efectos nocivos de la lesión por reperfundición.

Así pues, esta estrategia novedosa que utiliza una infusión intracoronaria de T-S parece ser un abordaje sencillo y fiable que permite la caracterización exacta de la perfusión miocárdica y la OMV en muestras de miocardio obtenidas en un modelo porcino *in vivo* del IAM de cara anterior. Es posible que esta metodología resulte útil en el futuro para alcanzar nuevos avances en el conocimiento de los mecanismos que subyacen en la OMV y para explorar los efectos de nuevas posibilidades terapéuticas dirigidas a prevenir o revertir este proceso.

Dinámica de la obstrucción microvascular

En las primeras horas y días siguientes a la reperfundición, se producen cambios en el estado de la microcirculación bajo la influencia de múltiples elementos patogénicos^{2,3}. Además de los autores del presente estudio, otros autores han puesto de manifiesto, empleando técnicas de imagen en los pacientes, que hay una tendencia a la resolución espontánea de la OMV durante las semanas y los meses que siguen a la reperfundición en el IAM^{2,3,17,18}.

El modelo *in vivo* que se presenta aquí es una plataforma ideal para la caracterización de la dinámica de este proceso. Para este fin, se llevaron a cabo experimentos tras distintos periodos de reperfusión: 1 min, 1 semana y 1 mes después del inicio de la reperfusión. Se observaron cambios importantes en la OMV: se detectó ya inmediatamente después de la reperfusión, alcanzó su grado máximo al cabo de 1 semana y se había resuelto casi por completo al llegar a 1 mes. En estudios recientes llevados a cabo en un modelo porcino, se han evidenciado otros aspectos del daño estructural del miocardio. En ellos se ha observado que el edema sigue un patrón bimodal durante la primera semana tras un IAM¹⁹. Los resultados del presente estudio revelan que la OMV tiene también un comportamiento dinámico que se caracteriza por un incremento durante la primera semana tras el IAM y una disminución al llegar a 1 mes. Estos resultados pueden tener consecuencias por lo que respecta al diagnóstico y el tratamiento.

En primer lugar, no hay acuerdo respecto a cuál es el momento más apropiado para evaluar la OMV en los pacientes con IAM. Según lo indicado por los resultados obtenidos, podría decirse que el análisis mediante técnicas de imagen antes del alta (aproximadamente 1 semana después del IAM) puede aportar una estimación aproximada del conjunto de todo el daño microvascular. En segundo lugar, el comportamiento dinámico de la OMV proporciona un objetivo terapéutico que va más allá de la salvación del miocardio. Hasta la fecha, aparte de una reperfusión temprana en las primeras pocas horas siguientes a la oclusión coronaria, los enfoques evaluados para reducir el tamaño del infarto no han tenido éxito²⁰. En consecuencia, la actuación sobre el miocardio dañado continúa resultando difícil. Sin embargo, aunque se han documentado claramente los efectos nocivos de una mayor OMV en la evolución clínica del paciente y el remodelado del VI, hasta el momento los tratamientos dirigidos a reducir la OMV no han sido eficaces, y en futuros estudios deberá demostrarse su utilidad adicional respecto a una reperfusión coronaria temprana mediante ensayos aleatorizados rigurosos²¹⁻²³.

Tal como se preveía, no se detectó tejido infartado en los animales de control ni en los grupos sin perfusión o con perfusión de 1 min. El área de infarto máxima se produjo 1 semana después de iniciada la reperfusión. Al llegar a 1 mes, como consecuencia del proceso de encogimiento, hubo una disminución del tamaño del infarto.

El equipo de investigación ha puesto de manifiesto en estudios previos que el daño estructural del VD no es exclusivo del IAM de cara inferior. En el IAM de cara anterior, tanto el tejido infartado como la OMV pueden detectarse en el territorio anterior del VD¹¹. El presente estudio confirma las consecuencias estructurales de un IAM de cara anterior en el VD. El curso de la OMV en el VD fue paralelo al observado en el VI. Esta observación aporta una información relevante sobre la naturaleza de la OMV y el daño por reperfusión, pero no están claras las consecuencias clínicas de estas observaciones.

Prueba de concepto del efecto de la reperfusión en la obstrucción microvascular

El papel de la lesión por isquemia-reperfusión en el daño miocárdico ha sido objeto de un amplio debate. La patogenia de la OMV es multifactorial e incluye la combinación de diversos elementos^{2,3}. No se ha esclarecido por completo el papel de la lesión por isquemia-reperfusión, en caso de que lo tenga, en este rompecabezas. La controversia respecto al papel que desempeña la lesión por isquemia-reperfusión ha existido durante años^{6,7}, pero se ha señalado que este mecanismo interviene de algún modo en la aparición de la OMV^{2,3}.

En este estudio, más allá de las afirmaciones teóricas, se pretendió aportar datos que constituyeran una prueba de concepto de la influencia decisiva que tiene la lesión por isquemia-reperfusión en la OMV. Con objeto de abordar específicamente esta cuestión, se diseñaron dos series de experimentos en los que se provocó un IAM de cara anterior en condiciones idénticas. El único factor que difería es la reperfusión. En la primera serie, al final del periodo de 90 min de oclusión de la DAI, se inyectó T-S a través de la luz del balón, que se mantuvo hinchado; así pues, no se permitió que se produjera reperfusión. En el segundo grupo, al final de los 90 min de oclusión de la DAI, se deshinchó el balón y se retiró, y la infusión de T-S se realizó a través del catéter colocado en la parte proximal de la DAI después de un periodo de reperfusión de 1 min. Se observaron diferencias notables en lo relativo a la OMV al comparar las muestras de miocardio de ambas series. Mientras que la perfusión miocárdica se preservó por completo en el grupo sin reperfusión, se observó OMV en todos los casos en que se aplicó una reperfusión de tan solo 1 min.

En opinión del presente equipo de investigación, los datos presentados aportan una evidencia convincente respecto al papel decisivo de la lesión por isquemia-reperfusión en la OMV. En la actualidad existen tratamientos prometedores para la lesión por reperfusión, pero se encuentran todavía en fase experimental²⁴. Además, diversos enfoques médicos o invasivos destinados a reducir la OMV en el IAM reperfundido han dado resultados controvertidos o han sido ineficaces^{21,22}. En consecuencia, más allá de la efectividad bien establecida de la intervención percutánea primaria temprana, continúan siendo necesarios grandes esfuerzos por comprender mejor y tratar de manera más apropiada los minutos del periodo perirreperfusión.

Limitaciones del estudio

En primer lugar, la limitación principal del presente estudio es la ausencia de una técnica de comparación que permita evaluar la OMV *in vivo*, como la resonancia magnética cardíaca; una segunda técnica que confirmara los resultados habría reforzado las conclusiones alcanzadas. En segundo lugar, las técnicas funcionales para evaluar la influencia de la OMV en la función cardíaca (como la ecocardiografía de *strain* —deformación— o los cristales intramiocárdicos) podrían haber aportado cierta perspectiva respecto a las consecuencias funcionales de la OMV, pero no se dispone de esas técnicas en el laboratorio.

Como siempre ocurre en la investigación básica, la traslación a la práctica clínica exige precaución. Los datos obtenidos en el presente estudio podrían inspirar la realización de estudios en el ser humano con objeto de replicar estos resultados empleando técnicas de imagen y fomentar el diseño de ensayos destinados a obtener nuevos instrumentos terapéuticos capaces de reducir al mínimo el efecto nocivo de la lesión por reperfusión en la perfusión microvascular.

CONCLUSIONES

El inicio inmediato de la OMV tras deshinchar el balón pone de manifiesto el papel decisivo de la lesión por isquemia-reperfusión en la aparición de este proceso y obliga a tener presente el manejo de este periodo, corto pero crítico, en la revascularización de pacientes con IAM. El modelo experimental *in vivo* presentado podría ser útil como plataforma para nuevos estudios traslacionales centrados en un mejor conocimiento de la OMV y en explorar posibilidades terapéuticas alternativas en unas condiciones muy controladas.

FINANCIACIÓN

El presente estudio fue financiado por el Instituto de Salud Carlos III III, el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (subvención PI1400271) y la Generalitat Valenciana (subvención PROMETEO/2013/007), y fue premiado por la Real Academia de Medicina de la Comunitat Valenciana.

CONFLICTO DE INTERESES

Ninguno.

MATERIAL SUPLEMENTARIO



Se puede consultar material suplementario a este artículo en su versión electrónica disponible en doi:10.1016/j.recesp.2015.04.016.

BIBLIOGRAFÍA

1. Steg G, James SK, Atar D, Badano LP, Blömmström-Lundqvist C, Borger MA, et al. ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Eur Heart J*. 2012;33:2569-619.
2. Jaffe R, Dick A, Strauss BH. Prevention and treatment of microvascular obstruction-related myocardial injury and coronary no-reflow following percutaneous coronary intervention: a systematic approach. *JACC Cardiovasc Interv*. 2010;3:695-704.
3. Niccoli G, Burzotta F, Galiuto L, Crea F. Myocardial no-reflow in humans. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54:281-92.
4. Bolognese L, Carrabba N, Parodi G, Santoro GM, Buonamici P, Cerisano G, et al. Impact of microvascular dysfunction on left ventricular remodeling and long-term clinical outcome after primary coronary angioplasty for acute myocardial infarction. *Circulation*. 2004;109:1121-6.
5. Brosh D, Assali AR, Mager A, Porter A, Hasdai D, Teplitsky I, et al. Effect of no-reflow during primary percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction on six-month mortality. *Am J Cardiol*. 2007;99:442-5.
6. Ovize M, Baxter GF, Di Lisa F, Ferdinandy P, Garcia-Dorado D, Hausenloy DJ, et al. Postconditioning and protection from reperfusion injury: where do we stand? Position Paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc Res*. 2010;87:406-23.
7. Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest*. 2013;123:92-100.
8. Kumar A, Green JD, Sykes JM, Ephrat P, Carson JJ, Mitchell AJ, et al. Detection and quantification of myocardial reperfusion hemorrhage using T2*-weighted CMR. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2011;4:1274-83.
9. Wu KC, Kim RJ, Bluemke DA, Rochitte CE, Zerhouni EA, Becker LC, et al. Quantification and time course of microvascular obstruction by contrast-enhanced echocardiography and magnetic resonance imaging following acute myocardial infarction and reperfusion. *J Am Coll Cardiol*. 1998;32:1756-64.
10. Klöner RA, Ganote CE, Jennings RB. The 'no-reflow' phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest*. 1974;54:1496-508.
11. Bodí V, Sanchis J, Mainar L, Chorro FJ, Nunez J, Monmeneu JV, et al. Right ventricular involvement in anterior myocardial infarction: a translational approach. *Cardiovasc Res*. 2010;87:601-8.
12. Bodí V, Sanchis J, Morales JM, Marrachelli VG, Nunez J, Forteza MJ, et al. Metabolomic profile of human myocardial ischemia by nuclear magnetic resonance spectroscopy of peripheral blood serum. A translational study based on transient coronary occlusion models. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59:1629-41.
13. Elmahdun NY, Sabe AA, Robich MP, Chu LM, Lassaletta AD, Sellke FW. The pig as a valuable model for testing the effect of resveratrol to prevent cardiovascular disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2013;1290:130-5.
14. Cuellas-Ramón C, Pérez de Prado A, Pérez-Martínez C, Diego-Nieto A, Gonzalo-Orden JM, Fernández-Vázquez F. Investigación traslacional en isquemia, infarto de miocardio y reperfusión. *Rev Esp Cardiol Supl*. 2013;13(E):57-63.
15. Santos-Gallego CG, Badimon JJ, Ibáñez B. Modelos experimentales de aterosclerosis. *Rev Esp Cardiol Supl*. 2013;13(E):3-12.
16. Bodí V, Sanchis J, Losada A, López-Lereu MP, García D, Pellicer M, et al. Usefulness of quantitative intravenous myocardial contrast echocardiography to analyze microvasculature perfusion in patients with a recent myocardial infarction and an open infarct-related artery: comparison with intracoronary myocardial contrast echocardiography. *Eur J Echocardiography*. 2005;6:164-74.
17. Galiuto L, Lombardo A, Maseri A, Santoro L, Porto I, Cianflone D, et al. Temporal evolution and functional outcome of no reflow: sustained and spontaneously reversible patterns following successful coronary recanalisation. *Heart*. 2003;89:731-7.
18. Bodí V, Sanchis J, Lopez-Lereu MP, Nunez J, Mainar L, Pellicer M, et al. Evolution of 5 cardiovascular magnetic resonance-derived viability indexes after reperfused myocardial infarction. *Am Heart J*. 2007;153:649-55.
19. Fernández-Jiménez R, Sánchez-González J, Agüero J, García-Prieto J, López-Martín GJ, García-Ruiz JM, et al. Myocardial edema after ischemia/reperfusion is not stable and follows a bimodal pattern: imaging and histological tissue characterization. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65:315-23.
20. Buja LM. Myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc Pathol*. 2005;14:170-5.
21. Bodí V, Ruiz-Nodar JM, Feliu E, Minana G, Nunez J, Husser O, et al. Effect of ischemic postconditioning on microvascular obstruction in reperfused myocardial infarction. Results of a randomized study in patients and of an experimental model in swine. *Int J Cardiol*. 2014;175:138-46.
22. Kalltoft A, Böttcher M, Nielsen SS, Hansen HH, Terkelsen C, Maeng M, et al. Routine thrombectomy in percutaneous coronary intervention for acute ST-segment-elevation myocardial infarction: a randomized, controlled trial. *Circulation*. 2006;114:40-7.
23. Niccoli G, Kharbada RK, Crea F, Banning AP. No-reflow: again prevention is better than treatment. *Eur Heart J*. 2010;31:2449-55.
24. Garcia-Dorado D, Rodríguez-Sinovas A, Ruiz-Meana M, Inerte J. Protección contra el daño miocárdico por isquemia-reperfusión en la práctica clínica. *Rev Esp Cardiol*. 2014;67:394-404.