

## UNIVERSIDAD DR. JOSÉ MATÍAS DELGADO

### RED BIBLIOTECARIA MATÍAS

### DERECHOS DE PUBLICACIÓN

Basados en

El Reglamento de Graduación de la Universidad Dr. José Matías Delgado

Capítulo VI, Art. 46

**“Los documentos finales de investigación serán propiedad de la Universidad para fines de divulgación”**

Publicado bajo la licencia Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual de Creative Commons  
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>



*Se permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra siempre que se especifique el autor y el nombre de la publicación y sin objetivos comerciales, y también se permite crear obras derivadas, siempre que sean distribuidas bajo esta misma licencia*

Para cualquier otro uso se debe solicitar el permiso a la Universidad

Universidad "Dr. José Matías Delgado"  
Facultad de Ciencias de la Salud "Dr. Luis Edmundo Vásquez".  
Escuela de Medicina.

TESIS DE GRADUACION

PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN MEDICINA

**"PRESERVACIÓN DE LA ZONA DE PENUMBRA EN ICTUS ISQUÉMICO  
EMBÓLICO CON TIROFIBÁN EN UN MODELO EXPERIMENTAL"**

Alumnos: Salvador Castaneda Vega.  
Laura Castillo Fuentes.  
Jonathan Gómez Hernández

Asesor: Dr. William Hoyos.  
Colaborador: Dr. Hector Moreira.

Abril 2009.

## Indice

INDICE.....	i
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	1
DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA. ....	2
JUSTIFICACIÓN. ....	3
ANTECEDENTES.....	5
OBJETIVOS. ....	7
Objetivo General: .....	7
Objetivos Específicos: .....	7
MARCO TEÓRICO. ....	8
FISIOPATOLOGÍA DEL ECV ISQUEMICO. ....	8
ESTUDIO DE LA ZONA DE PENUMBRA ISQUÉMICA.....	11
Estudios Imagenológicos. ....	11
Marcadores séricos de la Zona de Penumbra Isquémica. ....	14
Inmunohistoquímica en la zona de penumbra.....	14
TRATAMIENTO DEL ICTUS ISQUÉMICO. ....	15
HIPÓTESIS .....	18
Hipótesis general.....	18
Hipótesis específicas.....	18
DISEÑO METODOLÓGICO. ....	19
Plan de recolección de muestras .....	21
Análisis de datos.....	22
DISCUSION .....	29
CONCLUSIONES .....	35
RECOMENDACIONES.....	36
ANEXOS .....	37
BIBLIOGRAFIA .....	46

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define el evento cerebrovascular (ECV, ictus) como un cuadro clínico de desarrollo rápido de signos focales o globales de alteración cerebral con una duración mayor de 24 horas, a menos que sobrevenga la muerte, sin otra causa aparente de trastornos vasculares<sup>1</sup>. Etiológicamente se clasifica como isquémico (85% de los casos) o hemorrágico. Dentro del isquémico, el subtipo ateromatoso es el más frecuente<sup>2</sup>

Existe un consenso mundial reconociendo la eficacia de la terapia de reperfusión, dentro de las primeras tres horas del evento, con el activador del plasminógeno tisular (tPA), de forma intravenosa. No obstante, por varios factores, su uso en los países desarrollados típicamente se limita al 1-3% de los pacientes en la práctica actual.<sup>3,4</sup> A este dato, se suma la restricción que impone su costo, en el caso particular de nuestro país.

Esto motiva actualmente la búsqueda de nuevas estrategias para aumentar el tiempo de intervención y reducir su costo, entre ellas, el uso de inhibidores de la glicoproteína IIb-IIIa (combinados o no con fibrinolíticos): el más estudiado ha sido el Tirofiban, fármaco habitualmente usado en isquemia miocárdica, con buenos resultados y adecuada seguridad<sup>5,6,7</sup>.

Desde hace varios años, se ha investigado su potencial terapéutico en el manejo agudo del ECV isquémico.<sup>8</sup> En nuestro país, Segura et al, en un ensayo pre clínico demostró disminución del volumen del tejido infartado.<sup>9</sup> Dicho autor, en un estudio posterior, amplió el inicio de la terapia con Tirofiban hasta las 9 horas post-evento, pero no encontró diferencia significativa en la reducción del volumen del infarto (histopatológicamente), aunque sugiere que el Tirofiban puede bloquear la microtrombosis y proteger el área de penumbra isquémica.<sup>10</sup> Esta zona en particular, se ha vuelto el blanco de las nuevas investigaciones, dado el mejor conocimiento de los cambios a nivel celular que en ella ocurren y su importancia en el pronóstico de los pacientes.<sup>11,12</sup>

Debido a que se han encontrado mejores resultados al combinar el Tirofiban con fibrinólisis y/o terapia endovascular, últimamente se han venido abandonando los ensayos que estudian únicamente su monoterapia.<sup>8,13,14</sup> Es de nuestro interés continuar en esta línea, ya que por las características socioeconómicas de nuestro medio, podría ser una opción terapéutica más asequible; además de nuestro interés por extender su uso luego de tres horas posterior al evento. Varios autores concluyen que hacen falta más estudios para recomendar la monoterapia con Tirofiban en forma general.<sup>13,15</sup>

Por lo tanto, nos formulamos la siguiente pregunta:

¿Cuál es la eficacia del Tirofibán, al administrarlo luego de 3 horas de iniciado un ECV isquémico embólico, para mejorar la perfusión sanguínea a la zona de penumbra isquémica, en un modelo experimental en conejos?

#### DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA.

En recientes investigaciones se ha demostrado la efectividad del Tirofibán en el manejo agudo del ECV isquémico embólico, tanto en la reducción del tamaño del infarto<sup>13</sup> como en prevenir específicamente la transición del tejido isquémico a infarto, aunque esto último solo en pequeñas series de casos en humanos.<sup>16</sup>

La mayoría de estos estudios evalúan el uso del Tirofibán hasta en periodos de tres horas después de ocurrido el ictus, y en los que se ha prolongado la ventana terapéutica, no se halló diferencia histopatología significativa en cuanto al volumen del infarto, ni se evaluó específicamente la zona de penumbra isquémica.<sup>10</sup>

Es por ello que por medio de este estudio se determinara la eficacia del Tirofibán, comparado con placebo, al administrarlo luego de tres horas de producido el evento cerebrovascular isquémico, en mejorar la perfusión sanguínea a la zona de penumbra isquémica, medido con parámetros de Resonancia Magnética con gradiente de Difusión/Perfusión (DW/PW-MRI).

## JUSTIFICACIÓN.

En El Salvador, durante el año 2006 se reportaron 10,352 casos de Enfermedades Cerebrovasculares (ECV, ictus), con un total de 566 muertes, siendo la segunda causa de muerte en el sexo masculino<sup>21</sup>; sin embargo, no se puede descartar un subregistro de casos, sobre todo por las características de nuestra población y sistema de salud. Esto, y la escasez de investigaciones sobre el tema, dificultan el análisis de la magnitud del problema. En El Salvador se cuenta con estudios a nivel de centros de atención de tercer nivel, que reportan una mortalidad de hasta un 26% (Hospital médico quirúrgico del Instituto Salvadoreño de Seguro Social 2003)<sup>22</sup>, mientras que en países industrializados es únicamente la décima parte de esta cifra.<sup>23</sup>

El evento cerebrovascular es la tercera causa de muerte en Estados Unidos, con un total de 150,074 fallecimientos para el año 2004<sup>17</sup>. Para el año 2005 se reportaron 780,000 casos nuevos, estimándose que cada 40 segundos, un norteamericano sufría un episodio nuevo.<sup>18</sup>

En las últimas décadas se ha notado un incremento de los casos de ECV a nivel mundial, y según la OMS para el año 2030 será la segunda causa de muerte sólo después de la enfermedad cardiovascular, con más de 6 millones de decesos a nivel mundial. Además de la mortalidad, es impactante la morbilidad que genera en la población, estimándose que hasta un 30% de las personas que sobreviven a un ictus quedan con discapacidad permanente.<sup>18</sup>

Esto, traducido en costos para los sistemas de salud estadounidenses, significará directa e indirectamente \$65.5 billones de dólares para el año 2008 y para cada paciente que ha sufrido un ictus, durante y posterior al mismo, se estima un costo de \$140,048, incluyendo los costos por hospitalización, rehabilitación y seguimiento necesario para los déficit resultantes.<sup>19, 20</sup>

Una vez establecido el ictus, son pocas las opciones terapéuticas, y desafortunadamente no todos los pacientes son elegibles para ello. Las limitaciones del uso del tPA endovenoso (breve ventana terapéutica, tasa de recanalización de sólo 50% y riesgo sustancial de transformación hemorrágica) hacen que típicamente del 1 al 3% de los pacientes reciban terapia de perfusión.<sup>3, 4</sup>

Precisamente la ventana terapéutica del tPA –3 horas después del inicio de los síntomas – es el criterio que excluye a la mayoría de candidatos a trombólisis.<sup>24</sup> En un estudio multicéntrico llevado a cabo por Harraf en el Reino Unido, únicamente 37% de los pacientes consultan en este intervalo, siendo lo más frecuente 6 horas<sup>25</sup>. Además, todavía nos enfrentamos al llamado “retardo intrahospitalario” (desde la llegada a la Unidad de Emergencia hasta el diagnóstico imagenológico) que con promedios de 60 a 108 minutos, termina por excluir a otro número de pacientes de la terapia trombolítica.<sup>26, 27</sup>

Por lo tanto, ahora la necesidad de la investigación se enfoca en extender la ventana terapéutica con nuevos fármacos o la combinación de los existentes como anti agregantes plaquetarios y neuroprotectores, así como con otras estrategias como la trombólisis mecánica.<sup>3</sup>

En cuanto a los anti agregantes plaquetarios, el más estudiado es el Tirofiban, que ha demostrado efectividad tanto solo<sup>9,10,16</sup> como en combinación con fibrinolíticos.<sup>13</sup> En nuestro país, también reviste especial importancia por la eventual disminución de los costos en el manejo del ictus, en comparación con el tPA. Según datos obtenidos en un centro asistencial privado de San Salvador, la terapia con tPA intraarterial puede ascender a más de \$10,000, pues conlleva la necesidad de cateterismo selectivo en el vaso ocluido (mucho más efectivo que su aplicación intravenosa), hecho que no ocurre con la monoterapia con Tirofiban. Esto es una diferencia mucho más significativa que el costo por unidad (frasco) de rTPA (US \$838) y Tirofiban (US \$495).<sup>68</sup>

La zona de penumbra isquémica (o tejido en riesgo de infarto), es la que tiene el potencial de recuperación y por lo tanto es el blanco de la terapia.<sup>11</sup> El mejor abordaje de dicha zona es mediante la imagenología, ya que los cambios fisiológicos, como la hipoperfusión y el edema citotóxico, ocurren mucho antes de ser evidentes histopatológicamente.<sup>28</sup> Precisamente, el uso de la Resonancia Magnética con gradientes de difusión/perfusión (DW/PW MRI) se ha vuelto el estándar diagnóstico en el abordaje de la zona penumbra en el ECV isquémico, en los centros especializados.  
12, 29, 30, 31

Las más recientes investigaciones en los últimos 5 años a nivel internacional se han dedicado casi exclusivamente a evaluar el uso del Tirofiban como coadyuvante a otras modalidades terapéuticas (fibrinólisis, terapia endovascular), con resultados promisorios,<sup>13, 27</sup> pero que están prácticamente fuera del alcance del sistema nacional de salud, por ende, de la mayoría de la población de nuestro país. De ahí nuestro interés por continuar la investigación con este fármaco, con mayor accesibilidad y acorde a nuestras posibilidades reales de extender este conocimiento a la práctica.

## ANTECEDENTES.

La reperfusión del tejido encefálico es la terapia más efectiva para el tratamiento del evento cerebro vascular isquémico agudo (ECV). Al restaurar el flujo sanguíneo a un área comprometida con isquemia se puede disminuir el área de infarto, delimitar la zona de penumbra y disminuir las secuelas clínicas. Desde que se inició la era de la reperfusión cerebral se han realizado múltiples estudios clínicos y experimentales los cuales determinan múltiples factores que afectan la progresión del deterioro del tejido cerebral de isquemia a infarto. Se han estudiado métodos farmacológicos como fibrinolíticos, vasoprotectores, antiagregantes plaquetarios, neuroprotectores, además de métodos intervencionistas o mecánicos para la remoción del trombo como sonotrombolisis y trombectomía endovascular. Se ha estudiado además el tiempo necesario de trombolisis para evitar el infarto y disminuir el volumen de la zona de penumbra. Al momento todos estos estudios han llevado a un consenso mundial de terapia fibrinolítica utilizando el activador del plasminógeno tisular (rTPA) endovenoso en las primeras 3 horas del evento cerebral isquémico.<sup>3</sup>

La terapia temprana con rTPA ha sido limitada por el riesgo inherente de hemorragia cerebral y por la lenta reperfusión del tejido, lo cual conlleva isquemia y necrosis cerebral. Evidencia circunstancial además demuestra que la proteasa rTPA puede causar daño en tejido cerebral.<sup>33</sup> Posterior a la terapia con rTPA inevitablemente es activada la cascada de la coagulación, por lo que, aunque ocurran recanalizaciones exitosas se observa en un tercio de cada caso, reoclusiones vasculares acompañadas de deterioro neurológico.<sup>34</sup> Al momento se estudian nuevos fármacos como la Tenecteplasa la cual es una forma genéticamente modificada de rTPA que presenta aproximadamente 14 veces la especificidad, una vida media más prolongada y 80 veces la resistencia al inhibidor del plasminógeno recombinante tipo I.<sup>35</sup> Este medicamento permite una sola dosis, disminución de la hemorragia cerebral, y una lisis trombótica más efectiva. Ha demostrado además una disminución de la reoclusión de vasos por no actuar como procoagulante. Al momento el medicamento continúa en ensayos clínicos en Fase 2 para el tratamiento del ECV.

El Tirofiban es un medicamento que antagoniza los receptores GPIIb/IIIa disminuyendo la agregación plaquetaria. Este fármaco ha demostrado resultados favorables en tratamiento de pacientes con infarto del miocardio y angina inestable,<sup>5, 6</sup> por lo que ha sido considerado para terapia similar en pacientes con ECV. Se han realizado estudios utilizando la combinación de rTPA con inhibidores de GPIIb/IIIa en los cuales se encuentra un aumento del tiempo de ventana de 1 hora (logrando hasta 4 horas después del inicio de síntomas), presentando disminución de volumen del infarto y disminución de las secuelas neurológicas. Además se ha demostrado que hay una disminución de la isquemia tisular con el uso combinado de inhibidores de la GPIIb/IIIa y rTPA al disminuir la acumulación de depósitos microvasculares compuestos por plaquetas e inmunocomplejos manteniendo una adecuada permeabilidad microvascular.<sup>36</sup>

Al momento se han realizado pocas investigaciones en las cuales se hayan utilizado inhibidores de la GpIIb/IIIa como monoterapia para el manejo del ECV agudo. En El Salvador se ha realizado un estudio que ha pretendido extender la ventana terapéutica, después de 3 horas, de inhibidores de la GPIIb/IIIa utilizando como variable el volumen del infarto medido histopatológicamente en conejos, posterior a la inducción de infartos tromboembólicos. En este estudio se concluyó que no había cambios estadísticos significativos en la zona de infarto posterior al uso del medicamento, aunque la falta de evidencia de disminución de esta zona, no demuestra que no ocurra efecto en la penumbra, por lo que la continuación de esta rama de investigación esta inconclusa.<sup>10</sup> Actualmente el Tirofiban ha sido dejado de lado en los estudios como monoterapia para ECV, y el principal enfoque actualmente es su estudio en combinación con fibrinolíticos y/o terapia endovascular.<sup>8, 13, 14</sup>

## OBJETIVOS.

### **Objetivo General:**

- Evaluar los efectos del Tirofiban sobre la preservación del tejido en riesgo de la zona de penumbra isquémica, en un modelo experimental.

### **Objetivos Específicos:**

- Evaluar la eficacia del Tirofiban, comparado con placebo, en disminuir el volumen del tejido cerebral hipoperfundido, posterior a tres horas de establecido el ictus isquémico embólico en conejos.
- Determinar el porcentaje en que se evita la conversión a infarto del tejido en la zona de penumbra isquémica, con la administración de Tirofiban comparado con placebo, luego de tres horas establecido un ictus isquémico embólico en conejos.
- Identificar el incremento de la perfusión sanguínea a la zona de penumbra isquémica con la administración de Tirofiban, luego de tres horas del ictus isquémico embólico en conejos.

## MARCO TEÓRICO.

### FISIOPATOLOGÍA DEL ECV ISQUEMICO.

Los eventos isquémicos vasculares han sido estudiados por más de 150 años. Virchow describió en 1847 coágulos venosos y arteriales en múltiples áreas del cuerpo humano, entre ellos: cerebro, bazo, riñón, y vasculatura de miembros inferiores. Describió además la migración de trombos desde un sitio de lesión hacia un sitio de alojamiento, como ocurre en fibrilaciones auriculares y tromboembolismo pulmonar.<sup>37</sup>

Las oclusiones vasculares son el resultado de una interacción compleja de elementos sanguíneos, turbulencia de flujo y anomalías en la pared vascular. Una placa ateromatosa consiste de un suave componente lipídico conocido como componente ateromatoso y un tejido fibrótico llamado esclerótico.<sup>37</sup> Cuando estas placas se ulceran o se rompen, la matriz subendotelial se expone a la sangre circulante. Esto lleva a un aumento de la agregación plaquetaria en el sitio de lesión o úlcera y una activación de de coagulación. Esto conlleva a una cascada aterogénica, la cual es principalmente mediada por receptores GPIIb/IIIa en plaquetas y megacariocitos, siendo estos el principal mecanismo de formación de trombos. Los receptores median principalmente la adherencia de fibrinógeno y el factor de Von Willebrand. El trombo puede llegar a fraccionarse formando un embolo debido a factores mecánicos y fuerzas hemodinámicas que causan disrupción de la continuidad de la placa ateromatosa. Estos factores incluyen el aumento de la presión arterial, como esta descrito en la ley de Laplace, la compresión de la placa ateromatosa, la flexión longitudinal y la circunferencia del trombo.<sup>37,38</sup> Aunque no se entiende completamente la causa de ruptura de trombos, se asocia como se menciona anteriormente, a hipertensión y a cambios de tensión vasculares mediados por liberación espontánea de catecolaminas ya sea por ejercicio, esfuerzo, estrés emocional, entre otros.

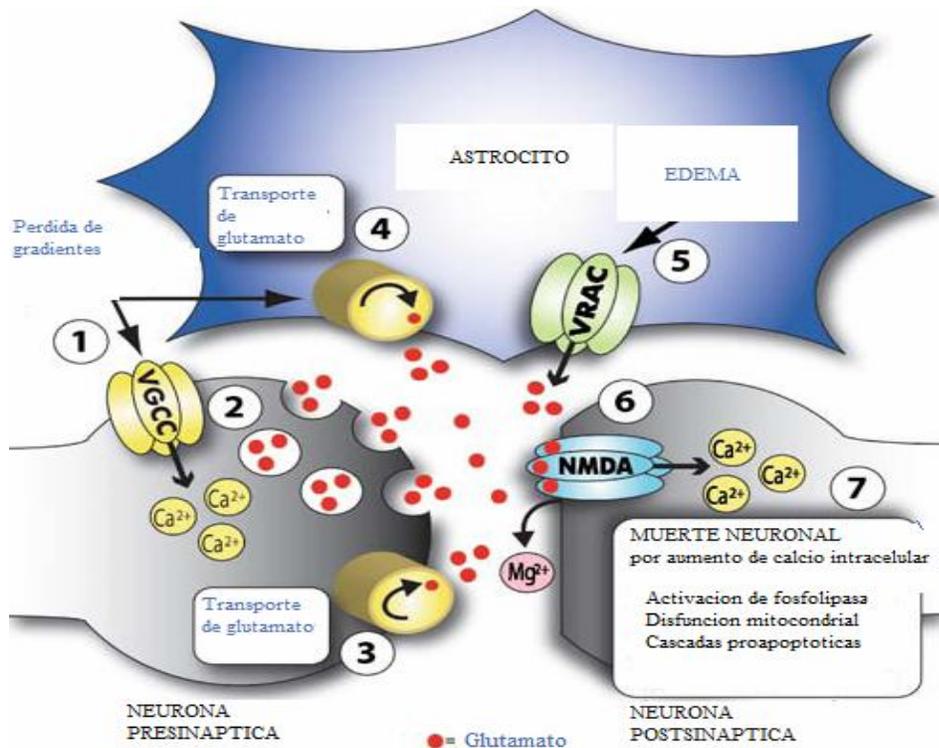
El evento cerebro vascular trombo embólico ocurre primordialmente a causa de una disminución parcial o completa de la perfusión sanguínea a una zona de parénquima cerebral por oclusión en un 85% de los casos. La magnitud de la reducción del flujo es afectada por el flujo colateral del área específica de la oclusión y la región anatómica de la lesión. Una caída de la perfusión a 0 causa muerte del parénquima en los próximos 4 a 10 minutos. Los valores de perfusión de <4.8 a 8.4ml/100g de tejido por minuto causan infarto dentro de una hora y valores <14.1 a 35 ml/100g tejido por minuto causa isquemia sin infarto, a menos que esta se prolongue por horas o días.<sup>39</sup> Este tejido en riesgo de infartarse ante la falta de perfusión es conocido en el campo de investigación como zona de penumbra isquémica.<sup>11</sup>

Ocurren una serie de complicados procesos en el área de infarto y penumbra como respuesta a la disminución del flujo sanguíneo. El progreso a infarto de la zona de penumbra depende principalmente de: el flujo sanguíneo colateral, la duración del daño, el estado funcional y metabolismo neuronal.<sup>39</sup>

El flujo sanguíneo colateral es afectado directamente por el proceso proinflamatorio, que lleva a un aumento del depósito de plaquetas, complejos autoinmunes y leucocitos.<sup>40</sup> Esto lleva a una oclusión de la microcirculación colateral lo cual compromete en gran parte la viabilidad a largo plazo de la zona de penumbra. Sin embargo hay porciones de parénquima cerebral, usualmente en los bordes de la lesión, los cuales presentan “oligemia benigna” o recuperación completa espontánea sin medidas de rescate terapéuticas.<sup>39</sup>

La disminución del aporte de glucosa y oxígeno lleva a depleción del trifosfato de adenosina (ATP) producido por las mitocondrias.<sup>41</sup> Al haber una disminución del ATP ocurre un cese de función de los canales iónicos, dependientes de ATP en la membrana celular (ie, Na/K ATPasa), por lo cual las células pierden su polarización al permitir una entrada masiva de calcio. Esto lleva a un desbalance electroquímico el cual causa un edema neuronal (predominantemente en astrocitos) y un acúmulo de iones de hidrógeno, o acidosis. Además el aumento de calcio intracelular lleva a una activación de la sintetasa de óxido nítrico neuronal, la cual lleva a un aumento del superóxido y peroxinitrito citosólico y mitocondrial, y activación de fosfolipasa, con aumento de producción de eucosanoídes. Esto por su parte, aumenta la liberación de factores de inducción de apoptosis mitocondriales, aumentando la apoptosis activa mediada por disminución de glucosa y oxígeno a causa de la isquemia.<sup>45</sup> La despolarización celular media la liberación de Glutamato en las terminales sinápticas y esto lleva neurotoxicidad debido a una activación excesiva de receptores de glutamato en la neurona postsináptica liberando más calcio intracelular<sup>40</sup>. (Figura 1)

Al mismo tiempo ocurren otros mecanismos, todavía en estudio, que llevan a apoptosis neuronal. En el centro necrótico de la lesión de infarto cerebral, la muerte neuronal ocurre por una isquemia prolongada y sostenida mientras que en el área de penumbra la muerte neuronal puede ocurrir por apoptosis mediada por mecanismos metabólicos (insuficiente aporte de oxígeno y glucosa resultando en liberación de factor inductor de apoptosis mitocondrial) y por la acción de ligandos que provocan muerte celular.<sup>41</sup> Un estudio de en ratones se determinó que los ligandos CD95 y TRAIL (tumor necrosis factor–related apoptosis-inducing ligand) se encontraban en las áreas apoptóticas del cerebro post isquémico. Se utilizó el inmunosupresor FK506 el cual prevenía la expresión de estos ligandos *in vivo* e *in vitro* y verificó que los volúmenes de las lesiones de infarto eran menores en los roedores a los cuales fue administrado el inmunosupresor.<sup>42</sup>



**FIGURA 1.** Contribución de las neuronas y los astrocitos a la muerte celular.

(1) La disminución de la función de los canales de sodio potasio lleva a una pérdida del gradiente electroquímico con un aumento del flujo de calcio intracelular. (2) La despolarización neuronal lleva a una liberación de glutamato a la hendidura sináptica, la cual ante su exceso causa una función inadecuada del transportador de glutamato (3 y 4) en la neurona y astrocito. 5. El cambio electroquímico lleva a edema, predominantemente en los astrocitos los cuales inducen una activación de canales aniónicos regulados por volumen (VRAC), quienes aumentan la liberación de glutamato. (6) Los canales, mediados por glutamato (NMDA) se sobreexcitan llevando a un incremento en la liberación de calcio postsináptico, causando muerte celular por diferentes mecanismos (7) Adaptado, Ratan et al. Harnessing hypoxic adaptation to prevent, treat, and repair stroke.<sup>45</sup>

Ocurren otros eventos inmunológicos los cuales median la muerte neuronal. La interleucina 1 (IL-1) es una citocina proinflamatoria que tiene numerosos efectos, incluyendo por ejemplo, la activación de células T, la inducción de la expresión de proteínas de la fase aguda y funciones neuroinmunes en el parénquima cerebral.<sup>40,41,43.</sup> Hay suficiente evidencia para involucrar la IL-1 como un mecanismo de injuria neuronal en estados degenerativos agudos y crónicos. En estudios realizados en roedores se ha utilizado un antagonista de los receptores de IL-1 demostrando una disminución de la muerte neuronal.<sup>43</sup> Tras la inyección de IL-1, se ha notado un aumento de la migración de neutrófilos, produciendo injuria endotelial y parenquimatosa directa a través de una discontinuidad de las membranas celulares, por una diapédesis descontrolada de células del sistema inmune. A esto se le agregan otros mediadores neurotóxicos los cuales penetran al tejido inflamado causando más daño endotelial, como el óxido nítrico, eicosanoides y citocinas. Sin embargo los mecanismos por los cuales la IL-1 aumenta la muerte celular no son bien conocidos (debido al gran número de funciones proinflamatorias de la familia de IL-1). Algo peculiar es la persistencia del aumento de

flujo sanguíneo que ha sido demostrado utilizando un antagonista del receptor de interleucina.<sup>43,44</sup>

Se estudian al momento un grupo de genes que median una adaptación de las neuronas a la hipoxia. El factor inducible de hipoxia (HIF-1) activa un grupo de hasta 70 genes los cuales transcriben proteínas que actúan a nivel celular, local, y sistémico, combatiendo el estrés isquémico por medio de diferentes vías metabólicas. Algunos mecanismos por los cuales se modifica la hipoxia, e isquemia tisular son: regulando el metabolismo energético al aumentar la expresión de receptores GLUT-1, aumentando la angiogénesis, regulando la función de la transferrina, aumentando la expresión de la anhidrasa carbónica, regulación vasomotora, y aumentando migración y motilidad celular. Pese a estar aun en investigación, se ha demostrado que con la inhibición de hidroxilasas hacia esta proteína, hay un aumento marcado de la supervivencia neuronal.<sup>45</sup>

### ESTUDIO DE LA ZONA DE PENUMBRA ISQUÉMICA.

El concepto de la zona de penumbra fue usado por primera vez por Astrup en 1981,<sup>46</sup> y se ha vuelto cada vez mas importante a medida que el tratamiento para el ictus se expande.<sup>47</sup> Debido a ello, numerosas técnicas se han desarrollado y perfeccionado para su abordaje. Para efectos prácticos, las mencionaremos en tres grupos: imagenológicos, séricos e inmunohistoquímicos.

#### Estudios Imagenológicos.

En el manejo de los pacientes con ictus, la tomografía computarizada sin contraste (CT) es el primero y más importante de los pasos diagnósticos, pues permite descartar rápidamente una etiología hemorrágica, tumores o enfermedades inflamatorias, siendo más disponible en la práctica clínica que otros métodos.<sup>48, 49</sup> Otras técnicas, como, la resonancia magnética con gradiente de difusión/perfusión (DW-MRI) y la tomografía por emisión de positrones (PET) son mucho más sensibles y específicos para detectar isquemia cerebral aguda.<sup>50</sup>

La tomografía por emisión de positrones (PET) tiene la gran ventaja de poder medir, además de parámetros de flujo sanguíneo, la fracción de extracción de oxígeno y su metabolismo por el tejido cerebral infartado y en su periferia, pudiendo definir la zona de penumbra isquémica fácilmente de acuerdo a estos parámetros. Pese a considerarse el “estándar de oro” para su evaluación, el uso es limitado por su poca disponibilidad y al requerimiento de radioisótopos.<sup>47, 48, 51</sup>

La tomografía computarizada por emisión de positrones (SPECT) también puede mostrar la perfusión del tejido cerebral, pero tiene la necesidad del uso de gases radioactivos de difícil manejo (como el Xenón-133), que sumado a la complejidad del análisis de los datos obtenidos, limita su uso de rutina en la isquemia cerebral aguda.<sup>48</sup>

La tomografía computarizada con Xenón (Xe-CT) permite la medición cuantitativa del flujo sanguíneo regional con relativamente alta resolución y adecuada correlación anatómica. A pesar de la disponibilidad de tomógrafos en prácticamente todos los centros involucrados en el manejo del ictus, la aplicación del Xe-CT está restringida a pocos centros, debido a la dificultad del manejo del gas y sus efectos anestésicos, que también afectan los valores medidos de flujo sanguíneo cerebral. Tampoco existen umbrales validados para la definición de la zona de penumbra isquémica.<sup>47, 48</sup>

La resonancia magnética (MRI) se ha destacado por su papel en la obtención de imágenes de alta resolución del cerebro humano y su mayor disponibilidad en la práctica clínica que el PET. La MRI es una compleja interacción entre los protones de hidrogeno en los tejidos, un campo magnético estático y la energía en forma de ondas de radiofrecuencia. Se obtienen diferentes imágenes – T1 y T2 – según el tiempo de relajación de los átomos de hidrógeno en el tejido. El T1 es el tiempo (en milisegundos) para que el 63% de los protones de hidrógenos retornen a su estado original de equilibrio luego de su excitación por el campo magnético, mientras que el T2 se obtiene prolongando la duración de los pulsos de radiofrecuencia (TR) y la recepción de la señal (TE), reflejando la interacción entre los protones cercanos. De esta forma, las imágenes de T2 son más sensibles al edema, desmielinización e infarto.<sup>52</sup>

No obstante, varias funciones y procesos patológicos que ocurren a nivel microscópico no se ven reflejados en T1 y T2. Este es el ejemplo del ECV isquémico, en donde el desarrollo de las técnicas de gradiente de difusión (DWI) y perfusión (PWI) ha permitido documentar las anomalías que la MRI convencional no logra detectar.<sup>29, 48</sup> Estas técnicas son relativamente nuevas, pero se han vuelto rápidamente parte integral del abordaje diagnóstico del ictus, y su combinación se ha vuelto el método más rápido para identificar tejido cerebral en riesgo de infarto (zona de penumbra).<sup>30, 48, 53</sup>

Las imágenes de DWI están basadas en la difusión de las moléculas de agua del tejido en estudio. La difusión está mucho más restringida en el espacio intracelular que en el extracelular, debido a estructuras que la limitan, como micropartículas y membranas. El edema citotóxico ocurrido en la isquemia aguda incrementa significativamente la proporción del espacio intracelular medido en la imagen y está relacionado con una disminución de la actividad de la bomba de sodio/potasio y fracaso energético celular; las alteraciones en la difusión de las moléculas de agua son un antecedente de cambios tardíos representativos del área central de infarto, con daños isquémicos irreversibles. Debido a que el desbalance de la homeostasis del agua ocurre inmediatamente a la falla de perfusión, la DWI es capaz de detectar los cambios isquémicos con solo minutos de la oclusión arterial y se correlacionan con los defectos histológicos y metabólicos estudiados con otras técnicas, como las inmunohistoquímicas y el PET.<sup>48, 50, 54, 55</sup>

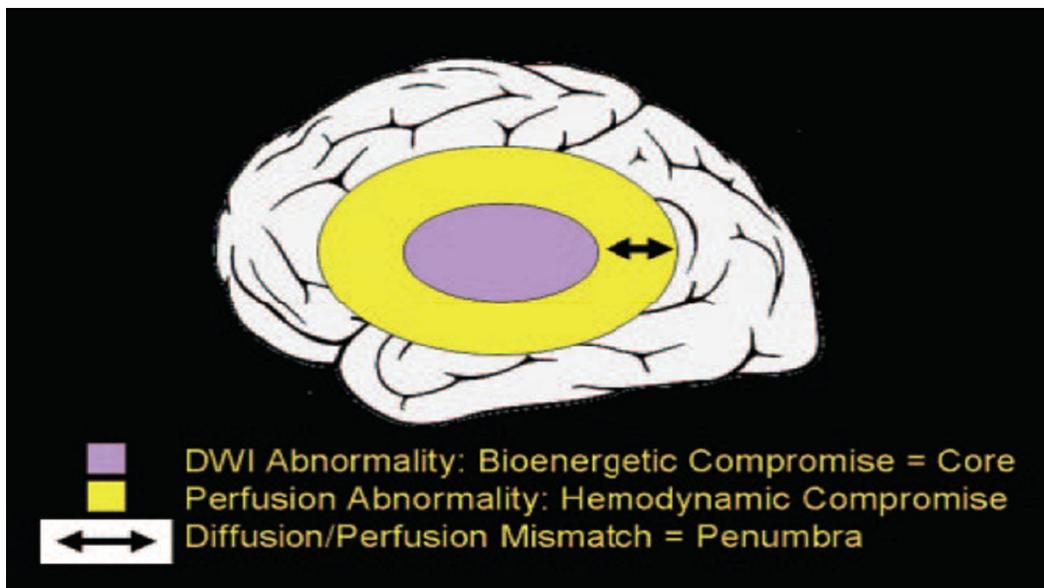
La lesión de DWI es traducida como el centro isquémico (daño irreversible), y en humanos los estudios establecen rangos de 39 a 100 minutos para su detección, con una sensibilidad superior al 93%.<sup>30, 48, 55</sup> La difusión es cuantificada mediante el

coeficiente aparente de difusión (ADC), el cual se determina mediante el análisis del área contralateral a la de interés.<sup>15, 50, 53</sup> En el contexto de una isquemia cerebral significativa, la DWI sólo es normal en caso que el área infartada sea muy pequeña (ie, en los infartos lacunares) y, en ausencia de tratamiento, rara vez experimenta regresión.<sup>49</sup>

Las imágenes de perfusión (PWI) utilizan la susceptibilidad a un medio de contraste paramagnético (usualmente gadolinio), inyectado como un bolo y compartimentalizado al espacio intravascular. Este agente induce un cambio temporal de la señal durante su primer paso a través de la vasculatura, y es tan sensible como para detectar cambios hasta en vasos de 20 micras, con tan solo minutos de la oclusión. Mediante su captura con T2, se obtiene una curva de señal/tiempo y subsecuentemente se utiliza para calcular varios parámetros de perfusión, los más frecuentemente usados son el volumen sanguíneo cerebral relativo (rCBV), el flujo sanguíneo cerebral relativo (rCBF), el tiempo medio de tránsito del agente de contraste del lado arterial al venoso (MTT) y el tiempo requerido hasta el cambio máximo en la intensidad de la señal ("time-to-peak", TTP) (Cuadro 1). De esta forma se puede estudiar el estado alterado de la vasculatura cerebral inmediatamente luego de un evento oclusivo, total o parcial.<sup>15, 48, 50</sup>

Durante las primeras horas de la evolución del ECV, las regiones con perfusión alterada (evidenciado con PW) son típicamente mayores que las de DW. Se ha postulado que la región de discordancia PW/DW refleja la zona de penumbra isquémica, es decir, el tejido cerebral hipoperfundido (en riesgo) que rodea el que ha ya sido irreversiblemente dañado. Típicamente, esta zona es incorporada al centro ya infartado en las primeras horas desde el inicio de los síntomas, y éste es el proceso que busca prevenirse farmacológicamente.<sup>53</sup> Es más, se menciona que sin establecerse imagenológicamente un área de penumbra isquémica, la terapia mas bien no tiene sentido.<sup>49</sup>

Operacionalmente, se define la zona de penumbra isquémica como el tejido con difusión normal pero con reducción de la perfusión, alrededor de la lesión de DW. (Figura 2). Una disminución del rCBF del 37% con respecto a la región contralateral, y del rCBV del 47% comparado con la región contralateral son criterios para identificar el tejido en penumbra, mientras que el centro isquémico muestra una reducción más severa, de hasta el 12% del rCBF y 19% del rCBV. Estos valores operacionales de flujo para penumbra y centro (37% y 12% respectivamente) son equivalentes a rangos de 18.5 y 6 ml/100g tejido/min correspondientes a los obtenidos en estudios de PET. Otros valores útiles para definirla son un aumento del MTT del 73% y un incremento del 29% en el rCBV.<sup>48</sup>



**FIGURA 2.** Modificado de Kidwell C et al. Beyond Mismatch Evolving Paradigms in Imaging the Ischemic Penumbra With Multimodal Magnetic Resonance Imaging.<sup>56</sup>

#### Marcadores séricos de la Zona de Penumbra Isquémica.

Además de la reducción del CBF, varios metabolitos pueden documentarse en la zona de penumbra isquémica. El trifosfato de adenosina (ATP), pH, lactato y n-acetil aspartato (NAA) pueden ser estimados experimentalmente y medidos con la espectroscopía por resonancia magnética (MRS), para distinguir el tejido infartado del que está en riesgo. La aplicación de estos marcadores se ha limitado en la clínica por su complejidad, la duración de la adquisición de datos y el procesamiento de los mismos en la MRS, así como por mayor disponibilidad y rapidez de la DW/PW MRI.<sup>54</sup>

Estudios en ratas, corroborados con MRS, han demostrado elevaciones del lactato luego de una hora de oclusión sanguínea; no obstante, se han documentado nuevas elevaciones a las 24 y 72 horas, consistentes daño tardío, pese a haberse reperfundido el tejido.<sup>54</sup>

El NAA es fácilmente detectado y tiene la ventaja de ser localizado intraneuronalmente, pero no es un marcador útil para identificar la penumbra de forma aguda, ya que su depleción no es evidente sino luego de dos horas de iniciada la isquemia.<sup>54</sup>

#### Inmunohistoquímica en la zona de penumbra.

La disminución o cese de la síntesis proteica es uno de las primeras y más sensibles respuestas metabólicas a la isquemia, que puede ser reversible en la penumbra pero no en el tejido infartado. Ocurre con reducciones del CBF de sólo 50% y no es debido a falla del metabolismo energético, ya que la depleción de ATP es vista hasta que el CBF

baja al 20%. A pesar de ello, ciertas proteínas y sus genes se ven aumentados en su expresión luego de la isquemia focal. Esta es la base para el uso de tinciones en cortes histológicos con marcadores para dichas moléculas.<sup>45, 57, 58, 59</sup>

Las proteínas de estrés, como la proteína de golpe de calor 70 (HSP-70) aumentan su expresión y han sido extensamente estudiadas como marcadores potencialmente útiles de deprivación metabólica. Su transcripción es inducida por presencia de proteínas desnaturalizadas por calor, trauma, isquemia o despolarización celular prolongada. Estudios en ratas sugieren su función neuroprotectora, previniendo la muerte celular tanto por necrosis como por apoptosis, mediante la restauración de proteínas desnaturalizadas, y bloqueando la cascada apoptótica en varios pasos, el más importante a nivel del citocromo c. Su expresión es marcadamente inducida en las neuronas de la zona de penumbra, y se correlaciona con los resultados obtenidos por DW-MRI y PET.<sup>28, 55, 60, 61, 62</sup>

La HSP-72, la proteína glial fibrilar ácida (GFAP) y la proteína nuclear neuronal (NeuN) son también inducidas en la zona de penumbra, pero no el centro de tejido infartado. La familia de genes c-fos, se ha estudiado con resultados similares.<sup>61,62</sup>

Estos marcadores han representado particular ventaja al relacionar sus hallazgos con las técnicas de neuroimagen, ya que ciertos autores han restado crédito a la DW/PW MRI como método para estudiar la penumbra isquémica (aisladamente se han observado regresiones de los cambios en las lesiones de difusión).<sup>56,63</sup> Investigaciones lo han comparado con tinciones en cortes histopatológicos para HSP-72, GFAP y la proteína asociada a los microtúbulos-2 (MAP2) hallando que las áreas de regresión en DWI también expresan estos marcadores, lo que probablemente se deba a poblaciones celulares con mayor tolerancia a la isquemia – como la glía – que compensan parcialmente el desequilibrio de líquido, reflejado como una regresión en la lesión de DWI.<sup>58</sup>

Otras proteínas de estrés, como el HIF-1, la oxigenasa del hemo-1, la ciclooxigenasa-2 (COX-2), han sido estudiadas, pero sin resultados concluyentes para la identificación de la penumbra, ya que se expresan en otras áreas topográficas diferentes a la isquémica.<sup>57</sup>

### TRATAMIENTO DEL ICTUS ISQUÉMICO.

Existen modelos experimentales en los que se ha evidenciado el uso de rTPA teniendo como resultado bajos índices de discapacidad en un periodo de un año. El rTPA es dado solamente al 1% a 3% de los pacientes con ECV en Estados Unidos, principalmente por haber sobrepasado el periodo de ventana de 3 horas de periodo de ventana aprobado por la FDA.<sup>64</sup> Además, ha observado que la reoclusión temprana solo ocurre aproximadamente en un tercio de los pacientes tratados con rTPA.<sup>64</sup>

Se han estudiado otros agentes fibrinolíticos como el Tenecteplasa (TNK) el cual es un análogo del rTPA con una alta especificidad por las moléculas de fibrina que le da la

característica de lisis rápida y completa del coagulo y a su vez, menos complicaciones hemorrágicas, y que por su efecto procoagulante reduce el riesgo de reoclusión temprana.<sup>35</sup> Estudios prospectivos con Retemplase demostraron que su administración intraarterial a las 9 horas de instalados los síntomas, resulta un alto índice de recanalización completa, aunque sigue en estudio.<sup>35</sup>

La Glicoproteína IIb/IIIa es una integrina de la superficie de las plaquetas, que es un receptor para fibrinógeno y factor de Von Willebrand, el cual ancla las plaquetas hacia superficies de cuerpos extraños y entre si, siendo el mediador final de la agregación plaquetaria. La integrina se activa por la trombina, colágeno y tromboxano A2, para desarrollar sitios de unión con sus ligandos, los cuales no se unen con plaquetas no activadas. La inhibición de esta unión con su receptor bloquea la unión y agregación plaquetaria inducida por los agonistas antes mencionados, por lo que los inhibidores de este receptor son potentes agentes antiplaquetarios, reducen el crecimiento del trombo y previene la reoclusión después de la recanalización obtenida con la fibrinólisis. Al momento se estudian, para el manejo hiperagudo del ictus, tres medicamentos que inhiben la GPIIb/IIIa que son Abciximab, el Tirofiban y el Eptifibatide.<sup>8, 32, 35</sup>

El Abciximab en un estudio clínico demostró un efecto hemostático profundo, con un bloqueo del 80% de los receptores de GP IIb/IIIa, así mismo, reduciendo marcadamente la agregación plaquetaria y prolongando el tiempo de sangrado.<sup>8</sup>

En un estudio clínico doble ciego aleatorizado en la Fase 1 (AbESTT I) se observaron resultados favorables en el grupo a quienes se le administró dicho medicamento comparado con el grupo control a quienes se les administro placebo.<sup>8</sup> Pero al llegar a la Fase 2 se observo una alta incidencia de hemorragia intracraneana sintomática comparado con el grupo placebo. Es por eso, que se están acumulando evidencia que el Abciximab conlleva poco beneficio en los pacientes con ACV y parece aumentar las complicaciones hemorrágicas por lo que el estudio fue interrumpido.<sup>8</sup> Otro estudio piloto<sup>15</sup> combinó Abciximab con dosis bajas de tPA resultando altas tasas de recanalización de ACV comparado con dosis tope de tPA solo.<sup>9</sup>

El Tirofiban es un inhibidor de la glicoproteína IIb/IIIa plaquetaria, derivado de la tirosina. Por ser un compuesto de bajo peso molecular no presenta inmunogenicidad. Posee una alta afinidad por los receptores de la GP IIb/IIIa, lo que impide la unión del fibrinógeno, del factor de von Willebrand, y de otros ligandos adhesivos al receptor IIb/IIIa de las plaquetas activadas. Su ventaja además radica en que previenen la agregación plaquetaria independientemente del agonista implicado. Así, el Tirofiban bloquea la agregación plaquetaria inducida por la trombina mientras que la aspirina es inactiva frente a este agonista. Alcanza un 90% de inhibición plaquetaria a los 30 minutos de su administración endovenosa y posee una vida media de 1.6 a 2 horas. Sus efectos adversos más temidos son la trombocitopenia y complicaciones hemorrágicas. El efecto antiagregante plaquetario del Tirofiban se mantiene mientras que el fármaco se administra en infusión desapareciendo en las 4 a 8 horas después de la discontinuación de la misma.<sup>7, 35, 69</sup>

Actualmente esta indicado su uso para la profilaxis de la trombosis y en combinación con heparina para la prevención de complicaciones cardiacas isquémicas, como el

infarto no Q y angina inestable, administrado a dosis inicial de 0.4 mcg/kg por treinta minutos, seguido de una infusión de 0.1 mg/kg/min por 12 a 24 horas posterior a la angioplastia o arterectomía. Por sus propiedades ha sido utilizado para la desintegración del trombo en enfermedad cerebrovascular sintomática solo o combinado con dosis bajas de rTPA y se ha demostrado un bajo riesgo de HIC. Por otra parte, en otro estudio se evidenció que el Tirofiban puede reducir el déficit de perfusión territorial cerebral y por lo tanto rescatar el tejido cerebral en riesgo de infarto<sup>16</sup>. Esto apoya la idea que el Tirofiban puede inhibir la formación aguda de trombo en arterias grandes y a nivel capilar cuando el endotelio es dañado y la cascada de coagulación se vuelve activa.<sup>8, 32</sup>

El uso de Eptifibatide esta bien limitado ya que en estudios iniciales se observó una alta tasa de mortalidad y HIC.<sup>8</sup>

Se han reportado más de 1000 estudios de terapias neuroprotectoras, pero ninguno ha documentado efectividad. Estos fármacos apuntan a la preservación tisular hasta que un flujo sanguíneo adecuado puede ser restablecido, ya sea por recanalización espontánea, recanalización terapéutica o flujos colaterales. Algunos estudios han usado el sulfato de magnesio como terapia neuroprotectora obteniendo buenos resultados para una reperfusión subsecuente.<sup>9</sup> Otros estudios experimentales apoyan fuertemente el potencial terapéutico de la hipotermia inducida como estrategia neuroprotectora, aunque todavía no hay resultados concluyentes y su enfoque todavía es experimental.<sup>64</sup>

## HIPÓTESIS

### **Hipótesis general.**

- El Tirofibán disminuye la zona de penumbra isquémica en el ictus isquémico-embólico y evita su conversión a infarto luego de tres horas de iniciada la oclusión arterial.

### **Hipótesis específicas.**

- La administración de Tirofibán disminuye el volumen del tejido hipoperfundido y evita su conversión a infarto, luego de tres horas de ocurrido el ECV isquémico embólico.
- A diferencia del placebo, el Tirofibán mejora la perfusión sanguínea a la zona de penumbra isquémica.

## DISEÑO METODOLÓGICO.

### **a. Tipo de estudio.**

El presente estudio es de tipo experimental, con muestreo aleatorio, doble ciego, placebo controlado.

### **b. Muestra.**

Se utilizaron 23 conejos, de los cuales se obtuvo una muestra de 12 conejos distribuidos en dos grupos de 6 individuos cada uno: Grupo de Tirofiban (Grupo A) y Grupo control (Grupo B).

#### CRITERIOS DE INCLUSIÓN.

- Conejos neozelandeses machos.
- Peso entre 2000 y 2500 g.
- Que presenten zona con déficit de perfusión en la MRI DW/PW, treinta minutos posterior a la embolización de la arteria carótida interna, con un coágulo autólogo.

#### CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.

- Conejos en los cuales se evidencie anomalía estructural en la MRI previa al estudio.
- Conejos en los cuales la MRI presente artefacto que dificulte su interpretación.
- Sujetos embolizados que fallezcan antes de finalizada la infusión.

### **c. Operacionalización de variables.**

#### VARIABLES DEPENDIENTES.

- Zona de infarto: Área que presenta lesión en DW. Expresada en ml.
- Zona de hipoperfusión: Área que presenta déficit de perfusión sanguínea, medida según parámetros de PW (tabla 1). Expresada en ml.
- Zona de penumbra isquémica: diferencia entre el volumen de PW menos el de DW. Expresado en ml.

CUADRO 1.

	Concepto	Indicador
rCBF (Flujo sanguíneo cerebral relativo)	La media del flujo microvascular	ml/100g tejido/min
rCBV (Volumen sanguíneo cerebral relativo)	El volumen sanguíneo de la microvasculatura perfundida	Mililitros
MTT (Tiempo medio de tránsito del medio de contraste)	Tiempo que le toma a la sangre para pasar del lado arterial al venoso	Segundos
TTP ("time-to-peak")	Tiempo que tarda el material de contraste desde su infusión hasta producir el máximo cambio en la señal observada.	Segundos
ADC (Coeficiente aparente de difusión)	Volumen del área que presenta lesión de DW, comparada con el área contralateral.	Mililitros

Modificado de Aronen H, Laakso M, Moser M, Perkiö J. Diffusion and perfusion-weighted magnetic resonance imaging techniques in stroke recovery. *Europa Medicophysica*. 2007;43:271-84 <sup>50</sup>

#### VARIABLES INDEPENDIENTES.

- Tirofibán (Agrastat ® 0.25 mg/ml, VIAL 50 ML. MERCK SHARP DOHME)  
Administrado en bolo a 0.4 mcg/kg/min y luego a infusión continua a 0.1 mcg/kg/min, en vehículo (solución salina al 0.9%). <sup>70</sup>
- Placebo: Solución salina al 0.9% a 5 ml/kg/dosis.
- Tiempo de evaluación post isquemia: La evaluación con MRI posterior a la embolización: treinta minutos.
- Tiempo de isquemia previo a la infusión: El periodo entre la embolización y el inicio de la infusión del medicamento: tres horas.
- Duración de administración del medicamento: Los conejos reciben una infusión del medicamento de cuatro horas.
- Tiempo de evaluación post infusión: Los sujetos serán reevaluados con MRI DW/PW a las dos y cuatro horas de la embolización.

#### d. Consideraciones éticas.

Al momento no hay guías acerca de consideraciones éticas en animales de investigación en El Salvador. Por lo tanto, se respetaran las guías de la "American Veterinary Medical Association", para Eutanasia del "Animal Welfare Information Center" (AWIC). Además se usara de guía el documento de Elementos Esenciales para

Investigación Animal, Una Guía para la Investigación Animal, basado en las normas de la AWIC. <sup>65, 66</sup>

*Plan de recolección de muestras*

## PREPARACION DE ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Luego del pesado de los conejos, se induce la anestesia con inhalación de éter, para luego administrar intraperitonealmente una mezcla de atropina (0.1 mg/kg), midazolam (2 mg/kg) y ketamina (20 mg/kg); esta se repite cada hora de ser necesario, según respuesta, mientras se manipule al animal.<sup>67</sup>

Se procede a disecar y canalizar una de las venas femorales, la cual sirve de acceso para la administración de la infusión de medicamento.

Se toma una MRI inicial para descartar la presencia de anomalías estructurales.

## INDUCCION DEL EVENTO CEREBRO VASCULAR ISQUÉMICO

Al ser negativo el resultado del MRI para anomalías estructurales, se procede a disecar y cateterizar la arteria carótida común derecha con un catéter 24 G x 2/3", introducido entre 0.5 y 1 cm dentro de la misma, fijándolo con nylon 3-0. Se extraerán 0.2 ml de sangre de dicha arteria, dejándola en la jeringa durante diez minutos para obtener el coágulo. Ésta se emboliza y es seguido de un bolo de 0.2 ml de solución salina al 0.9%.<sup>9</sup>

A los 30 minutos de la embolización, se toma una MRI con angiografía para comprobar si fue satisfactoria (visualización de vaso ocluido). En caso negativo, se repetirá la embolización.

Cuando ha sido exitosa la embolización, se asignan los conejos aleatoriamente en dos grupos (Grupo A y Grupo B) por un asesor que no participará en la fase experimental ni en el análisis de imágenes.

## TRATAMIENTO

Luego de tres horas de la embolización, se infunde el medicamento, vía intravenoso, durante cuatro horas de la siguiente forma:

- Placebo: Solución salina al 0.9% (5 ml/kg/dosis).
- Tirofibán: Tirofibán administrado en bolo a 0.4 mcg/kg/min y luego a infusión continua a 0.1 mcg/kg/min en vehículo (solución salina al 0.9%).

Cada tres horas, hasta el final de la infusión, se administra un bolo intraperitoneal de 10 ml de solución salina al 0.9%, con el objeto de reponer las pérdidas hídricas en los sujetos de experimentación.

Finalizada la infusión, se toma una MRI con DW/PW; luego de ésta, se realiza la eutanasia de los sujetos con la administración de 5 ml intravenosos de cloruro de potasio.

### IMAGENOLOGÍA.

Las imágenes son obtenidas mediante un equipo Siemens Magnetom Vision 1.5 T Whole Body MR Scanner (Siemens AG, Erlangen). Las imágenes de difusión (DW) son obtenidas con una secuencia simple tridimensional de tres valores  $b$  –  $b=0$  segundos/mm<sup>2</sup>,  $b=500$  segundos/mm<sup>2</sup> y  $b=1,000$  segundos/mm<sup>2</sup>. Los parámetros de imagen son tiempo de eco (TE)=100 milisegundos, 7 cortes axiales a 2.2 mm de grosor, brecha entre cortes de 1.5 mm, matriz 96x128, campo de vista (FOV)= 240 mm, tiempo de imagen= 26 segundos.

Las imágenes de perfusión (PW) se obtendrían con T2, a un ritmo de 12 cortes 40 veces cada 2 segundos. Los parámetros serán TE=54 mseg, 7 cortes con 2.2 mm de grosor, con brecha entre los mismos de 1.5 mm, matriz de 128, FOV=240 mm. Se inyectaría un bolo de material de contraste (galodinio) a una dosis de 0.2 ml/kg, a una velocidad de 5 ml/minuto, seguidos de 1 ml de cloruro de sodio al 20% a la misma velocidad de infusión.

El volumen del área infartada es determinada por la lesión en DW. El volumen del área hipoperfundida sería determinada por las variables de PW ya descritas (TABLA 1). La zona de penumbra isquémica se obtendría:

$$\text{Penumbra (ml)} = \text{PW (ml)} - \text{DW (ml)}_{50}$$

El análisis imagenológico es realizado por un médico radiólogo que tampoco conoce a qué grupo fueron asignados los sujetos de experimentación.

#### *Análisis de datos.*

Los datos son analizados con pruebas de estadística descriptiva, utilizando el software SPSS versión 11.0 y Microsoft Excel Vista.

*Debido a dificultades técnicas con el equipo de MRI, no fue posible evaluar la secuencia de Perfusión (PW), por lo que no fue cuantificable la zona de penumbra isquémica; se presentan los datos de las lesiones de difusión únicamente, a modo descriptivo, como casos y controles. Se ampliara este punto en la discusión.*

## RESULTADOS

Se realizaron los experimentos según los lineamientos establecidos previamente, no obstante, debido a dificultades técnicas con el Equipo de Resonancia Magnética Nuclear, no fue posible evaluar a los sujetos de experimentación con el parámetros de Perfusión (PW), lo que es discutido más adelante. Por lo que la única variable a ser presentada es la lesión de Difusión (DW), lo cual determina el volumen de infarto.

Se tomaron tres secuencias de MRI por conejo: a una hora de embolizado para corroborar cambios isquémicos, a tres horas (justo antes de iniciar la infusión de tirofiban y placebo) y luego de cuatro horas de infusión. Cuatro sujetos no lograron finalizar el tiempo de infusión, por lo que fueron excluidos de los datos presentados a continuación.

El cuadro 2 detalla los volúmenes de infarto en ml de cada uno de los conejos en los grupos TIROFIBAN y PLACEBO.

CUADRO 2.

GRUPO TIROFIBAN	Volumen de infarto previo infusión de tirofiban ml	Volumen de infarto posterior a infusión de tirofiban ml	Reducción de volumen de infarto %
Conejo a	17.7	2.5	85
Conejo b	17.2	2.4	86
Conejo c	27.6	22.4	18
Conejo d	11.9	1.6	86
Conejo e	16.8	8.5	49
Conejo f	15.6	4	74
<b>Promedio</b>	<b>17.8</b>	<b>6.9</b>	<b>66.3</b>
<b>Desviacion estandar</b>	<b>5.23</b>	<b>7.98</b>	<b>27.6</b>

El cuadro presenta un resumen de los volúmenes de infarto de cada sujeto previo a la infusión de tirofiban y posterior esta. Se puede evidenciar una notable disminución en el promedio de los volúmenes de infarto.

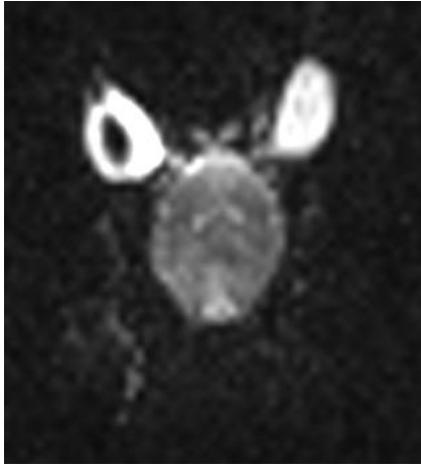
Como se puede observar en el cuadro, los sujetos embolizados a quienes se les administro la infusión de Tirofiban, presentaron una disminución sustancial en el volumen de tejido cerebral infartado. El cuadro presenta un promedio de volumen infartado previo al Tirofiban de 17.8 ml y un promedio de volumen infartado posterior al Tirofiban de 6.9ml, una reducción de 66.3%. Además la desviación estándar es de 5.23 para el grupo pre Tirofiban y 7.98 para el post infusión de Tirofiban.

El sujeto C presento un infarto de mayor proporción que los demás conejos con un volumen de 27.6 y de la misma manera presento una reducción de infarto 18%. Vale la pena mencionar que la reducción de infartos de menor volumen fue mas significativa que la reducción del infarto de mayor volumen, como lo es el sujeto C.

En la figura 3 y 4 se puede apreciar la imagen de difusión pre y post tirofiban lo cual es representativo del 100% de los casos estudiados. *Ver ANEXOS al final del documento*

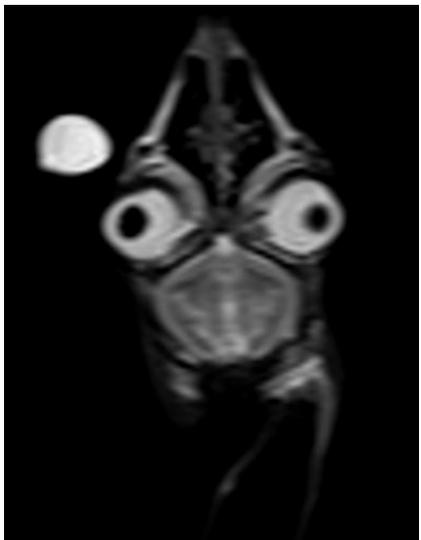
*para apreciar el corte mas representativo de la perdida de volumen en cada sujeto de estudio.*

Figura 3



En esta imagen se puede notar la zona de infarto en la región frontal del encéfalo del sujeto B. Además se puede notar una pequeña área infartada en la región occipital. Este es uno de los múltiples cortes realizados durante el estudio de la tercera hora posterior a la embolización y previo a la infusión por tirofiban. La mayoría de imágenes presentan baja resolución debido al tamaño del cerebro del sujeto, abundante tejido óseo y la capacidad del aparato para poder configurar la imagen.

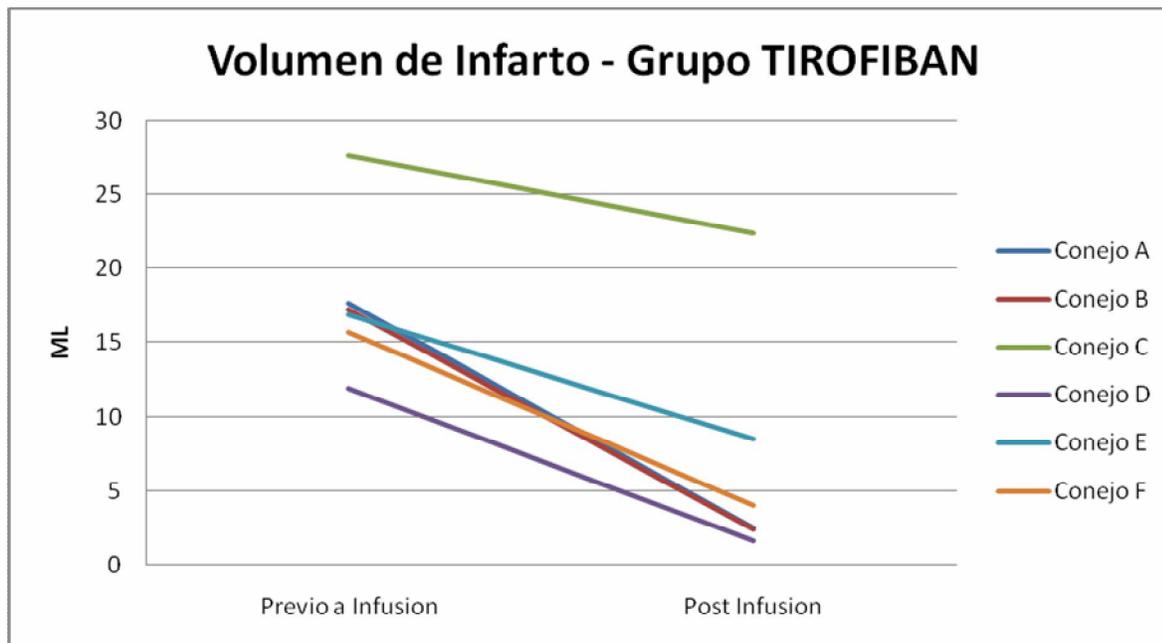
Figura 4



La imagen es correspondiente al mismo sujeto B siete horas posterior a la embolización con cuatro horas de infusión de tirofiban. El corte presenta la mayor area de infarto presentado en todos los cortes de la serie del estudio del sujeto B y al igual que en todos los otros sujetos, se nota una reducción significativa del area de infarto.

Ademas se nota un artefacto en la región superior izquierda de la imagen.

GRAFICO 1.



Se puede apreciar en la grafica la tendencia a agrupación que presentan los sujetos de estudio a excepción del sujeto C.

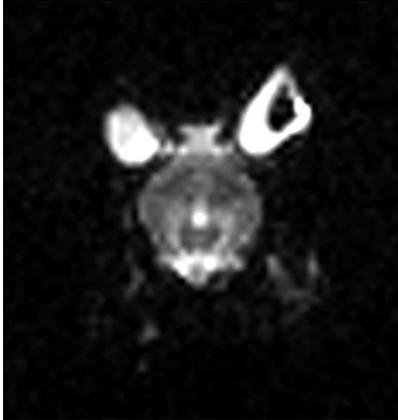
CUADRO 3.

VOLUMEN DE INFARTO GRUPO PLACEBO	Volumen de infarto previo infusión de tirofiban ml	Volumen de infarto posterior a infusión de Placebo ml	Aumento de volumen de infarto %
Conejo G	14	16.8	20
Conejo H	18.9	21.5	13
Conejo I	19.7	21.5	8
Conejo J	14.7	16.9	14
Conejo K	16.5	16.5	0
Conejo L	16.5	17.2	4
<b>Promedio</b>	16.7	18.7	11
<b>Desviación estándar</b>	2.245	2.411	7.28

El volumen de infarto en la muestra de sujetos infundidos con placebo tiene un promedio de 16.7ml. Posterior a la infusión el volumen del infarto aumento a un promedio de 18.7ml. Esto significa un aumento en el tamaño del infarto del 11%. Se infundio a este grupo con Solucion Salina Normal al 0.9% sin presentar ninguna disminucion de infarto en los casos. Hubo más variabilidad en los porcentajes de aumento en esta muestra de sujetos sin embargo el 100% presento aumento de tamaño de infarto.

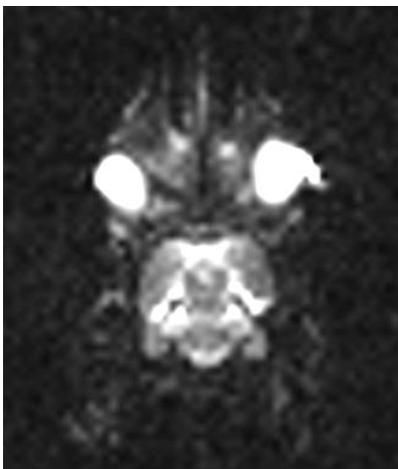
Las figuras 5 y 6 representan una generalización de los cortes con sus respectivos aumentos de volumen de infarto en el grupo placebo

Figura 5



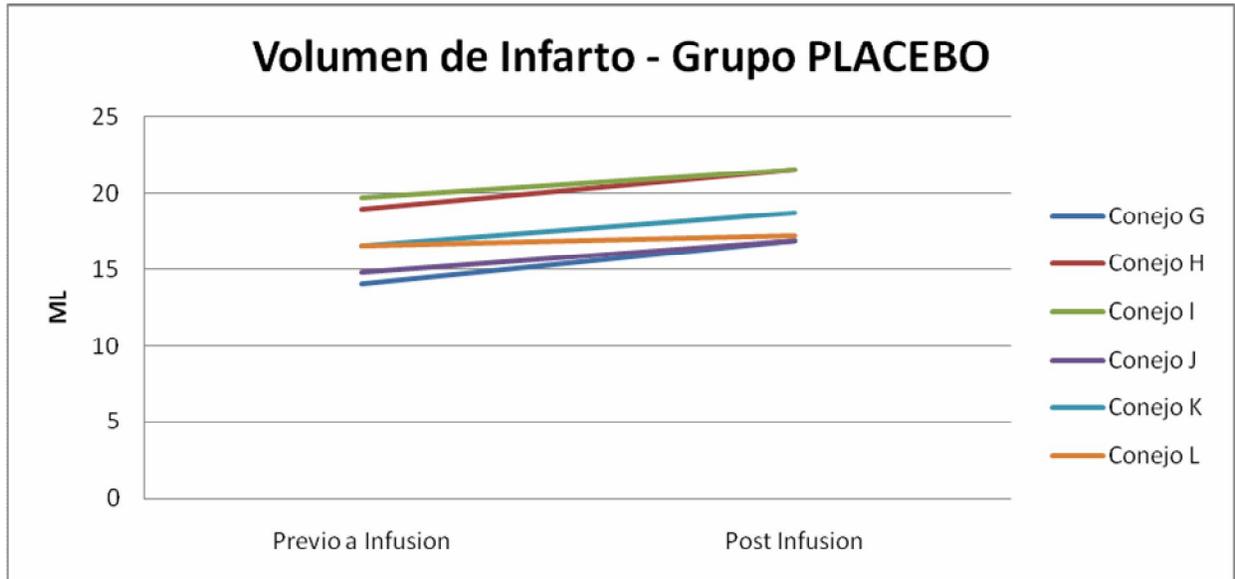
En la imagen se nota una región de infarto en la zona occipital del encéfalo del sujeto H. Esta imagen fue tomada a las 3 horas de haberse realizado la embolización y previo a la infusión de solución salina normal.

Figura 6



El corte representa la imagen con el mayor aumento de volumen en la resonancia magnetica tomada a las 7 horas de la embolización y 4 horas posterior a la infusión de solución salina normal. Se nota un aumento considerable de la región de infarto en comparación a la figura 5.

GRAFICO 2.

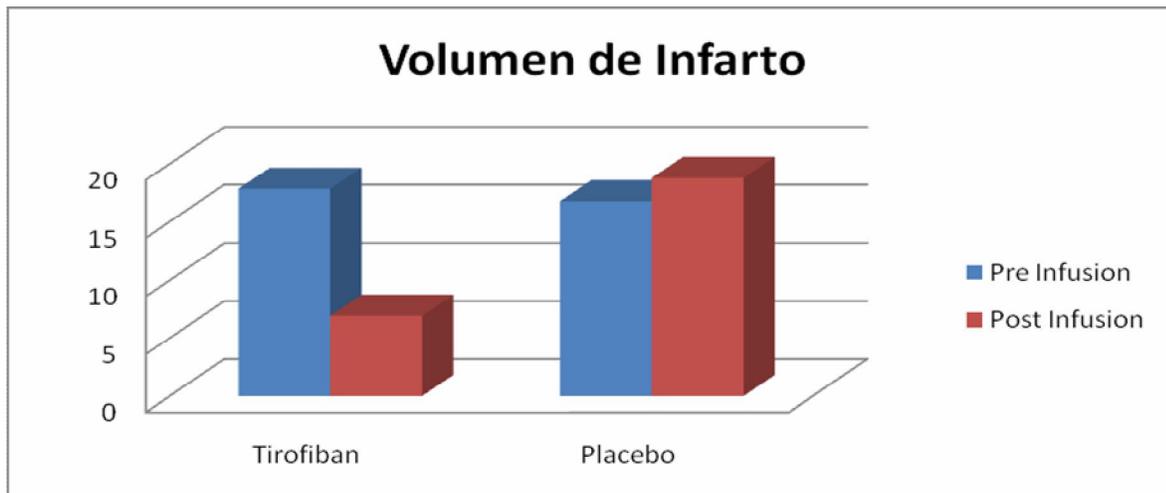


En la grafica se nota el aumento gradual del volumen de infarto que ocurrió en todos los sujetos de estudio del grupo placebo.

CUADRO 4.

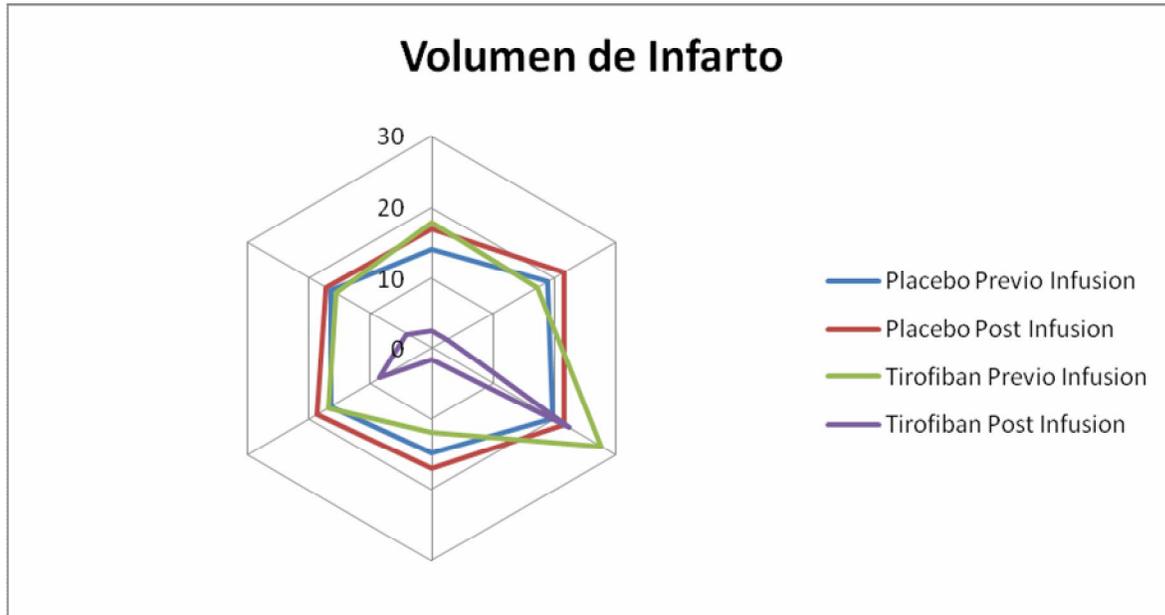
VOLUMEN DE INFARTO	PRE INFUSION	POST INFUSION
TIROFIBAN	17.8	6.9
PLACEBO	16.8	18.8

GRAFICO 3.



Se demuestra la similitud de volumen de los grupos pre infusión y la gran variabilidad que presentan dependiendo en el medicamento administrado.

GRAFICO 4.



El grafico superior demuestra de una manera más clara la agrupación de los datos pre infusión de medicamento. Además se nota el aumento de volumen de los sujetos infundidos con placebo que rodea a los grupos pre infusión. El grupo de tirofiban post infusión se nota completamente separado y rodeado de los otros datos con un volumen mucho menor. Se nota una cola de gran tamaño producida por el sujeto C en la región inferior derecha. Esta se puede ver ha disminuido notablemente posterior a las 4 horas de infusión de tirofiban, sin embargo su reducción no es proporcional a la de los otros datos post infusión de tirofiban.

## DISCUSION

La terapia antitrombótica con fármacos inhibidores de la GP-IIb/III-a es una alternativa que se ha venido desarrollando desde hace varios años, principalmente como coadyuvante a la fibrinólisis con r-TPA, aunque hay estudios que han sugerido su monoterapia. Estos últimos han sido ensayos pre clínicos o con número reducidos de pacientes, pero sugieren el potencial terapéutico del Tirofiban dada su efectividad en el periodo previo al inicio de acción de los anticoagulantes convencionales<sup>8</sup>; no obstante es una rama inconclusa dentro de la investigación de esta patología y su manejo.

En el desarrollo de nuestro estudio contamos con varias limitantes que afectaron sustancialmente su desarrollo: la primera es la baja tasa infarto cerebral al utilizar el método de embolización con coagulo autologo; esto ya lo pudimos observar en los estudios de Segura y colaboradores<sup>9, 10</sup> donde la tasa de embolización exitosa e infarto ronda el 45%<sup>9, 10</sup>. En los estudios de Segura se realizaban las embolizaciones, los experimentos y luego las craniectomías prácticamente a ciegas, sin conocer si la embolización fue exitosa, el conejo continuaba en el estudio.

En nuestro estudio tuvimos la ventaja de realizar luego de la embolización una angio resonancia, con lo que se corroboraba el éxito de la misma en cuanto a la oclusión. Si no se observaba oclusión de la vasculatura cerebral, el conejo era reembolizado, hasta lograrlo (FIGURA 6). Pese a esto, hubo conejos que con la vasculatura cerebral ocluida no presentaban áreas isquémicas, probablemente debido a circulación colateral. Esto se tradujo en que únicamente logramos incluir doce sujetos en el estudio (infartados), mientras que hubo conejos que fueron embolizados en forma sucesiva (seis en total), incluso en ambas arterias carótidas, sin lograr lesiones isquémicas.

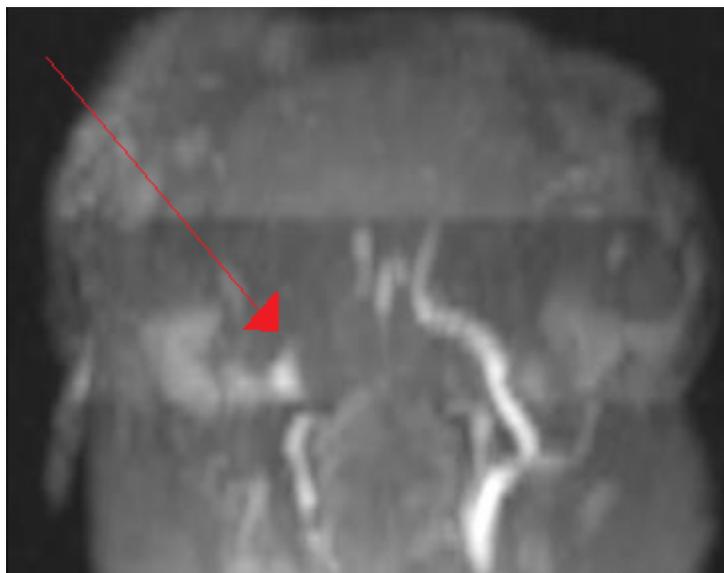


FIGURA 6. Angio resonancia de conejo embolizado, observando obstrucción del sistema de la arteria carótida interna derecha.

Esto ya ha sido discutido por varios autores, sin llegar a un acuerdo. Dentro de los modelos mas utilizados para ECV isquémico en animales de experimentación (principalmente ratas y conejos), el más usado es la sutura endoscópica intravascular de la arteria cerebral media. Los métodos de embolización además de la embolización carotídea con coágulo autólogo (usado en nuestro estudio) esta descrita la embolización selectiva de la arteria cerebral media. Henniger apoya los modelos de embolización en lugar de la oclusión mecánica mediante sutura intravascular, y propone que la fragmentación del coágulo o una oclusión mas completa (proximal) son los mecanismos por los que la zona de penumbra es mayor y mas duradera mediante la embolización.<sup>71</sup>

Otro factor que pudo influir negativamente en nuestro estudio fue el método de preparación del coágulo. Ciertos autores que apoyan el uso coágulos ricos en fibrina (incubados y fragmentados), con mejores resultados que los preparados y embolizados en el acto, durante el mismo experimento.<sup>72, 73</sup> No obstante, los estudios de Segura Lemus han utilizado dos métodos diferentes de preparación del mismo, con similares tasas de embolización exitosa<sup>9, 10</sup>

Definitivamente la mayor limitante que tuvo nuestro estudio, fue la inadecuada resolución del equipo de Resonancia Magnética Nuclear para realizar las secuencias de Perfusión (PW) en los conejos, como lo podemos observar. En las figuras 7 y 8 vemos la comparación de una MRI con PW en humano, con adecuada resolución, y luego las que obtuvimos con el equipo de MRI de la Clínica BMJ.

Esto imposibilitó obtener imágenes adecuadas que pudiesen ser analizadas por el Médico Radiólogo que asesoró el estudio. Debido a no tener las imágenes de PW no pudo ser delimitada la zona de penumbra isquémica, objetivo de nuestro estudio (FIGURA 2). Se intentó con diferentes imanes del equipo de MRI, incluyendo los de mayor resolución disponibles, como los imanes para imágenes de rodilla y neonato), sin mejora en los resultados.

Los especialistas de la Clínica Brito Mejía Peña, Colonia Escalon, en San Salvador, que explican el fenómeno secundario a la relación hueso/tejido cerebral del conejo. En el humano, hay un volumen cerebral considerablemente mayor comparado al tejido óseo que lo circunda. En el conejo, esta relación es inversa, pues el cráneo y huesos del macizo facial ocupan mucho mas espacio que la masa encefálica. La hipótesis de estos especialistas es que se genera un efecto de “artefacto” para el imán del equipo de MRI, distorsionando completamente la imagen (FIGURAS 8 y 9).

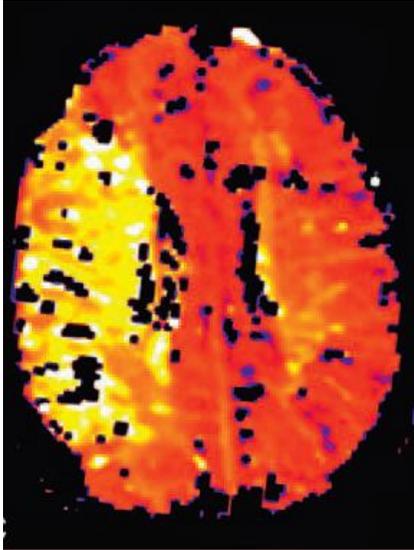


FIGURA 7. Imagen de PW en humano, donde se observa un déficit de perfusión en el area correspondiente a la arteria cerebral media derecha. Modificado de Gonzalez RG, Imaging-Guided Acute Ischemic Stroke Therapy: From "Time Is Brain" to "Physiology Is Brain". American Journal of Neuroradiology 27:728 –35 Apr 2006

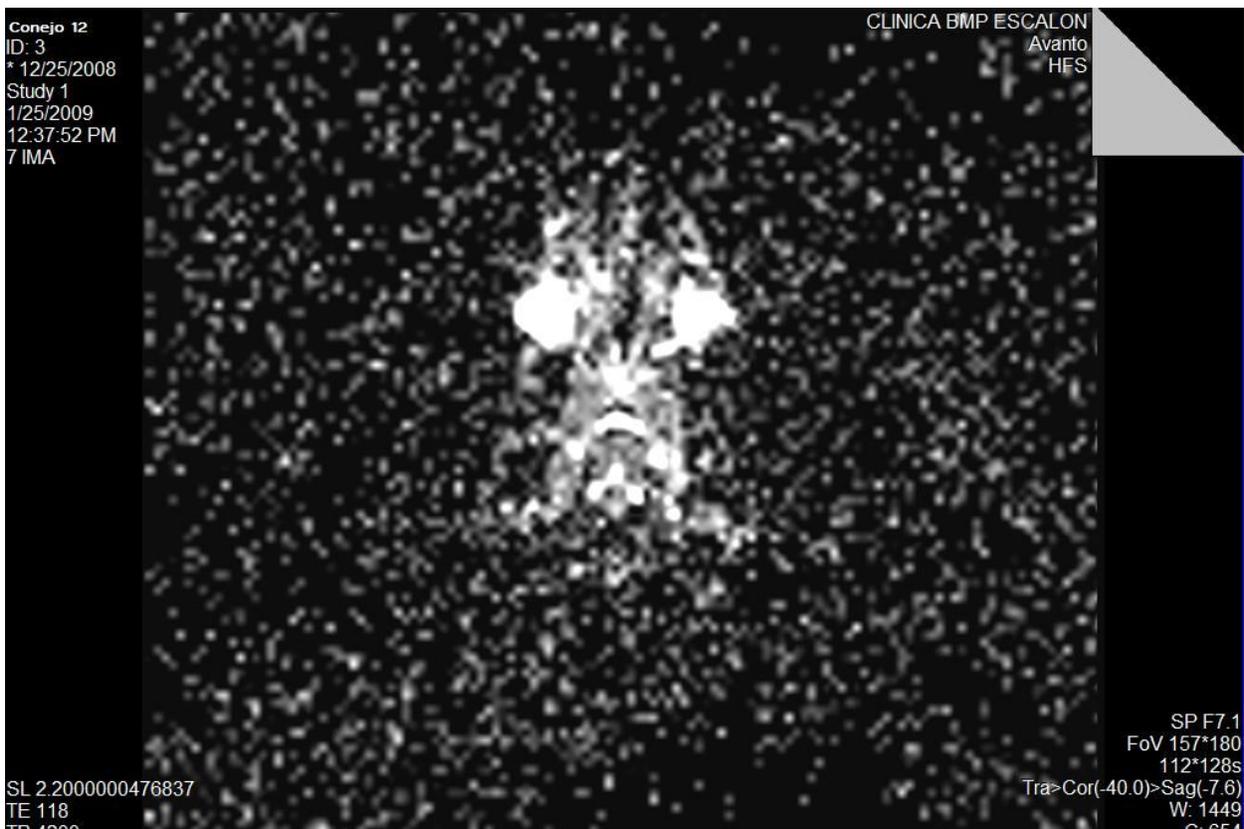


FIGURA 8. Imagen de PW de conejo embolizado, con área isquémica en DW pero con inadecuada resolución en PW. Obtenida en Clínica Brito Mejía Pena, Colonia Escalon.

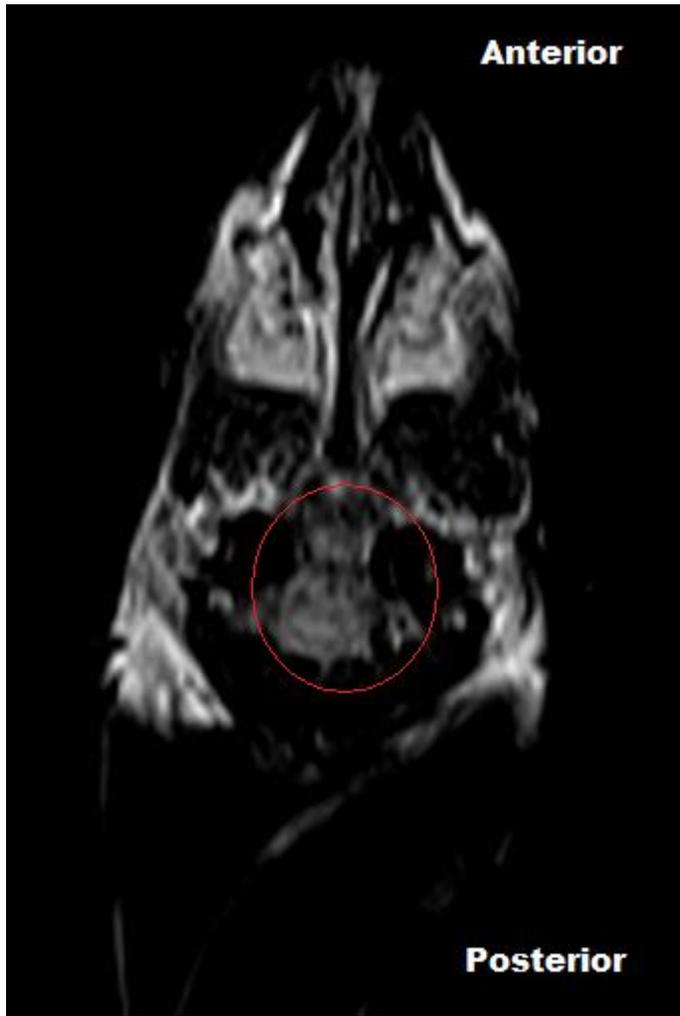


FIGURA 9. Corte coronal de la cabeza del conejo. El tejido encefálico encerrado en un círculo, demostrando su relación con el cráneo.

Se discutió la situación con especialistas de la Clínica de Diagnóstico Neuroradiológico de Eppendorf, Alemania. La opinión de Jens Fiehler, miembro de dicho departamento, luego de sugerir el uso de imanes de mayor resolución (rodilla y neonato), es que el equipo de MRI no dispone de la resolución adecuada para evaluar este parámetro en el conejo.<sup>74</sup>

Retomando los resultados del estudio, en el grupo TIROFIBAN se encontró una reducción marcada del volumen del infarto medido por DW, de un promedio de 17.84 ml previo a la terapia a 6.93 ml luego de cuatro horas de infusión de Tirofiban. Esta diferencia se observó incluso en un conejo con infarto masivo (conejo C), aunque la reducción del tejido infartado fue menor a los demás conejos.

Por lo general, en el grupo PLACEBO la tendencia fue la progresión de la lesión en DW, en un promedio de 2 ml luego de cuatro horas. El comportamiento de este grupo fue sumamente homogéneo, pese a la adecuada hidratación de los conejos durante el estudio y a cierto efecto neuroprotector de los anestésicos que utilizamos, en particular la Ketamina<sup>67</sup>. No consideramos este efecto neuroprotector un sesgo para nuestro estudio, pues esta variable (anestésico) fue administrada a todos los sujetos por igual.

De los autores que más han estudiado este tema podemos citar a Junghans, quien llevó a cabo un estudio de monoterapia con Tirofiban, en veinte pacientes con lesiones en PW similares (evaluadas con el TTP). Luego de una semana de la terapia observó diferencia significativa estadísticamente ( $p = 0.029$ ) en los pacientes tratados; nuevamente se menciona el escaso número de pacientes incluidos en el estudio, reconociendo asimismo el potencial terapéutico de este fármaco.<sup>16</sup>

Los resultados obtenidos por Segura en su segundo estudio en esta misma línea, mostraron cierta dispersión de los datos, por lo que no pudo concluir firmemente el propósito de aumentar la ventana terapéutica del Tirofiban<sup>10</sup>. Nosotros nos inclinamos por seguir con la pauta terapéutica de tres horas para el inicio de la terapia, ya descrita por Segura en su primer estudio<sup>9</sup> con resultados bastante similares, aunque no pudimos incluir un número de sujetos mayor por razones de índole técnico (sólo disponíamos de un equipo de MRI para el estudio) y, obviamente, económico.

Definitivamente el aspecto más llamativo de nuestros resultados, es la disminución de la lesión en DW, cuando teóricamente es un área de lesión tisular irreversible, cuyo fracaso energético celular y necrosis se traduce en alteraciones de la difusión del agua a través de la pared celular, evidenciadas en la imagen.<sup>48, 50, 54, 55</sup> González ya describió que este tipo de lesiones, en ausencia de terapia, rara vez experimenta regresión<sup>49</sup>; todo lo contrario de nuestros resultados, donde las lesiones catalogadas como definitivas por numerosos autores, han mostrado disminución en el 100% de los conejos sometidos a la infusión de Tirofiban ( $n=6$ ). Esto se podría interpretar como un efecto adicional al ya sugerido sobre la zona de penumbra isquémica, evaluada con cambios en la PW, incluso en pequeñas series de humanos.<sup>16</sup>

A pesar que la gran mayoría de autores coincide en la opinión arriba descrita, existe una controversia al respecto. Por ejemplo, Ringer llevó a cabo un estudio con diez ratas con isquemia cerebral mediante sutura intravascular de la arteria cerebral media, la cual fue retirada treinta minutos después para lograr su reperusión. Se observaron lesiones en DW; se tomaron imágenes control a las 3 y 5 horas. El 100% de las ratas experimentaron disminución de las lesiones, de las cuales cuatro de ellas tuvieron regresión completa de los cambios en DW, y seis, regresión parcial. Pero cuando lo correlaciono con cortes histológicos teñidos con marcadores para la Proteína Asociada a los Microtúbulos 2 (MAP) y la Proteína de Golpe de Calor 72 (HSP72), se tiñeron extensas áreas positivas a la marcación con estas proteínas relacionadas con la isquemia cerebral aguda, que coincidían con la lesión inicial en DW<sup>58</sup>.

La reversión de los cambios en DW es estudiada por otros autores en diferentes

aspectos. Fuhai Li, la asocia al tiempo que transcurre entre isquemia y reperfusión, con resultados que apoyan la posibilidad que los cambios imagenológicos normalmente catalogados como “irreversibles” desaparezcan<sup>76</sup>.

Por otro lado, la presencia de hemorragia intracerebral, aunque no fue objetivo del estudio, fue observada en un solo caso, de los dieciséis conejos infartados. Esta complicación de la terapia ya ha sido mencionada por otros autores y es punto de controversia<sup>75</sup>; en estudios pre clínicos como el nuestro, la frecuencia es similar.<sup>10</sup>

Definitivamente, la importancia de este estudio no se basa en los resultados estadísticos sino en haber desarrollado un método de evaluación imagenológica del evento cerebrovascular isquémico, con limitantes debido a los pocos recursos con los que disponemos. Su correlación de resultados con estudios realizados en nuestro país<sup>9,10</sup> y el aporte a la controversia sobre la irreversibilidad de las lesiones en DW es un gran aporte al estudio imagenológico de estas lesiones.

## CONCLUSIONES

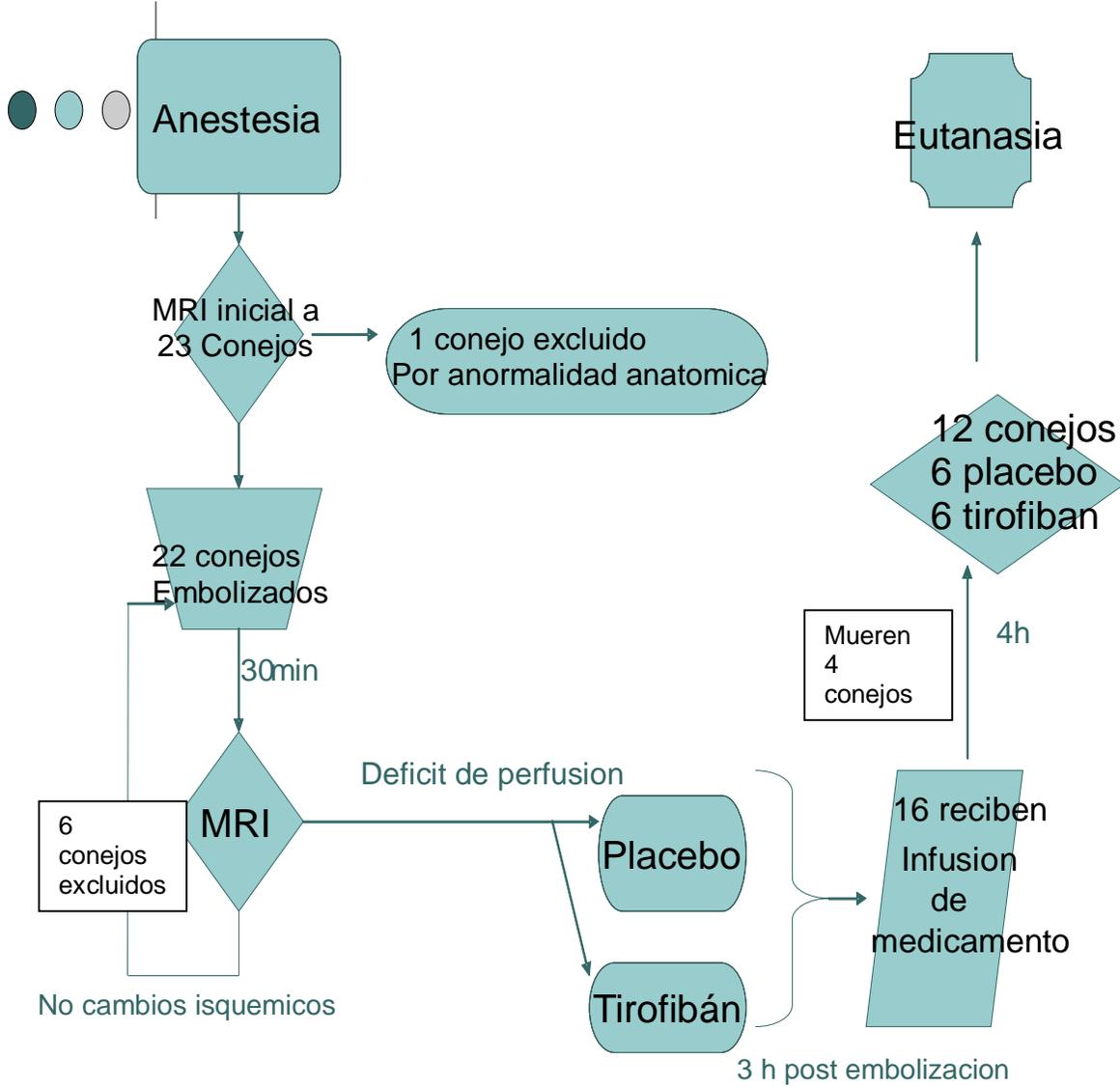
1. El Tirofiban disminuyó el volumen de la lesión de DW en el 100% de los conejos infartados que recibieron infusión de Tirofiban.
2. El volumen de infarto en el grupo de conejos infundidos con Tirofiban a las 7 horas de un evento tromboembólico presentó una reducción promedio de 66%
3. El 100% de los conejos infartados que recibieron infusión de placebo (n 6) sufrieron un aumento del volumen del infarto.
4. El volumen de infarto en el grupo de conejos infundidos con placebo a las 7 horas de un evento tromboembólico presentó un aumento promedio de 12%
5. De 16 conejos que presentaron embolización exitosa solo uno (6.2%) presentó hemorragia intracerebral.

## RECOMENDACIONES

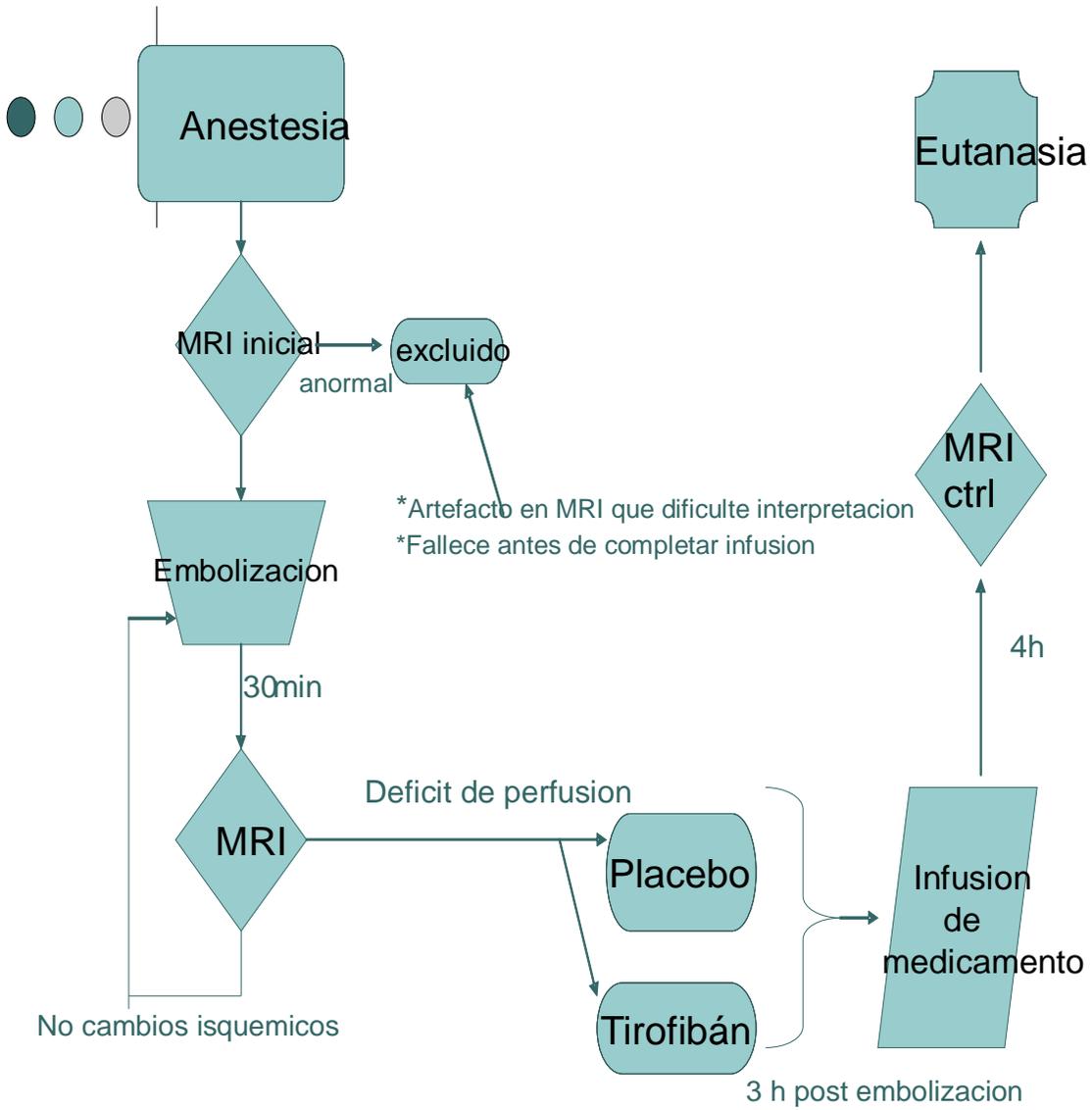
1. Futuros estudios bajo el mismo tema deberían hacerse con mayor número y mayor tamaño de animales para que resistan más tiempo los efectos de los anestésicos y la injuria sistémica provocada por el ECV además de tener mejores resultados con el tipo de imagen a utilizar.
2. Es importante que la resolución del aparato de MRI sea mayor, en la que se pueda obtener cortes de 1.5 mm ya que nuestro estudio utilizamos cortes de 2.2 mm lo que dificultó la evaluación de las imágenes y su evaluación.
3. Retomar el modelo de formación de coagulo ocupado por Segura V<sup>9</sup> para una embolización exitosa.
4. Realizar correlación entre estudios de imágenes y cortes histológicos con tinciones para detectar isquemia cerebral aguda, como la HSP 72 o MAP2.
5. Comparar los resultados obtenidos con RMN con otro método de obtención de imágenes como el PET + TAC con Xenón.

# ANEXOS

Flujograma de trabajo de campo



Algoritmo de la selección de sujetos.



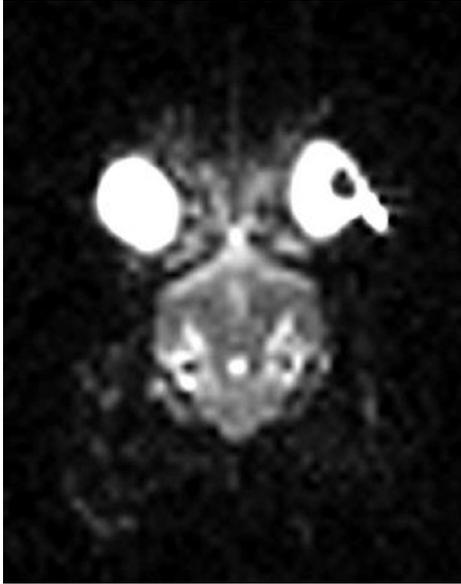


Se puede apreciar en la figura cortes sagitales y axiales en los conejos de experimentación. Se nota la región de infarto en la imagen inferior derecha. Además se nota una obstrucción arterial en la imagen superior derecha posterior a la embolización. En la imagen inferior derecha se nota la distorsión que presentaba la máquina de resonancia magnética en algunos tipos de cortes.

GRUPO DE TIROFIBAN

FIGURA A

Preinfusion

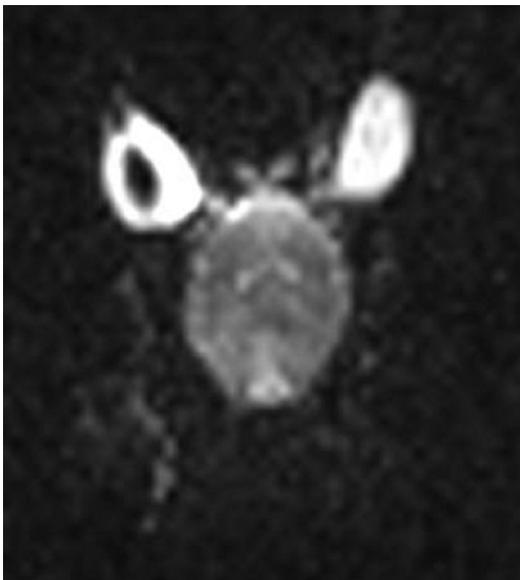


Postinfusion



FIGURA B

Preinfusion



Postinfusion

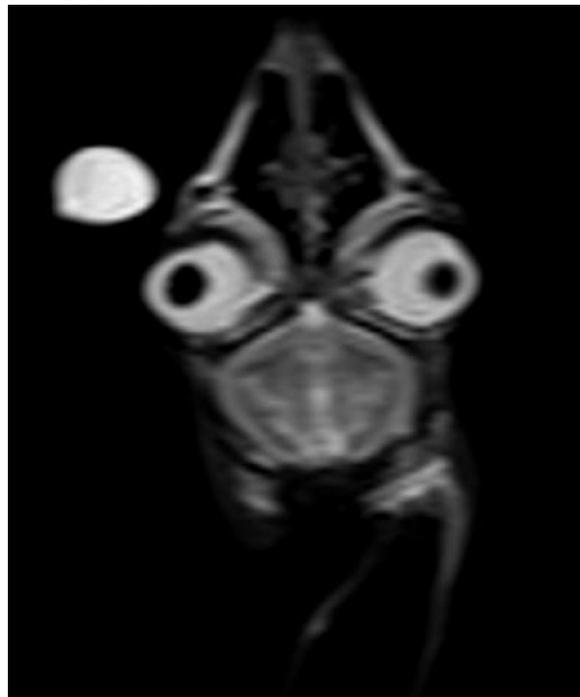


FIGURA C

Preinfusion



Postinfusion

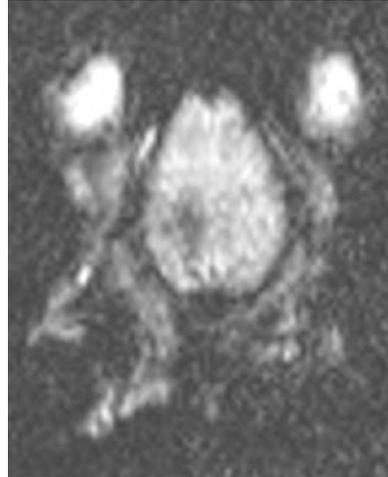
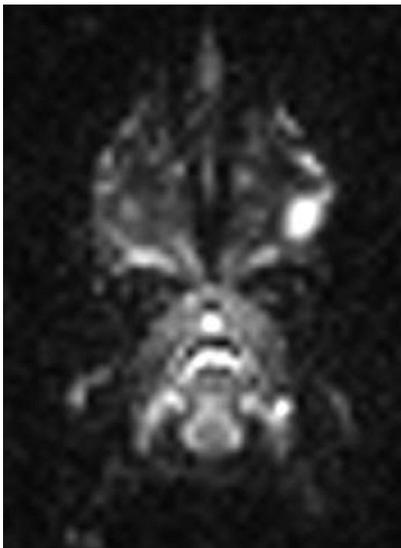


FIGURA D

Preinfusion



Postinfusion

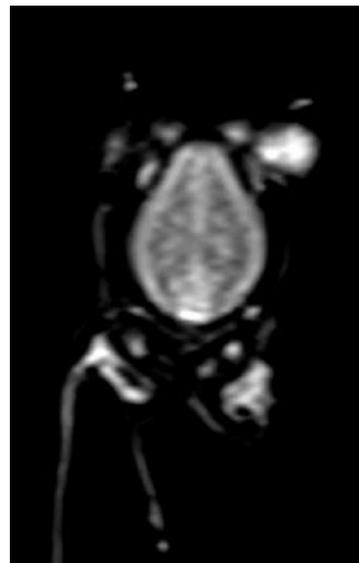
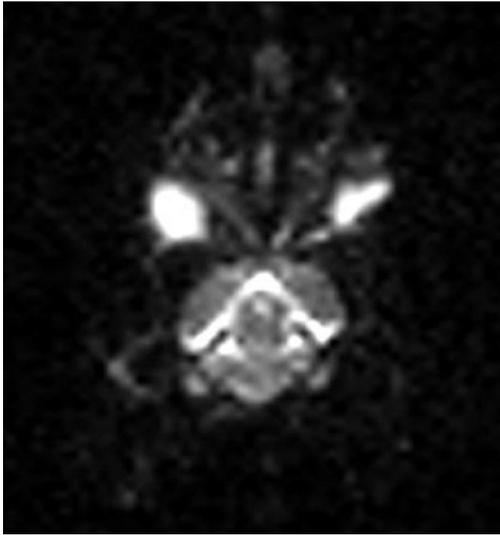


FIGURA E

Preinfusion



Postinfusion

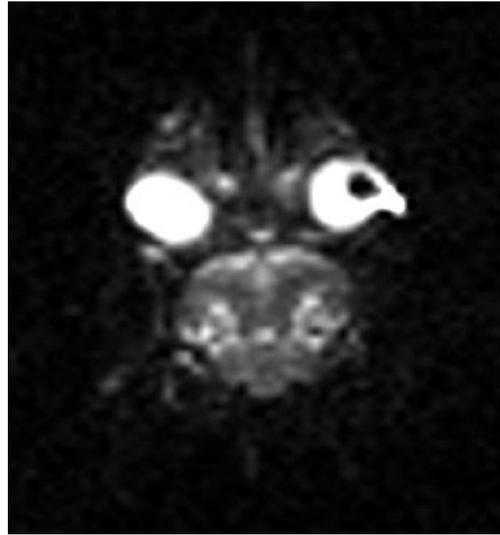
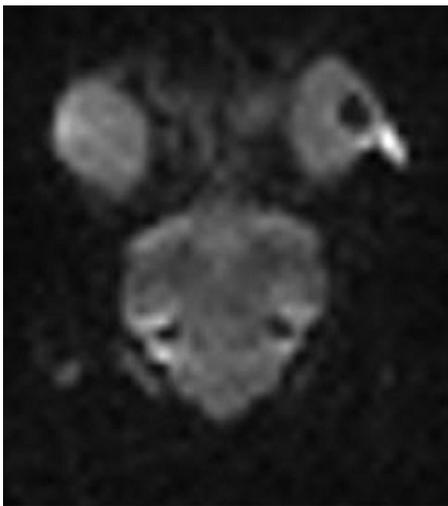
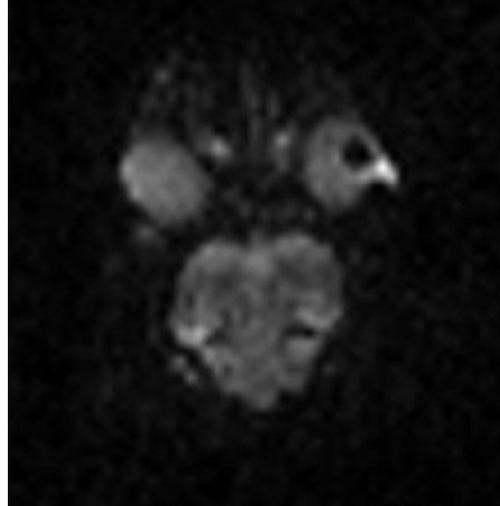


FIGURA F

Preinfusion



Postinfusion



GRUPO DE PLACEBOS

FIGURA G

PREINFUSION

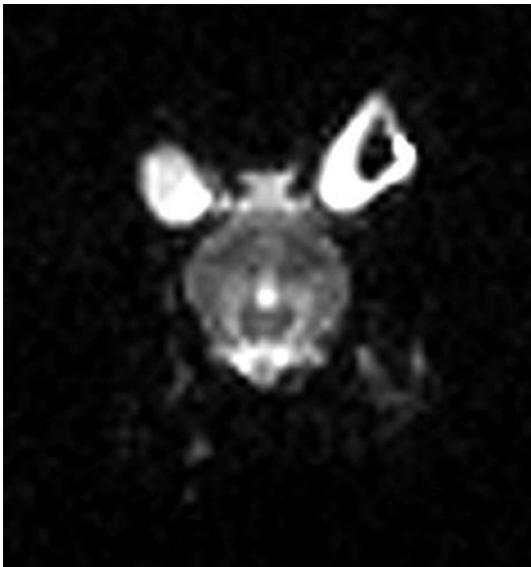


POSTINFUSION



FIGURA H

Preinfusion



Postinfusion

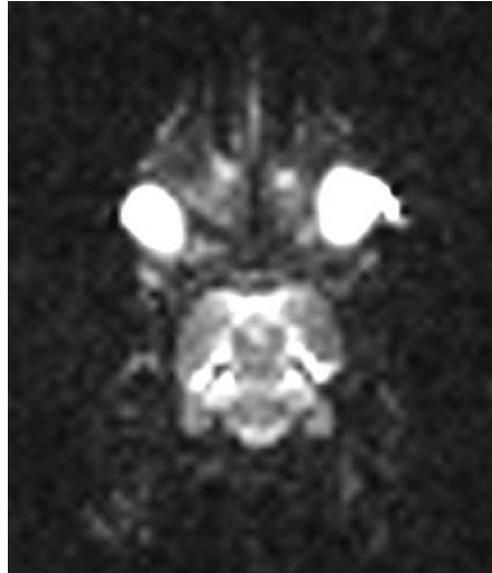


FIGURA I

Preinfusion



Postinfusion

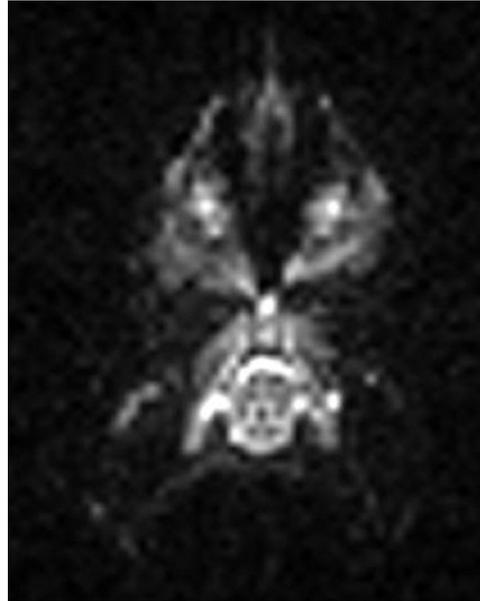
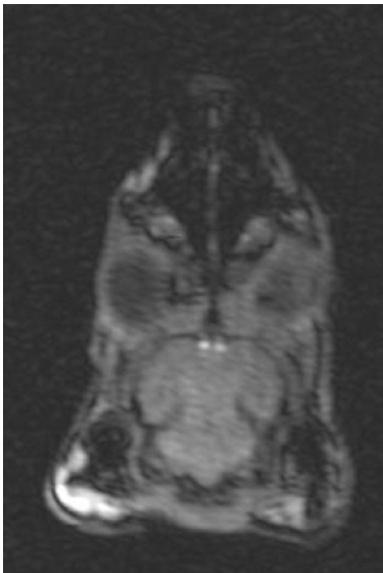


FIGURA J

Preinfusion



Postinfusion

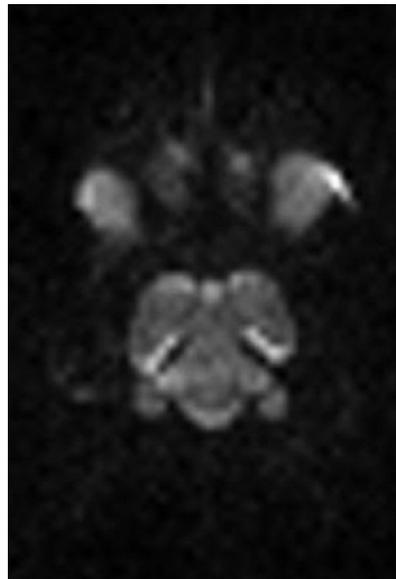
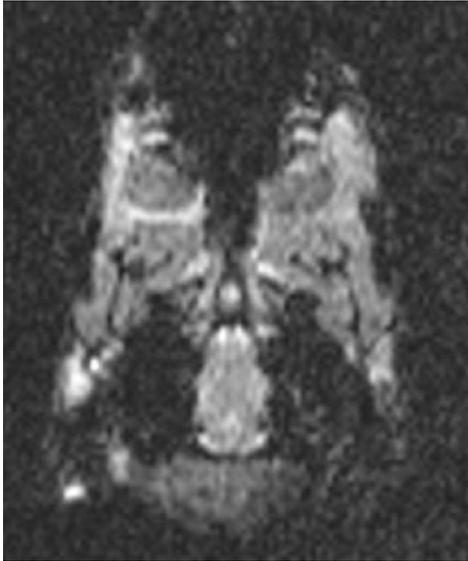


FIGURA K

Preinfusion



Postinfusion

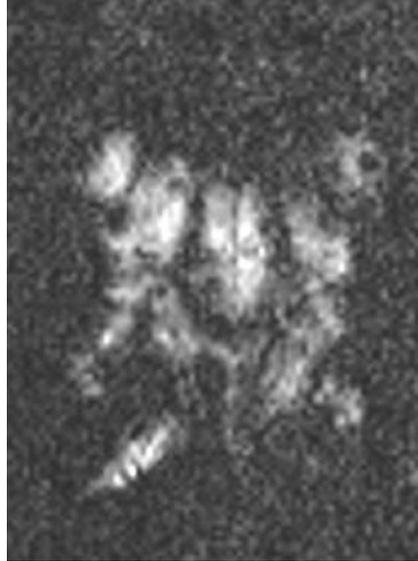
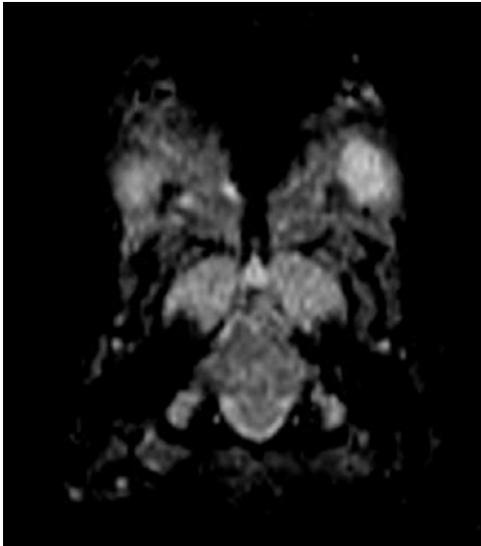
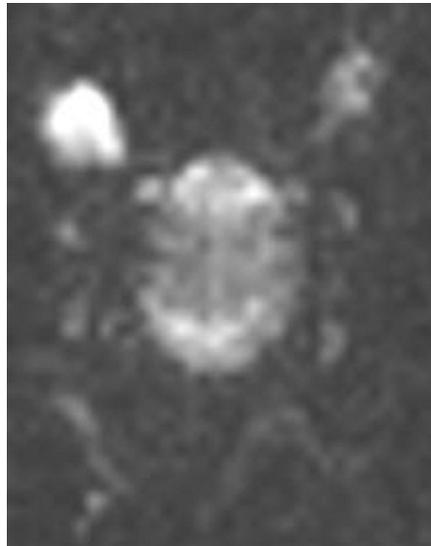


FIGURA L

Preinfusion



Postinfusion



## BIBLIOGRAFIA

1. Organización Mundial de la Salud (OMS). Surveillance in brief Update of Noncommunicable Diseases and Mental Health Surveillance activities, Genova 5a edition. 2003. Organización Mundial de la Salud.
2. Albers G, Amarencu P, Easton J, Sacco R, Teal P. Antithrombotic and Thrombolytic Therapy for Ischemic Stroke. *Chest*. 2001; 119:300S-320S.
3. Molina C. Extending reperfusion therapy for acute ischemic stroke. *Stroke*. 2005; 36:2311-2320.
4. Shih L, Saver J, Alger J, Starkman S, Leary M, Vinuela F, Duckwiler G, Pierre Gobin Y, Jahan R, Villablanca J, Vespa P, Kidwell C. Perfusion-Weighted Magnetic Resonance Imaging Thresholds Identifying Core, Irreversibly Infarcted Tissue. *Stroke*. 2003; 34:1425-1430.
5. Decalf V, Sabbah L, Lafont A, Danchin N, Durand E. Gp IIb/IIIa receptor antagonists in acute coronary syndromes with no ST elevation. *Arch Mal Coeur Vaiss*. 2007 Dec; 100(12):1006-12.
6. Song Yu'e. Evaluation on the Safety and Efficacy of Tirofiban in the Treatment of Acute Coronary Syndrome. *Journal of Huazhong University of Science and Technology*. 2007 27 (2): 142-144.
7. Tuhta AG, Yeşildağ O, Köprülü D. Tirofiban-associated acute thrombocytopenia. *Acta Cardiol*. 2006 Oct;61(5):577-9.
8. Seitz R, Siebler M. Platelet GPIIb/IIIa receptor antagonists in human ischemic brain disease. *Current Vascular Pharmacology*, 2008, 6, 29-36
9. Segura V, Huang C, Martín E, Martínez E, Sansivirini F, Astacio N. Antithrombotic therapy in an experimental model of acute ischemic stroke in rabbits. *Critical Care* 2004, 8(Suppl 1):P318.
10. Segura Lemus V, Alfaro Ponce R, Castellanos Gonzalez J, Tenze Epperson R, Sansivirini Valle F, Astacio Soria N. Therapeutic window of opportunity assessment in antithrombotic therapy, using a glycoprotein IIb/IIIa inhibitor (tirofiban), in an experimental model of acute ischemic embolic stroke in rabbits. *Critical Care* 2005, 9(Suppl 1):P274.
11. Fisher M. Characterizing the Target of Acute Stroke Therapy *Stroke* 1997;28:866-87
12. Schaefer P, Ozsunar Y, He J, Hamberg L, Hunter G, Sorensen G, Koroshetz , Gilberto Gonzalez. Assessing Tissue Viability with MR Diffusion and Perfusion Imaging. *American Journal of Neuroradiology*. 24:436-443
13. Stefan Straub, MD; Ulrich Junghans, MD; Verica Jovanovic, MD; Hans J. Wittsack, PhD; Rüdiger J. Seitz, MD; Mario Siebler, MD. Systemic Thrombolysis With Recombinant Tissue Plasminogen Activator and Tirofiban in Acute Middle Cerebral Artery Occlusion. *Stroke*. 2004;35:705-709.
14. Mangiafico S, Cellerini M, Nencini P, Gensini G, Inzitari D. Intravenous Glycoprotein IIb/IIIa Inhibitor (Tirofiban) followed by Intra-Arterial Urokinase and Mechanical Thrombolysis in Stroke. *American Journal of Neuroradiology*, 2005, 26:2595-2601.
15. Haerten K, Krabbe C, Raiber M. Efficacy and safety of treatment of acute ischemic stroke with glycoprotein IIb/IIIa receptor blocker in routine clinical practice. *Aktuelle Neurologie (Thieme)* 2004; 129: 607-610. En alemán.
16. U. Junghans, MD, R. J. Seitz, MD, A. Ritzl, PhD, H.-J. Wittsack, PhD, G. R. Fink,

- MD, H.-J. Freund, MD and M. Siebler, MD. Ischemic brain tissue salvaged from infarction by the GP IIb/IIIa platelet antagonist tirofiban. *Neurology* 2002; 58:474-476.
- 17.Center for Disease Control. CDC. National Center for Health Statistic. Online en <http://www.cdc.gov/nchs/fastats/deaths.htm>. Fecha de búsqueda 9 Febrero de 2008.
- 18.Center for Disease Control. CDC. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2007. May 18; 56(19):474-8.
- 19.American Heart Association. Heart Disease and Stroke Statistics — 2008 Update, American Heart Association. Online en [http://www.americanheart.org/downloadable/heart/1200078608862HS\\_Stats%202008.final.pdf](http://www.americanheart.org/downloadable/heart/1200078608862HS_Stats%202008.final.pdf) Fecha de búsqueda 9 de Febrero de 2008.
- 20.Taylor T, Davis P, Torner J, Holmes J, Meyer J, Jacobson M. Lifetime Cost of Stroke in the United States. *Stroke*. 1996; 27:1459–1466.
21. Sistema de Morbimortalidad en línea. Unidad de Información en Salud. Dirección de Planificación de los Servicios de Salud. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, El Salvador. En línea <http://www.mspas.gob.sv/estadisticas2006.asp> (fecha de acceso 2 agosto 2008).
- 22.Palacios M, Morales E, Segura V, Delgado F. Risk factors related to death in patients with ischemic stroke. *Critical Care* 2003, 7(Suppl 2):P085.
- 23.Ringleb P, Kretz R, Kunze A, Hartmann E, Brandt T, Grau A, Hacke W. Realization of a Stroke Unit Concept in the First Year after Opening. *Aktuelle Neurologie* 2002; 29: 176-18 (en alemán).
- 24.Barber PA, Zhang J, Demchuk AM, Hill MD, Buchan AM. Why are stroke patients excluded from TPA therapy? An analysis of patient eligibility. *Neurology*. 2001 Apr 24; 56(8):1015-20.
- 25.Harraf F, Sharma AK, Brown MM, Lees KR, Vass RI, Kalra L. A multicentre observational study of presentation and early assessment of acute stroke. *BMJ*. 2002 Jul 6; 325(7354):17.
- 26.Chen CH. Pre-hospital and in-hospital delays after onset of acute ischemic stroke – a hospital-based study in southern Taiwan. *Kaohsiung J Med Sci*. 2007 Nov; 23(11):552-9.
- 27.Jungehulsing GJ, et al. Emergency department delays in acute stroke - analysis of time between ED arrival and imaging. *European Journal of Neurology*. 2006 Mar;13(3):225-32.
- 28.Weerd L, Lythgoe M, Aron R, Valentim L, Tariq M, de Belleruche J, Latchman D, Gadiana D. Neuroprotective effects of HSP70 overexpression after cerebral ischaemia—An MRI study. *Experimental Neurology*. 2005. 195(1):257-266
- 29.Sorensen A, Wu O, Copen W, Davis T, Gonzalez R, Koroshetz W, Reese T, Rosen B, Wedeen V, Weisskoff R. Human acute cerebral ischemia: Detection of changes in water diffusion anisotropy by using MR imaging. *Radiology*, 1999; 212:785-792
- 30.Saur D, Kucinski T, Grzyska U, Eckert B, Eggers C, Niesen W, Schoder V, Zeumer H, Weiller C, Röther J. Sensitivity and Interrater Agreement of CT and Diffusion-Weighted MR Imaging in Hyperacute Stroke. *Am J Neuroradiol* 24:878–885, May 2003
- 31.Röther J, Schellinger PD, Gass A, Siebler M, Villringer A, Fiebach JB, Fiehler J, Jansen O, Kucinski T, Schoder V, Szabo K, Junge-Hulsing GJ, Hennerici M, Zeumer H, Sartor K, Weiller C, Hacke W. Kompetenznetzwerk Schlaganfall Study Group.

- Effect of intravenous thrombolysis on MRI parameters and functional outcome in acute stroke \_6 hours. *Stroke*. 2002; 33:2438 –2445.
32. Brunton L, Lazo J, Parker K. Goodman & Gilman's. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 11a Ed. Seccion 11, Capitulo 54, Blood Coagulation and Anticoagulant, Thrombolytic and Antiplatelet Drugs. The Mc Graw Hill Company, 2006.
  33. Pfefferkorn T, Rosenberg GA. Closure of the Blood-brain barrier by matrix metalloproteinase Inhibition reduces rTPA-mediated mortality in cerebral ischemia with delayed reperfusion. *Stroke* 2003; 34:2025-2030.
  34. Alexandrov AV, Grotta JC. Arterial Reocclusion in stroke patients treated with intravenous tissue plasminogen activator. *Neurology*. 2002; 59; 862-867.
  35. Davydov L, Cheng JW. Tenecteplase: a review. *Clinical Therapeutics*. 2001; 23:982–997.
  36. Zhang L, Gang Z, Zhang R. Adjuvant Treatment With a Glycoprotein IIb/IIIa Receptor Inhibitor Increases the Therapeutic Window for Low-Dose Tissue Plasminogen Activator Administration in a Rat Model of Embolic Stroke. *Circulation*. 2003; 107:2837.
  37. Saposnik G, Caplaan L. Arteriosclerosis and the promise of GPIIB/IIIA inhibitors in stroke *Arq. Neuro-Psiquiatr.* vol.58 n.1 São Paulo Mar. 2000
  38. Cheng GC, Loree HM, Kamm RD, Fishbein MC, Lee RT. Distribution of circumferential stress in ruptured and stable atherosclerotic lesions: a structural analysis with histopathological correlation. *Circulation* 1993; 87:1179-1187.
  39. Bandera E, Botteri M. Cerebral Blood Flow Threshold of Ischemic Penumbra and Infarct Core in Acute Ischemic Stroke. *Stroke*. 2006;37:1334-1339.
  40. Allan S, Tyrrell P and Rothwel N. Interleukin-1 and neuronal injury. *Nature Reviews Immunology* 5, 2005, 629-640.
  41. Aktas O, Ullrich O. Neuronal Damage in brain Inflammation. *Arch Neurol*. 2007;64:185-189
  42. Martin-Villalba A, Herr I, Jeremias I. CD95 ligand (Fas-L/APO-1L) and tumor necrosis factor–related apoptosis-inducing ligand mediate ischemia-induced apoptosis in neurons. *J Neurosci*. 1999;19:3809-3817
  43. Kostulas N, Pelidou S, Kivisakk P, Kostulas V, Link H. Increased IL-1, IL-8, and IL-17 mRNA expression in blood mononuclear cells observed in a prospective ischemic stroke study. *Stroke* 30, 2174–2179
  44. Ching S, He L, Lai W, Quan N. IL-1 type I receptor plays a key role in mediating the recruitment of leukocytes into the central nervous system. *Brain Behav. Immun*, 2005; 19, 127–137.
  45. Ratan R, Siddiq A, Smirnova N, Karphisheva A. Harnessing hypoxic adaptation to prevent, treat, and repair stroke. *J Mol Med*. 2007; 85(12): 1331–1338.
  46. Duval V, Chabaud S, Girard P, Cucherat M, Hommel M, Boissel JP. Physiologically Based Model of Acute Ischemic Stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 2002, 22:1010–1018.
  47. Fisher M, Ginsberg M. Current concepts of the ischemic penumbra. *Stroke*. 2004; 35[suppl I]:2657-2658.
  48. Heiss, W. Ischemic Penumbra: Evidence From Functional Imaging in Man. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2000, 20:1276–1293
  49. González R. Imaging-Guided Acute Ischemic Stroke Therapy: From “Time Is Brain”

- to "Physiology Is Brain". *American Journal of Neuroradiology*, 2006 27: 728-735
50. Aronen H, Laakso M, Moser M, Perkiö J. Diffusion and perfusion-weighted magnetic resonance imaging techniques in stroke recovery. *Europa Medicophysica*. 2007;43:271-84
  51. Markus H. Cerebral perfusion and stroke. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 2004;75;353-361
  52. Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL et al. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 17th edition. Part 16, Section 1, Chapter 362, Neuroimaging in Neurologic Disorders. The Mc Graw Hill Company, 2008.
  53. Neumann-Haefelin T, Wittsack H, Wenserski F, Siebler M, Seitz J, Mödder U, Freund H. Diffusion- and Perfusion-Weighted MRI. The DWI/PWI Mismatch Region in Acute Stroke. *Stroke*. 1999;30:1591-1597
  54. Weinstein P, Hong S, Sharp F. Molecular Identification of the Ischemic Penumbra Stroke. 2004;35[suppl I]:2666-2670
  55. Ginsberg M. The New Language of Cerebral Ischemia. *American Journal of Neuroradiology*, 18:1435–1445, Sep 1997 0195-6108/97/1807–1435
  56. Kidwell C, Alger J, Saver J. Beyond Mismatch Evolving Paradigms in Imaging the Ischemic Penumbra With Multimodal Magnetic Resonance Imaging.
  57. Mancuso A, Derugin N, Ono Y, Hara K, Sharp F, Weinstein P. Transient MRI-detected water apparent diffusion coefficient reduction correlates with c-fos mRNA but not hsp70 mRNA induction during focal cerebral ischemia in rats. *Brain Research*. 1999, 839(1):7-22
  58. Ringer T, Neumann-Haefelin T, Sobel R, Moseley M, Yenari M. Reversal of Early Diffusion-Weighted Magnetic Resonance Imaging Abnormalities Does Not Necessarily Reflect Tissue Salvage in Experimental Cerebral Ischemia. *Stroke*. 2001; 32:2362-2369.
  59. Massa SM, Swanson RA, Sharp FR. The stress gene response in brain. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*. 1996;8:95–158.
  60. Tsuchiya D, Hong S, Matsumori Y, Shiina H, Kayama T, Swanson RA, Dillman WH, Liu J, Panter SS, Weinstein PR. Overexpression of rat heat shock protein 70 is associated with reduction of early mitochondrial cytochrome c release and subsequent DNA fragmentation after permanent focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003;23:718 –727
  61. Kokubo Y, Matson GB, Liu J, Mancuso A, Kayama T, Sharp FR, Weinstein PR. Correlation between changes in apparent diffusion coefficient and induction of heat shock protein, cell-specific injury marker expression, and protein synthesis reduction on diffusion-weighted magnetic resonance images after temporary focal cerebral ischemia in rats. *J Neurosurgery*. 2002 Jun;96(6):1084-93
  62. Kokubo Y, Liu J, Rajdev S, Kayama T, Sharp FR, Weinstein PR. Differential cerebral protein synthesis and heat shock protein 70 expression in the core and penumbra of rat brain after transient focal ischemia. *Neurosurgery*. 2003 Jul;53(1):186-90.
  63. Sobesky J, Weber O, Lehnhardt F, Hesselmann V, Neveling M, Jacobs A, Heiss W. Does the Mismatch Match the Penumbra? Magnetic Resonance Imaging and Positron Emission Tomography in Early Ischemic Stroke. *Stroke*. 2005; 36:980-985.

64. Goldstein, Larry B. Acute ischemic Stroke treatment in 2007 *Circulation* 2007; 116: 1504-1514
65. Bennett B. T, Brown M.J, Schofield J. C. Elementos Esenciales Para Investigación Animal, Una Guía Para La Investigación Personal. American Welfare Information Center. Traducido al Español por la Universidad Autónoma de Nuevo León, Mexico 2000.
66. American Veterinary Medical Association Guidelines on Euthanasia. Junio 2007 En línea en: [http://www.avma.org/issues/animal\\_welfare/euthanasia.pdf](http://www.avma.org/issues/animal_welfare/euthanasia.pdf) Acceso 27 Marzo, 2008
67. Unit for Laboratory Animal Medicine. University of Michigan. Anesthesia and Analgesia Guidelines: Rabbit. Online en <http://www.ulam.umich.edu/sops/ULAM%20SOP%20Rabbit%20Anesthesia.doc> fecha de acceso: 25 de marzo de 2008).
68. Staff de Medicina Crítica. Hospital de Diagnóstico Escalón, San Salvador.
69. Kondo K, Umemura K. Clinical pharmacokinetics of tirofiban, a nonpeptide glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonist: comparison with the monoclonal antibody abciximab. *Clin Pharmacokinet* 2002 41:3 187-95.
70. Braunwald E, Antman EM, Beasley JW, et al. ACC/AHA guidelines for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction: executive summary and recommendations. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on practice guidelines (committee on the management of patients with unstable angina). *Circulation* 2000;102:1193—209.
71. Henninger N, Sicard K, Schmidt K, Bardutzky J, Fisher M. Comparison of Ischemic Lesion Evolution in Embolic Versus Mechanical Middle Cerebral Artery Occlusion in Sprague Dawley Rats Using Diffusion and Perfusion Imaging. *Stroke*. 2006;37:1283-1287
72. Niessen F, Hilger T, Hoehn M, Hossmann K. Differences in Clot Preparation Determine Outcome of Recombinant Tissue Plasminogen Activator Treatment in Experimental Thromboembolic Stroke. *Stroke*. 2003;34:2019-2024
73. Kirchhof K, Welzel T, Zoubaa S, Lichy C, Sikinger M; Lorbacher de Ruiz H, Sartor K. New Method of Embolus Preparation for Standardized Embolic Stroke in Rabbits. *Stroke*. 2002;33:2329-2333.
74. Fiehler, Jens. Consulta personalizada por correspondencia. Klinik und Poliklinik für Neuroradiologische Diagnostik und Intervention, W14, EG Diagnostikzentrum Universitätsklinikum Eppendorf Martinistrasse 52, Alemania.
75. Junghans U, Seitz R, Aulich A, Freund H, Siebler M. Bleeding Risk of Tirofiban, a Nonpeptide GPIIb/IIIa Platelet Receptor Antagonist in Progressive Stroke: An Open Pilot Study. *Cerebrovasc Dis* 2001;12:308-312 DOI: 10.1159/000047726
76. Fuhai Li, Kai-Feng Liu, Silva M, Omae T, Sotak C, Fenstermacher J, Fisher M. Transient and Permanent Resolution of Ischemic Lesions on Diffusion-Weighted Imaging After Brief Periods of Focal Ischemia in Rats. *Stroke*. 2000;31:946