



TESIS DOCTORAL

**PAPEL DE LA PRAVASTATINA EN EL DAÑO
MIOCÁRDICO POR ISQUEMIA Y
REPERFUSIÓN**

AUTOR:

MARIO CASTAÑO RUIZ

DIRECTORES:

PROF. ALBERTO GÓMEZ ALONSO

CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA
FACULTAD DE MEDICINA. UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

PROF. JOSE M^a GONZÁLEZ SANTOS

PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA
FACULTAD DE MEDICINA. UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

SALAMANCA 2010

A Viri, la mujer de mi vida, por su inmensa paciencia, dedicación, respeto y apoyo incondicional a todo cuanto hago. A mis hijas, María y Paula, que le dan el último sentido a nuestras vidas. A mis padres, sin cuyo amor y sacrificio nada de esto hubiera sido posible.

A mis maestros, porque una parte de cada uno de ellos está, sin duda, en este manuscrito.

"Un viaje de mil millas comienza con el primer paso" (Lao-Tse).

Salamanca, 3 de marzo de 2010

PROF. ALBERTO GÓMEZ ALONSO
DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA
CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA
FACULTAD DE MEDICINA. UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Y

PROF. JOSE M^a GONZÁLEZ SANTOS
DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA
PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA
FACULTAD DE MEDICINA. UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICAMOS

que **D. MARIO CASTAÑO RUIZ** ha elaborado bajo nuestra dirección el trabajo titulado "**PAPEL DE LA PRAVASTATINA EN EL DAÑO MIOCÁRDICO POR ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN**", y que lo consideramos apto para ser presentado como tesis doctoral en la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca.

Para que conste a todos los efectos oportunos,

Fdo.: Prof. A. Gómez Alonso

Fdo.: Prof. J. M. González Santos



INSTITUTO NACIONAL DE LA SALUD
HOSPITAL UNIVERSITARIO DE SALAMANCA
Paseo de San Vicente, 58-182
37007 SALAMANCA
MITÉ ETICO DE INVESTIGACION CLINICA
SECRETARIA

Teléf. : 923 291 358
Fax : 923 291 358

**EL COMITÉ ETICO DE INVESTIGACION CLINICA DEL HOSPITAL
UNIVERSITARIO DE SALAMANCA,**

INFORMA :

Que el Proyecto de Tesis Doctoral presentado por el Doctorando, D. MARIO CASTAÑO RUIZ, del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca,

Titulado: "Papel de la pravastatina en el daño miocárdico por isquemia y reperfusión".

CUMPLE LAS NORMAS DE BUENA PRACTICA CLÍNICA, exigida en la legislación referente y SE AJUSTA A LAS NORMAS DEONTOLÓGICAS establecidas para tales casos.

Y para que conste lo firma en Salamanca a trece de diciembre de dos mil uno.



AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a todos los miembros de los Servicios de Cirugía Cardíaca, Medicina Intensiva y Anestesiología, Reanimación y Terapéutica del Dolor y Cardiología del Hospital Universitario de Salamanca que me ayudaron en el difícil trabajo de campo con los pacientes.

Al profesor José María González Santos, mi maestro por excelencia, con quien estaré siempre en deuda por muchos motivos y al que debo una inmensidad de mi saber científico, profesional y humano.

Al profesor Alberto Gómez Alonso, por velar siempre por la integridad de nuestro trabajo y ser un férreo y paciente apoyo.

A mis amigos cirujanos, los doctores Javier López, Jorge Centeno y María José Dalmau, que colaboraron conmigo en la meticulosa recogida de muestras sanguíneas intraoperatorias con inmensa paciencia y entrega.

A mi querida María José Bueno, compañera, amiga y confidente, por su incansable devenir con papeles, muestras, teléfonos y pacientes.

A las enfermeras perfusionistas del Servicio por su meticulosa recogida de todos los datos relacionados con la circulación extracorpórea y la protección miocárdica intraoperatoria.

A los doctores Javier García Criado y Begoña García por el inmenso trabajo realizado en el procesamiento de todas las muestras en la Facultad y su inapreciable ayuda con el análisis de los datos.

A la doctora Belén Aparicio, por su incansable labor en la preparación de las muestras.

A todos los médicos, enfermeras y auxiliares de la planta de Cirugía Cardíaca, de la UCI de postoperatorio cardíaco y del Servicio de Cardiología del Hospital, con quienes siempre me he sentido como en casa y a quienes debo gran parte de los resultados presentados en este trabajo.

...Y sobre todo, a los pacientes, quienes son el fin último y el sentido de todo cuanto hacemos.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	15
CONCEPTO DEL DAÑO MIOCÁRDICO POR ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN	17
Concepto de isquemia Concepto de daño por reperfusión	
FISIOPATOLOGÍA DEL DAÑO POR REPERFUSIÓN	18
Radicales libres derivados del oxígeno	19
Concepto de radical libre Generación de radicales libres durante la reperfusión Fisiopatología de los radicales libres Manipulación de los radicales libres y el NFκB y su efecto en el daño por isquemia y reperfusión cardiaca	
Alteración de la homeostasis del calcio	25
Activación del sistema del complemento	26
Vías de activación del sistema de complemento Fisiopatología de la activación del complemento Activación del complemento en la isquemia-reperfusión	
Acción de las citoquinas	28
Citoquinas proinflamatorias Citoquinas anti-inflamatorias Citoquinas y daño por isquemia y reperfusión miocárdica	
Interacción entre el neutrófilo y el endotelio	32
Fases de la interacción leucocito-endotelio Consecuencias de la interacción endotelio-leucocito	

Manipulación de la interacción leucocito-endotelio y su efecto en el
daño por isquemia y reperfusión cardiaca
Limitaciones del tratamiento con anticuerpos monoclonales

PAPEL DEL ÓXIDO NÍTRICO EN EL DAÑO POR REPERFUSIÓN

.....

40

Fisiología del óxido nítrico

Características bioquímicas del óxido nítrico
Generación de óxido nítrico: isoformas de la óxido nítrico sintasa

Papel del óxido nítrico en el tratamiento de la isquemia-reperfusión

Administración de óxido nítrico inhalado
Administración de óxido nítrico a través del oxigenador de membrana
Administración de óxido nítrico disuelto o con donadores
Administración de L-arginina
Administración de inhibidores de la hidroximetilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa

ADMINISTRACIÓN DE INHIBIDORES DE LA HIDROXY-METIL-GLUTARIL COENZIMA A (HMG-COA) REDUCTASA (ESTATINAS) EN EL DAÑO POR ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN

.....

48

CIRCULACIÓN EXTRACORPÓREA Y REACCIÓN INFLAMATORIA SISTÉMICA

.....

53

Inicio de la reacción inflamatoria sistémica por circulación extracorpórea

Contacto de la sangre con el sistema de circulación extracorpórea
Endotoxemia

Mantenimiento de la reacción inflamatoria sistémica por circulación extracorpórea

Liberación de citoquinas
Adhesividad, infiltración y degranulación leucocitarias
Óxido nítrico en la respuesta inflamatoria por circulación extracorpórea

pórea

ESTATINAS EN LA REACCIÓN INFLAMATORIA POR CIRCULACIÓN EXTRACORPÓREA	62
FARMACOCINÉTICA APLICADA DE LAS ESTATINAS	65
Actividad inhibitoria periférica de las estatinas Farmacodinámica de la pravastatina Farmacocinética de la pravastatina y su relación con los efectos Secundarios	
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	70
3. UTILIDAD PRÁCTICA DE LOS RESULTADOS	72
4. MATERIAL Y MÉTODOS	74
RACIONALIZACIÓN DEL DISEÑO DEL ESTUDIO Y CRITERIOS DE INCLUSIÓN	75
CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	77
VARIABLES	78
Variables clínicas Variables analíticas	
MANEJO DE LAS MUESTRAS SANGUÍNEAS Y MÉTODOS EXPERIMENTALES	80
Radicales libres del oxígeno Citoquinas: factor de TNF- α , INF- γ e IL-10 Moléculas solubles de adhesión celular (selectinas, ICAM-1 Y CD18), i-NOS y NFkB Óxido nítrico	

Muestras para determinaciones analíticas convencionales	
PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO	85
.....	
MANEJO POSTOPERATORIO	87
.....	
RECOGIDA Y ANÁLISIS DE DATOS	87
.....	
SEGURIDAD DEL ESTUDIO	89
.....	
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	89
.....	
5. RESULTADOS	91
.....	
COMPARACIÓN PRE- E INTRAOPERATORIA DE LOS GRUPOS	92
.....	
Variables clínicas preoperatorias	
Variables clínicas intraoperatorias	
MARCADORES BIOQUÍMICOS DE DAÑO MIOCÁRDICO	94
.....	
ÁCIDO LÁCTICO Y PH	96
.....	
MARCADORES INESPECÍFICOS DE INFLAMACIÓN: PCR, NF κ B Y CITOQUINAS	97
.....	
LIBERACIÓN DE RADICALES LIBRES	99
.....	
MOLÉCULAS DE ADHESIÓN	101
.....	
Selectinas	
Integrinas e ICAM	

PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO Y NIVELES DE i-NOS	103
MARCADORES BIOQUÍMICOS Y CLÍNICOS DE EFECTOS SECUNDA- RIOS ATRIBUIBLES AL FÁRMACO	105
RESULTADOS CLÍNICOS POSTOPERATORIOS	106
COMPARACIÓN DE LAS DETERMINACIONES PREVIAS A LA CIRCU- LACIÓN EXTRACORPÓREA ENTRE LOS GRUPOS Y LOS CONTRO- LES SANOS	107
6. DISCUSIÓN	114
CARACTERÍSTICAS PREOPERATORIAS E INTRAOPERATORIAS DE LOS GRUPOS	115
EFFECTOS SECUNDARIOS ATRIBUIBLES A LA ADMINISTRACIÓN DEL FÁRMACO	117
RESULTADOS CLÍNICOS POSTOPERATORIOS	119
EFFECTOS EN EL DAÑO MIOCÁRDICO POR ISQUEMIA Y REPERFU- SIÓN	121
EFFECTOS EN LA REACCIÓN INFLAMATORIA PERIOPERATORIA	128
Respuesta inflamatoria quirúrgica previa a la circulación extracorpórea	
Marcadores inespecíficos de inflamación	
Moléculas de adhesión	
Producción de óxido nítrico y niveles de iNOS	
Respuesta inflamatoria inducida por la circulación extracorpórea	
Marcadores inespecíficos de inflamación	

Moléculas de adhesión
Producción de óxido nítrico y niveles de iNOS

PERSPECTIVAS FUTURAS	145
7. LIMITACIONES DEL ESTUDIO	147
8. CONCLUSIONES	149
9. BIBLIOGRAFÍA	152

ABREVIATURAS

AMP: adenosín monofosfato
ATP: adenosín trifosfato
AUC: área bajo la curva
CEC: circulación extracorpórea
cGMP: guanosina monofosfato cíclica
Cmax: concentración máxima
CPK: creatín-fosfo-kinasa
CPK-MB: creatín-fosfo-kinasa-MB
EDTA: ácido etileno diamino tetracético
eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial
FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo
IAM: infarto agudo de miocardio.
ICAM-1: molécula de adhesión intercelular-1
IL: interleuquina
INF- γ : interferón-gamma
iNOS: óxido nítrico sintasa inducible
ISQ/REP: isquemia y reperfusión
LDL: lipoproteínas de baja densidad
L-NAME: N(G)-nitro-L-arginina metil-éster
NAD: Nicotinamida adenina
NADPH: Nicotinamida adenina fosfato
NEU: neutrófilos.
NO: óxido nítrico
NOS: óxido nítrico sintasa
O₂⁻: anión superóxido
PCR: Proteína C reactiva
% δ banda: porcentaje de densidad de banda
PRAV: pravastatina
SOD: superóxido dismutasa
t_{1/2}: semivida de eliminación
Tmax: tiempo hasta la concentración máxima del fármaco
TNF: factor de necrosis tumoral
Tn-I: troponina I
UCI: Unidad de Cuidados Intensivos.
VCAM-1: Molécula de adhesión celular vascular-1
XO: xantina oxidasa.

1. INTRODUCCIÓN

La cirugía cardíaca bajo circulación extracorpórea (CEC) (también llamada derivación cardiopulmonar) requiere, en la mayoría de los casos, el pinzamiento de la aorta durante un periodo de tiempo más o menos prolongado, lo que supone la interrupción del flujo coronario y la consiguiente isquemia miocárdica. Para evitar o, más bien, minimizar sus consecuencias, actualmente se dispone de numerosas técnicas de protección miocárdica que intentan disminuir al máximo el consumo de oxígeno tisular durante los períodos de isquemia, aportar los nutrientes necesarios para el miocardio isquémico y prevenir los efectos perjudiciales del restablecimiento de la perfusión miocárdica.

La parada diastólica del corazón en hipotermia mediante la administración de diferentes tipos de soluciones frías con altas concentraciones de potasio (*cardioplejia*) llega a disminuir el consumo de oxígeno de 8 a 0,3 ml/100gr/minuto¹. Sin embargo y a pesar de ello, puede producirse lesión miocárdica y empeoramiento de la función ventricular, especialmente en pacientes con escasa reserva funcional previa (isquemia en evolución o disfunción ventricular) y cuando el tiempo de pinzamiento es prolongado². Ello conlleva el consiguiente aumento de la mortalidad y morbilidad a corto y largo plazo.

Aunque con el tiempo se han modificado las soluciones cardiopléjicas en cuanto a su composición (cristaloide o hemática)³, vía de administración (anterógrada, retrógrada o ambas)⁴⁻⁶, frecuencia (continua e intermitente)⁷⁻⁹ y temperatura (fría, templada o caliente)¹⁰⁻¹² no se ha conseguido hasta el momento que ninguna de las pautas resultantes sea capaz de abolir por completo el daño por isquemia y reperfusión (ISQ/REP) en el entorno clínico. En algunos trabajos, los pinzamientos aórticos mayores de 180 minutos se relacionan con mortalidades quirúrgicas de hasta el 25%³.

Por otro lado la CEC es usada actualmente para una gran parte de los procedimientos cardioquirúrgicos. Aunque se están desarrollando continuamente nuevas tecnologías que hacen a las tubuladuras, cánulas y oxigenadores muy biocompatibles¹³, todavía se produce una importante reacción inflamatoria sistémica en todos los pacientes cuando la sangre entra en contacto con las superficies no endotelizadas del sistema¹⁴. Esta reacción inflamatoria es generalmente inocua desde el punto de vista clínico¹⁵. Sin embargo en algunos casos puede ser responsable de complicaciones de trascendencia clínica^{14,16} y de manera sistemática se traduce en importantes alteraciones bioquímicas¹⁷.

La ISQ/REP miocárdicas y la reacción inflamatoria provocada por la CEC están íntimamente ligadas. La derivación cardiopulmonar produce incrementos significativos en la concentración de múltiples moléculas relacionadas con la activación del proceso inflamatorio^{14,18-25} que pueden amplificar la disfunción contráctil postoperatoria inducida por el proceso de ISQ/REP^{22,26}. Por su parte, la

ISQ/REP miocárdica supone un importante estímulo para la activación y amplificación de la cascada inflamatoria sistémica inducida por la CEC¹⁴.

El objetivo de este trabajo consiste en analizar la eficacia, seguridad y reproducibilidad de la administración de un fármaco para disminuir en la clínica el daño por ISQ/REP miocárdica provocada tanto por el pinzamiento aórtico como, secundariamente, por la reacción inflamatoria que induce la CEC.

CONCEPTO DEL DAÑO MIOCÁRDICO POR ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN

Concepto de isquemia

La isquemia de un órgano se define como la reducción del flujo sanguíneo local de manera que el aporte de oxígeno es menor que la demanda requerida para mantener su función²⁷. Cuando esta situación se mantiene de manera indefinida conduce a la muerte celular, bien en forma de *apoptosis* o "muerte programada"²⁸ como cambios que se producen en el núcleo de la célula sin alteraciones citoplásmicas, bien como *necrosis* caracterizada fundamentalmente por la pérdida de integridad de la membrana celular²⁷ o como una combinación de ambas²⁹.

En el ámbito celular la isquemia produce un aumento del ácido láctico y acidificación del citosol, depleción de glucógeno y de fosfatos de alta energía (adenosín trifosfato, ATP) así como el acúmulo de adenosín monofosfato (AMP) y sus metabolitos²⁷. En el miocardio, cuando los depósitos de ATP descienden por debajo del 60% de los niveles basales se observa pérdida de glucógeno, edema intermiofibrilar, agrupación de la cromatina nuclear y edema mitocondrial. Cuando el nivel es de tan sólo el 30% del valor inicial se comienzan a observar cambios considerados irreversibles, como son la aparición de cuerpos amorfos nucleares y daño del sarcolema³⁰.

Evidentemente en el corazón, como en cualquier órgano, estos cambios son más acentuados según se prolonga el periodo de isquemia. En modelos caninos la isquemia miocárdica de una duración menor de 20 minutos seguida de reperfusión se traduce normalmente en una recuperación funcional completa del miocardio y en una ausencia de alteraciones histológicas o bioquímicas³¹. Cuando la isquemia dura alrededor de 20 minutos no se suele producir muerte celular, aunque se puede observar una disfunción contráctil que, normalmente, es autolimitada y que se denomina "*aturdimiento miocárdico*"³². Más allá de esos 20 minutos se produce una muerte celular de extensión variable, directamente proporcional a la duración de la isquemia, el desarrollo de la circulación colateral y la demanda de oxígeno. La necrosis comienza en la región subendocárdica y, a modo de "*fenómeno de frente de onda*", se va extendiendo a la región subepicárdica del área en riesgo³¹. A los 40 minutos se produce necrosis subendocárdica local o difusa que afecta al 35% del

área de riesgo, a los 90-180 minutos afecta al 42% de la misma y la oclusión coronaria permanente puede llegar a afectar al 74%³³.

Concepto de daño por reperfusión

Como se puede suponer, el único tratamiento eficaz para evitar la muerte celular isquémica es el restablecimiento del flujo sanguíneo o reperfusión. Sin embargo en el miocardio, cuando el período de isquemia se prolonga durante al menos 45 minutos, el tejido no es lesionado únicamente por dicha isquemia sino que la reperfusión misma también se convierte en deletérea y produce el llamado "*daño por reperfusión*". Este fenómeno ha sido definido como la muerte de miocitos, vivos en el último momento de la isquemia previa a la reperfusión, producida por uno o más eventos iniciados con el aflujo de sangre al tejido³⁴. Rosenkranz lo define como "*las consecuencias metabólicas, estructurales y funcionales de restablecer el flujo coronario que pueden ser evitadas o atenuadas modificando las condiciones de reperfusión*"³⁵. Reimer la denomina "*lesión miocítica letal*", situación en la que miocitos reversiblemente dañados antes de la reperfusión desembocan en necrosis tras ella³⁶. Este concepto no es reciente, y ya en 1977 Hearse introdujo la idea de que la reperfusión por sí misma era capaz de inducir daño celular³⁷.

Microscópicamente la muerte celular que se produce por la reperfusión se caracteriza por edema explosivo, bandas de contracción²⁷, así como edema y depósitos de fosfato de calcio en las mitocondrias³⁸. Estas lesiones tienen un carácter súbito. Ocurren en minutos desde el inicio de la restauración del flujo, a diferencia de lo que sucede con los miocitos que han sido sometidos a un período indefinido de isquemia sin reperfusión. En este caso pueden tardar horas en presentar cambios irreversibles. En definitiva, la reperfusión del miocardio previamente isquémico produce una lesión tisular propia añadida al daño que la isquemia aislada es capaz de producir^{39,40}, o a la exclusiva "aceleración de la lesión producida por la isquemia".

FISIOPATOLOGÍA DEL DAÑO POR REPERFUSIÓN

El daño por reperfusión está provocado por múltiples mecanismos fisiopatológicos relacionados entre sí. Su activación se inicia durante el periodo isquémico (nunca existe daño por reperfusión sin isquemia previa) y que se establece desde el momento del retorno del flujo sanguíneo y, por tanto, de todos sus componentes plasmáticos y celulares. Estas vías fisiopatológicas por las que se completa el daño por reperfusión son:

- Generación de radicales libres.
- Alteración de la homeostasis del calcio intracelular.
- Activación del sistema del complemento.

- Acción de las citoquinas.
- Activación leucocitaria e interacción con el endotelio.

Radicales libres derivados del oxígeno

La hipótesis de la "Paradoja del Oxígeno" consiste en la suposición de que aunque el oxígeno resulta imprescindible para la supervivencia celular su presencia durante la reperfusión puede lesionar gravemente los tejidos⁴¹.

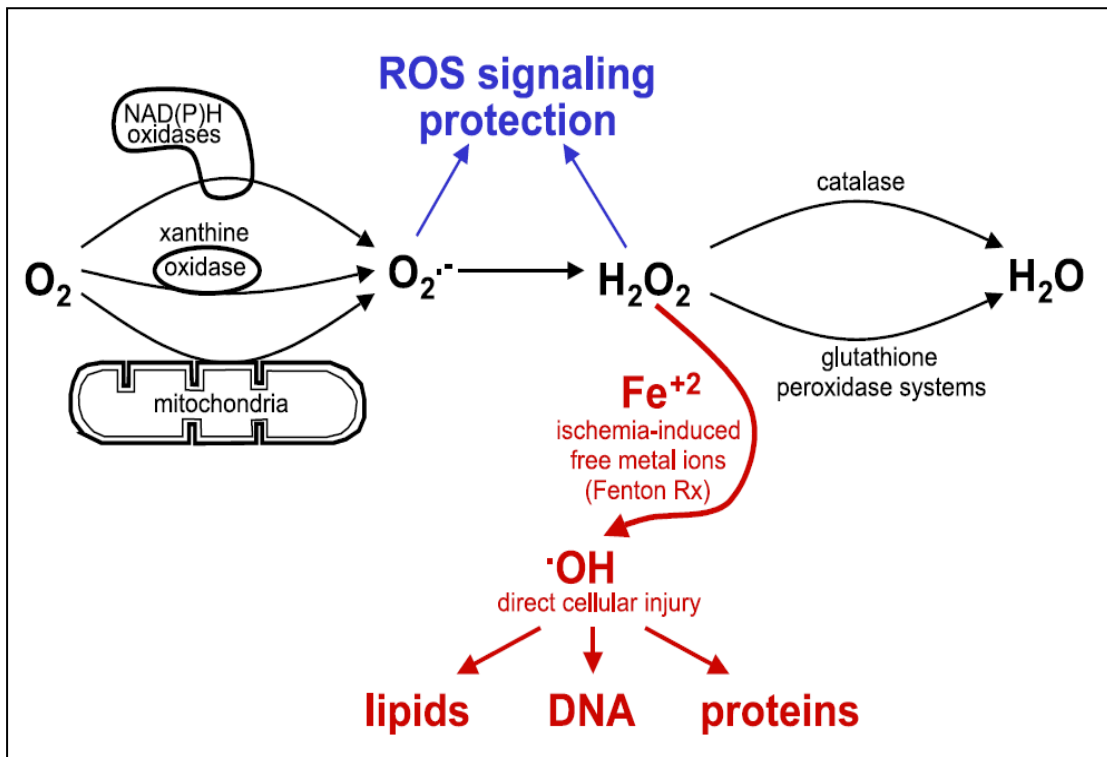


Figura 1. Metabolismo oxidativo de los radicales libres. Reacción de Fenton. Tomado de: Becker LB. *Cardiovasc Res* 61 (2004) 461– 470.

CONCEPTO DE RADICAL LIBRE

Un radical libre es un átomo o molécula que puede existir independientemente con uno o más electrones no apareados en su órbita externa. Esta condición hace de ellos elementos altamente reactivos. Aunque existen radicales libres derivados de otros átomos (azufre, carbono o nitrógeno), comúnmente se suele identificar el término "radical libre" al de "radical libre derivado del oxígeno".

GENERACIÓN DE RADICALES LIBRES DURANTE LA REPERFUSIÓN

Los radicales libres son generados en pequeñas cantidades durante el metabolismo normal de las células y son inactivados por sus sistemas barrenderos o

“scavenger”. Sin embargo, la reperfusión postisquémica se asocia a la generación de grandes cantidades de radicales libres, hecho también constatado como es lógico después de la cirugía cardíaca con pinzamiento aórtico y la consiguiente isquemia miocárdica inducida por él¹⁵. La producción de radicales libres es asumida por dos grupos celulares, el endotelial y el leucocitario.

1) Generación endotelial

La célula endotelial es considerada la fuente primaria de radicales libres en la lesión por ISQ/REP⁴². Durante la isquemia la xantina deshidrogenasa endotelial, que normalmente utiliza la nicotinamida adenina (NAD) como donador de electrones, es convertida, probablemente por una proteasa, a xantina oxidasa (XO)⁴³ (figura 1). Por otro lado, la isquemia aumenta la producción de xantina e hipoxantina por la hidrólisis rápida de los depósitos de ATP. El otro sustrato de la enzima, el oxígeno, está evidentemente ausente durante la isquemia por lo que la xantina se acumula.

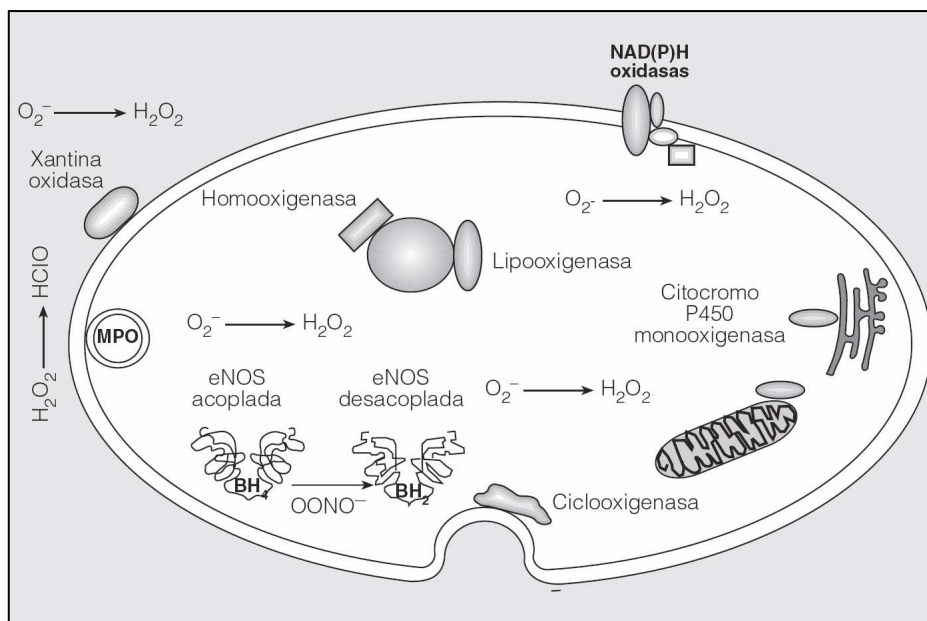
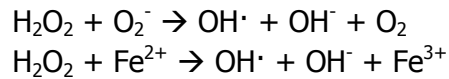


Figura 2. Fuentes de producción de radicales libres. Tomado de Barceló A, et al. Arch Bronconeumol. 2005;41:393-9.

Cuando se restablece el flujo y el aporte de oxígeno la acción masiva de la xantina oxidasa produce cantidades ingentes de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y de anión superóxido (O_2^-).



Por fin, el H_2O_2 y el O_2^- degeneran en hidrogeniones (OH^\cdot) a través de las reacciones de Haber-Weiss y Fenton (reacción de Haber-Weiss catalizada por hierro, figura 1):

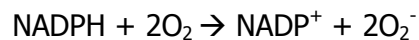


La generación endotelial de radicales libres no sólo se produce por la XO sino que existen otras vías enzimáticas, como la de la citocromo oxidasa mitocondrial, la ciclooxigenasa, lipooxigenasa y la oxidación de catecolaminas³⁴ (figura 2).

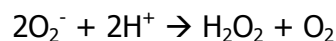
2) Generación leucocitaria

Los neutrófilos (NEU) también son fuente de gran cantidad de radicales libres durante la ISQ/REP:

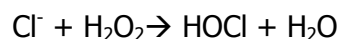
- El O_2^- es generado por la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa asociada a la membrana del NEU⁴⁴, la cual es activada a su vez por moléculas proinflamatorias como N-formil-péptidos, C5a o el factor activador de las plaquetas (PAF)⁴⁵.



- El H_2O_2 se forma por dismutación de aniones O_2^- tras la liberación de mieloperoxidasa de los gránulos azurofílicos⁴⁵.



- El ácido hipocloroso (HOCl) es la molécula citotóxica predominante derivada de los NEU. La mieloperoxidasa es también la responsable de su generación, a partir del H_2O_2 ⁴⁶.



El HOCl es entre 100 y 1000 veces más tóxico que el O_2^- y el H_2O_2 y reacciona rápidamente con el ADN, aminoácidos y nucleótidos de pirimidina⁴⁷. Su citotoxicidad deriva de la producción de poderosas cloraminas oxidizantes de corta vida media que penetran con facilidad en la membrana celular y reaccionan con componentes intracelulares.

Los radicales libres generados por los NEU activan a las células endoteliales⁴⁸ y viceversa, produciéndose una "amplificación" de las respuestas celulares.

FISIOPATOLOGÍA DE LOS RADICALES LIBRES

La capacidad lesional de estas moléculas depende de que se supere la capacidad "scavenger" o antioxidante intracelular, bien por un exceso absoluto de radicales libres o bien por una alteración de los mecanismos antioxidantes producida también por la ISQ/REP.

Los mecanismos deletéreos de actuación de los radicales libres son, entre otros:

1) Peroxidación de los fosfolípidos de membrana del miocito y de sus organelas así como oxidación de los grupos sulfhidrilo de las proteínas estructurales y enzimas⁴⁹, que producen lesiones irreversibles y disfunción contráctil subsiguiente. La peroxidación de los lípidos se inicia por la separación de un átomo de hidrógeno de un grupo metileno en la cadena lateral de un ácido graso. La extracción de un hidrogenión desde un ácido graso se hace más sencilla cuanto más número de dobles enlaces tenga por lo que los ácidos grasos poliinsaturados son los más vulnerables²⁸. Este proceso se puede convertir en una reacción en cadena que es capaz de autoperpetuarse a través de tres fases:

- Iniciación: $A\cdot + LH \rightarrow AH + L\cdot$
- Propagación: $L\cdot + \cdot OO\cdot \rightarrow LOO\cdot$; $LOO\cdot + LH \rightarrow LOOH + L\cdot$
- Terminación: $L\cdot + LOO\cdot \rightarrow LOOL$

donde L es lípido (normalmente un ácido graso insaturado), LOO· es un radical peroxil lipídico y LOOH es un hidroperóxido lipídico.

De esta manera, un solo radical libre puede convertir cientos de cadenas laterales de ácidos grasos en radicales peroxiles lipídicos.

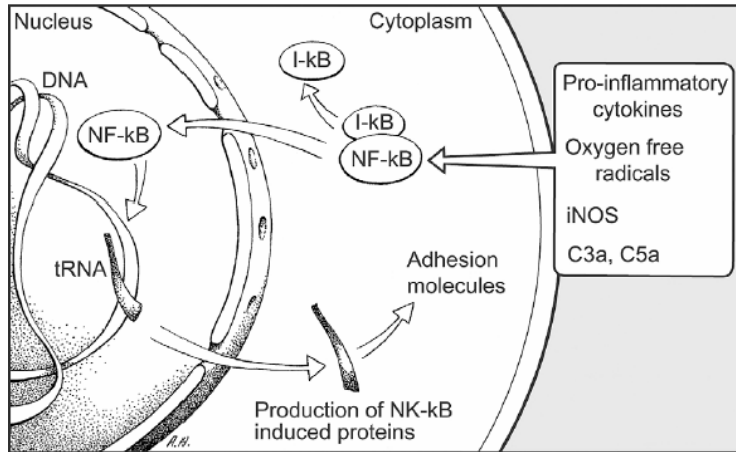
La vitamina E y otros antioxidantes pueden ser capaces de favorecer la terminación de estas reacciones⁴².

La peroxidación lipídica ha sido descrita en la clínica en muchas situaciones de ISQ/REP, entre ellas miocárdica^{50,51}. Este proceso es capaz de inducir por sí mismo la disfunción de la membrana celular, con alteraciones en el reconocimiento de antígenos y ligandos proteicos de receptores específicos, e incluso la apoptosis celular²⁸.

2) Inhibición de la fosforilación oxidativa de las mitocondrias⁵².

- 3) Inactivación del óxido nítrico (NO) producido por las células endoteliales⁵³.
- 4) Estimulación de la generación de complemento mediante señales

Figura 3: Mecanismo de acción del NF-κB



Tomado de: Paparella D, et al. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2002 Feb;21(2):232-44.

leucotácticas.

5) Activación de las células endoteliales a través de la expresión de P-selectina y, de manera muy importante, del aumento de la expresión del **factor transcripcional kappa B ("Nuclear factor kappa B", NFκB)**, sobre todo a cargo del H₂O₂⁴². El NFκB se encuentra en el citoplasma celular unido a una proteína que inhibe su actividad (IκB). Cuando se activa la molécula se fosforila y la fracción IκB se separa e inactiva (figura 3), lo que permite al factor transcripcional entrar en el núcleo de la célula, unirse a su ADN e inducir la transcripción de múltiples genes (llamados "*genes de activación*") de:

- Citoquinas pro-inflamatorias, como interleuquina (IL)-1, IL-6, IL-8 y factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-α)⁵⁴ y sus receptores;
- PAF, lo cual conduce a la secreción de sustancias quimiotácticas y a la generación de trombosis intravascular por estimulación de la síntesis de factor tisular⁴⁹;
- Moléculas de adhesión (ICAM-1 y E-selectina)⁵⁵, que promueven la interacción neutrófilo-endotelio con las consecuencias que se describen más adelante;
- NO sintasa inducible⁵⁶.

El NFκB es capaz además de activar la fosfolipasa A2, con la subsiguiente generación de leucotrienos⁵⁷ y PAF⁵⁸ que promueven por sí mismos la activación e infiltración leucocitaria.

Como posteriormente veremos este proceso juega un importante papel en todo el proceso de daño por ISQ/REP y la reacción inflamatoria en general, así como también en la secuencia temporal de liberación de moléculas de adhesión y citoquinas que se observa en ellas. Ello es debido a que precisan de esa transcripción genética y síntesis proteica "de novo" a partir de la acción del NFκB, proceso que lleva un determinado periodo de tiempo.

Todo ello hace que el NFκB juegue un papel básico y fundamental en el inicio y, sobre todo, amplificación del daño por ISQ/REP y en el proceso inflamatorio en general⁵⁹.

MANIPULACIÓN DE LOS RADICALES LIBRES Y EL NFκB Y SU EFECTO EN EL DAÑO POR ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN CARDIACA

Se ha demostrado que la adición de radicales libres en el medio de perfusión del corazón conduce invariablemente a una alteración de la función contráctil del miocardio y cambios bioquímicos similares a los producidos por la ISQ/REP³⁴. Además, la administración de superóxido dismutasa (SOD) (molécula anti-O₂⁻), y de catalasa (molécula anti-H₂O₂), o sus derivados, como el análogo de la SOD SC-52608, durante la reperfusión precoz puede disminuir el tamaño del infarto⁶⁰ y preservar la función miocárdica en gatos³⁴, perros⁴⁹ y humanos⁶¹. Aunque otros estudios han llegado, sin embargo, a conclusiones contradictorias al respecto⁶²⁻⁶⁴, parece lógico pensar que la disminución de la producción de radicales libres durante la ISQ/REP o durante la CEC podría ser beneficiosa para reducir el tamaño del daño inducido por estos eventos.

Por su parte, como se ha visto el NFκB es capaz de activar múltiples cascadas pro-inflamatorias potencialmente deletéreas en el periodo de ISQ/REP. Efectivamente, su inhibición mediante la introducción intracelular de oligodeoxinucleótidos con alta afinidad por él reduce el tamaño del infarto inducido experimentalmente⁶⁵. De hecho, estudios experimentales muy recientes han observado que la eritropoyetina reduce el tamaño del infarto después de oclusión coronaria aguda a través de un mecanismo de inhibición del NFκB⁵⁴.

A pesar de todo ello, se ha demostrado que la activación de esta molécula durante los periodos de precondicionamiento isquémico podría ser imprescindible para la activación de posteriores procesos antiapoptóticos y genes cardioprotectores. Su inhibición específica mediante prolinditiocarbamato hace que dicho precondicionamiento deje de ser cardioprotector de cara a la reducción del tamaño del infarto en modelos experimentales⁶⁶. Adicionalmente se ha demostrado que la liberación del NFκB es proporcional al tiempo de isquemia independientemente de que se someta al miocardio a precondicionamiento isquémico o no⁶⁷.

Alteración de la homeostasis del calcio

La isquemia miocárdica seguida de reperfusión produce una alteración de la capacidad del miocito para mantener la homeostasis del calcio intracelular en límites fisiológicos lo que resulta en un aumento de su concentración intracelular.

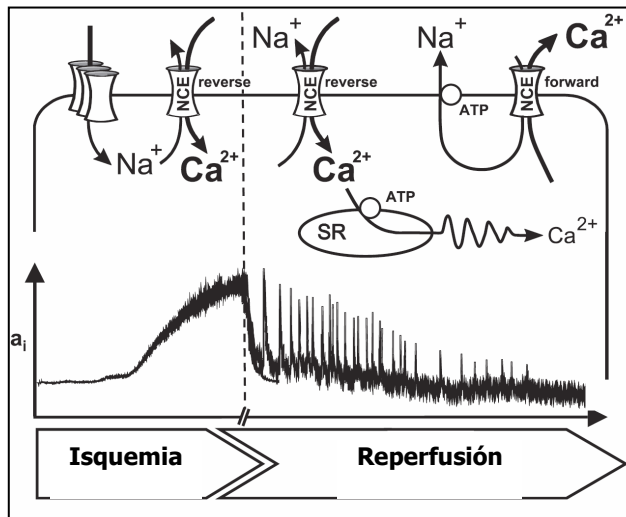


Figura 4: Metabolismo del calcio en isquemia/reperfusión. Modificado de Piper et al. *Cardiovasc Res*, 2004; 61: 365–371.

SR: retículo sarcoplásmico

secuestro de calcio en su interior.

- Alteración de la actividad del mecanismo de intercambio de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$.
- Difusión pasiva.

Durante la isquemia, los cardiomiocitos acumulan sodio en su interior por una alteración de los canales propios de este ion, de los canales Na^+/H^+ y $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$. Además la extrusión de sodio está inhibida ya que la Na^+/K^+ -ATPasa del sarcolema está dañada por el déficit de ATP. El influjo de sodio conduce a un influjo de calcio al interior de la célula ya que el canal $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ invierte su funcionamiento en el contexto de una célula despolarizada con exceso intracelular de sodio.

La célula sufre por tanto un incremento de la concentración de calcio en el interior del citosol⁶⁹ (figura 4). El exceso de calcio puede activar las fosfolipasas endógenas, lo cual induce la disminución del contenido total de fosfolípidos de la membrana y soluciones de continuidad en la misma²⁷. Además la sobrecarga de calcio acelera la depleción de proteasas y ATP a través de ATP-ases mediadas por este ión.

Los mecanismos etiológicos responsables de este exceso de calcio intracelular son poco conocidos pero podrían ser varios^{64,68}:

- Incapacidad del retículo sarcoplásmico, lesionado por esa acumulación de radicales libres derivados del O_2 , de mantener un adecuado

Activación del sistema del complemento

El sistema de complemento está compuesto por más de 30 proteínas plasmáticas o asociadas a membranas celulares y su función fundamental consiste en iniciar la respuesta inflamatoria y mejorar la respuesta inmune primaria.

VÍAS DE ACTIVACIÓN DEL SISTEMA DE COMPLEMENTO

Su activación se puede realizar por dos vías:

- Vía clásica. En ella la primera proteína, C1, compuesta a su vez por tres subunidades (C1q, C1r y C1s)⁷⁰, se activa al unirse a un complejo antígeno-anticuerpo y su fracción activa continúa la cascada hasta formar el complejo de ataque a la membrana (MAC).

- Vía alternativa, que está en un estado continuo de activación baja latente que se puede amplificar en respuesta a diversos estímulos, como ciertos polisacáridos, hongos, bacterias y virus, además de ciertos tipos de células de mamíferos y agregados de inmunoglobulinas. El factor C3 se activa a C3b, quien gracias a los factores B y D forma el complejo C3b-Bb que activa a su vez al factor C5, donde la vía alternativa se une a la cascada de la vía clásica para formar el MAC.

FISIOPATOLOGÍA DE LA ACTIVACIÓN DEL COMPLEMENTO

La activación del sistema por cualquiera de las vías da lugar a:

- Formación de anafilotoxinas, C3a, C4a y C5a, liberadas durante la activación de la cascada por ambas vías, con propiedades vasoactivas por contracción del músculo liso, promotoras de la alteración de la permeabilidad vascular y de la quimiotaxis de polimorfonucleares. C5a interacciona además con las células endoteliales para estimular la xantina oxidasa⁷¹ que, como ya vimos, es fuente de potentes radicales libres derivados del oxígeno y estimula directamente la expresión de P-selectina en la superficie de las plaquetas y el endotelio⁷². La anafilotoxina más potente es C5a seguida de C3a y C4a. La quimiotaxis leucocitaria pone en marcha toda una serie de eventos que culminan con la interacción endotelio-polimorfonucleares y la infiltración tisular de los leucocitos, con desastrosas consecuencias para el tejido como se verá más adelante.

- Formación del complejo de ataque de membrana (MAC, C5b-9), que se une a la membrana de la célula objetivo y crea un flujo de agua y calcio hasta su lisis. Las células nucleadas tienen cierta capacidad de defensa frente a este complejo a través de mecanismos de endocitosis del mismo o de la inactivación de la ensambladura de sus partes terminales.

Además de sus propiedades anafilótóxicas y citolíticas, el sistema de complemento se relaciona, por tanto, con la producción de radicales libres, eicosanoides, citoquinas, la activación de enzimas y, adicionalmente con la liberación de péptidos mitógenos y la estimulación de la proliferación celular⁷³.

ACTIVACIÓN DEL COMPLEMENTO EN LA ISQUEMIA-REPERFUSIÓN

La participación del sistema de complemento en el daño por ISQ/REP miocárdica se sugirió ya inicialmente en 1969 tras el hallazgo de fragmentos del componente C3 en miocardio de rata infartado⁷⁴. Posteriormente se ha demostrado una relación entre la concentración tisular de C1q y la cantidad de leucocitos acumulados en tejido miocárdico canino isquémico y reperfundido de perro⁷⁵, así como relación entre la concentración de MAC y el daño tisular en ISQ/REP⁷⁶. Además, conejos congénitamente deficientes en C6 padecen un infarto menor después de una oclusión coronaria, con menos fenómeno de "no-reflujo" y arritmias que los conejos normales⁷⁷.

En cuanto al origen de su activación, existen evidencias de que durante la reperfusión de una zona infartada se podrían producir complejos antígeno-anticuerpo entre los miocitos dañados e Ig séricas que se unirían a dichas células y activarían el sistema de complemento y todas sus consecuencias⁷³. Otros estudios revelan que durante la isquemia se producen sustancias que son capaces de unirse a la subunidad C1q de C1 y activar la vía clásica del complemento⁷⁸. Estas sustancias podrían provenir de fracciones celulares ricas en mitocondrias⁷⁹.

En casos de isquemia indefinida la aparición de MAC en la superficie de las células se produce lenta, escasa y tardíamente, de manera que probablemente todas las células en riesgo están ya irreversiblemente dañadas. Sin embargo, un período de isquemia de 30 minutos seguido de una reperfusión de tan sólo 15 minutos se asocia a un aumento explosivo del depósito de MAC en las membranas afectadas³⁴.

Este hecho puede explicar en parte el carácter agudo del daño por reperfusión en contraste con la lentitud con la que se establece el daño irreversible en caso de isquemia indefinida sin reperfusión.

Acción de las citoquinas

Las citoquinas son moléculas polipeptídicas o glicoproteicas que son segregadas por células específicas. Forman parte de múltiples procesos fisiopatológicos del organismo y contribuyen de manera definitiva al mantenimiento de la homeostasis. Actúan fundamentalmente de mensajeros intercelulares en respuesta a la activación celular²². Su producción requiere de transcripción y traslación genética ya que no se suelen almacenar en el organismo como formas preactivas⁸⁰.

Ejercen su acción uniéndose a receptores específicos de membrana de las células objetivo, que en condiciones fisiológicas suele ser bien la propia célula secretora (autocrina) o bien células colindantes (paracrinas). Su detección en plasma en cantidades significativas suele suponer un aumento patológico de su generación en el ámbito tisular⁸⁰. Ello suele corresponder a estímulos mantenidos en el tiempo y/o de una magnitud suficiente²² capaces de producir alteraciones en diversos órganos y sistemas, como el miocardio, el pulmón, hígado, sistema nervioso central o sistema de la coagulación. Son manifestaciones clínicas generales propias de la diseminación sistémica de citoquinas la fiebre, la disminución del estado de conciencia, la inestabilidad hemodinámica o la depresión de la contractilidad miocárdica.

Existen citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias según regulen al alza o a la baja respectivamente el resto de mecanismos implicados en el proceso inflamatorio que sigue al daño tisular.

CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS

El **TNF- α** es una citoquina proinflamatoria de respuesta precoz que es considerada un desencadenante de toda la activación de citoquinas y de la respuesta inflamatoria en general después de la ISQ/REP^{54,81} y después de la CEC^{14,22}. Es segregado por los NEU y los macrófagos tisulares ante el estímulo de lipopolisacáridos de las membranas bacterianas, leucotrienos y complemento, así como por el músculo durante la isquemia^{82,83}, aunque también se ha encontrado actividad intracelular relacionada con la molécula en las células endoteliales²².

El TNF- α induce la expresión de los genes de otras citoquinas como IL-1, IL-6, IL-8, PAF, MCP-1 (*Monocyte chemotactic protein-1*) y el de sí mismo^{82,83}. Es un potente quimiotáctico con propiedades estimulantes del metabolismo oxidativo. Induce la expresión de la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) y de la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1)⁸⁴ y la secreción de O₂⁻, H₂O₂ y otros metabolitos tóxicos. Además disminuye la secreción de NO por el endotelio.

El **PAF** actúa principalmente como quimiotáctico y favorece la adhesión firme leucocitaria, su metabolismo oxidativo y su degranulación, así como agregación y

degranulación de las plaquetas^{85,86}. Es producido por las células endoteliales después de la secreción de fosfolipasa A₂ por los leucocitos activados. Las células endoteliales segregan igualmente PAF ante el estímulo de citoquinas proinflamatorias como el TNF- α , el H₂O₂ o la trombina, la plasmina, estreptoquinasa y r-TPA.

El **interferón gamma** (INF- γ) es segregado por linfocitos T-*helper*-1 activados⁸⁷ y se puede considerar un marcador específico de activación linfocitaria⁸⁸. Además de su conocida y útil actividad anti-viral induce la expresión de genes de histocompatibilidad mayor e inhibe la proliferación celular^{27,89,90}. Además, estimula la producción de IL-12 por monocitos y macrófagos e inhibe la producción de IL-4 y de IL-5 por linfocitos T, con lo que contribuye a la regulación del balance necesario entre la respuesta inmune específica y no específica⁸⁷.

La **IL-1** es segregada por los macrófagos principalmente y también por las células endoteliales y los polimorfonucleares. Tiene dos isoformas la IL-1 α y la IL-1 β . Es uno de los quimiotácticos más potentes. Estimula la síntesis de IL-6, TNF- α , INF- γ , IL-8/CXCL1, MCP-1/CCL2 y de sí misma⁹¹. Incrementa la expresión de ICAM-1 en el endotelio vascular y de E-selectina endotelial, que interacciona con la L-selectina de los NEU en la fase de "*rolling*" o rodamiento leucocitario (tal y como se discute más adelante). La fracción IL-1 β es necesaria para la iniciación de la respuesta inmune celular y para la activación de IL-2. Posteriormente la secreción de IL-8 y PAF por la célula endotelial activa más intensamente al NEU para favorecer la adhesión firme gracias a la vía de la familia de las integrinas. Su liberación produce clínicamente efectos similares a los del TNF- α , como fiebre, somnolencia e hipotensión. Además aumenta la expresión de NO sintasa inducible y la producción de prostaglandinas²².

La **IL-2** es segregada por los linfocitos T activados²² y es responsable de múltiples funciones inmunológicas, como la proliferación y diferenciación de las células T o la respuesta cutánea tardía a las reacciones de hipersensibilidad²².

La **IL-6** es una proteína segregada por monocitos, fibroblastos, queratinocitos y células endoteliales en respuesta a la IL-1 y al TNF- α . Es considerada un marcador inespecífico de inflamación que regula la respuesta inmune y se asocia a respuesta inflamatoria sistémica después de la CEC^{14,25}. Entre sus funciones pueden estar estimular el metabolismo oxidativo de los NEU, la expresión endotelial de ICAM-1 y VCAM-1⁸⁴ y aumentar la permeabilidad endotelial. Contribuye además a la diferenciación terminal y secreción de inmunoglobulinas por los linfocitos B²².

La **IL-8** es también segregada por las células endoteliales después de su estímulo por TNF- α o IL-1, así como por monocitos, macrófagos y fibroblastos. El estrés oxidativo induce también la transcripción del gen de la IL-8⁸⁰. Es un potente

quimiotáctico leucocitario de manera que interviene en la regulación de la quimiotaxis de los NEU de la migración transendotelial²². Induce expresión de integrinas y migración transendotelial, así como la liberación de enzimas de los gránulos neutrófilicos y estimulación de su poder oxidativo.

Se ha postulado que la IL-8 podría ser el eslabón entre la generación de los radicales libres y la infiltración de los NEU en el daño por ISQ/REP. Los quimiotácticos neutrofilicos podrían ser liberados en dos fases: una precoz mediada por C5a, detectable ya a los 5 minutos de reperfusión, y otra tardía, mediada por IL-8 después de 1,5 horas⁸⁰.

CITOQUINAS ANTI-INFLAMATORIAS

El "**Transforming Growth Factor-beta**" (TGF-beta) es una proteína dimérica que protege al huésped del daño por ISQ/REP por su capacidad para inhibir la acción anti-NO del TNF- α y para disminuir la producción de radicales libres⁹².

Las **chaperonas moleculares** son proteínas denominadas del "golpe de calor" producidas por células que son expuestas a diversas formas de estrés como el calor, la hipo/anoxia, el shock o los radicales libres. Parece que protegen a las proteínas de la desnaturalización producida por estas agresiones y que los glucocorticoides podrían actuar a través de ellas⁹³.

La **IL-4** tiene propiedades antitrombóticas y antiinflamatorias en el endotelio vascular gracias a la regulación a la baja de la trombomodulina⁹⁴ y de la adhesividad leucocitaria⁹⁵, así como de IL-1, TNF- α e IL-6.

La **IL-10**, llamada inicialmente "*factor inhibidor de la síntesis de citoquinas*"⁹⁶, es una citoquina antiinflamatoria sintetizada por monocitos/macrófagos activados, queratinocitos y linfocitos⁹⁶⁻⁹⁸, aunque en el miocardio isquémico y reperfundido la mayoría de la IL-10 se encuentra en los linfocitos que han infiltrado el miocardio⁹⁶. La síntesis de esta citoquina es estimulada por la IL-12 y la IL-6 en los linfocitos T y por el TNF- α en el caso de los monocitos⁹⁸. Inhibe la síntesis de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8²², así como la metaloproteinasa y el NO, probablemente por inhibición de factores transcripcionales⁹⁹. Además estimula la producción del inhibidor tisular de metaloproteinasas en los macrófagos humanos, con lo que favorece la preservación de la matriz celular durante la respuesta inflamatoria que sigue a la isquemia miocárdica¹⁰⁰ y se ha relacionado favorablemente con los procesos reparadores miocárdicos después del daño isquémico⁹⁶. Además, inhibe la fosforilación del complejo NF κ B-I κ B y, por tanto, la activación del factor transcripcional⁵⁶. Se ha demostrado que la ausencia de IL-10 en ratones genéticamente deficientes aumenta significativamente la infiltración granulocítica y el tamaño del infarto después de ISQ/REP miocárdica respecto a los ratones normales^{101,102}. Otros

trabajos experimentales han demostrado el mismo efecto de la molécula, evidenciándose además una reducción de la adhesividad endotelial de los granulocitos atribuible a ella¹⁰³. El mecanismo por el que la IL-10 actúa parece independiente de la iNOS¹⁰¹, aunque como se ha dicho en otros trabajos se ha demostrado que inhibe la síntesis de NO y de TNF- α ¹⁰².

Entre las funciones de la IL-10 está también la modulación de la síntesis de **IL-12**, molécula angular en la adecuación de la respuesta inmune ante antígenos externos y endógenos. Las células T activadas se diferencian en dos subtipos, Th1 y Th2, según los subtipos de citoquinas liberadas por ellos. Las células Th1 están asociadas a la activación de los macrófagos y de los procesos pro-inflamatorios, mientras que las Th2 inhiben las respuestas de las Th1 y, por tanto, reducen la inflamación local⁹⁶. La IL-12 es una proteína de 70 kD que induce la actividad citolítica de numerosas efectoras estimulando el patrón tipo Th1. Por el contrario la IL-10 facilita las respuestas tipo Th2 y regula a la baja la producción de IL-12⁹⁶. Además es capaz de regular la síntesis de moléculas proinflamatorias como son el TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8^{96,104} y de desactivar a los macrófagos⁹⁶.

Los picos en las concentraciones séricas de IL-10 no se producen hasta las 2 horas de la reperfusión⁵⁴ y sus niveles máximos no se detectan hasta las 24-120 horas de la misma⁹⁶.

CITOQUINAS Y DAÑO POR ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN MIOCÁRDICA

La ISQ/REP miocárdica inicia la cascada de activación de las citoquinas. El TNF- α , como se ha dicho desencadenante de la cascada de respuesta inflamatoria⁵⁴, es liberado por los mastocitos cardiacos en pocos minutos tras la ISQ/REP miocárdica⁸¹. En pacientes con cuadros clínicos de ISQ/REP cardiaca (angina inestable, infarto agudo de miocardio (IAM) o cirugía de revascularización coronaria con pinzamiento aórtico) se ha observado además elevación de IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, INF- γ ^{88,105}, IL-8^{25,106} y complemento²⁵, con todas las consecuencias en cuanto a quimiotaxis, activación leucocitaria, infiltración transendotelial y daño tisular que se han apuntado y que se detallarán más adelante.

Tras cirugía de revascularización coronaria con pinzamiento aórtico se observa una elevación de la concentración de TNF- α en la sangre del seno coronario¹⁰⁶. Esta elevación se ha asociado a una amplificación del tamaño del infarto y a disfunción contráctil. De hecho, el TNF- α , al igual que la IL-1, induce un efecto inotrópico negativo directo sobre el miocardio¹⁰⁷ mediado por la esfingosina, molécula que disminuye la capacidad del retículo sarcoplásmico de segregar calcio⁵⁶. También es capaz de aumentar drásticamente la permeabilidad capilar, aumentar el contenido en agua de la membrana alvéolo-capilar y provocar disfunción pulmonar. Igualmente inducen depósito glomerular de fibrina, infiltración celular y

vasoconstricción que provocan disminución de la tasa de filtrado glomerular y disfunción renal⁵⁶. Se ha demostrado en estudios experimentales que la inhibición de esta molécula con anticuerpos anti-TNF- α reduce el tamaño del IAM después de una oclusión coronaria¹⁰⁸. Muy recientemente se ha observado además que el TNF- α produce disfunción endotelial durante la ISQ/REP a través de la estimulación de la expresión de arginasa en las células endoteliales, con la consiguiente inhibición de la producción de NO y el aumento de la producción de O₂⁻¹⁰⁹.

Es de destacar también que en el contexto del síndrome coronario agudo se ha observado un desequilibrio entre las citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias a favor de las primeras, con elevación de INF- γ y TNF- α y disminución de IL-10¹⁰⁵.

Interacción entre el neutrófilo y el endotelio

Tal y como se viene comentando, durante la ISQ/REP se produce la activación de las células endoteliales y NEU, lo cual induce a una interacción entre ambos grupos celulares de vital importancia para todo el proceso^{21,110,111}.

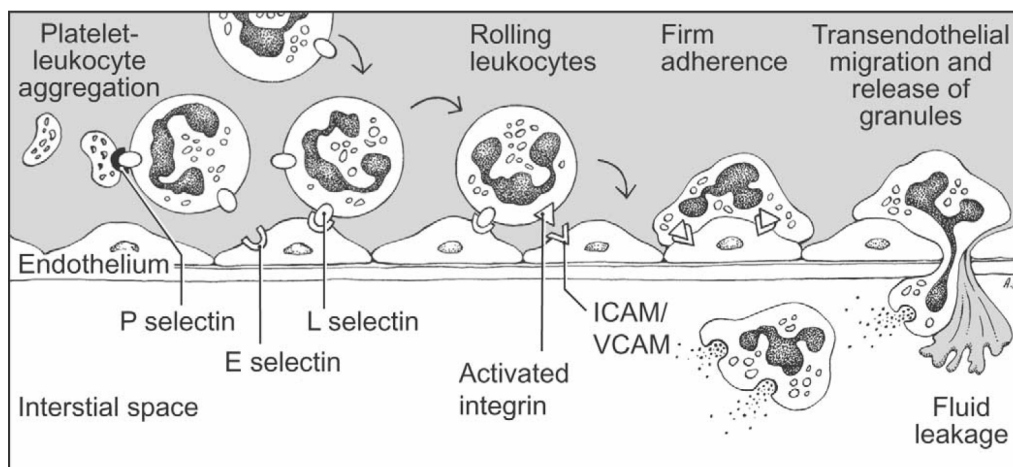


Figura 5. Fases de la interacción leucocito – endotelio. Tomado de Paparella et al. *Eur J Cardio-thorac Surg*, 2002; 21: 232–244.

FASES DE LA INTERACCIÓN LEUCOCITO-ENDOTELIO

La interacción leucocito-endotelio se produce en tres fases bien diferenciadas (figura 5):

1) "Rolling" leucocitario

En esta fase el leucocito disminuye la velocidad con la que circula por el vaso y pasa de la región central del flujo a las zonas periféricas, de manera que comienzan a rodar y a saltar a lo largo del endotelio, contactando con él.

Esta fase está regulada en gran medida por las glicoproteínas de adhesión de la familia de las selectinas¹¹². Todas ellas comparten una estructura en mosaico común, compuesta por un dominio lecitina en el NH₂ terminal, un dominio *EGF-like*, una serie de entre 2 y 9 dominios ligadores de complemento, un dominio transmembrana y un corto dominio COOH citoplásmico. Existen tres moléculas de adhesión en la familia de las selectinas:

- L-selectina (también llamada LAM-1, LECAM-1, Mel-14 o CD62L) que se expresa en la superficie de todos los leucocitos y podría ser el contraligando de la P-selectina de la célula endotelial¹¹²⁻¹¹⁴. Se encuentra en la superficie de los NEU no activados y, de hecho, existen evidencias de que procesos inflamatorios pueden resultar en regulación a la baja de la L-selectina por su desprendimiento de la membrana y, por tanto, aumento de su concentración soluble en suero¹¹⁵. Estas formas solubles podrían tener un papel inhibitorio en la quimiotaxis subsiguiente de otros NEU al punto de la lesión. La única molécula inflamatoria incriminada en la estimulación de la concentración de L-selectina en la membrana leucocitaria es el INF- α ¹¹⁶.
- P-selectina (también GMP-140, PADGEM o CD62P), que se sintetiza y almacena en los cuerpos de Weibel-Palade endoteliales y se transporta rápidamente a la superficie de la célula cuando es activada por un estímulo inflamatorio adecuado¹¹²⁻¹¹⁴. A diferencia de la L-selectina, que se puede hallar en la superficie de NEU quiescentes, esta molécula no se encuentra en la superficie de las células endoteliales inactivas¹¹⁶. La expresión de P-selectina endotelial, evento precoz en la reperfusión (10-20 minutos), puede ser inducida por la trombina, radicales libres, el complemento (C5a)¹¹⁷, la histamina y el H₂O₂⁴⁵.

Esta selectina también se encuentra en las plaquetas activadas, acumulada en los gránulos alfa. La P-selectina así expresada media el reclutamiento de leucocitos al trombo¹¹⁶ e induce la secreción de O₂⁻ por parte de los monocitos¹¹⁸. Además de su liberación procedente de las reservas intracelulares, la P-selectina puede ser sintetizada por estimulación transcripcional por parte de la endotoxina y el TNF- α ¹¹⁶.

- E-selectina (también ELAM-1, CD62E), que se sintetiza transitoriamente en la célula endotelial activada por IL-1, TNF- α y endotoxina y es transportada a su superficie. Su expresión se produce a las 3-8 horas de la reperfusión, por lo que parece comenzar a actuar en fases más tardías de la misma, y desaparece a las 12-24 horas¹¹⁶.

2) Adhesión firme

Tras ese contacto repetido con el endotelio activado o disfuncionante, los NEU se adhieren firmemente al mismo gracias a la interacción de la molécula leucocitaria β_2 integrina CD11/CD18¹¹⁹ con otros componentes de la superficie de la célula endotelial, como son:

- Proteína opsonizante derivada del complemento asociada al endotelio, la iC3b¹²⁰, que crea una adhesión firme precoz en la evolución de la reperfusión.
- Moléculas de adhesión intercelular (*“InterCellular Adhesion Moleculé”*, ICAM-1 y 2), miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas de las moléculas de adhesión. Juegan su papel de adhesión firme más tardíamente (2-4 horas)⁴⁵, reclutando más polimorfonucleares en las fases avanzadas de la reperfusión.

Las **integrinas** son una familia de glicoproteínas formadas por la unión no covalente de subunidades alfa y beta. Los leucocitos pueden expresar 13 tipos diferentes de integrinas y de ellas seis son importantes en la relación leucocito-endotelio, todas pertenecientes a las familias β_1 , β_2 y β_7 ¹¹⁶. Los NEU expresan sólo integrinas pertenecientes a la subfamilia β_2 , que consiste en moléculas formadas por tres cadenas- α distintas (CD11a, CD11b y CD11c) y una subunidad β común (CD18)¹²¹. Los complejos CD11a/CD18, CD11b/CD18 y CD11c/CD18 son sintetizados en el NEU pero sólo las fracciones 11b y 11c son almacenados en gránulos secundarios¹¹³ y son transportados rápidamente a su superficie después de su activación.

Los contraligandos de CD11a/CD18 y CD11b/CD18 son la ICAM-1 y 2 para la primera y sólo la ICAM-1 para la segunda. Se desconoce el contraligando de CD11c/CD18 y parece que su contribución a la interacción leucocito-endotelio es muy pequeña¹¹³. Existen evidencias de que la adherencia de NEU no activados al endotelio depende de la interacción CD11a/ICAM, mientras que la de los NEU activados depende principalmente de CD11b/ICAM¹¹⁶.

El estímulo de citoquinas y mediadores inflamatorios aumenta la concentración de las moléculas de adhesión en la superficie celular leucocitaria y endotelial entre 3 y 10 veces. Además, después de su activación, estas moléculas son capaces de cambiar su estructura desde un estado de baja afinidad a otro de alta afinidad por sus contraligandos endoteliales⁴⁵.

Los NEU activados segregan leucotrieno B4 y PAF, potentes estimulantes leucocitarios de la quimiotaxis, degranulación y adhesión a las células endoteliales. El LTB₄ y el PAF incrementan además la avidéz de estas moléculas por el ICAM-1⁴⁵ y

el último estimula a las plaquetas, que pueden producir un sinergismo en las mismas para amplificar la lesión tisular⁴⁵.

Otros agentes quimiotácticos (CD5a), radicales libres (O_2^- , H_2O_2) y citoquinas producidas durante el proceso de ISQ/REP (IL-1, TNF- α)¹²² han sido implicados en la adherencia neutrófilo-endotelio por mecanismos CD11/CD18-dependientes¹¹⁶. Además estas citoquinas promueven la expresión de moléculas de adhesión en la superficie del miocito, y estimulan la liberación de IL-8, otra molécula con marcadas propiedades proinflamatorias y de activación leucocitaria⁴⁹.

En cuanto a los radicales libres y como se ha comentado, la vía de la xantina oxidasa produce grandes cantidades de H_2O_2 y O_2^- después de la reperfusión. En el caso del O_2^- , su liberación aumentada inactiva al NO, molécula con propiedades anti-adhesivas, cuyo fundamental papel en el proceso inflamatorio post-reperfusión será posteriormente expuesto con detenimiento. El H_2O_2 por su parte induce la adhesión neutrofílica por un mecanismo PAF-dependiente.

La **superfamilia de las inmunoglobulinas** incluye cinco miembros implicados en la interacción leucocito-endotelio: ICAM-1(CD54a), ICAM-2 (CD54b), ICAM-3 (CD54c), VCAM-1 ("**V**ascular **C**ell **A**dhesion **M**olecule", CD106) y PECAM-1 ("**P**latelet **E**ndothelial **C**ell **A**dhesion **M**olecule-1"). De ellas, ICAM-1, ICAM-2 y PECAM-1 actúan como contraligandos de los NEU:

- ICAM-1 reconoce tanto a CD11a/CD18 como a CD11b/CD18. Su expresión aumenta cuando la célula se activa con IL-1, TNF- α o lipopolisacáridos¹²³.
- ICAM-2 es una fracción de ICAM-1 y su expresión no se activa por citoquinas.

3) Migración o "diapédesis" transendotelial

Muchos de los NEU resultan activados durante el proceso de adhesión y migran a través de las células endoteliales. Este proceso está mediado por el miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas PECAM-1^{124,125}, presente en las uniones de las células endoteliales, así como en plaquetas y leucocitos. Una vez que los polimorfonucleares activados han migrado a través del endotelio, se hacen paso a través del tejido miocárdico liberando proteasas (colagenasa y elastasa), radicales libres derivados del oxígeno (O_2^- y OH^- , H_2O_2), ácido hipocloroso y otras sustancias citotóxicas, como los tromboxanos y leucotrienos. Además se fijan a la superficie de los miocitos por un mecanismo dependiente, de nuevo, de la ICAM-1¹²⁶.

Los NEU son dirigidos al sitio de la lesión por la formación secuencial de factores quimiotácticos como C5a, IL-8, y el TGF- α ("*transforming growth factor- α* ") por

parte de los mismos NEU, el endotelio y el miocito. En corazones de rata aislados se ha podido demostrar que la reperfusión con NEU o plasma aislados no produce una disfunción contráctil significativa, aunque sí una acumulación excesiva en el miocardio. Cuando se reperfunde con polimorfonucleares y plasma, o bien con polimorfonucleares y C5a aislado el daño contráctil se observa sistemáticamente. De todo ello se deriva que el plasma y, más concretamente el complemento, es necesario para la activación del polimorfonucleares, la generación de radicales libres y el daño tisular y disfunción contráctil. La quimiotaxis se lleva a cabo por un gradiente de concentración a uno y otro lado del endotelio, de su matriz extracelular, que es capaz de secuestrar el factor quimiotáctico y presentarlo con una configuración adecuada para la subsecuente activación del NEU. De hecho, sin el endotelio el NEU no es capaz de posicionarse adecuadamente para su activación durante el proceso inflamatorio. Este hecho se demuestra en que cuando estimulamos NEU con IL-8 antes de que contacten con el endotelio son incapaces de adherirse a las paredes vasculares y acaban siendo inactivados³⁴.

CONSECUENCIAS DE LA INTERACCIÓN ENDOTELIO-LEUCOCITO

Gran parte del daño por reperfusión está causado por la infiltración de los leucocitos en el tejido miocárdico reperfundido. Los NEU se acumulan muy precozmente en el miocardio durante el transcurso de la reperfusión, preferentemente en la región subendocárdica durante las primeras 4 horas desde el inicio de la reperfusión, cada vez con una menor intensidad¹²⁷.

La reperfusión acelera el influjo de NEU al tejido previamente isquémico¹²⁸. Estudios histológicos demuestran que hay una correlación directa entre el tiempo de isquemia y el tamaño del infarto con la cantidad de NEU acumulados en el miocardio¹²⁹. De hecho, la depleción de los leucocitos circulantes o su anulación disminuye el daño por reperfusión^{129,130}. En el trabajo de Smith y cols. se encontró una correlación directa entre la liberación de CPK-MB a las 24 horas de la reperfusión de miocardio isquémico de rata y la cantidad de NEU acumulados en el miocardio, medida histológicamente y por la actividad mieloperoxidasa del tejido¹³¹.

Los mecanismos por los que los NEU producen daño de reperfusión son:

- Liberación de sustancias citotóxicas, tales como enzimas proteolíticas y radicales libres derivados del oxígeno²⁷.
- Oclusión mecánica de los lechos capilares (fenómeno de no-reflujo)¹³².

1) Liberación de sustancias citotóxicas

La interacción de leucotrieno B₄, PAF, complejos antígeno-anticuerpo o productos bacterianos con receptores de la membrana del NEU induce la activación

de la NADPH-oxidasa, que genera grandes cantidades de agua oxigenada y O_2^- . El NEU activado genera igualmente mieloperoxidasa al medio extracelular, que induce la generación de ácido hipocloroso, potente citotóxico ya comentado previamente.

La adhesión de polimorfonucleares al miocito produce una "transferencia directa" de radicales libres en el seno de la célula miocárdica. En ella provocan lesiones tanto en el retículo sarcoplásmico, el cual se vuelve incapaz de re-secuestrar calcio durante la diástole, como en las mitocondrias, que ven alterada gravemente su capacidad para regular la homeostasis del ADP¹³². La incapacidad del retículo sarcoplásmico para recuperar el calcio durante la diástole hace que ésta se prolongue inadecuadamente y se produzca lo que se llama "aturdimiento diastólico", con alteración del llenado ventricular, disminución del volumen latido y aumento de la presión telediastólica. Estos mecanismos pueden ser responsables del fracaso ventricular precoz después de tiempos de isquemia prolongados en el trasplante cardiaco.

De igual manera, los NEU activados segregan proteasas al medio intercelular, tales como elastasas y metaloproteinasas. Las metaloproteinasas (colagenasa y gelatinasa) son segregadas de manera inactiva y es el ácido hipocloroso y N-cloraminas las encargadas de activarlas. De la misma manera inactivan antiproteasas naturales (alfa-1-antitripsina y alfa-2-macroglobulina) existentes en grandes cantidades normalmente en plasma y tejido intersticial, con lo que se potencia su efecto.

2) Fenómeno de no-reflujo

Este fenómeno se describió inicialmente como edema intenso de las células endoteliales de un territorio isquémico reperfundido cuyos capilares quedan obstruidos por tapones de hematíes, leucocitos polimorfonucleares y trombos ricos en plaquetas¹³³. El fenómeno de no-reflujo limita el efecto beneficioso de la reperfusión e impide que las drogas administradas durante la misma lleguen al tejido que ha estado sometido a un periodo de isquemia.

La situación de no-reflujo se puede deber a varios factores (figura 6):

- La adhesión leucocitaria y la pérdida de elasticidad de su membrana inducida por la activación pueden provocar obstrucción mecánica de los capilares miocárdicos⁴⁹.
- La menor capacidad de vasodilatación debida a la inhibición en la producción de NO y prostaciclina y la vasoconstricción con contractura del músculo liso derivada de una liberación aumentada de endotelina y una degeneración de β -receptores disminuyen también la perfusión capilar. La

prevalencia de vasoconstricción en los capilares induce un gradiente de presión transcapilar, lo cual promueve una mayor acumulación de NEU⁴⁹.

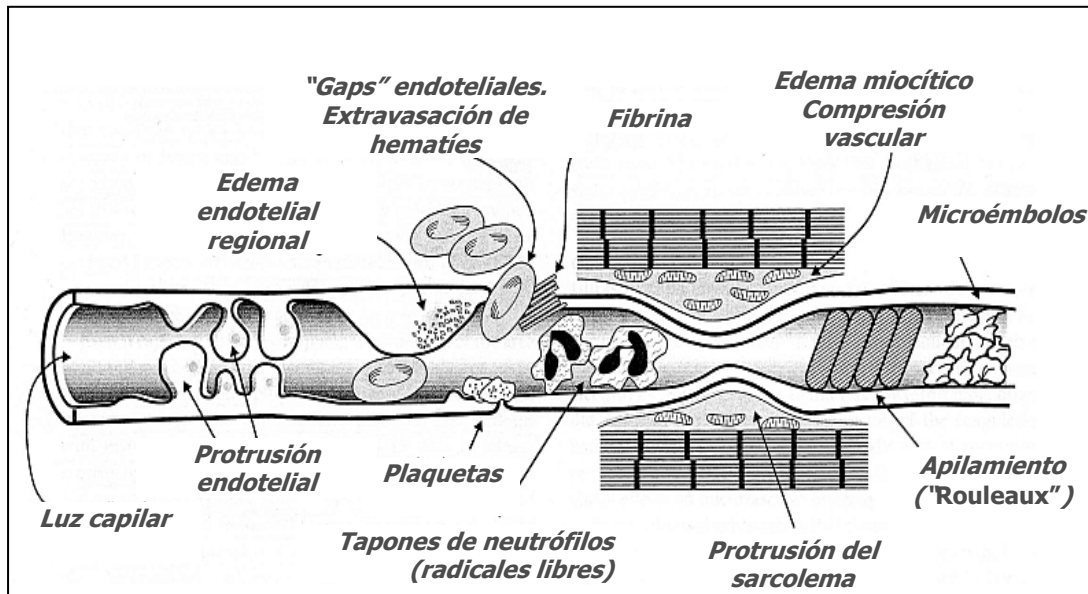


Figura 6. Fenómeno de no reflujo. Modificado de Best, B. *Ischemia and Reperfusion Injury in Cryonics*.

- El daño endotelial produce fugas capilares con edema miocárdico y agregados de fibrina, que contribuyen también al no-reflujo³⁴. Aparte del aumento de la permeabilidad capilar, el edema miocárdico se produce por edema miocítico y endotelial en sí mismo, por aumento de la permeabilidad y edema del sarcolema y disfunción del transporte de sodio, potasio y cloro²⁷.
- De igual manera se puede producir apilamiento (fenómeno de "Rouleaux") de los glóbulos rojos que impide su movimiento y la oxigenación tisular, así como agregación plaquetaria y formación de microémbolos.

Existen diversas teorías acerca de cual de estos mecanismos es el principal responsable del no-reflujo. La inhibición del CD-18 y de la ICAM-1 impiden su desarrollo, pero sólo el anti-CD18 disminuye el edema miocárdico y la actividad mieloperoxidasa del tejido reperfundido, por lo que ni el edema tisular ni la agregación leucocitaria deben ser factores críticos en su patogénesis¹³². Por ello, la contractura muscular, probablemente junto a la vasoconstricción debida a la inhibición del NO por el O₂⁻ y a la disminución de su producción por la lesión endotelial por reperfusión⁴⁵, pueden ser los factores principales en su desarrollo.

MANIPULACIÓN DE LA INTERACCIÓN LEUCOCITO-ENDOTELIO Y SU EFECTO EN EL DAÑO POR ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN CARDIACA

Los trabajos que han investigado el papel de las beta₂integrinas y de la superfamilia de las inmunoglobulinas en el daño por ISQ/REP han intentando inhibir alguna de las dos últimas fases en que se produce esta interacción para intentar disminuir la lesión miocárdica. Todos ellos son trabajos experimentales en animales en los que se ha provocado isquemia miocárdica, bien mediante la oclusión temporal de una arteria coronaria con el corazón latiendo o extrayendo el órgano para trasplantarlo posteriormente en otro animal. Antes de la reperfusión se han administrado anticuerpos específicos contra las diferentes moléculas de adhesión leucocitaria para comprobar su efecto en el daño miocárdico.

1) Inhibición de las selectinas

Existen varios estudios que han bloqueado mediante anticuerpos específicos la selectina L (DREG-200¹³⁴ y sus variantes "humanizadas"¹³⁵) y la selectina P (PB1.3¹³⁶) que han demostrado un efecto protector frente al daño por ISQ/REP y una reducción del tamaño del infarto.

2) Inhibición de la adhesión firme

Varios trabajos experimentales han demostrado que la inhibición específica de CD18 mediante el anticuerpo R15,7 es capaz de proteger al miocardio del daño por ISQ/REP, con reducción de la adhesión de los NEU al endotelio, de su migración al seno del tejido miocárdico isquémico y reperfundido y de la actividad mieloperoxidasa del tejido^{137,138}. Además se preserva también la funcionalidad del endotelio para liberar adecuadas cantidades de NO ante el estímulo de vasodilatadores endotelio-dependientes, como la acetilcolina o el A23187. La inhibición de la fracción CD11b del CD11/CD18 ofrece similares resultados¹³⁹.

La administración del anticuerpo anti-ICAM-1 RR1/1 puede producir un efecto beneficioso por doble mecanismo, tanto por la inhibición de la adherencia de los polimorfonucleares al endotelio como por el entorpecimiento de la adherencia al miocito de los polimorfonucleares que han conseguido atravesar la barrera endotelial. Aunque experimentalmente disminuye la migración de los NEU al seno del miocardio después de la reperfusión y la extensión de la necrosis, no lo hace tan eficazmente como el R15,7¹⁴⁰. En otros estudios se ha demostrado que sólo la administración de anti-CD18 (R15,7) y no el anti-ICAM-1 disminuye la actividad mieloperoxidasa del tejido y el contenido de agua del miocardio¹³². Por tanto debe existir un mecanismo independiente de esta molécula (probablemente mediado por la ICAM-2) para la adherencia del CD18 del polimorfonuclear al endotelio.

3) Inhibición de la diapédesis transendotelial: PECAM-1

La inhibición de la PECAM-1 endotelial y leucocitaria disminuye drásticamente la migración transendotelial de los polimorfonucleares al tejido miocárdico, pero preserva sólo débilmente la funcionalidad del endotelio y no disminuye la actividad mieloperoxidasa del tejido. Ello es debido a que los NEU se siguen adhiriendo firmemente al endotelio¹⁴¹. Sin embargo, los anti- PECAM-1 protegen al miocardio del daño por reperfusión tan eficazmente como la inhibición de la ICAM-1^{141,142}.

LIMITACIONES DEL TRATAMIENTO CON ANTICUERPOS MONOCLONALES

A pesar de lo prometedor de los resultados de la utilización de anticuerpos monoclonales contra las integrinas, selectinas, etc. esta manipulación tiene varias limitaciones. Todo ello hace poco práctico su uso en el contexto clínico⁴⁵:

- Estos anticuerpos tienen una vida media reducida en la circulación sistémica. Aunque disminuir la acción leucocitaria en las fases iniciales podría limitar la amplificación del daño por reperfusión que se produce a lo largo de las horas su efecto en las fases tardías del proceso podría estar limitado por dicha vida media.
- Se pueden generar anticuerpos naturales contra los anticuerpos terapéuticos, todos ellos procedentes de animales, y formar así complejos antígeno-anticuerpo. La humanización de estos anticuerpos monoclonales podría aportar algún beneficio a este respecto.
- La inhibición de la adhesión leucocitaria podría producir una susceptibilidad aumentada a las infecciones, especialmente cuando se inhibe el CD18¹²¹.

PAPEL DEL ÓXIDO NÍTRICO EN EL DAÑO POR REPERFUSIÓN

Fisiología del óxido nítrico

CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DEL ÓXIDO NÍTRICO

El NO o *factor relajante derivado del endotelio (EDRF)* es una molécula biológica, descubierta en 1980 por Robert Furchgott y su ayudante John Zawadzki¹⁴³, con una masa molecular de 30d¹⁴⁴, gaseosa, cuyo precursor natural es la L-arginina. La óxido nítrico sintasa (NOS), una enzima activada por la calmodulina, requiere NADP



Dr. Robert Furchgott

reducido y O_2 para oxidar la arginina y convertirla en NO y L-citrulina¹⁴⁵. Por tanto, la hipoxemia reduce la producción de NO mientras que la reoxigenación la aumenta bruscamente dado que el resto de precursores permanecen totalmente disponibles dentro de la célula a pesar de la reducción de la disponibilidad de oxígeno.

El NO se caracteriza por ser altamente soluble en los lípidos, por lo que difunde muy fácilmente a través de las membranas celulares. Su vida media es extremadamente corta, de aproximadamente 10-20 segundos en medio natural, incluida la sangre, ya que se combina ávidamente con el grupo hemo de la hemoglobina y es inactivado por el radical superóxido. Se segrega por el endotelio a concentraciones de 2-20 nmol/L¹⁴⁴.

GENERACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO: ISOFORMAS DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA

El NO es sintetizado por tres isoformas de la NOS: la nNOS, la NOS endotelial o derivada del endotelio (eNOS) y la NOS inducible (iNOS).

La **nNOS** o **NOS 1**, descubierta inicialmente en el tejido cerebral, se expresa en el tejido nervioso del corazón y está relacionada con el control de la frecuencia cardíaca. El NO actúa en las células nerviosas del corazón como un neurotransmisor¹⁴⁶.

La **NOS inducible**, **iNOS** o **NOS 2** fue descubierta por primera vez en los macrófagos. Tras un estímulo inflamatorio del miocardio, como miocarditis, ISQ/REP o rechazo o bien un mecanismo mediado por citoquinas como la IL-1 beta, el TNF- α o la IL-6, la actividad de la iNOS aumenta en las células musculares lisas vasculares, en los miocitos cardiacos, en las células endoteliales y en los linfocitos y macrófagos que infiltran la zona afectada¹⁴⁷. En este contexto el aumento de la actividad de iNOS produce NO que, al actuar con el O_2^- (también producido por el proceso inflamatorio) en una reacción biradical muy rápida e irreversible genera grandes cantidades de peroxinitrito y OH^{\cdot} ^{45,145}. El peroxinitrito es, como se ha dicho, un dañino radical libre implicado en daño celular oxidativo por peroxidación lipídica a través de, al menos, tres mecanismos:

- 1) Lisis catalizada por el OH^{\cdot} que genera radical hidroxilo y dióxido de nitrógeno.
- 2) Reacción oxidativa directa con grupos sulfhidrilo.
- 3) Reacción con iones metálicos para formar un potente agente nitrante¹⁴⁵.

Esta peroxidación lipídica podría inducir apoptosis miocítica y promover la disfunción contráctil de los miocitos cardiacos. De igual manera induciría la disminución de su respuesta a los estímulos adrenérgicos que se observa en estos

procesos, así como en otros, como la sepsis por gram-negativos mediada por lipopolisacáridos¹⁴⁷.

La **NOS endotelial, eNOS o NOS 3** se describió inicialmente en las células endoteliales¹⁴⁶. El NO producido por las células endoteliales ante el estímulo de la eNOS tiene un efecto citoprotector a través de funciones tanto en la pared vascular como en su luz¹⁴⁷:

- ❖ Por un lado se difunde en profundidad al músculo liso vascular adyacente y regula su tono. El NO produce relajación de la célula muscular lisa vascular después de estimular la guanilato-ciclasa y generar así guanosina monofosfato cíclica (cGMP)^{148,149}. El NO posee un potente efecto vasodilatador en el miocardio isquémico, lo cual puede contribuir a una mejor distribución de las soluciones cardioplégicas durante los procedimientos con pinzamiento aórtico y CEC.
- ❖ De igual manera difunde a la cara luminal del endotelio donde ejerce importantes misiones:
 1. La elevación del cGMP en las plaquetas inhibe la agregación plaquetaria ante una gran variedad de estímulos, como ADP, ácido araquidónico, colágeno y trombina. También inhibe la adhesión de las plaquetas al endotelio sano. De hecho, el NO inhalado inhibe la agregación plaquetaria y alarga el tiempo de hemorragia tanto en animales como en humanos con SDRA¹⁵⁰.
 2. Inactiva radicales superóxido, probablemente por una interacción directa con la NADPH oxidasa que está ligada a la membrana del NEU, además de una reacción biradical muy rápida e irreversible. Desgraciadamente genera peroxinitrito y OH^{-45,145} que pueden causar, como hemos visto, un efecto paradójico de lesión por NO durante la reperfusión en presencia de O₂⁻.
 3. Modula la permeabilidad endotelial¹⁵¹.
 4. Inhibe la función leucocitaria¹⁴⁴ a través de diferentes mecanismos:
 - Inhibición de la secreción de radicales superóxido por los polimorfonucleares activados a través de la inhibición del ensamblamiento celular de la NADPH oxidasa¹⁴⁴.
 - Inhibición del "rolling" leucocitario por inhibición de la expresión de la P-selectina en la membrana endotelial vascular¹⁵². El NO inhibe la regulación al alza de P-selectina, E-selectina e ICAM-1. La inhibición de la regulación de la P-selectina se debe a la inhibición del RNA-m implicado en su síntesis⁴⁵
 - Inhibición de la adhesión firme¹⁵² a través de la inhibición de la expresión de la ICAM-1 y VCAM-1. Estas acciones las realiza por medio

de la disminución de la activación de la proteín-kinasa C e impidiendo la transcripción del NFκB, que normalmente induce a su vez la expresión del m-RNA para estas moléculas de adhesión¹⁵³.

- Inhibición de la adhesión firme a través de la regulación a la baja de la expresión de CD18. El NO estimula la guanilato ciclasa y, por tanto, la síntesis de cGMP. Esta molécula produce una inhibición del flujo de Ca⁺⁺ en la célula, que es un mediador fundamental en la trasducción de señales intracelulares durante la activación del polimorfonucleares. La acumulación de cGMP que induce el NO podría ser la responsable de una disminución del Ca⁺⁺ intracelular y un entorpecimiento de la comunicación intracelular de las señales de activación. La integrina CD18 y otras están unidas a la F-actina por proteínas del citoesqueleto tales como alfa-actinina, talina, vinculina, paxilina y tensina, por lo que la disminución de la formación de F-actina impide la traslocación del receptor CD18 a la superficie celular. En otros trabajos se ha demostrado que el NO cambia también la distribución de la F-actina de las células endoteliales y que disminuye la expresión del CD18 en estas células endoteliales activadas^{144,151}.

- Inhibición del secuestro tisular de leucocitos y de la diapédesis. Tras ser activados se produce una disminución de la deformabilidad de los polimorfonucleares causada por ensamblamiento de filamentos de F-actina en la periferia de la célula a partir de G-actina soluble, que aumentan su rigidez considerablemente. La discrepancia entre el tamaño de los capilares y de los polimorfonucleares hace que éstos se acumulen en el lecho vascular¹⁴⁸. Por otro lado, los estímulos inflamatorios aumentan la liberación de nuevos polimorfonucleares de la médula ósea, muy rica en ellos. El NO reduce el secuestro tisular de polimorfonucleares sin alterar la secreción de la médula ósea gracias a una disminución de la concentración de F-actina en los polimorfonucleares de una manera dosis dependiente^{148,154}. Parece que el NO produce ribosilación del ADP de la actina, o que produce la inhibición del ensamblamiento de filamentos de F-actina.

Papel del óxido nítrico en el tratamiento de la isquemia-reperfusión

La isquemia y posterior reperfusión inducen una disfunción endotelial que se caracteriza por una significativa reducción de la liberación endotelial de NO que ocurre ya en los primeros 2,5-5 minutos del inicio del retorno sanguíneo^{39,155}. Como se ha comentado, la NOS requiere NADP reducido y O₂ para oxidar la arginina y convertirla en NO y L-citrulina¹⁴⁵. Por tanto, la hipoxemia reduce la producción de NO de manera que a los 60 minutos de isquemia la secreción de NO queda reducida en un 90%^{156,157}. Por su parte la reoxigenación la aumenta bruscamente dado que

el resto de precursores permanecen totalmente disponibles dentro de la célula a pesar de la reducción de la disponibilidad de oxígeno.

La disfunción endotelial y el defecto en la liberación de NO favorecen, como ya se ha comentado, la interacción leucocito-endotelio^{39,155,158}, pieza clave para el inicio y desarrollo de la lesión por reperfusión. A este respecto, Bell et al¹⁵⁹ demostraron que la atorvastatina era capaz de reducir el tamaño del IAM en ratones sometidos a un periodo de isquemia miocárdica global de un modo dosis dependiente. Sin embargo, los ratones congénitamente deficientes en eNOS no se beneficiaban de esta protección.

La disminución de los niveles de NO endotelial no sólo se observa en este proceso, sino que existen otros en los que el desarrollo fisiopatológico de la lesión tisular está mediado de alguna manera por niveles bajos de síntesis o disponibilidad de NO, como son la hipercolesterolemia, el shock y el trauma¹⁴⁴. En el caso de la hipercolesterolemia, la disminución de sus niveles ocurre en los estadios más precoces del desarrollo de las placas de aterosclerosis, antes incluso del inicio de su formación. Por ello, el aporte de NO a la superficie vascular en estas situaciones de carencia es uno de los caballos de batalla actual en muchos frentes de investigación, incluido el de la ISQ/REP. Después de todo lo comentado parece lógico pensar que el aporte de NO dependiente de eNOS al endotelio disfuncionante de los pacientes hipercolesterolémicos podría proteger del daño miocárdico ante un proceso isquémico.

El NO se lleva administrando con éxito por vía inhalada para actuar directamente sobre los vasos pulmonares desde hace más de 18 años¹⁶⁰, con excelentes resultados. Sin embargo, debido a su corta vida media en sangre esta vía tiene significativas limitaciones para alcanzar con garantías el lecho vascular sistémico del organismo vivo a concentraciones terapéuticas y se debe recurrir a otras formas de administración.

Actualmente existen 5 formas de administrar NO de manera sistémica en el contexto del daño por ISQ/REP:

- Administración de NO como tal a bajas concentraciones con las limitaciones apuntadas, bien inhalado, administrado en los oxigenadores de la bomba de CEC o bien disuelto en solución.
- Administración de donadores de NO.
- Transferencia del gen de la NOS para que la célula endotelial sea capaz de fabricar su propio NO. Este abordaje está aún en fase experimental.
- Administración del precursor del NO, la L-arginina.

- Administración de inhibidores de la hidroxymetilglutaril coenzima A reductasa, también llamadas estatinas, objeto precisamente de nuestro estudio.

ADMINISTRACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO INHALADO

La inhalación de NO ha resultado ser altamente eficaz en el tratamiento de la hipertensión pulmonar en ciertos procesos fisiopatológicos. Una vez en el pulmón la molécula difunde rápidamente a través de las células alveolares hacia la trama arteriolar subyacente y aumenta los niveles de cGMP gracias a la activación de la guanilato ciclasa. Ello induce vasorrelajación y, dudosamente, broncodilatación¹⁶⁰.

Además, dadas sus marcadas propiedades antiadhesivas durante la interacción leucocito-endotelio, la inhalación de NO ha demostrado ser eficaz en prevenir la acumulación de NEU en los pulmones inducida por la hemodiálisis, la infusión de lipopolisacárido, la ISQ/REP, el síndrome de distrés respiratorio del adulto o la infusión de IL-1 y el trasplante pulmonar¹⁶¹.

A pesar de que el NO es rápidamente inactivado en los capilares pulmonares al interactuar con la oxihemoglobina y, como ya se ha dicho, posee una vida media plasmática media muy corta, se ha demostrado que el NO puede sufrir un proceso de autooxidación a N_2O_3 . Éste es un potente compuesto nitrosante que se une a proteínas plasmáticas y forma S-nitrosoproteínas estables incluyendo S-nitrosoalbúmina. Estas proteínas podrían funcionar así como donadoras periféricas del NO inhalado¹⁶². De hecho Keaney et al han demostrado que *in vitro*, la S-nitrosoalbúmina posee propiedades "EDRF-like" con vasodilatación e inhibición de la agregación plaquetaria. Aunque la intensidad del efecto es siete veces menos potente que la del nitroprusiato su duración es de casi 10 minutos en comparación con los 19 segundos de éste¹⁶³. De igual manera, se ha demostrado que la hemoglobina puede convertirse en S-nitrosohemoglobina en el pulmón, con propiedades vasodilatadoras al disociarse en los capilares periféricos¹⁶¹. Además existen otras moléculas, como el glutatión o la cisteína, que pueden tener capacidad de transporte del NO¹⁵⁷. Durante la inhalación de NO la concentración de nitratos en plasma aumenta hasta cuatro veces y se mantiene a dichas concentraciones después de 60 minutos de suspendido el tratamiento¹⁵⁷.

Todo ello podría explicar que el NO inhalado sea capaz de alcanzar la vasculatura periférica y ejercer efectos beneficiosos sobre las interacciones endotelio-neutrófilo en estados de depleción de NO, como es la ISQ/REP. Sin embargo, esto no sucede en situaciones en las que hay abundante NO como la perfusión de endotoxina, en la que se induce la iNOS y se producen grandes cantidades de NO, o en el contexto de un endotelio normal^{156,161}. Experimentalmente, el NO inhalado a altas concentraciones (80 p.p.m.) es capaz de disminuir el número de NEU que sufren

"rolling", adhesión y diapédesis en territorios vasculares sistémicos después de un período de isquemia y posterior reperfusión, prevenir la disfunción endotelial medida como aumento de su permeabilidad y de abolir prácticamente el fenómeno de no-reflujo. Además, inhibe la vasoconstricción arteriolar provocada por la administración local de inhibidores del NO (N(G)-nitro-L-arginina metil-éster, L-NAME), con lo que estos efectos se pueden atribuir a la actuación realmente periférica de NO y no a su acción sobre los NEU a su paso por el pulmón¹⁵⁶. A esas concentraciones los niveles de NO₂ no ascienden del límite tóxico de las 5 p.p.m. en ningún momento y no se observan efectos nocivos cardiovasculares¹⁶¹. Sin embargo el NO inhalado es incapaz de proporcionar periféricamente la concentración suficiente de NO para prevenir la disfunción endotelial provocada por la histamina¹⁶⁴. Por otro lado, otros trabajos han demostrado que el NO inhibe la adhesión leucocitaria CD18-dependiente *in vitro* a concentraciones entre 10 y 50 nmol de NO generado/minuto, con escaso o nulo efecto a concentraciones superiores o inferiores¹⁶⁵. Este escaso margen hace que la eficacia clínica de esta forma de administración se vea muy limitada.

Por fin, cabe decir que en estudios de isquemia intestinal se ha demostrado que el NO inhalado no es capaz de disminuir la disfunción mucosa producida por la isquemia¹⁵⁷. Sin embargo, donadores de NO o su precursor, L-arginina, han preservado la función endotelial en este tipo de modelos experimentales^{166,167}. Este hecho puede ser debido a que la forma en que se transporte el NO sea mayoritariamente como nitrosoalbúmina o nitrosohemoglobina que difícilmente pasan la barrera endotelial aun bajo los efectos de la ISQ/REP. También se puede deber a que la avidéz del endotelio vascular reperfundido sea tal por el NO que no llegue a pasar al espacio extravascular¹⁵⁷.

ADMINISTRACION DE ÓXIDO NÍTRICO A TRAVES DEL OXIGENADOR DE MEMBRANA

Aunque existen evidencias experimentales y clínicas de que el NO administrado en el oxigenador durante la CEC podría preservar la funcionalidad de las plaquetas^{168,169} la experiencia con este tipo de administración en cuanto a activación leucocitaria está todavía en fases experimentales. Chello y cols.¹⁷⁰ demostraron que la administración de dosis terapéuticas de NO (40 p.p.m.) en la mezcla de gases de oxigenadores cebados con sangre humana de voluntarios sanos disminuía la adhesividad hacia las células endoteliales de cordón umbilical humano en los primeros 60 minutos de derivación cardiopulmonar respecto al grupo control. Además los NEU tratados expresan menor cantidad de CD11b/CD18 en su superficie que los no tratados. Por su parte, en un estudio más reciente, Hayashi et al¹⁷¹ han demostrado en un modelo con sangre humana realizado "*in vitro*" que a dosis elevadas, superiores a las habituales en uso clínico, el NO en el oxigenador proporciona una reducción de la activación leucocitaria similar a la observada con

circuitos de CEC biocompatibles. Además han demostrado que la combinación de ambas estrategias potencia los efectos conseguidos por cada una de ellas por separado.

No existe por el momento evidencia clínica de reducción del daño por ISQ/REP mediante este tipo de administración.

ADMINISTRACION DE ÓXIDO NÍTRICO DISUELTO O CON DONADORES

La administración experimental de **NO disuelto** en agua destilada o solución salina antes de la reperfusión miocárdica disminuye el tamaño del infarto e inhibe además la acumulación de los NEU en el tejido isquémico y reperfundido. Ello se debe a que se reduce la actividad mieloperoxidasa del tejido tanto en la zona necrosada como en la isquémica¹⁷². Este abordaje, sin embargo, no ha tenido traducción clínica hasta el momento actual.

Los **donadores de NO** más habituales son la nitroglicerina y el nitroprusiato, fármacos habituales en el manejo clínico cardiovascular. El nitroprusiato ha demostrado mejorar la microcirculación hepática en modelos experimentales de ISQ/REP¹⁷³. Sin embargo, estos agentes producen tolerancia y requieren del metabolismo celular para liberar su NO por lo que actualmente se están empleando donadores más potentes como las sydnoniminas SIN-1 y C87-3754. Estos compuestos también han demostrado reducir el tamaño del infarto y preservar la función del endotelio, conservando la capacidad de la relajación vascular ante el estímulo con acetilcolina¹⁷⁴. Además, son capaces de reducir la generación de radicales superóxido por los NEU o bien de inactivarlos interaccionando directamente con ellos.

ADMINISTRACION DE L-ARGININA

Como se ha dicho, la disfunción endotelial producida por la ISQ/REP produce una disminución de la generación endógena de NO en humanos. La administración de L-arginina, precursor del NO, podría inducir una producción endógena de NO que puede tener una serie de ventajas respecto a la administración exógena directa o por donadores:

- Una liberación específica tanto en tiempo (justo en el momento de la reperfusión) como en espacio (en el lugar del daño isquémico).
- Una liberación asegurada aunque no exista un buen flujo coronario.
- Prevención de los efectos secundarios de altas dosis de NO exógeno.

Además es un método práctico de generar NO, ya que puede ser administrada como suplemento nutricional, no es tóxica aun a dosis elevadas y es relativamente barata¹⁷⁵⁻¹⁷⁸.

Experimentalmente se ha demostrado que la L-arginina y no la D-arginina, regula a la baja las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1¹⁷⁵. Engelman y cols. demostraron que la administración de L-arginina en modelos de ISQ/REP miocárdica en ratas es más beneficiosa cuando se infunde antes del pinzamiento aórtico, puede ser beneficiosa administrada durante el mismo y puede ser perjudicial si se administra durante la reperfusión¹⁷⁹. En otros trabajos, sin embargo, su administración intracoronaria en el momento de la reperfusión resultó en un significativo descenso del tamaño del infarto y en una disminución de la actividad de mieloperoxidasa del tejido en un modelo canino de ISQ/REP miocárdica¹⁷⁸. De igual manera se constató una protección de la función endotelial con preservación de la vasodilatación inducida por acetilcolina en el grupo tratado respecto al grupo control y al tratado con D-arginina.

Clínicamente, sin embargo, los beneficios no han sido concluyentes. Carrier et al no han encontrado diferencias significativas en cuanto a la mortalidad, al infarto peri-operatorio, la estancia en la unidad post-quirúrgica o la necesidad de vasopresores después de administración de L-arginina en la solución cardiopléjica durante los primeros 30 minutos de pinzamiento aórtico. No obstante encontraron que la L-arginina redujo significativamente los niveles de los marcadores de daño miocárdico^{176,177}.

ADMINISTRACIÓN DE INHIBIDORES DE LA HIDROXY-METIL-GLUTARIL COENZIMA A (HMG-COA) REDUCTASA

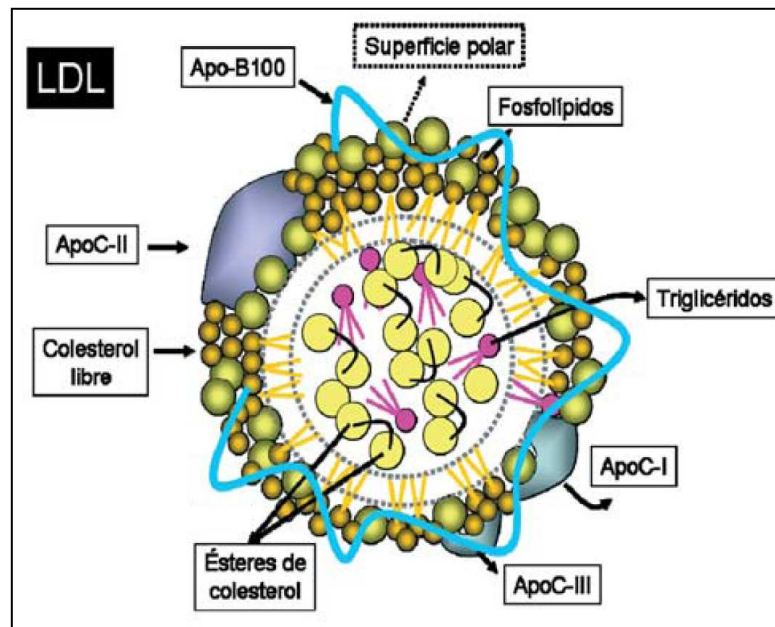
Las características pleiotrópicas de estos fármacos se están asociando a numerosos beneficios independientes de su efecto hipolipemiante, tal y como se describe en detalle en el siguiente apartado.

ADMINISTRACIÓN DE INHIBIDORES DE LA HIDROXY-METIL-GLUTARIL COENZIMA A (HMG-COA) REDUCTASA (ESTATINAS) EN EL DAÑO POR ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN

Está demostrado que la hiperlipidemia es un importante factor de riesgo para el desarrollo de la aterosclerosis. Los niveles crónicamente elevados de colesterol producen cambios en la composición de las membranas celulares y alteraciones significativas en su viscosidad, incluidas las de las células sanguíneas¹⁸⁰ y endoteliales¹⁸¹. La consecuente disminución de la deformabilidad de los eritrocitos altera las propiedades reológicas de la sangre y puede favorecer el desarrollo del proceso aterosclerótico¹⁸⁰. La célula endotelial por su parte también ve alterada la fluidez de su membrana lo cual, combinado con los cambios reológicos descritos, puede inducir separación intercelular y retracción que de igual manera favorecen la aterosclerosis¹⁸¹. La hiperlipidemia también estimula la liberación de factores de crecimiento por la célula endotelial lo cual genera mitosis y proliferación de los miocitos lisos vasculares, otro factor en la génesis de la placa de ateroma. Por fin, la

hiperlipidemia reduce la liberación de NO por parte del endotelio, bien por una disminución de su síntesis o por un aumento de su catabolismo por radicales superóxido¹⁸². Se ha sugerido que los niveles elevados de lipoproteínas de baja densidad (LDL, figura 7) podrían interferir con el transporte activo de la L-arginina en la célula endotelial, rompiendo la cadena L-arginina-eNOS y disminuyendo la síntesis de NO, además de aumentar la producción de radicales superóxido¹⁸³.

Figura 7: Molécula de LDL



Tomada de: Badimon et al. *Rev Esp Cardiol*, 2009; 62(10):1161-78.

Como se ha visto ya extensamente, la disminución de la disponibilidad de NO favorece la interacción leucocito-endotelio y otros mecanismos íntimamente implicados de nuevo en el proceso aterosclerótico. Las estatinas son potentes fármacos hipolipemiantes que actúan a través de la inhibición reversible y competitiva de la HMG-COA reductasa y, por tanto, impiden la transformación de HMG-COA en mevalonato con la consiguiente reducción de la síntesis hepática de colesterol (figura 8). Ello conlleva una estimulación de la síntesis y expresión de receptores de LDL y la subsiguiente reducción del colesterol sanguíneo, así como de los niveles de apolipoproteína B100 y de las lipoproteínas ricas en triglicéridos¹⁸⁴.

Por todo ello, las estatinas ejercen hoy en día un papel fundamental en la reducción de la generación y progresión del proceso aterosclerótico gracias a su demostrada eficacia en el control de la hipercolesterolemia a través de la reducción de la síntesis de colesterol hepático¹⁸⁵, concretamente de las LDL, y en la reducción de la morbimortalidad cardiovascular. Pedersen et al¹⁸⁶ llevaron a cabo estudio

multicéntrico aleatorizado y controlado por placebo de gran trascendencia en el que participaron 94 hospitales de 5 países y en el que se incluyeron 4444 pacientes. En este estudio se demostró que después de un seguimiento medio de más de 7 años la simvastatina reducía de manera muy significativa mortalidad cardiovascular (RR 0,70 (IC al 95% 0,60 – 0,82, $p = 0,00002$) y que este efecto se mantenía en el tiempo y no añadía riesgos adicionales a los pacientes.

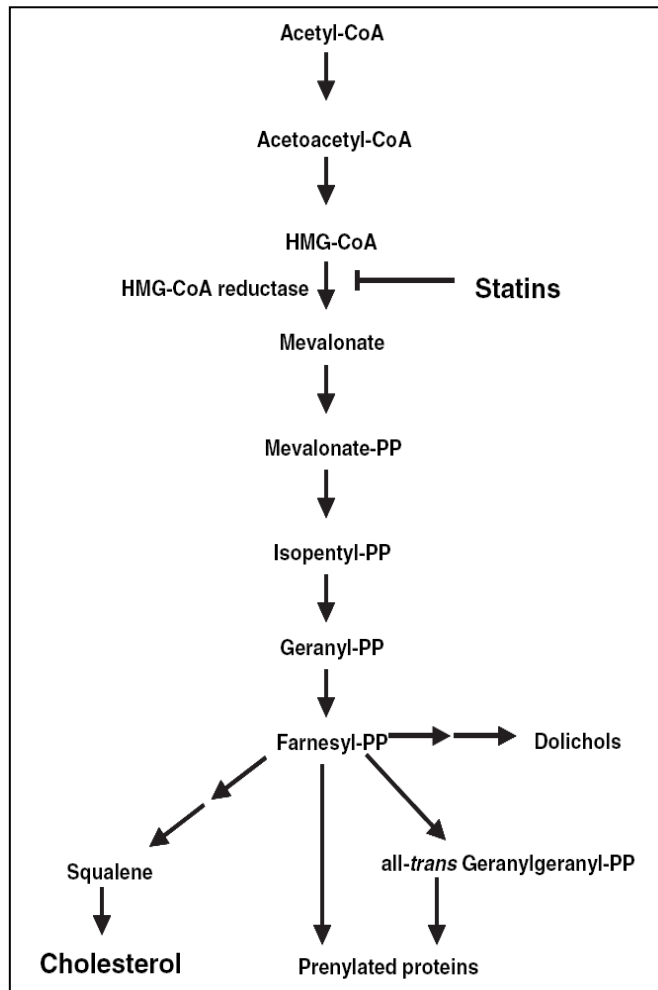


Figura 8: Mecanismo de acción de las estatinas. Tomado de Schachter M. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 2004; 19: 117–125.

Actualmente se considera que estos fármacos además de su principal efecto, el hipolipemiente, poseen un importante papel protector de la función endotelial gracias a diversos mecanismos pleiotrópicos:

- La estimulación directa de la síntesis del NO endotelial por parte de todas las estatinas comercializadas¹⁸⁷⁻¹⁹¹, con un incremento en la actividad de la eNOS^{189,191}, así como un aumento de su vida media¹⁹². El incremento en la expresión y actividad del enzima se observa incluso en condiciones de hipoxemia. Esto ocurre probablemente por mecanismos post-transcripcionales, como la estabilización del RNA mensajero¹⁹³, que parece estar relacionada íntimamente con la inhibición de la Rho-GTPasa¹⁸⁹. En pacientes hipercolesterolémicos, la expresión endotelial de caveolina-1 está directamente relacionada con los niveles de LDL y esa abundancia en caveolina-1 promueve la actividad inhibitoria de la eNOS que tienen las LDL y por tanto su capacidad para reducir la producción de NO. Aún más, las estatinas promueven la producción endotelial de NO a través e la inhibición de la expresión de la propia caveolina-1 por la célula endotelial¹⁹⁴. Las estatinas también aumentan la actividad a largo plazo de la eNOS a través de la asociación de la chaperona molecular Hsp90¹⁹⁴. Experimentalmente se ha conseguido contrarrestar el efecto de la L-NAME mediante el tratamiento concomitante con pravastatina (PRAV) sin alterar los niveles de colesterol de los animales¹⁹⁵. La L-NAME es un inhibidor de la NOS que produce aumento de la presión sistólica y cambios inflamatorios en las arterias coronarias (infiltración monocítica, expresión de sustancias quimiotácticas para los monocitos y proliferación celular)¹⁹⁵. En un reciente trabajo, Kaesemayer et al¹⁹⁰ han observado que la PRAV y la simvastatina son capaces de inducir vasodilatación arterial endotelio-dependiente con aumento de la producción de NO. Han demostrado que tanto la relajación vascular como la síntesis de NO son dosis dependiente y más potente para la PRAV. Esto puede explicar que su beneficio clínico esté menos ligado a la disminución de los niveles de colesterol.
- La reducción de la inhibición de la eNOS asociada a la hipoxemia y a otros estímulos, como el TNF, la IL-1 o las LDL oxidadas¹⁹⁶.
- La modulación de la actividad de la iNOS que ha demostrado ser deletérea a través de la síntesis de NO en el contexto del proceso inflamatorio y su oxidación a radicales peroxinitrito¹⁹⁷.
- Disminución de la actividad del NFκB¹⁹⁸, de la quimiotaxis de los NEU y monocitos humanos¹⁹⁹ y de la adhesividad leucocitaria por la reducción de la expresión de CD11b monocítico²⁰⁰ y de ICAM-1 endotelial¹⁹⁸.

El efecto resultante de todo ello sería una mayor disponibilidad del NO producido por la eNOS en el lecho vascular que explicaría las propiedades antiinflamatorias que efectivamente se ha demostrado que poseen estos fármacos, así como una disminución del NO producido por la iNOS en las situaciones en las que un aumento de NO en presencia de radicales libres puede ser claramente deletéreo. Clínicamente el vínculo entre las propiedades anti-inflamatorias de las estatinas y su beneficio clínico es tal que comienza a haber evidencias de que los pacientes con

mayores beneficios son aquellos que consiguen reducir, además de la LDL a cifras cada vez más bajas, sus concentraciones de proteína C-reactiva (PCR) por debajo de 2 mg/L²⁰¹.

Estos hallazgos pueden justificar que los inhibidores de la HMG-CoA-reductasa se hayan demostrado eficaces también en la reducción de la morbimortalidad cardiovascular en pacientes con niveles normales de colesterol. En el estudio CARE²⁰² se aleatorizaron 4159 pacientes con antecedentes de IAM con niveles de colesterol menores de 240 mg/dl, de LDL entre 110 y 174 mg/dl, de triglicéridos menores de 350 mg/dl. El tratamiento con 40 mg al día de PRAV resultó en una reducción significativa de la incidencia de muerte de origen cardiaco, de IAM no fatal y total, de accidentes cerebrovasculares y de necesidad de revascularización coronaria. La cifra de LDL previa al inicio del tratamiento influyó notablemente en el resultado de manera que los pacientes con LDL menores de 125mg/dl no obtuvieron ningún beneficio con el mismo mientras que los pacientes con niveles entre 150 y 175 mg/dl obtuvieron un beneficio similar al que se observa en los pacientes con hipercolesterolemia. Dentro del subgrupo de pacientes con procedimientos de revascularización previos, en el trabajo de Flaker et al²⁰³ se incluyeron un total de 2245 pacientes del estudio CARE, todos ellos con antecedentes de IAM, que habían recibido revascularización coronaria mediante ACTP y/o cirugía previamente a la randomización con o sin PRAV. La administración del fármaco se tradujo en una reducción significativa en la incidencia de IAM, muerte cardiológica o revascularización, así como en la incidencia de accidente cerebrovascular agudo. En otros estudios de ámbito igualmente quirúrgico se ha confirmado que el tratamiento preoperatorio con estatinas se asocia de manera independiente a una reducción en la mortalidad quirúrgica de causa cardiaca²⁰⁴ y a una reducción en la incidencia de accidente cerebrovascular perioperatorio²⁰⁵. Además, está demostrado que la discontinuación del tratamiento con el fármaco se ha asociado a un aumento de la mortalidad global y de la tardía de causa cardiaca tanto en pacientes diagnosticados de síndrome coronario agudo²⁰⁶ como en el periodo postquirúrgico²⁰⁴. Incluso, en alguno de estos trabajos se observa una tendencia a presentar más eventos desfavorables cardiovasculares en los pacientes en los que se discontinuó la administración de estatinas que en aquellos que nunca las tomaron²⁰⁶.

En diferentes trabajos se ha ido observando que el beneficio del tratamiento con estatinas se puede obtener tratando a los pacientes antes del insulto isquémico durante periodos de duración muy variable, entre 3-7 días y un mes^{191,193,198}. Por fin, varios trabajos experimentales han demostrado que una dosis única intravenosa del fármaco capaz de alcanzar una concentración sérica similar a la que se consigue con dosis clínicas terapéuticas es capaz de proporcionar múltiples efectos beneficiosos. Con esta estrategia se ha conseguido disminuir el fenómeno de no-reflujo, la disfunción ventricular después de la reperfusión, la capacidad adhesiva e infiltrativa

de los leucocitos, la infiltración absoluta de leucocitos en el tejido miocárdico isquémico-reperfundido, la expresión de P-selectina endotelial, la apoptosis miocítica, la inducción del RNAm-eNOS a través de mecanismos post-transcripcionales y el aumento de producción postisquémica de la iNOS²⁰⁷. También se ha observado un aumento de la producción de NO endotelial, independientemente de sus acciones sobre los niveles de colesterol^{208,209}. En otros trabajos similares se ha sugerido que el efecto podría ser dosis dependiente. Sin embargo, en el trabajo experimental de Bell et al¹⁵⁹ se observó que el efecto protector del miocardio frente a una isquemia global de 35 minutos seguida de 30 minutos de reperfusión se observaba con rangos de concentración de atorvastatina de 25 a 100mmol/L, con un beneficio máximo con dosis de 50 mmol/L, curiosamente mayor que el conseguido con la dosis de 100 mmol/L. Jones et al¹⁹² han demostrado que esa administración aguda en monodosis permite, incluso, que el corazón tratado mantenga unas cualidades hemodinámicas similares a la de los corazones no sometidos a ISQ/REP al cabo de 6 meses.

Por todo ello, la administración de estatinas en dosis única inmediatamente antes del insulto isquémico podría resultar beneficiosa para disminuir los efectos del daño por ISQ/REP y, dados los mecanismos que suscita, también la reacción inflamatoria inducida por la derivación cardiopulmonar.

CIRCULACIÓN EXTRACORPÓREA Y REACCIÓN INFLAMATORIA SISTÉMICA

La CEC forma parte hoy en día del armamentario habitual en los procedimientos quirúrgicos cardíacos. A pesar de los avances que se han obtenido en la biocompatibilidad del sistema de tubuladuras, dispositivos de oxigenación, filtración sanguínea, etc., la CEC sigue generando todavía una importante reacción inflamatoria sistémica que amplifica enormemente la inflamación provocada por el propio acto quirúrgico. Estudios que comparan la reacción inflamatoria en pacientes sometidos a cirugía de revascularización coronaria con y sin derivación cardiopulmonar y pinzamiento aórtico demuestran este hecho de manera específica y contundente^{17,210}.

Inicio de la reacción inflamatoria sistémica por circulación extracorpórea

La inflamación generada durante este tipo de procedimientos quirúrgicos tiene su origen en diversos factores:

- ❑ El procedimiento quirúrgico en sí mismo.
- ❑ La ISQ/REP, tanto cardíaca inducida por el pinzamiento aórtico¹⁴, como de otros órganos que por diversas causas pueden sufrir también procesos de ISQ/REP, como son los periodos de hipotensión, bajo gasto e

hipoperfusión, el flujo no pulsátil que proporciona el dispositivo de derivación cardiopulmonar, etc.¹¹⁷.

- El contacto de la sangre con las superficies no endotelizadas del sistema de CEC.
- La endotoxemia transitoria que se observa frecuentemente en el periodo post-CEC.

El trauma quirúrgico induce la reacción inflamatoria correspondiente, cuyo abordaje y estudio se extiende más allá de los objetivos de este trabajo, aunque se tratará someramente en apartados posteriores del manuscrito. El papel de la ISQ/REP en la activación inflamatoria ya ha sido ampliamente comentada en los apartados previos. El patrón temporal de la elevación de alguno de los marcadores inflamatorios, como las citoquinas, ha sugerido que la ISQ/REP miocárdicas suponen un importante desencadenante de la activación y amplificación de la cascada inflamatoria sistémica inducida por la CEC¹⁴, como se comentará en detalle más adelante.

CONTACTO DE LA SANGRE CON EL SISTEMA DE CIRCULACIÓN EXTRACORPÓREA

El suceso más precoz y determinante del inicio de la cascada inflamatoria con relación a la CEC se produce cuando la sangre entra en contacto con las superficies no endotelizadas del sistema (tubuladuras, oxigenador, filtros, etc.), momento en el que se produce una activación masiva del sistema de complemento, con la aparición de grandes cantidades de C3a y C5a en la sangre que retorna del sistema hacia el paciente¹¹⁷. Esta activación está potenciada adicionalmente por el estímulo de la kalikreína que se genera al activarse también de forma importante el factor XII de la coagulación.

El complemento se activa de manera escasa por la vía clásica durante la CEC. Los mecanismos para ello son, probablemente, reconocimiento del complejo heparina-protamina como consecuencia de la existencia de anticuerpos preformados en algunos pacientes²¹¹ o bien la generación durante la propia isquemia de moléculas procedentes de fracciones celulares ricas en mitocondrias⁷⁹. Estas moléculas son capaces de unirse a la subunidad C1q de C1 y activar dicha vía clásica⁷⁸. Sin embargo, la vía alternativa está continuamente activando C3b de manera fisiológica. Normalmente, en las superficies endotelizadas intactas y normofuncionantes del sistema vascular existen proteínas específicas que degradan ese componente del complemento, como el factor acelerador de la degradación ("*Decay Accelerating Factor*", DAF) e impiden su acción (figura 9). Sin embargo, esto no ocurre en el sistema de derivación cardiopulmonar, que carece de estas moléculas, por lo que C3b continúa de manera rápida y masiva con la activación de la cascada, con la generación del complejo de ataque a la membrana (MAC) y anafilotoxinas C3a y

C5a, con las propiedades quimiotácticas y anafilótóxicas mencionadas previamente^{56,117}. Chenoweth et al demostraron que inmediatamente tras el inicio de la CEC se produce un aumento masivo de la concentración de C3a y C5a en sangre que coincide con un importante secuestro leucocitario en el tejido pulmonar²¹² y que posteriormente se ha relacionado con la propiedad de C5a para aumentar la expresión endotelial de P-selectina¹¹⁷. Esta selectina es, como ya sabemos, promotor inicial del "rolling" leucocitario necesario para su posterior adhesión. C5a, además, activa a los NEU para la expresión de moléculas de

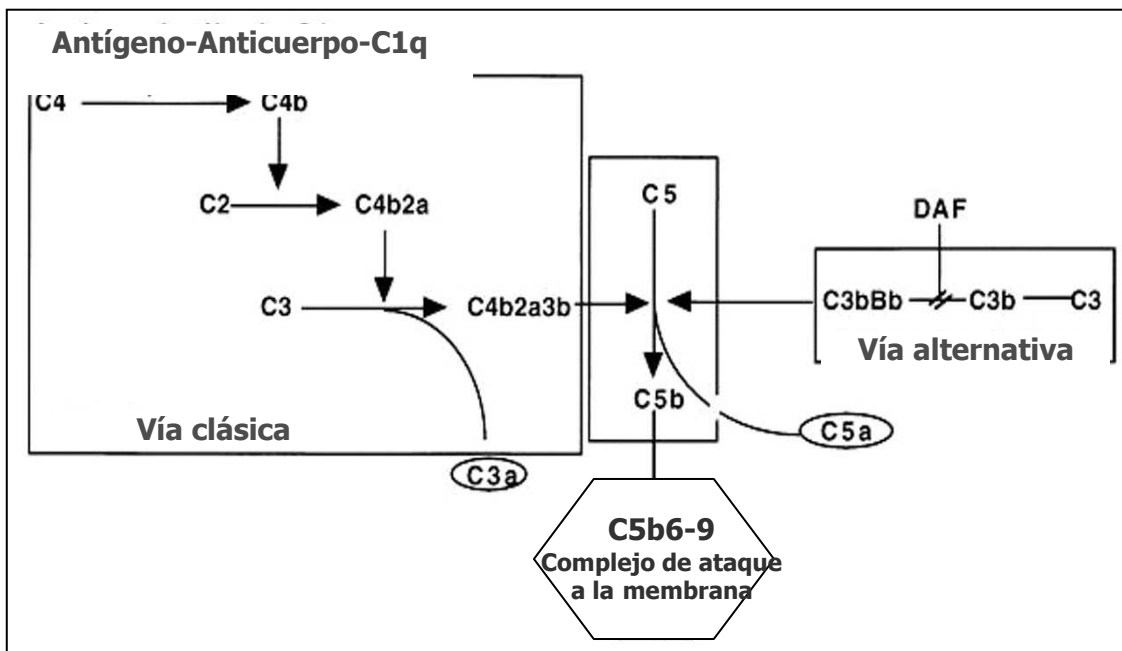


Figura 9: Activación del sistema de complemento. Modificado de Boyle EM Jr, et al. *Ann Thorac Surg* 1997;63:277-284. DAF: factor acelerador de la degradación de C3b.

adhesión CD11/CD18, que interactúan con ICAM-1 endotelial, se adhieren al endotelio y migran al interior del tejido. Tras ello liberan proteasas que lisan colágeno, elastina y fibronectina, destruyen las estructuras extracelulares y contribuyen al aumento de la permeabilidad capilar y del espacio extravascular, así como al desequilibrio hidroelectrolítico característicos del periodo postoperatorio después de CEC¹¹⁷. Además liberan también radicales libres derivados del oxígeno, como el $O_2^{-213,214}$, OH^{-215} , $H_2O_2^{14}$ o peroxinitrito²¹⁶ que aumentan la peroxidación lipídica^{51,217} y producen lesiones tisulares pulmonar²¹⁸, renal¹⁴, cerebral¹⁵ y hepática¹⁴, así como exacerbación del daño por ISQ/REP cardíaca^{15,219}. Por otro lado, los radicales libres producen hemólisis que libera hierro procedente del grupo hemo de la hemoglobina que, a su vez, cataliza la reacción de Fenton para la formación de cantidades adicionales de OH^{-215} .

El estrés oxidativo se manifiesta muy precozmente tras el inicio de la CEC. Clermont et al¹⁵ demostraron en un meticuloso estudio utilizando resonancia electrónica de *spin* (ERS) que la concentración del reactivo trampa para radicales con *spin* desapareado (la α -fenil N-t-butilnitrona, PBN) comienza a ascender ya antes de los 30 minutos posteriores al pinzamiento aórtico y se encuentra significativamente elevado de manera sistemática antes del despinzamiento. La sangre del seno coronario experimenta un ligero ascenso de la concentración de PBN a los 3 minutos del despinzamiento, pero no es significativamente mayor que la de la sangre de la arteria periférica (figura 10). En el caso específico del O_2^- su concentración es máxima 12 horas después de la cirugía, momento en el cual el recuento leucocitario suele ser también mayor²¹³.

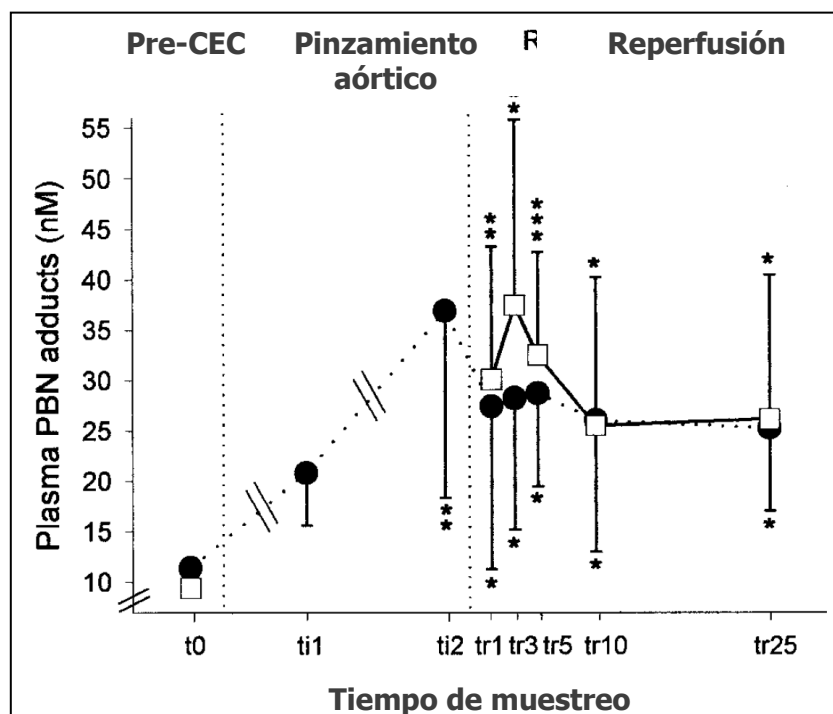


Figura 10: Evolución temporal de la concentración de PBN en sangre periférica (círculos) y seno coronario (cuadrados). t0 antes del inicio de la circulación extracorpórea; ti1 30min tras el pinzamiento aórtico; ti2; tr1, tr3, tr5, tr10, tr25 durante la reperusión miocárdica a 1, 3, 5, 10, y 25 min tras retirar el clamp. Modif. de Clermont G, et al. *Anesthesiology* 2002; 96:80-7.

ENDOTOXEMIA

En los últimos años se está dando mucha importancia a la endotoxemia que se produce durante la CEC en el proceso inflamatorio sistémico que se genera durante la misma. Durante la derivación cardiopulmonar se produce una elevación de la

concentración de endotoxina por, posiblemente, traslocación de gérmenes saprofitos de la luz intestinal por isquemia mesentérica²² asociada a disfunción de las células de Kupffer¹¹⁷.

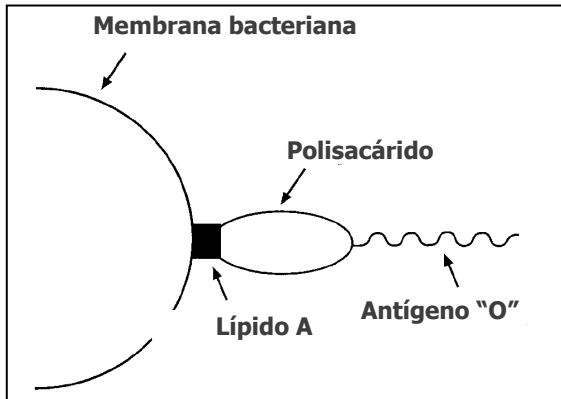


Figura 11: Lipopolisacárido A. Modificado de Hall et al. *Anesth Analg*, 1997;85:766-82.

Durante la CEC se han detectado niveles anormales de endotoxina que están en relación con la duración de la derivación cardiopulmonar y del pinzamiento aórtico²²⁰. La unión del lipopolisacárido A de esta molécula (figura 11) con la proteína ligadora de lípidos ("lipid binding protein", LBP) es 1000 veces más potente que el propio

lipopolisacárido en inducir la producción de TNF- α ²². Además, es capaz de activar al complemento y, por supuesto, a los NEU.

Mantenimiento de la reacción inflamatoria sistémica por circulación extracorpórea

LIBERACIÓN DE CITOQUINAS

La reacción inflamatoria inicial secundaria a la producción de complemento es intensa y precoz pero poco duradera. Este proceso induce la secreción de múltiples citoquinas inflamatorias^{25,56,221} como la IL-1, IL-6, IL-8 y TNF- α , así como moléculas antiinflamatorias, como la IL-10, cuyo patrón de liberación durante la CEC se ha estudiado extensamente.

La liberación de TNF-alfa se inicia precozmente durante la derivación cardiopulmonar (ya antes del pinzamiento aórtico), presenta un pico de concentración a las 4 horas del fin de la misma y se mantiene elevado al menos en las 24 horas siguientes¹⁴. La IL-6 comienza a ascender durante la CEC, alcanza un pico también a las 4 horas de su finalización^{14,110} y se mantiene significativamente elevada al menos hasta el 7º día postoperatorio¹¹⁰. La IL-8 alcanza el máximo de concentración más precozmente después de la finalización de la CEC (5 minutos tras la administración de protamina en el trabajo de Birdi et al²²² y después de el cierre de la piel en el estudio de Wan et al²²¹), se mantiene elevada hasta las 4 horas postprocedimiento y posteriormente declina. La IL-10 presenta un pico precoz (entre 10 y 30 minutos tras la reperfusión^{25,110} o al finalizar la CEC²²¹, según se

realice la extracción de muestras) y al 7º día ya ha retornado a sus valores normales preoperatorios¹¹⁰.

Estos patrones de liberación de citoquinas, con picos constantemente cercanos al inicio de la reperfusión y de manera independiente a la duración de la derivación cardiopulmonar en el caso de la IL-8 y la IL-10, sugiere que la ISQ/REP del corazón y los pulmones es un importante desencadenante de la respuesta inflamatoria sistémica, más que la propia CEC¹⁴. De hecho, en el estudio de Wan et al²²¹ que compara la evolución temporal de los incrementos de citoquinas proinflamatorias e IL-10 en pacientes sometidos a cirugía coronaria con y sin derivación cardiopulmonar, se observa que la IL-10 tiene sus concentraciones pico al finalizar la CEC y, sin embargo, en los enfermos sin el uso de la misma el pico es mucho más retrasado, concretamente a las 4 horas de la cirugía (figura 12).

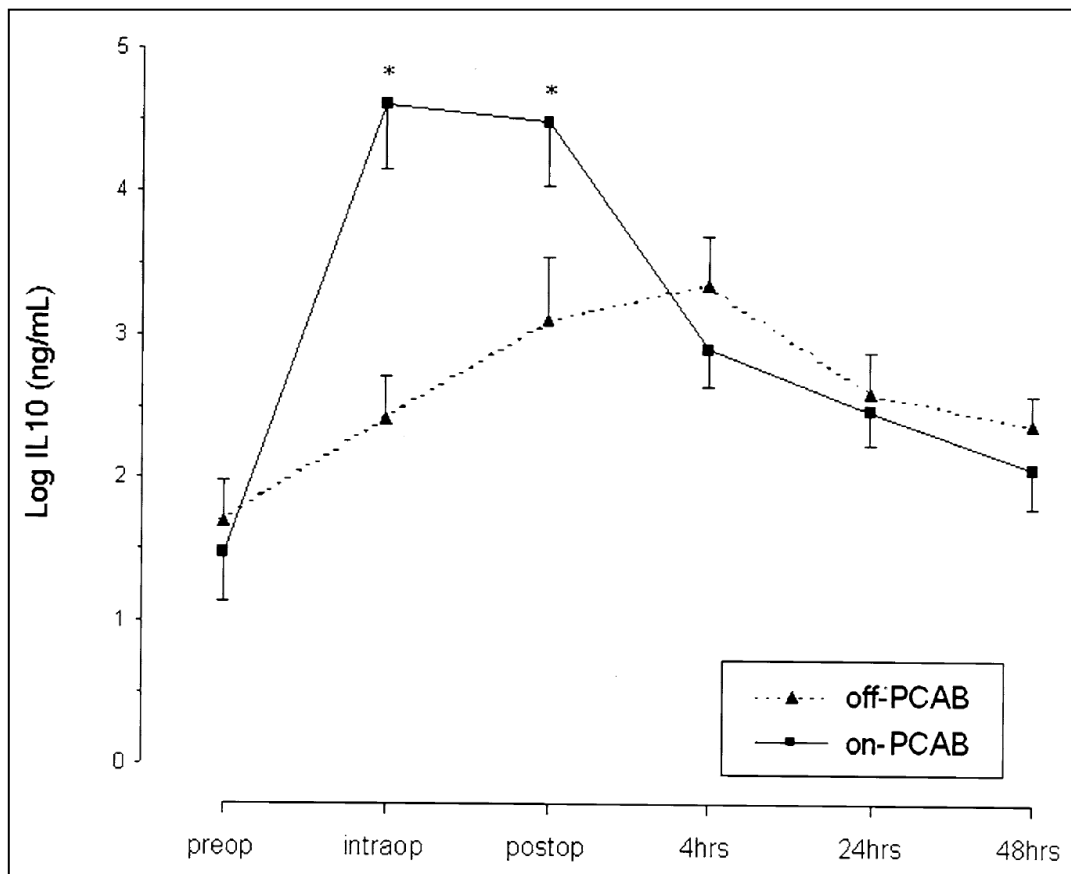


Figura 12: Liberación de IL-10 en cirugía coronaria con y sin CEC.
 Modificado de Wan IY, et al. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2004;127:1624-1631.
 Off-PCAB: cirugía coronaria sin CEC; on-PCAB: cirugía coronaria con CEC.

La CEC produce una liberación de citoquinas que sobrepasa significativamente la que produce la isquemia miocárdica o al trauma quirúrgico aislados. En el estudio

de Wan et al²²¹ se comparó la liberación de citoquinas inflamatorias (IL-6, IL-8), antiinflamatorias (IL-10) y moléculas de adhesión (VCAM-1) entre pacientes sometidos a cirugía coronaria con derivación cardiopulmonar sin pinzamiento aórtico y pacientes sin CEC, es decir, intentando observar el efecto inflamatorio puro de la derivación cardiopulmonar. Se observó que la liberación de IL-6, IL-8 e IL-10 era significativamente mayor en el grupo con CEC, igualándose las concentraciones a las 4 horas para la IL-6, la IL-10 y el TNF-alfa y a las 24 horas para la IL-8. En el caso de la VCAM-1, los enfermos con derivación cardiopulmonar presentaban valores menores intraoperatoriamente, con un repunte significativamente mayor a las 4 horas del procedimiento. Por su parte, el estudio de Diegeler et al²⁵ supone un completo estudio de la liberación de complemento, interleuquinas inflamatorias (IL-6 y 8, TNF-alfa) y también de la IL anti-inflamatoria IL-10 antes, durante y después del proceso quirúrgico en pacientes sometidos a cirugía de revascularización coronaria por esternotomía media con y sin CEC y por minitoracotomía sin CEC, es decir, supuestamente con menor trauma quirúrgico. Los niveles de C5a se elevaron de manera similar en todos los pacientes con el pico al inicio de la CEC en el grupo intervenido por esternotomía con CEC y un descenso más rápido a niveles normales en los otros dos grupos (en 4 horas) respecto al grupo con derivación cardiopulmonar (significativamente elevado todavía a las 24 horas). El C3d sólo se elevó en los grupos con esternotomía, con diferencias significativas entre el sometido a CEC y el menos invasivo a las 4 horas del procedimiento. El TNF-alfa se elevó sobre todo en el grupo sometido a derivación cardiopulmonar, con un pico a las 4 horas del procedimiento y una elevación mantenida durante todo el postoperatorio (hasta 6 días después de la cirugía). La IL-6 aumentó de manera similar en los tres grupos con un pico a las 4 horas del procedimiento, con niveles normales en todos los grupos a las 24 horas. La elevación de IL-8 se observó también en todos los grupos, pero de manera significativamente mayor en el grupo con derivación cardiopulmonar. Los niveles se mantuvieron significativamente más elevados en este grupo a las 24 y 48 horas de la cirugía. Por su parte la IL-10 se incrementó significativamente más también a las 4 horas en el grupo asistido, con valores similares en los tres grupos a las 24 y 48 horas, momento en que las concentraciones retornaron a valores preoperatorios en todos los grupos. Todos estos datos confirman que, efectivamente, la CEC resulta en una respuesta inflamatoria exagerada y en una consecuente liberación aumentada de prácticamente todas las citoquinas.

En algunos trabajos se ha sugerido que el balance entre la producción de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias resulta en la mayor o menor extensión del proceso inflamatorio⁵⁶.

ADHESIVIDAD, INFILTRACIÓN Y DEGRANULACIÓN LEUCOCITARIAS

Las citoquinas liberadas en el proceso en cantidad proporcional a la duración del insulto proinflamatorio, en nuestro caso la CEC, alcanzan el resto de las superficies

endoteliales del organismo y junto a la endotoxina se unen a receptores específicos que activan la célula endotelial. Una vez activada, ésta inicia la transcripción de los "genes de activación" de E-selectina, ICAM, VCAM, IL-8, iNOS y factor tisular a través de una única molécula mediadora, el NF κ B¹¹⁷. Está demostrado que la CEC induce una marcada activación del NF κ B en el tejido miocárdico¹⁶. Parece además que es bastante independiente del trauma quirúrgico en sí. En algunos trabajos, en pacientes sometidos a revascularización coronaria con pinzamiento aórtico y derivación cardiopulmonar normotérmica, la actividad de NF κ B en monocitos de sangre periférica no se vio afectada durante el procedimiento de manera significativa²²³.

Este proceso tarda 4 horas en completarse y tiene su máximo efecto entre 8 y 24 horas después del insulto, dependiendo del gen de que se trate. Por tanto, una vez que la respuesta precoz de expresión inicial de P-selectina se ha producido, se induce la más duradera expresión de E-selectina e ICAM-1, que perpetúan durante más tiempo el "rolling" y la adhesión leucocitaria al endotelio.

La adhesividad leucocitaria alcanza valores elevados a las 12 horas después de la cirugía y se mantiene elevada hasta el 7º día postoperatorio²¹³. La E-selectina se mantiene en niveles preoperatorios, mientras que la ICAM-1 y la P-selectina solubles se elevan significativamente después de la CEC²²⁴. El pico de ICAM-1 soluble es mucho más tardío (20 horas) que el de la P-selectina soluble, que se empieza a elevar a los 30 minutos, alcanza un pico a las 4 horas y se mantiene elevada a las 20 horas²²⁴.

La liberación de citoquinas se puede ver alterada por la temperatura de la perfusión durante la CEC, aunque existen hasta el momento datos contradictorios en cuanto a que la perfusión normotérmica pueda producir disminución²²² o aumento²²⁵⁻²²⁷ de los marcadores proinflamatorios. Birdi et al²²² observaron que la normotermia atenúa la liberación de IL-8 con relación a la hipotermia ligera (32°C) y moderada (28°C). En otros estudios se ha observado aumento de la liberación de IL-1 y TNF- α ^{225,226}, así como el complemento²²⁷ durante la perfusión normotérmica al compararla con la hipotérmica.

Por otro lado se ha descrito que la CEC disminuye la capacidad de producción de IL-2²², IL-12 y de INF- γ ⁸⁷, lo cual se puede asociar a alteraciones de la respuesta inmune y a complicaciones infecciosas postoperatorias por inmunodepresión.

ÓXIDO NÍTRICO EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA POR CIRCULACIÓN EXTRACORPÓREA

La producción de NO está aumentada durante la CEC. El aumento de su concentración se empieza a detectar a los 30 minutos de iniciada la derivación cardiopulmonar¹⁴⁹. Ambas NO sintasas están implicadas en su producción en este

contexto. Por un lado, la activación de la cascada inflamatoria induce un aumento de la actividad de la iNOS²²⁸. Como se ha visto, citoquinas como la IL-1 beta, el TNF- α o la IL-6 aumentan la actividad de la iNOS en las células musculares lisas vasculares, en los miocitos cardiacos, en las células endoteliales, linfocitos y macrófagos¹⁴⁷. Por otro lado, el flujo anormal, no pulsátil, que proporciona la bomba de CEC y la propia reacción inflamatoria estimula al endotelio para activar la eNOS y producir NO²²⁹. La bradikina, que es capaz de estimular a la célula endotelial para producir NO, está igualmente aumentada durante la CEC²³⁰. Cuando se lleva a cabo la derivación cardiopulmonar con hipotermia moderada, la producción de NO durante la misma y en el periodo de recuperación posterior parece atenuarse^{149,231}.

Aunque, como se ha visto, el NO puede ejercer efectos favorables locales en el proceso de ISQ/REP inhibiendo la interacción leucocito-endotelio entre otros, el producido en reacción al estímulo inflamatorio por la iNOS también puede tener efectos perniciosos durante el proceso a través de la generación de peroxinitrito¹⁴⁹. Igualmente, el exceso de NO durante la CEC también puede tener efectos deletéreos, como son la inhibición del metabolismo celular a través de la reacción directa con enzimas como la guanilato ciclasa o la ciclooxigenasa. Igualmente a través de su unión al citocromo p450s produce inhibición de su importante actividad enzimática²³². Además este NO producido ante el estímulo de la iNOS induce hipotensión arterial por su efecto vasodilatador¹⁴⁹, y puede provocar depresión miocárdica²² y lesión tisular pulmonar²². A pesar de todo ello, Hayashi et al²²⁸ en un interesante trabajo experimental, demostraron que gran parte del NO que se produce después de la CEC es derivado de la iNOS y que inhibiendo su actividad con amionoguanidina se reducía la concentración de NO después de la derivación cardiopulmonar. Ello produjo contrariamente a lo esperado una amplificación de la respuesta inflamatoria (mayor elevación de los niveles de IL-6 e IL-8), mayor infiltración leucocitaria tisular en el pulmón y mayor disfunción pulmonar, aunque se redujo la persistencia en el tiempo de la concentración elevada del radical libre peroxinitrito. Dado que la CEC puede producir disfunción endotelial progresiva por la respuesta inflamatoria mantenida y disminuir, por tanto, la actividad de la eNOS, la iNOS se puede convertir en la fuente predominante de NO en esas fases tardías de la derivación cardiopulmonar y del postoperatorio inmediato²²⁸. Los autores llegaron a la conclusión de que la actividad aumentada de la iNOS en la cirugía con CEC puede jugar, en contra de los que se cree, un efecto citoprotector en el contexto de la reacción inflamatoria mediada por esa CEC.

En otros trabajos en los que se demuestra que ciertas condiciones quirúrgicas como la hipotermia moderada combinada a la cardioplejia cristaloides fría reduce la producción de NO también se observa una amplificación de la respuesta inflamatoria en forma de una mayor y más prolongada elevación de diversas interleucinas como la IL-6 e IL-8²³¹.

ESTATINAS EN LA REACCIÓN INFLAMATORIA POR CIRCULACIÓN EXTRACORPÓREA

Desde hace años se ha demostrado que los fármacos antiinflamatorios pueden disminuir la reacción inflamatoria sistémica inducida por la CEC. Las drogas antiinflamatorias más estudiadas en este sentido son evidentemente los corticosteroides^{14,19,233}. Estos fármacos reducen la liberación de TNF- α e IL-1 por macrófagos activados, reducen la traslocación del RNA-m del TNF- α , reducen la expresión de selectinas endoteliales por un mecanismo mediado por un receptor para su molécula, así como la expresión de integrinas leucocitarias gracias a la disminución de la activación por citoquinas. Finalmente, reducen la producción de NO gracias a la interferencia con la endotoxina y con el RNA-m de la iNOS^{22,56}. En un reciente estudio clínico aleatorizado y controlado con placebo Bourbon et al¹⁴ aleatorizaron 36 pacientes en tres grupos para recibir placebo, 5 o 10 mg/kg de metilprednisolona justo al inicio de la CEC y se determinaron las concentraciones de TNF- α e IL-6 en suero así como la producción de radicales libres por los leucocitos en sangre periférica. Se observó que los corticoides son capaces de disminuir la liberación de citoquinas inflamatorias y la producción de radicales libres en estos pacientes gracias a una disminución eficaz y dosis dependiente de la reacción inflamatoria sistémica.

Sin embargo, su utilidad práctica se ha visto ensombrecida por el hallazgo de que su administración perioperatoria en estos pacientes puede disminuir la relación alvéolo-arterial de oxígeno, aumentar el cortocircuito y disminuir la distensibilidad pulmonar. A consecuencia de todo ello pueden, además, prolongar los tiempos de intubación en pacientes sometidos a estrategias de recuperación rápida postoperatoria o "*fast-track*"²³⁴. Todo ello puede ser debido al conocido efecto de aumento del número de leucocitos que provocan estas drogas, debido a que inducen un aumento de su salida de la médula ósea y una disminución de su aclaramiento del torrente sanguíneo. El aumento de las cifras de leucocitos podría favorecer su secuestro en el pulmón en las fases más iniciales de la derivación cardiopulmonar.

Por otra parte, recientemente también se ha comenzado a atribuir un potente efecto inhibitor de la inflamación y de sus potenciales consecuencias a las estatinas en estos pacientes. Desde el punto de vista clínico Shao et al demostraron en un trabajo experimental en ratas que el pretratamiento con simvastatina reducía la lesión pulmonar inducida por la CEC de una manera dosis dependiente, con una mejoría de la relación pO_2/FiO_2 y del índice respiratorio (pO_2 alveolar- pO_2 arterial/ pO_2 arterial)²³⁵. Además, otros beneficios que se han asociado con el uso preoperatorio de estatinas son la reducción de la incidencia de fibrilación auricular^{18,236}, alteraciones psiquiátricas (síndrome confusional post-derivación

cardiopulmonar²³⁷) o infecciones²³⁸ postoperatorias, aunque en este último caso los datos recientes son altamente contradictorios²³⁹.

Cuando se observa la evolución de los marcadores inflamatorios clínicos más comunes, como la PCR, hay controversia en que la administración preoperatoria de estatinas sea capaz de inhibir el exceso de su liberación después de la CEC. Dereli y cols.²⁴⁰ han objetivado en un reciente trabajo clínico reducción de la liberación de PCR, así como de IL-6 en pacientes tratados durante al menos 15 días con atorvastatina comparados con pacientes sin hiperlipidemia y sin tratamiento hipolipemiente, con reducción también de la estancia postoperatoria en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI). Otros investigadores han observado resultados similares en cuanto a la reducción de estos mismos marcadores inflamatorios²⁴¹ administrando PRAV 9 días antes de la cirugía a pacientes sometidos a CEC. Estos resultados no han sido confirmados en otros estudios^{18,242}.

Sin embargo, cuando se observa la evolución de marcadores más sensibles de respuesta inflamatoria se comprueba un efecto claramente beneficioso^{240,241,243}. Se ha observado que las moléculas de adhesión pueden estar elevadas basalmente en los pacientes con hipercolesterolemia, especialmente ICAM-1 y la E-selectina²⁴⁴. Chello et al observaron que la expresión de CD11b leucocitario y de P-selectina endotelial²⁴⁵ así como de VCAM-1 e ICAM-1²⁴⁴ en el postoperatorio de pacientes sometidos a cirugía de revascularización coronaria disminuían en aquellos que estaban tomando simvastatina de manera crónica independientemente del grado de control de la hiperlipidemia que presentaran al ingreso. Para analizar el efecto de las estatinas en la liberación de citoquinas, Chello et al²⁴³ administraron de manera randomizada 20 mg/d de atorvastatina o placebo 3 semanas antes de la cirugía coronaria con CEC a 40 pacientes que no habían tomado medicación hipolipemiente durante el año previo a la cirugía y que tenían un nivel de colesterol total medio preoperatorio cercano a 240 mg/dl. La liberación de IL-6 y de IL-8 fue significativamente mayor a las 4 horas del procedimiento en el grupo al que se administró placebo. No se encontraron diferencias en la liberación de TNF- α , cuyo pico en ambos grupos se registró también a las 4 horas. La expresión de CD11b en NEU de sangre periférica se incrementó significativamente en ambos grupos aunque de manera más llamativa en el grupo placebo a las 4 y 24 horas postoperatorias. A pesar de una mayor hipercolesterolemia en el grupo no tratado, la adhesión de los NEU al endotelio de vena safena no fue diferente antes de la cirugía. Sin embargo a las 4 y 24 horas del procedimiento la capacidad de adhesión leucocitaria fue mayor en el grupo placebo, aunque sólo alcanzó significación estadística a las 4 horas. Este mismo grupo de investigadores ha demostrado en otro reciente trabajo que el pretratamiento con 40 mg diarios de simvastatina durante 3 semanas antes de la cirugía normaliza la apoptosis de los NEU después de la CEC²⁴⁶. En un trabajo previo, también Chello y cols.²⁴⁶ demostraron que la apoptosis de los NEU quedaba retrasada por el efecto de la reacción inflamatoria inducido por la derivación

cardiopulmonar. La disminución de la apoptosis programada de los NEU, células que no están más de 24 horas en la circulación desde que se empiezan a observar los primeros rasgos característicos de apoptosis, hace que los NEU se mantengan más tiempo en el tejido y provoquen más daño tisular durante el proceso inflamatorio. El tratamiento con la estatina acelera el proceso apoptótico respecto al grupo no tratado y, por tanto, disminuye su capacidad funcional y su grado de activación observado como una menor expresión de CD11b en su superficie.

Estos hallazgos sin embargo no se han confirmado en otros trabajos. Mathew et al no encontraron diferencias en los niveles perioperatorios de IL-6, IL-8, IL-1, TNF- α tras administración crónica de estatinas, a pesar de que los niveles de LDL fueron significativamente menores en el grupo tratado²⁴². En el estudio de Florens et al¹⁶ la administración aguda de atorvastatina a dosis terapéuticas (40 mg la tarde antes y 40 mg la mañana de la cirugía) a pacientes sin dislipemia y sin tratamiento previo con estatinas no produjo alteraciones significativas en los niveles de IL-6, IL-8, sP-selectina, ICAM-1 y lactoferrina ni en la expresión de CD11b en la superficie leucocitaria ni de NF κ B en los miocitos auriculares. Por su parte Liakopoulus et al, aunque demostraron que el pretratamiento con estatinas es capaz de atenuar la liberación de IL-6 después de la CEC y de, además, aumentar la producción de la molécula anti-inflamatoria IL-10, ni el TNF- α ni la IL-8 se vieron afectadas por el tratamiento²⁴⁷.

Por lo que conocemos, hasta el momento actual no existen estudios que hayan analizado el efecto de la administración de una dosis única de estatinas inmediatamente antes de la intervención en pacientes con tratamiento crónico con el fármaco y por tanto un adecuado control de la hiperlipidemia y una función endotelial crónicamente protegida. Caorsi et al²⁴¹ evidenciaron reducciones de la generación postoperatoria precoz de IL-6 y tardía de PCR en 43 pacientes administrando PRAV o placebo 48 horas antes y 7 días después de la intervención con una dosis preoperatoria adicional de 40 mg una hora después de la finalización de la CEC, aunque el grupo placebo no recibió estatinas en ningún momento del proceso. De la misma manera, Mannacio et al objetivaron reducciones en la liberación de marcadores de daño miocárdico en pacientes coronarios tratados con rosuvastatina a dosis bajas, pero también durante una semana previa a la cirugía y sin tratamiento farmacológico para el grupo tratado con placebo²³⁶.

Aunque en un modelo animal, Tsunooka et al²⁴⁸ han demostrado recientemente que la administración de estatinas disminuye la producción de iNOS intestinal y, también, la traslocación bacteriana que ella origina durante periodos de CEC no pulsátil a bajos flujos, no existen estudios clínicos que hayan determinado clínicamente el efecto del tratamiento con estatinas en la producción de NO durante la CEC.

FARMACOCINÉTICA APLICADA DE LAS ESTATINAS

La primera estatina descubierta fue la mevastatina (figura 13), por el Dr. Akira Endo, en los años sesenta. Desde entonces y hasta la fecha se han comercializado 8 estatinas diferentes, las primeras de ellas extractos fúngicos (lovastatina, simvastatina y PRAV) y las restantes manufacturadas de manera sintética (fluvastatina, cerivastatina, atorvastatina, rosuvastatina y pitavastatina, figura 14). La cerivastatina fue retirada del mercado en el año 2001 porque su administración se asoció a una elevada incidencia de complicaciones musculares. Con diferencia, las más estudiadas en el contexto en el que se desarrolla este estudio son lovastatina, simvastatina y PRAV.

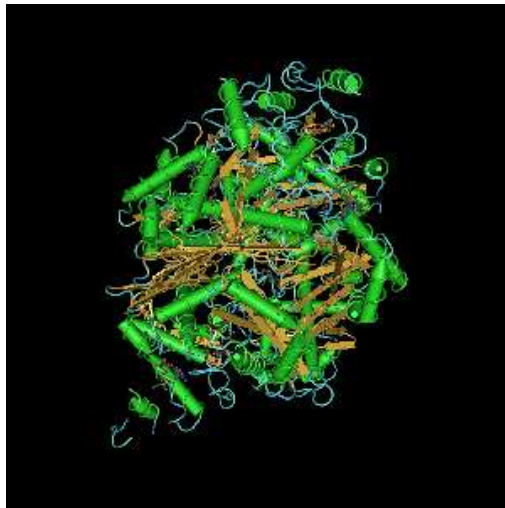


Figura 13. Estructura cristalográfica de la HMG-CoA reductasa unida a la mevastatina



Dr. Akira Endo

Actividad inhibitoria periférica de las estatinas

Para valorar el efecto pleiotrópico sistémico de la estatina en sangre su concentración como droga activa en plasma debe ser máxima. Clínicamente tanto la simvastatina como la lovastatina se administran como prodrogas inactivas, mientras que en el caso de la PRAV se hace como forma β -hidroxiácida activa²⁴⁹ y ya en animales se ha demostrado que la actividad inhibitoria periférica de la HMG-CoA-reductasa es mucho mayor para esta droga que para las dos primeras²⁵⁰. Aunque la absorción de simvastatina en el tubo digestivo es bastante completa (60-80%), sufre un primer paso hepático muy importante y sólo se observa un 5% del metabolito activo en sangre respecto a la concentración observada después de la administración intravenosa de la misma dosis del metabolito activo directamente²⁵¹.

Por ello es necesario administrar dosis elevadas del fármaco por vía oral para alcanzar niveles sistémicos elevados del metabolito activo²⁵². En el trabajo de

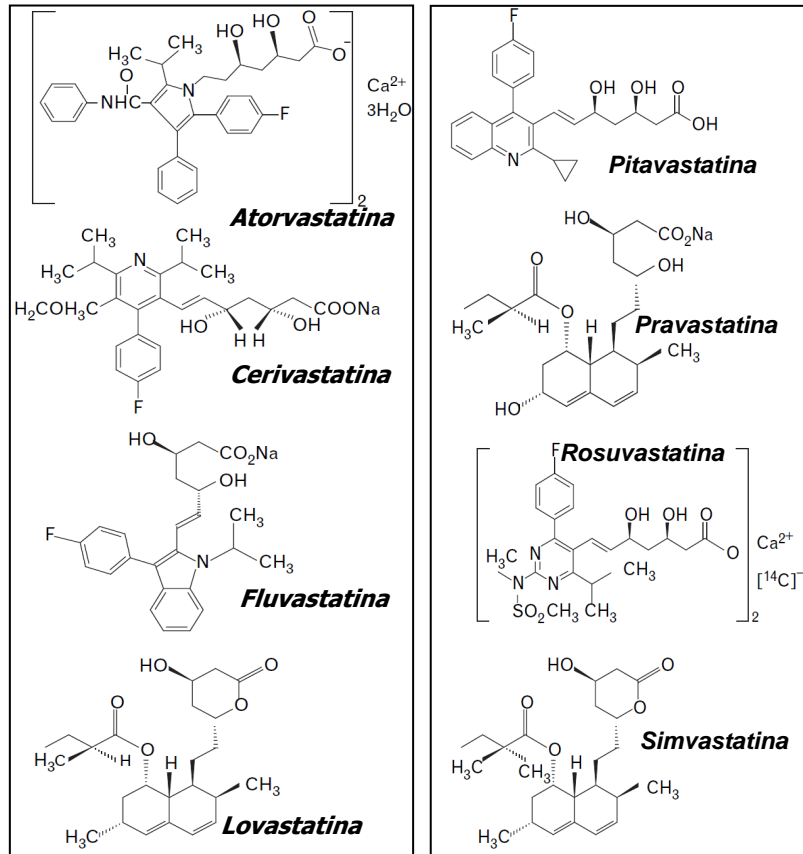


Figura 14: Estatinas comercializadas. Modificado de Mukhtar RYA, et al. *Curr Opin Lipidol*, 2005; 16 (6): 640-7.

Pentikainen et al²⁴⁹, se compararon la farmacocinética de simvastatina, lovastatina y PRAV en humanos. Tras su administración, la PRAV alcanzaba concentraciones de droga activa, es decir, con actividad inhibitoria de la HMG-CoA-reductasa *per se*, 5 veces superiores a las alcanzadas por simvastatina y lovastatina. Además, el área bajo la curva de estos compuestos fue igualmente 2-3 veces superior que para las otras dos drogas. El T_{max} para los inhibidores activos y totales (considerando *totales* las moléculas circulantes en formas inactivas, es decir prodrogas, junto a las formas activas), ocurrió 1 hora después de la administración en caso de la PRAV y entre 2 y 3 horas tras la administración de simvastatina y lovastatina. Las formas inactivas circulantes no contribuyen en modo alguno a ninguno de los efectos farmacodinámicos de estas drogas, aunque la activación periférica de las formas inactivas está todavía pendiente de estudio.

Por todo ello y dado que los órganos diana principales del estudio para valorar el efecto del fármaco son el corazón y el endotelio y, secundariamente, la reacción

inflamatoria valorada sistémicamente, parece que la PRAV es el compuesto de elección si queremos obtener el efecto deseado después de una administración oral.

Farmacodinámica de la pravastatina

La PRAV es un inhibidor hidrofílico de la HMG-CoA-reductasa que se administra como sal sódica del β -hidroxiácido activo²⁴⁹. Su efecto hipolipemiante se realiza por dos mecanismos. Por un lado la inhibición de la HMG-CoA-reductasa reduce los depósitos de colesterol intracelular y ello genera un aumento de los receptores de LDL en la superficie celular, con el consiguiente aclaramiento de las LDL plasmáticas y aumento de su catabolismo. Por otro, inhibe la síntesis hepática de VLDL, precursor de las LDL. El tratamiento con PRAV ha demostrado una reducción significativa de los niveles de colesterol total y LDL, así como una reducción de la morbi-mortalidad cardiovascular en varios estudios randomizados con un gran número de pacientes^{202,253}.

Farmacocinética de la pravastatina y su relación con los efectos secundarios

Su biodisponibilidad es baja, aproximadamente de un 18%²⁵⁴, debido a una absorción incompleta en la parte alta del intestino delgado y a un primer paso hepático muy importante²⁵⁵. Sin embargo es significativamente mayor que la biodisponibilidad de la simvastatina. Tras su administración oral se absorbe rápidamente y, tras el primer paso hepático en el que aproximadamente la mitad de la PRAV que llega por la vena porta es extraída por un transportador de ácidos biliares sodio-independiente²⁵⁵, alcanza niveles plasmáticos máximos en 1-1,5 horas desde su administración²⁴⁹. Su unión a proteínas plasmáticas es mucho menor que para el caso de la simvastatina y otras estatinas lipofílicas por lo que su desplazamiento por fármacos es menor²⁵⁵, como en el caso de los anticoagulantes. Los niveles plasmáticos son altamente variables entre individuos, aunque individualmente en cada uno de ellos el nivel plasmático es directamente proporcional a la dosis administrada. En el estudio de Siekmeier et al²⁵⁶ la concentración máxima (Cmax) obtenida mediante cromatografía después de una dosis de 60 mg fue de entre 37 y 126 microgr/l. El área bajo la curva (AUC) varió entre 52 ng/ml por hora y 311 ng/ml por hora y la vida media de eliminación plasmática resultó entre 95 y 165 minutos. En el trabajo de Sigurbjornsson et al²⁵⁵, tras una dosis de 20 mg la Cmax media fue de 48,9 +/- 7,1 microg/l (n = 20), y la AUC 0-4,5h media fue de 104,4 ng x h/ml (n = 5). De nuevo, se encontró una gran variabilidad interindividual en la Cmax (entre 6,2 y 117,8 microg/l), lo cual obligaría a administrar el fármaco de forma intravenosa si se quieren conseguir concentraciones plasmáticas uniformes. Como era de esperar, la Cmax y la AUC 0-4,5h fueron dosis dependientes, pero no así el tiempo hasta la concentración máxima del fármaco (Tmax) y la semivida de eliminación (t_{1/2}), que varía entre 0,8 y

2,3 horas²⁵⁷. En seis casos la eliminación de la droga en plasma describió una única curva, pero en otros 4 la curva fue bifásica. No se encontraron diferencias en la C_{max} al comparar edades o sexos.

En cuanto a la administración intravenosa del fármaco en humanos, se ha demostrado que la t_{1/2} es menor que para la administración oral, de 0,8 a 1,8 horas respectivamente²⁵⁴. La eliminación también varía, invirtiendo la recuperación del fármaco en orina/heces de un 20/71% después de la administración oral frente a un 60/34% en caso de la inyección intravenosa, lo cual se ha corroborado en otros estudios²⁵⁸. También se ha empleado dosis de 20 mg i.v. del fármaco como dosis única en pacientes en hemodiálisis, sin que se hayan observado efectos secundarios²⁵⁹.

La eliminación de PRAV sigue las rutas hepática y renal, donde la secreción tubular es el mecanismo predominante²⁵⁵. De esta manera, cuando se administra por vía oral, aproximadamente el 20% de la dosis oral radiomarcada se elimina por orina y el 70% por heces²⁵⁴. Los metabolitos más importantes son producidos por degradación química en el estómago en un metabolito 3-alfa-hidroxi-isomérico vía reacciones fase II y muy escasamente por metabolismo dependiente de citocromo p-450 del hígado^{184,255}. La simvastatina, lovastatina, cerivastatina y atorvastatina son metabolizadas en el hígado primariamente por el citocromo P450-3A4 (reacciones fase I). Por el contrario, fluvastatina es metabolizada principalmente por el citocromo P450-2C9, raramente utilizado por otros fármacos, por lo que junto a la PRAV es la droga que menos problemas de aumento de biodisponibilidad presenta por interacción con otros fármacos²⁶⁰.

Dadas estas características metabólicas, las estatinas son frecuentemente susceptibles de interacciones cuando se administran con fármacos que utilizan sus mismas vías metabólicas, como ciclosporina A, tacrolimus, mibefradil, o nefazodona, digoxina, warfarina, niacina o eritromicina¹⁸⁴. Por ello, se ha descrito que la PRAV aumenta sus niveles plasmáticos cuando se administra concomitantemente con ciclosporina con aumentos en la biodisponibilidad de entre 5 y 23 veces²⁶⁰. Sobre todo debido a este mencionado aumento de biodisponibilidad puede producir daño muscular que se refleja como miositis, mialgias y rabdomiólisis, así como de hepatotoxicidad, dos de los efectos secundarios más temibles de estos fármacos. De todos modos, la PRAV no se acumula con el tiempo, lo que hace muy rara la incidencia de miositis cuando se administran ambos tratamientos²⁶¹. Además, dado su carácter hidrofílico, las concentraciones que alcanza en el músculo esquelético son menores que para el caso de la estatinas lipofílicas como la simvastatina o la lovastatina²⁶². De hecho existen estudios específicamente diseñados para su administración en pacientes transplantados en tratamiento con ciclosporina sin que se hayan evidenciado elevaciones de las transaminasas ni signos de miositis²⁶². En un estudio en el que se comparaba la seguridad de simvastatina y PRAV en este

tipo de pacientes²⁶³, sólo se demostró aparición de miositis con el primero y no con PRAV, con una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,032$).

A pesar de ello, se ha observado un aumento de la incidencia de miositis o miopatía en pacientes tratados con PRAV concomitantemente con ciclosporina, eritromicina, derivados del ácido fíbrico y ácido nicotínico. La asociación gemfibrozilo-PRAV se ha mostrado segura en 83 pacientes seguidos durante una media de 4 años, con un caso de miopatía y tres elevaciones transitorias de la CPK que se resolvieron espontáneamente²⁶⁴.

Los mecanismos por los cuales las estatinas producen alteraciones musculares (rabdomiólisis y miositis) no están del todo claros, y podrían ser¹⁸⁴:

- La depleción de colesterol intracelular puede afectar a las propiedades eléctricas de las membranas celulares y comprometer su integridad. Ello puede conllevar un aumento del influjo de calcio a su interior y a una interferencia con la contractilidad de las miofibrillas.
- La inhibición del ácido mevalónico y sus metabolitos podrían resultar en la depleción de productos que son necesarios para la síntesis proteica, la transducción intracelular de señales y el metabolismo. Ello podría generar finalmente una disminución de las reacciones de transferencia de energía mitocondrial.

Por su parte, la hepatotoxicidad parece estar mediada directamente por la propia inhibición de la HMG-CoA reductasa, ya que se puede limitar mediante la administración de ácido mevalónico²⁶².

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La **hipótesis** del estudio es que la administración oral en humanos del inhibidor de la hidroximetilglutaril CoA reductasa, la estatina hidrofílica **pravastatina** a dosis elevadas en rango terapéutico en monodosis antes de una intervención de revascularización coronaria con CEC es capaz de reducir el **daño miocárdico** inducido por la ISQ/REP y la **respuesta inflamatoria sistémica** producidas por la derivación cardiopulmonar y el pinzamiento aórtico reflejados por diferentes marcadores clínicos y analíticos en pacientes con hiperlipidemia tratada de manera crónica con estatinas.

Los **objetivos principales** de este estudio son:

- Analizar la eficacia de la PRAV en la reducción del daño miocárdico perioperatorio inducida por la ISQ/REP del corazón.
- Analizar la eficacia de la PRAV en la reducción de la intensidad de la respuesta inflamatoria sistémica desencadenada por la CEC.

Como **objetivos secundarios**, debido a la importante limitación metodológica que genera el pequeño tamaño muestral estudiado, se pretende analizar la seguridad de la administración preoperatoria de PRAV, expresada como:

- Ausencia de efectos secundarios atribuibles a la administración del fármaco.
- Ausencia de mayor morbi-mortalidad en términos de:
 - Mortalidad hospitalaria (a 30 días).
 - IAM perioperatorio.
 - Arritmias postoperatorias.
 - Necesidad de inotrópicos y balón de contrapulsación.
 - Tiempos de estancia postoperatoria en UCI y hospitalización.

3. UTILIDAD PRÁCTICA DE LOS RESULTADOS

La confirmación positiva de la hipótesis del trabajo y de los objetivos del estudio supondría:

- 1) Una mejoría en la calidad de la asistencia a los pacientes sometidos a cirugía cardiaca bajo CEC con pinzamiento aórtico con una reducción en la mortalidad y morbilidad. Los pacientes con un beneficio potencialmente mayor serían aquellos de más riesgo, es decir, aquellos con depresión de la función ventricular y/o con isquemia o IAM en evolución o aquellos en los que cabría esperar una respuesta inflamatoria sistémica intensa como consecuencia de tiempos de derivación cardiopulmonar prolongados o procesos proinflamatorios concomitantes (endocarditis, cirugía de las complicaciones de IAM, isquemia/ IAM en evolución, etc.).
- 2) Un importante fundamento científico para el inicio de ensayos clínicos que incluyesen a la PRAV como componente de las soluciones cardiopléjicas, en especial en el contexto del trasplante cardiaco. Con ello se conseguiría:
 - Aumentar el tiempo de isquemia "seguro" del corazón donante, que actualmente se considera de unas 4 horas y que limita notablemente las posibilidades de trasplantar a pacientes que estén a distancias largas de su potencial órgano donante.
 - Disminuir la incidencia de fracaso primario del injerto, primera causa de muerte precoz en este tipo de pacientes.
- 3) Una nueva evidencia de la acción beneficiosa de las estatinas sobre el endotelio vascular y sobre el proceso inflamatorio independiente de su acción hipolipemiante, que apoyaría la ampliación del uso de estos fármacos en pacientes con enfermedad aterosclerótica pero sin hiperlipidemia.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

RACIONALIZACIÓN DEL DISEÑO DEL ESTUDIO Y CRITERIOS DE INCLUSIÓN

El estudio se ha llevado a cabo de modo **prospectivo, aleatorizado, controlado por placebo y doble ciego**. Se han incluido 20 pacientes con hiperlipidemia en tratamiento con estatinas lipídicas de manera crónica intervenidos bajo CEC con pinzamiento aórtico por el Servicio de Cirugía Cardíaca del Hospital Universitario de Salamanca. El tratamiento previo con estos fármacos aseguraban un control adecuado de la función endotelial de manera crónica. Por otro lado, dada la profusión del tratamiento con estatinas en este tipo de pacientes, este diseño garantiza la reproducibilidad de los resultados en la población más habitual intervenida por esta patología, tratados de manera prácticamente constante con estatinas.

Todos los pacientes han sido intervenidos por el mismo equipo quirúrgico siguiendo los protocolos asistenciales del Servicio.

La **dosis**, obligatoriamente, debía ser una dosis utilizada y contrastada en la clínica. Las dosis orales eficaces experimentales han sido muy variables, pero han llegado a ser de hasta 15 mg/kg¹⁹¹. La dosis máxima terapéutica más habitual es de 40 mg al día (aproximadamente 0,5 mg/kg para un adulto de 70-80 kg de peso). Sin embargo, se han empleado dosis de 20 mg iv en pacientes en hemodiálisis sin efectos secundarios²⁵⁹, la cual equivale, considerando su biodisponibilidad después de administración oral (18%²⁵⁴), a una dosis de 110 mg. Dado que los efectos sobre la producción de NO son dosis-dependiente se consideró estudiar el efecto de las dosis más elevadas usadas en la clínica de este tipo de fármacos, es decir, 80 mg. Para evitar potenciación de los efectos secundarios por niveles séricos excesivamente elevados en el momento de la cirugía y disminuir el sesgo de mezclar diferentes estatinas (hidrofílicas y lipofílicas) en sangre en el momento del insulto isquémico e inflamatorio se suspendió la dosis de estatina que el paciente tomaba el día antes de la cirugía.

En cuanto al **momento de administración**, Lefer y cols.²⁰⁸ administraron la dosis de estatina 18 horas antes del episodio isquémico. Bell et al han demostrado, sin embargo, que la administración de atorvastatina en el mismo momento de la reperfusión también consigue el efecto protector sobre el miocardio¹⁵⁹. Dado que alcanza niveles plasmáticos máximos en 1-1,5 horas desde su administración oral²⁴⁹ se ha administrado a los pacientes 2 horas antes de la inducción anestésica para asegurar una completa absorción y una concentración en plasma óptima en el momento del inicio de la isquemia.

El grupo de **candidatos** debía ser lo más homogéneo posible en cuanto a su patología y a su posible respuesta al daño por reperfusión, por lo que era

aconsejable incluir un solo tipo de procedimiento. Los pacientes a los que se va a incidir el miocardio (patología valvular mitral o tricúspide, comunicaciones interauriculares, etc.) presentan elevaciones fisiológicas de los marcadores de daño miocárdico por la lesión muscular que producen esas incisiones, por lo que se reduciría el valor de dichas determinaciones. Por su parte, los pacientes con patología valvular aórtica van a tener una fisiopatología diferente según sea la enfermedad de base (predominio de hipertrofia miocárdica en caso de la estenosis y de dilatación ventricular en caso de insuficiencia), por lo que la respuesta a la ISQ/REP miocárdica puede ser variable. Además, la manipulación y lesión de grandes superficies de endotelio con la apertura de cavidades cardiacas o de grandes vasos artefactaría todas las determinaciones analíticas relacionadas con la activación de las células endoteliales y su relación con los leucocitos. Por tanto, el subgrupo de pacientes intervenidos de revascularización coronaria aislada se ha considerado el más adecuado. La lesión miocárdica mecánica iatrogénica es mínima y la fisiopatología de los pacientes es homogénea.

Los pacientes se distribuyeron, de forma prospectiva, randomizada y doble ciego, en **dos grupos**:

- **Grupo Estudio (grupo E, n = 10):** pacientes a los que se administró el fármaco, 80 mg de PRAV, 2 horas antes del procedimiento.
- **Grupo placebo (grupo P, n = 10):** pacientes a los que se administró placebo igualmente 2 horas antes del procedimiento.

Adicionalmente se realizaron determinaciones analíticas basales a 4 **voluntarios sanos** sin factores de riesgo cardiovascular como referencia para poder contrastar respecto a ellos el estado proinflamatorio de los pacientes incluidos en la intervención y poder tomar como referencia su valor de porcentaje de densidad de banda (% δ banda) obtenido en los estudios de iNOS, moléculas de adhesión celular (sCD18, sP-selectina, sICAM-1 y sL-selectina) y factor transcripcional NF κ B (I κ B) tal y como se detallará más adelante en la descripción de los Métodos.

El estudio ha sido autorizado por la **Comisión de Ética** del Hospital Universitario de Salamanca. Todos los pacientes candidatos fueron informados del contenido y objetivos del estudio, así como de los riesgos a los que serían sometidos y los posibles beneficios que se intentaban obtener. Tras ello dieron su consentimiento informado por escrito en plena capacidad de sus facultades, sin presión externa alguna para su inclusión en el mismo y con la absoluta confianza y libertad para poder abandonar el estudio en el momento en que ellos lo desearan sin que ello supusiera la más mínima merma en la calidad asistencial recibida.

Cada paciente candidato fue informado en nuestra Consulta Externa en el momento de su inclusión en lista de espera para cirugía o en la Planta de

Hospitalización en el momento de su ingreso para la cirugía. Su inclusión en el estudio se efectuó sólo después de su ratificación por escrito del consentimiento informado.

El día antes de la cirugía el paciente fue aleatorizado a uno de los grupos por una persona ajena a la recogida y análisis de datos, quien entregó la medicación correspondiente (PRAV o placebo) a la enfermera responsable del paciente para su administración en el momento indicado. La medicación iba debidamente envasada para la imposibilidad de su diferenciación por el paciente y el resto del equipo quirúrgico y, con el mismo objetivo, el comprimido que contenía placebo era totalmente indistinguible del fármaco activo.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Los **criterios de exclusión** han sido:

1) Previos a la randomización:

- Pacientes bajo tratamiento crónico con PRAV para evitar interferencia o potenciación de los efectos del fármaco/placebo por niveles séricos de fármaco residuales.
- Pacientes con inestabilidad hemodinámica en el momento del procedimiento (shock o EAP de origen cardiaco), tratamiento inotrópico y/o BIACP.
- Procedimientos emergentes o urgentes que no permitieran la administración del fármaco el número de horas previas protocolizadas o la realización de las determinaciones analíticas necesarias.
- Pacientes con angina de reposo menos de 48 horas antes del procedimiento.
- Insuficiencia renal y/o hepática preoperatoria.
- Hipersensibilidad a la PRAV o a cualquier componente del preparado.
- Pacientes bajo tratamientos farmacológicos que pudieran potenciar los posibles efectos secundarios de la PRAV: ciclosporina, eritromicina o claritromicina, derivados del ácido nicotínico o fibratos.
- Antecedentes de ingesta de más de 80 gramos de etanol al día.
- Pacientes embarazadas.
- Denegación del consentimiento informado.

2) Posteriores a la randomización:

- Imposibilidad de canulación del seno coronario durante el procedimiento que hiciera imposible la recogida de muestras.
- Signos de isquemia miocárdica aguda previa al pinzamiento aórtico.

- Muerte durante el procedimiento previa a la reperfusión y/o a la toma de las muestras de seno coronario/sangre periférica post-reperfusión.

VARIABLES

Para cada paciente se recogieron una serie de variables de manera prospectiva y sistemática.

Variables clínicas

Las variables clínicas recogidas fueron:

- Mortalidad quirúrgica, definida como éxitus de cualquier causa en los 30 días siguientes a la intervención o durante el ingreso hospitalario aunque se produjera más allá de esos 30 días.
- IAM perioperatorio, definido como la elevación de CPK-MB por encima de un 10% de la CPK total junto a aparición de ondas Q nuevas en el ECG y/o alteraciones segmentarias de la contractilidad por ecocardiografía.
- Arritmias cardiacas perioperatorias, bien ventriculares (taquicardia ventricular o fibrilación ventricular) o auriculares (taquicardias supraventriculares, flutter auricular o fibrilación auricular).
- Necesidad de inotrópicos (necesidad de dobutamina o dopamina a dosis beta-adrenérgicas durante más de dos horas o de adrenalina) y/o balón de contrapulsación perioperatorios.
- Tiempos de intubación endotraqueal, estancia en UCI y hospitalaria postoperatoria global.

Variables analíticas

Además se realizaron una serie de determinaciones analíticas específicas encaminadas a cuantificar el daño por ISQ/REP miocárdicas, la respuesta inflamatoria sistémica y los posibles efectos secundarios del fármaco.

Las concentraciones séricas esperables de la droga tras administración de dosis clínicas de fármaco iban a ser significativamente menores que las alcanzadas por vía endovenosa en los estudios experimentales. Por otro lado los efectos sobre el miocardio han demostrado ser dosis-dependiente. Por todo ello las pruebas a realizar para demostrar un efecto beneficioso debían ser altamente específicas y sensibles para la detección de las diferencias en el daño por ISQ/REP y en la respuesta inflamatoria.

Durante la cirugía coronaria en nuestro Centro se canaliza sistemáticamente el seno coronario para administración de cardioplejia por vía retrógrada. Las

extracciones de muestras sanguíneas del mismo son capaces de proporcionar una estimación directa del metabolismo y las alteraciones endoteliales cardíacas producidas durante la ISQ/REP cardíaca, así como de los cambios leucocitarios al paso por la microvasculatura tisular del miocardio.

Las determinaciones analíticas sanguíneas que se realizaron fueron:

1. Muestra preoperatoria: se extrajo aproximadamente 24 horas antes de la cirugía (sangre venosa periférica) para la determinación de:

- Hemograma completo⁽²⁾, con determinación de hemoglobina, hematocrito, recuento de glóbulos rojos, hemoglobina corpuscular media y su concentración, recuento de leucocitos y plaquetas y fórmula leucocitaria.
- Bioquímica sanguínea⁽²⁾: glucosa, creatinina, urea, sodio, potasio, bilirrubina (BR) total, BR directa, AST, ALT, GGT, LDH, amilasa, proteínas totales, albúmina, CPK, CPK-MB, Tn-I, colesterol, triglicéridos, LDL colesterol, HDL colesterol, ratio LDL/HDL y PCR.
- Coagulación⁽²⁾: APTT, actividad de protrombina, INR, fibrinógeno.

2. Muestras intraoperatorias de sangre del seno coronario antes de la entrada en CEC y a los 30 minutos del despinzamiento aórtico para la determinación de:

- ⁽²⁾Ácido láctico (también realizada a los 2 minutos del despinzamiento y simultáneamente en sangre arterial periférica antes del procedimiento y a los 2 y 30 minutos del despinzamiento aórtico).
- ⁽¹⁾Radicales libres: O₂⁻.
- ⁽¹⁾Citoquinas (TNF- α , INF- γ , IL-10).
- ⁽¹⁾Moléculas de adhesión celular solubles (sICAM-1, sP-selectina, sL-selectina y sCD18), iNOS, NO y factor transcripcional (NF κ B).

3. Muestras postoperatorias de **sangre venosa** para la determinación de:

- ⁽²⁾CPK, CPK-MB y Tn-I al ingreso, cada 8 horas durante las primeras 48 horas, a los 5 días postoperatorios y a los 30 días.
- ⁽²⁾PCR, BR total, directa, AST y ALT al ingreso y cada 8 horas durante 48 horas, a las 72 horas, a los 5 días y a los 30 días postoperatorios.
- ⁽¹⁾Radicales libres: O₂⁻ a las 24 horas y al 5º día.
- ⁽¹⁾Citoquinas (TNF- α , INF- γ , IL-10) a las 24 horas y al 5º día.
- ⁽¹⁾Moléculas de adhesión celular solubles (sICAM-1, sP-selectina, sL-selectina y sCD18), iNOS y NO a las 24 horas y al 5º día, y factor transcripcional (NF κ B) a las 24 horas

MANEJO DE LAS MUESTRAS SANGUÍNEAS Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

Las muestras de sangre se manejaron de diferente modo según el tipo de muestra de que se tratara.

Anión superóxido, citoquinas, moléculas de adhesión celular soluble, óxido nítrico sintasa inducible, óxido nítrico y factor transcripcional⁽¹⁾

Este subgrupo de muestras tipo⁽¹⁾ se procesaron en los Laboratorios de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca. Los sistemas y dispositivos empleados para ello fueron:

- Balanza de precisión: Precisa 205^a.
- Balanza Sartorius T2101.
- Balanza Sartorius T6101.
- Baño de agua: Lauda Ecoline Re 120.
- Sistema de purificación de agua Millipore Elix 3.
- Agitador orbital: Cole Parmer Rocker Platform.
- Agitador magnético: Raypa AG-2.
- Agitador calefactado: Eppendorf Mixmate.
- pHmetro: Oaktlon ph 510 series.
- Congelador -80C: Forma Scientific -86 freezer.
- Centrífuga refrigerada Eppendorf 5417R.
- Centrífuga Eppendorf miniSpin.
- Homogeneizador: Glas Col GKH.
- Sonicador Sonics Vibra Cell Tm.
- Esterilizador: Amprolene AN74i.
- Autoclave: Raypa Steam Sterilizer.
- Sellador de bolsas de autoclave: Selecta Sealcom 600.
- Campana de flujo laminar TELSTAR CV-30/70.
- Sistema de anestesia por gases Matrix.
- Estufa Heraeus E42.
- Baño de ultrasonidos Branson 2510.
- Contenedor de nitrógeno líquido con sistema de administración THERMO.
- Equipo automatizado de pipeteo Eppendorf opMotion 5057.
- Espectrofotómetro Unicam Helios α .
- Lector de placas Thermo Electro Corporation Multiskan ascent.
- Equipo de Western Blot: BIO-RAD Miniprotean.
- Equipo de revelado / y análisis de imagen ImageQuant RT ECL de GeneralElectrics.
- Analizador automático Hitachi 747-200 (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN).

RADICALES LIBRES DEL OXÍGENO

Las muestras fueron procesadas mediante su introducción en tampón de homogeneizado (fosfato potásico monobásico 0,05M y ácido etileno diamino tetracético (EDTA) 1mM, solución a la que se añadió colato sódico al 0,25% (1+19); pH 7,8) a una temperatura entre 0 y 4° C para minimizar los procesos oxidativos. Posteriormente fueron pesadas y homogeneizadas con el tampón anteriormente descrito, según la proporción (1/10, Peso/Volumen). El homogeneizado se centrifugó a 100,000 g durante 60 minutos, a una temperatura de 4°C. La fracción soluble que se obtuvo se dividió en alícuotas y se congeló a -80° C hasta el momento de su estudio.

La técnica de determinación del ritmo de producción del O_2^- es modificación de la descrita por Boveris y Forman para mitocondrias y se basa en la reducción del citocromo C por el radical superóxido. Esta reducción del citocromo C no es, naturalmente, específica para este radical. Esta especificidad es conferida por el uso de SOD, para lo cual el radical superóxido es el único sustrato conocido. De acuerdo con esto, el ensayo se realiza con y sin SOD, y únicamente la reducción del citocromo C inhibida por SOD se usa para calcular la producción de O_2^- . Esta reducción del citocromo C se sigue espectrofotométricamente a 550 nm de λ . Para ello se precisaron los siguientes reactivos:

- Tampón fosfato-potásico 0,1 M+0,1 mM EDTA ; pH 7,8.
- Citocromo C 75 μ M.
- SOD (aproximadamente 240 U).

La lectura espectrofotométrica se realizó a 550 nm de λ ; pH 7,8 y temperatura de 25° C durante 1 minuto con intervalos de 6 segs. en cubetas de 1 ml, con un paso de luz de 1 cm. Nuestros resultados se expresaron en nmol de O_2^- / mg prot. / minutos. El incremento de unidades de absorbancia en la mezcla de la reacción se convierte en nmol de O_2^- con el coeficiente de extinción molar: $\Delta E_{550} / 21,0 \times 10^3 M^{-1} cm^{-1}$. Esta conversión depende del supuesto de que el citocromo C en la cubeta de referencia está totalmente oxidado y, por tanto, de que el incremento de absorbancia observada representa únicamente la absorbancia del producto reducido (Δ absorbancia: reducido - oxidado). Tras el establecimiento de las condiciones óptimas, en la cubeta de referencia se añadieron 100 μ l de citocromo C (75 μ M), 20 μ l de SOD (aproximadamente 264 U) y 25 μ l de muestra. La diferencia de volumen hasta 1.000 μ l se completó con tampón fosfato potásico + EDTA. En la cubeta de referencia se sustituyó el volumen de tejido por uno equivalente de tampón. Se registró la lectura a 550 nm de λ en 2 fases:

1ª fase: Reducción del citocromo C inespecífica: sin SOD.

2ª fase: Reducción del citocromo C independiente del superóxido: con SOD.

La pendiente máxima se registró en el primer minuto. La temperatura fue de 25° C y pH de 7,8.

CITOQUINAS: TNF- α , INF- γ E IL-10

Para la determinación del TNF- α , INF- γ e IL-10 utilizamos los kits comerciales DuoSet ELISA Development System human TNF- α /TNFSF1A, R&D SYSTEMS, DuoSet ELISA Development System human IFN- γ , R&D SYSTEMS y DuoSet ELISA Development System human IL-10, R&D SYSTEMS respectivamente, basados en la técnica de ELISA específico para seres humanos. Utilizamos muestras sanguíneas no hemolizadas. Inmediatamente después de su extracción, fueron centrifugadas extraído el suero, dividido en alícuotas y congeladas a -80°C.

Estos kits (tipo ELISA) emplean múltiples anticuerpos con el principio de "sandwich". En primer lugar se utilizó un plato con 96 pocillos con un anticuerpo monoclonal anti-TNF- α , anti-INF- γ o anti-IL-10 según el caso, adherido en cada uno de ellos para capturar el TNF- α , INF- γ o IL-10 presentes en las muestras y estándares que se añadieron por duplicado en cada uno de los pocillos junto con los blancos correspondientes. Después de lavar el plato para eliminar el material no adherido se añadió una peroxidasa conjugada policlonal anti-TNF- α , anti-INF- γ o anti-IL-10 según la determinación. A continuación el plato fue lavado de nuevo para eliminar el material no adherido y se agregó la solución sustrato que inició la catalización de la peroxidasa. El cambio de color se detuvo por acidificación.

La absorbancia fue medida a 450 nm λ siendo los resultados obtenidos proporcionales a las cantidades de TNF- α , INF- γ o IL-10 de las muestras, las cuales fueron calculadas por interpolación con la curva estándar. Los resultados se expresaron en pg/ml para todos ellos.

MOLÉCULAS SOLUBLES DE ADHESIÓN CELULAR (SELECTINAS, ICAM-1 Y CD18), iNOS Y NF κ B

La extracción de proteínas de grupos celulares se efectuó a 4°C, utilizando el siguiente tampón de lisis (1 mL por 100 mg de tejido): HEPES 25 mM, pH 7,5; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM; IGEPAL CA-630 1%; Glicerol 10%; MgCl₂ 10 mM; desoxicolato sódico 0,25%. A él se añadieron inhibidores de proteasas: aprotinina 10 μ g/ml, leupeptina 10 μ g/ml y fluoruro de fenilmetil sulfonilo (PMSF) 10 mM e inhibidores de fosfatasa: ortovanadato sódico Na₂VO₄ mM y fluoruro sódico 25mM.

Se procedió a la homogenización de las muestras, se mantuvieron entre 30-60 minutos en hielo y a continuación, el lisado tisular, se centrifugó durante 25 minutos a 12000g y a 4°C. Después de la centrifugación se recogió el sobrenadante y se

congeló a -80°C hasta el momento de su utilización. Una alícuota se utilizó para la determinación de la concentración de proteínas.

Para la cuantificación de las proteínas tisulares, las muestras fueron diluidas (1:20) en tampón de lisis y se utilizó un kit de Bio-Rad, basado en el método de Lowry. La reacción se llevó a cabo en placas de 96 pocillos (Microtest™ 96, Becton Dickinson Labware, NJ, EEUU) utilizando $5\ \mu\text{L}$ tanto para las muestras como para la recta patrón. Cada una de las medidas se realizó por triplicado. Se elaboró previamente una curva de calibrado a partir de soluciones patrón de concentración conocida de BSA. A continuación se añadieron $25\ \mu\text{L}$ del reactivo A (suplementado con $20\ \mu\text{L}$ del reactivo S por cada mL reactivo A, ya que las muestras contenían detergente IGEPAL CA-630), posteriormente se añadieron $200\ \mu\text{L}$ del reactivo B. La mezcla se incubó al menos 15 minutos y se midió la absorbancia a $750\ \text{nm}$.

La separación de las proteínas mediante electroforesis se basó en el método de Laemmli.

Las proteínas se cargaron en un gel de $1,5\ \text{mm}$ de espesor de Tris-glicina-poliacrilamida que contenía un gel de carga al 17% de acrilamida mix (acrilamida 29,2%, bis-acrilamida 0,8%) y un gel de separación de acrilamida mix de un grosor variable, según el tamaño de la proteína y el volumen de muestra a cargar, también se cargó un marcador de pesos moleculares (Low / Broad range, Bio-Rad Laboratories, CA, EEUU o BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder, Invitrogen Corporation, CA, EEUU).

La cantidad de extracto tisular usado fue de $200\ \mu\text{g/pocillo}$, cada muestra se mezcló con un volumen igual de tampón de carga (1% 2-mercaptoetanol, 2% dodecil sulfato sódico (SDS), 10% glicerol, 125 mM Tris pH 6,8, azul de bromofenol 0,0005% p/v), desnaturalizándose las proteínas a 100°C durante 5 minutos y posteriormente depositando en los pocillos sin muestra una pequeña cantidad de tampón de carga, y rellenando el espacio restante de todos los pocillos con tampón de electroforesis (glicina 192 mM, SDS 0,1%, Tris base 25 mM, pH 8,3). La electroforesis se efectuó en tampón de electroforesis aplicando un voltaje constante de 100 V.

Las proteínas separadas e incluidas en el gel de acrilamida se transfirieron a una membrana. La transferencia se realizó en una cubeta con solución de transferencia (glicina 190 mM, Tris 20mM pH 8,3) manteniendo un amperaje constante de 400 mA, habiendo embebido previamente el material (papeles secantes y esponjas) y equilibrado el gel y la membrana de nitrocelulosa (Hybond-ECL Amersham Biosciences) en el tampón de transferencia durante 15 minutos.

Una vez finalizada la transferencia, la membrana se lavó con tampón de lavado TTBS (TWEEN-20 0,1% v/v; NaCl 150 mM; 20 mM Tris pH 7,5) e inmediatamente

se incubó con 10 mL de tampón de bloqueo en agitación constante, para evitar uniones inespecíficas durante la inmunodetección. La incubación con el anticuerpo primario, a la dilución y temperatura adecuada en el tampón correspondiente en agitación constante, se realizó durante tiempos diferentes dependiendo de cada proteína. Tras la incubación con el anticuerpo primario se hicieron 4 lavados de 5 minutos con tampón de lavado, y posteriormente se incubó la membrana con el correspondiente anticuerpo secundario a la dilución adecuada durante tiempos variables para cada proteína. Al terminar se hicieron otros 4 lavados de 5 minutos con tampón de lavado.

La detección de las bandas específicas de las distintas proteínas se realizó mediante un ensayo de quimioluminiscencia, para lo cual se utilizó una mezcla de unas soluciones de revelado comercial (Amersham Biosciences, Reino Unido) en una proporción 1:1. Se mantuvo en agitación constante durante 1 minuto a temperatura ambiente y a continuación se desechó la solución de revelado. Seguidamente se colocó la membrana en una cámara para capturar la imagen (ImageQuant RT ECL imager, GE Healthcare).

Una vez capturada la imagen fue cuantificada la densidad óptica de las bandas obtenidas con el programa *ImageQuant TL software*. Después de cada determinación, se realizó un "stripping" con una solución comercial (Re-Blot Plus Strong Antibody Stripping Solution, Chemicon International, CA, EEUU), para posteriormente cuantificar la α -tubulina, que se utilizó como control de carga.

Realizamos estudios de iNOS, de diferentes moléculas de adhesión celular (sCD18, sP-selectina, sICAM-1 y sL-selectina) y para el factor transcripcional NF κ B (I κ B). Por defecto, al resultado obtenido en el grupo simulado (pacientes sanos) se les asignó el 100% y al resto de los grupos se asignaron valores porcentuales en relación con este. Los resultados se expresaron en % de densidad de banda.

ÓXIDO NÍTRICO

Para la determinación de NO se utilizó un método indirecto, cuantitativo y colorimétrico basado en la reacción de Griess. Utilizando las muestras de suero, se separaron 500 μ L de sobrenadante de cada pocillo y se mezclaron con 250 μ L de reactivo de Griess (sulfametacina 1% y dihidrocloruro de naftil-etilen-diamida 0,1% en ácido ortofosfórico al 2,5%). Después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 560 nm. La concentración de nitritos se calculó interpolando en una recta patrón de concentraciones crecientes de nitrito sódico. Los resultados se expresaron en micromoles.

Muestras para determinaciones analíticas convencionales

Las determinaciones analíticas convencionales tipo⁽²⁾ fueron procesadas de manera convencional por el Laboratorio del Servicio de Análisis Clínicos de nuestro Hospital. Incluyeron hemograma (hemoglobina, hematocrito, recuento de glóbulos rojos, hemoglobina corpuscular media y su concentración, recuento de leucocitos y plaquetas y fórmula leucocitaria), bioquímica sanguínea (glucosa, creatinina, urea, sodio, potasio, bilirrubina (BR) total, BR directa, AST, ALT, GGT, LDH, amilasa, proteínas totales, albúmina, CPK, CPK/MB, Tn-I, colesterol, triglicéridos, LDL colesterol, HDL colesterol, ratio LDL/HDL y PCR), coagulación (APTT, actividad de protrombina, INR, fibrinógeno) y ácido láctico.

PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO

Tras la preparación del campo quirúrgico de manera convencional y tras antisepsia de la piel con povidona iodada al 10% se procedió a la esternotomía media, disección de la grasa tímica y apertura en T invertida del pericardio parietal anterior. Tras el estudio de la anatomía coronaria y la planificación de la estrategia quirúrgica se procedió a la disección de los injertos coronarios.

Se disecó sistemáticamente la arteria mamaria interna izquierda de manera pediculada *in situ* para revascularizar la arteria descendente anterior y, en ocasiones, ramas diagonales. Se disecó la arteria mamaria interna derecha de manera esqueletizada, normalmente libre, la arteria radial y/o la vena safena interna para revascularizar el resto de los territorios. Como estrategia general se utilizó la vena safena interna para revascularizar estos territorios en pacientes mayores de 70 años. En pacientes con edad igual o inferior a los 70 años se empleó la arteria mamaria interna derecha libre o la arteria radial libre del brazo no dominante para revascularizar el territorio diagonal y/o circunflejo y la arteria radial o la vena safena interna para revascularizar el territorio dependiente de la arteria coronaria derecha. Se contraindicó la utilización de la arteria radial en arterias coronarias diana con lechos distales de calibre menor de 1,5mm o con estenosis menores del 70% del diámetro de la luz del vaso independientemente del territorio. Se contraindicó el uso de arteria mamaria interna bilateral en los pacientes diabéticos.

Después de la disección de los injertos se procedió a la heparinización sistémica del paciente con una dosis inicial de 3 mg/kg de peso y para conseguir un tiempo de coagulación activado (ACT) superior a 450 segundos. Se procedió a administrar dosis adicionales de heparina sódica en los casos con ACT inferiores.

Todos los pacientes fueron intervenidos con CEC mediante bomba centrífuga (Stöckert SIII, Alemania) con hipotermia moderada (30-32°C) mediante canulación

arterial en aorta ascendente (Stöckert, Alemania) y venosa en la orejuela derecha mediante cánula única atriocava (Medtronic, EEUU). Se implantó un catéter en la cara anterior de la aorta ascendente media para administración de cardioplejia anterógrada (Jostra, Alemania) y posteriormente para aspiración de la raíz aórtica y deaireación cardiaca, y otro en el seno coronario para administración de cardioplejia retrógrada y toma de muestras sanguíneas directamente del seno coronario (RMI, EEUU). Tras la toma de la primera muestra sanguínea del seno coronario (muestra pre-CEC) se procedió a comenzar la CEC con flujos iniciales de 2,4 l/minuto/m², una presión arterial media objetivo por encima de 70 mmHg e hipotermia moderada con temperaturas de hasta 32°C.

Después del pinzamiento de la aorta ascendente entre la cánula de cardioplejia anterógrada y la cánula arterial se procedió a inducir la parada diastólica del corazón mediante cardioplejia hemática 4:1 fría a 10°C (Cobe Cardiovascular, EEUU). Se inició su administración por vía anterógrada y, después de conseguir la asistolia cardiaca, por vía retrógrada con presiones de seno coronario entre 20 y 40mmHg (entre 1000 y 1200cc en total según el peso del paciente y la rapidez del inicio de la asistolia). Se monitorizó sistemáticamente la temperatura miocárdica en el septo interventricular anterior para un mejor control de la correcta administración de cardioplejia al tejido miocárdico. Se consideró adecuada la inducción cardiopléjica cuando la temperatura del septo interventricular anterior alcanzó los 16°C o menos. En caso contrario se procedió a la administración de dosis adicionales de cardioplejia o a la revisión de la correcta implantación del catéter alojado en el seno coronario. Se administraron dosis adicionales de cardioplejia retrógrada hemática 4:1 fría cada 15 ó 20 minutos según la evolución del proceso quirúrgico.

Se realizaron posteriormente las anastomosis distales (entre los injertos y las arterias coronarias) mediante sutura continua de polipropileno 7/0 (vena safena) u 8/0 (arterias mamarias y radial). Al finalizar la última anastomosis distal se procedió al inicio del recalentamiento sistémico del paciente. Posteriormente y sin despinzar la aorta ascendente se procedió a realizar las anastomosis proximales entre los injertos coronarios y la aorta ascendente con sutura continua de polipropileno 6/0 (vena safena) o 7/0 (arteria radial o arteria mamaria). Siempre que fue posible se realizaron las anastomosis proximales de arteria radial y arteria mamaria sobre el extremo más proximal de otro injerto de vena safena anastomosado previamente en la aorta. Mientras se finalizaba la última anastomosis proximal se procedió a reperfundir de manera controlada el miocardio mediante una última dosis de cardioplejia hemática retrógrada, en este caso caliente (a temperatura sistémica). Finalmente se realizó el despinzamiento aórtico, y tras él se extrajo una nueva muestra sanguínea del seno coronario a los 30 minutos.

Tras comprobar la adecuada estanqueidad de las anastomosis realizadas y una adecuada curva de flujo coronario mediante medición ultrasonográfica (Medi-Stim, Noruega), y cuando las condiciones de temperatura, contractilidad y ritmo cardíacos y de equilibrio hidroelectrolítico lo permitieron se procedió a la emancipación de la CEC, a la retirada de cánulas y a la neutralización de la heparina con protamina. Después de realizar una hemostasia rigurosa se procedió a la implantación de tubos de drenaje, de cables de marcapasos epicárdicos temporales (2 en cara anterior de ventrículo derecho y, en los pacientes en ritmo sinusal preoperatorio, otros dos en la cara lateral de la aurícula derecha). Finalmente se realizó el cierre de la esternotomía por planos según técnica convencional.

MANEJO POSTOPERATORIO

Los pacientes fueron trasladados a la UCI bajo anestesia general y ventilación mecánica controlada por presión. Fueron sometidos a monitorización continua electrocardiográfica, del débito urinario y de la saturación arterial por pulsioximetría, así como a monitorización continua invasiva de la presión arterial sistémica y de la presión venosa central. La implantación preoperatoria de un catéter de arteria pulmonar se dejó a criterio del médico anestesista. Todos los pacientes fueron sometidos a control radiológico simple torácico mediante proyección posteroanterior al ingreso y cada 24 horas durante su ingreso en UCI. Una exploración adicional se realizó después de la retirada de los tubos de drenaje torácico, indicada cuando el débito fue $\leq 20\text{ml/h}$ durante al menos 4 horas seguidas. Se realizó ECG de 12 derivaciones al ingreso, cada 12 horas durante la estancia en UCI y cada 24 horas hasta el alta hospitalaria. Todos los pacientes fueron sometidos a monitorización electrocardiográfica continua mediante telemetría en la planta de hospitalización tras el alta de UCI durante al menos 24 horas. En todos los pacientes se inició la antiagregación plaquetaria mediante ácido acetil salicílico a dosis de 100mg al día en el momento en que se constató ausencia de sangrado significativo y a ser posible antes de las primeras 6-12 horas de ingreso. Del mismo modo, la noche siguiente a la cirugía se reinició el tratamiento con la estatina previa del paciente a las mismas dosis que estuviera tomando siempre que la tolerancia oral del paciente lo permitió. Como norma general y salvo contraindicaciones, se inició tratamiento con betabloqueantes beta-selectivos de manera sistemática la mañana siguiente a la cirugía para prevención de fibrilación auricular. El manejo de las complicaciones postoperatorias se llevó a cabo según los protocolos del Servicio.

RECOGIDA Y ANÁLISIS DE DATOS

Cada paciente aleatorizado fue incluido en un protocolo exhaustivo de recogida prospectiva de datos clínicos y analíticos perioperatorios distribuidos como sigue:

1. Datos de filiación y antecedentes personales cardiológicos y no cardiológicos: datos demográficos hospitalarios (apellidos y nombre, número de historia clínica), edad, sexo, peso y talla, existencia de factores de riesgo cardiovascular y su tratamiento/control (hipertensión arterial, diabetes mellitus, hiperlipidemia, tabaquismo), existencia de obesidad, hiperuricemia, enfermedad vascular periférica, enfermedad cerebrovascular, accidentes cerebrovasculares o tromboembolismos cerebrales o sistémicos previos, enfermedad pulmonar obstructiva crónica e insuficiencia renal (definida como cifra de creatinina preoperatoria mayor o igual a 1,5mg/dl).
2. Datos clínicos de la enfermedad cardiológica actual: antecedentes de IAM, tipo de angina actual, clase funcional para disnea según la clasificación de la *New York Heart Association -NYHA-*, clase funcional para angina según la *Canadian Cardiovascular Society -CCS-*.
3. Datos de las exploraciones preoperatorias: estudios preoperatorios habituales (analítica sanguínea, radiografía de tórax y ECG), ecocardiografía y cateterismo cardiaco, con definición del ritmo cardiaco de base preoperatorio, la extensión de la enfermedad coronaria, existencia de enfermedad del tronco de la coronaria izquierda, fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) determinada mediante ventriculografía izquierda.
4. Determinación del riesgo quirúrgico según las escalas de Euroscore y Parsonnet.
5. Datos analíticos rutinarios y específicos intraoperatorios y postoperatorios (protocolo descrito previamente).
6. Datos acerca del procedimiento quirúrgico y la CEC: tiempo total de cirugía, tiempo de CEC y de pinzamiento aórtico, número de dosis de cardioplejia, tiempo de isquemia real (tiempo absoluto del pinzamiento aórtico durante el cual no se administra cardioplejia hemática) y el tiempo medio de isquemia real (tiempo de isquemia real / nº de dosis de cardioplejia), número de derivaciones coronarias, tipo de injertos utilizados y extensión de la revascularización.
7. Datos clínicos de la evolución postoperatoria y de las complicaciones.
8. Datos clínicos del seguimiento quirúrgico (primer mes postoperatorio o hasta el alta del paciente en caso de ingresos más prolongados).

Los datos clínicos y analíticos fueron recogidos en una base de datos informática (*Filemaker Pro 5.0 Database, EEUU*). El análisis de datos se ha realizado mediante procesamiento estadístico con el programa informático SPSS (*SPSS Inc, EEUU*).

SEGURIDAD DEL ESTUDIO

La administración de PRAV a dosis terapéuticas es segura en seres humanos, tal y como se ha demostrado en múltiples estudios clínicos ya mencionados previamente. En el contexto en el que se quiere emplear, es decir, previamente a un insulto isquémico, se ha demostrado previamente que la utilización de estatinas es altamente beneficiosa para la reducción de eventos desfavorables y que, incluso, su interrupción puede ser deletérea en el proceso perioperatorio²⁰⁴⁻²⁰⁶. En algunos estudios experimentales se ha demostrado, sin embargo, que la administración de simvastatina a corto plazo (3 semanas) antes de un episodio isquémico puede potenciar el aturdimiento (también llamado "*stunning*") miocárdico en corazones de perro después de un episodio de isquemia a través de una depleción de ATP, con disminución de la fracción de acortamiento segmentaria. Estos eventos ocurren con significativa menor magnitud con la administración de PRAV o placebo²⁶⁵. Este hallazgo se ha confirmado de nuevo en otro estudio, también en perros, utilizando otros tres inhibidores de la HMG-CoA-reductasa lipofílicos, la fluvastatina, cerivastatina y atorvastatina. Todas ellas inducían, de nuevo, disminución de la función contráctil postisquémica y depleción de las reservas tisulares de ATP respecto a la PRAV (reductasa-inhibidor de carácter hidrofílico) y al placebo²⁶⁶.

En cuanto a las tomas de muestras del seno coronario varias evidencias demuestran la inocuidad de estas determinaciones para el paciente. Por un lado, durante todas las cirugías coronarias con CEC se realiza por protocolo canulación del seno coronario para la administración de cardioplejia por vía retrógrada, método estandarizado mundialmente para la protección miocárdica durante el pinzamiento aórtico y cuya utilidad está avalada por numerosos estudios desde hace décadas^{4,6,267}. Por tanto, las tomas de sangre venosa del seno coronario no requieren maniobras adicionales durante el procedimiento salvo por la lógica extracción de la cantidad de sangre necesaria para las determinaciones.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de la frecuencia de las variables cualitativas se ha reflejado como porcentajes. Dado el pequeño número de casos de cada grupo, para el análisis de las variables cuantitativas se ha realizado la prueba de Kolmogorov-Smirnov de manera sistemática para contrastar el ajuste de los datos a la distribución normal. Las variables en las que se ha demostrado seguir una distribución normal la tendencia central se han expresado como media +/- desviación típica (intervalo de confianza de la media al 95%). En el resto de las variables cuantitativas se ha reportado como mediana +/- amplitud intercuartil, marcadores más robustos de la tendencia central de la muestra y de su dispersión de la muestra que la media

aritmética y la desviación típica respectivamente. Los diagramas de caja expresan de manera convencional la mediana mediante una línea transversa horizontal en el interior de la caja. Los bordes superior e inferior representan los percentiles 25 y 75 respectivamente y las patillas superior e inferior los percentiles 10 y 90 respectivamente.

La comparación intergrupos de las variables cuantitativas se ha realizado mediante la prueba t de Student para variables con distribución normal y directamente mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para el resto. Se han considerado significativos valores de p menor de 0,05. Para hacer la determinación lo más potente posible e intentar neutralizar el efecto del pequeño tamaño muestral de los grupos y la implícita limitación en la aplicación de las pruebas de normalidad se han aplicado pruebas no paramétricas en todos los casos en los que las pruebas paramétricas arrojaban diferencias estadísticamente significativas. Finalmente se ha reportado únicamente este resultado y siempre como significación bilateral.

La comparación intergrupos de las variables cualitativas se ha realizado mediante el cálculo del coeficiente Chi-cuadrado de Pearson y se ha reportado la significación asintótica bilateral. Se ha considerado estadísticamente significativo un valor de p menor de 0,05. Cuando alguna de las frecuencias esperadas de la tabla de contingencia ha sido menor de 5 la comparación se ha realizado mediante el cálculo del estadístico de Fisher y se ha reportado, de igual manera, únicamente la significación exacta bilateral. Se ha considerado estadísticamente significativo un valor de p menor de 0,05.

5. RESULTADOS

Desde diciembre de 2002 hasta mayo de 2003 fueron incluidos en el estudio 20 pacientes candidatos a cirugía de revascularización coronaria aislada que fueron distribuidos de manera randomizada y doble ciego en dos grupos, el Grupo Estudio (grupo E, n = 10) y el Grupo Placebo (grupo P, n = 10). Ningún paciente requirió ser excluido del estudio por criterios intra- o postoperatorios.

COMPARACIÓN PRE- E INTRAOPERATORIA DE LOS GRUPOS

Variables clínicas preoperatorias

Los datos clínicos preoperatorios de los pacientes de ambos grupos están reflejados en la tabla 1.

Tabla 1. Variables clínicas preoperatorias. Datos clínicos

	Grupo E	Grupo P (placebo)	p
Edad (años)	64.4+/-8.1 (58.6-70.2)	66.9 +/- 9.2 (60.3-73.5)	NS
Mujer (%)	20 (2/10)	10 (1/10)	NS
Diabetes (%)	40 (4/10)	50 (5/10)	NS
DMID (%)	20 (2/10)	10 (1/10)	NS
HTA (%)	70 (7/10)	30 (3/10)	0.07
Hipelipidemia (%)	100 (10/10)	100 (10/10)	NS
Tabaquismo (%)	70 (7/10)	60 (6/10)	NS
Hiperuricemia (%)	20 (2/10)	10 (1/10)	NS
EPOC (%)	10 (1/10)	10 (1/10)	NS
Enf. cerebrovascular (%)	20 (2/10)	0	NS
EVP (%)	10 (1/10)	10 (1/10)	NS
IR preoperatoria (%)	0	10 (1/10)	NS
Obesidad (%)	40 (4/10)	30 (3/10)	NS
ACVA previo (%)	0	10 (1/10)	NS
TE previo (%)	0	10 (1/10)	NS
NYHA III-IV (%)	0	0	NS
CCS III-IV (%)	30 (3/10)	50 (5/10)	NS
Angina inestable (%)	20 (2/10)	10 (1/10)	NS
Enfermedad del tronco	30 (3/10)	0	NS
IAM previo (%)	50 (5/10)	50 (5/10)	NS
ACXFA (%)	0	10 (1/10)	NS
FEVI (%)	60.4+/-13.7 (49.9-71.0)	65.2+/-8.2 (58.9-71.5)	NS
Euroscore	2.5 +/- 4	3 +/- 4	NS
Parsonnet	2.5 +/-4	2 +/- 3	NS

DMID: diabetes mellitus en tratamiento con insulina; HTA: hipertensión arterial; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica, EVP: enfermedad vascular periférica; IR: insuficiencia renal; ACVA: accidente cerebrovascular; TE: tromboembolismo; IAM: infarto agudo de miocardio; ACXFA: fibrilación auricular.

La edad media de los pacientes fue de 64,4 y 66,9 años en los grupos E y P respectivamente (p = NS) y un 20% y 10% fueron mujeres en cada uno de dichos grupos (p = NS). A pesar de la randomización se objetivó una diferencia importante en la incidencia de hipertensión arterial entre ambos grupos, con un porcentaje

mayor de hipertensos en el grupo Estudio (grupo E, 70%; grupo P, 30%), aunque debido al reducido número de casos de la muestra esta diferencia no llegó a ser estadísticamente significativa ($p = 0,07$). No hubo diferencias significativas en cuanto a la distribución de los factores de riesgo cardiovascular (diabetes/diabetes insulino-dependiente, tabaquismo, hiperlipidemia), a comorbilidades asociadas (hiperuricemia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad cerebrovascular, enfermedad vascular periférica, insuficiencia renal, obesidad, accidente cerebrovascular agudo, episodios tromboembólicos o fibrilación auricular), al perfil cardiológico de los pacientes (clase funcional, tipo de angina, FEVI, etc.) ni en la estimación del riesgo quirúrgico según las escalas de Euroscore y Parsonnet.

Aunque el control preoperatorio de la hiperlipidemia resultó más desfavorable en el grupo Estudio, las diferencias no fueron significativas. Los porcentajes de pacientes con LDL preoperatoria mayor de 100 mg/dl (grupo E 40%, 4/10; grupo P 20%, 2/10, $p = \text{NS}$), colesterol total mayor de 200 mg/dl (grupo E 30%, 3/10; grupo P 10%, 1/10, $p = \text{NS}$), HDL menor de 40 mg/dl (grupo E 30%, 3/10; grupo P 30%, 3/10, $p = \text{NS}$) o triglicéridos mayores de 150 mg/dl (grupo E 20%, 2/10; grupo P 10%, 1/10, $p = \text{NS}$) fueron similares. El ratio LDL/HDL tampoco fue significativamente diferente (grupo E, 2,0 +/- 0,7 (1,5-2,6); grupo P, 2,3 +/- 1,0 (1,5-3,0), $p = 0,9$).

En el grupo Estudio 5 pacientes estaban tomando preoperatoriamente de manera crónica atorvastatina y otros 5 estaban tomando simvastatina. El 40% (4/10) estaban tomando 40 mg al día y el resto 20 mg al día de fármaco. En el grupo Placebo 4 pacientes estaban pretratados con atorvastatina, 4 pacientes con simvastatina y 1 pacientes con fluvastatina. El 30% (3/10) tomaban 40 mg de fármaco y el resto (70%, 7/10) 20 mg al día ($p = \text{NS}$ respecto al grupo Estudio).

Tabla 2. Variables clínicas preoperatorias. Datos analíticos

	Grupo E	Grupo P (placebo)	p
BR total (mg/dl)	0.9 +/- 0.4 (0.7-1.2)	0.9 +/- 0.2 (0.8-1.0)	NS
BR directa (mg/dl)	0.1 +/- 0.1 (0.04-0.1)	0.1 +/- 0.1 (0.03-0.2)	NS
AST (UI/l)	21 +/- 3.4 (18.6-23.4)	25 +/- 7.0 (20.1-30.1)	NS
ALT (UI/l)	26.8 +/- 9.2 (20.2-30.4)	28.2 +/- 10.9 (20.4-36.0)	NS
CPK (UI/l)	87.2 +/- 43.5 (56.0-118.4)	92.8 +/- 74.9 (39.2-146.4)	NS
CPK-MB (UI/l)	6.1 +/- 2.1 (4.6-7.5)	7.6 +/- 4.2 (4.3-10.9)	NS
Tn-I (ng/ml)	0.02 +/- 0.02 (0.01-0.04)	0.07 +/- 0.1 (-0.03-0.17)	NS
PCR (mg/dl)	0.6 +/- 0.5 (0.1-1.0)	0.5 +/- 0.3 (0.1-1.4)	NS
Colesterol total (mg/dl)	174.3 +/- 35.6 (137.3-192.0)	164.7 +/- 49.5 (136.3-212.4)	NS
Triglicéridos (mg/dl)	139.1 +/- 126.0 (42.3-236.0)	116.1 +/- 32.9 (90.1-141.4)	NS
HDL (mg/dl)	50.0 +/- 15.7 (38.0-62.0)	45.0 +/- 10.1 (36.6-53.4)	NS
LDL (mg/dl)	96.3 +/- 28.4 (74.5-118.1)	96.4 +/- 32.9 (71.2-121.7)	NS

BR: bilirrubina; PCR: proteína C reactiva; Tn-I: troponina I.

Los datos analíticos preoperatorios están recogidos en la tabla 2. No se observaron diferencias significativas en el perfil hepático, el grado de miolisis, los marcadores de daño miocárdico ni en los niveles de PCR preoperatorios.

Variables clínicas intraoperatorias

Los datos clínicos intraoperatorios de los pacientes de ambos grupos están reflejados en la tabla 3. No existieron diferencias significativas en los tiempos de pinzamiento aórtico o CEC entre ambos grupos ni en los tiempos absoluto y medio de isquemia real. No hubo diferencias en el grado ni la calidad de revascularización, expresados como número de anastomosis distales, porcentaje de revascularizaciones completas y porcentajes de utilización de injertos arteriales (arteria mamaria y arteria radial).

Tabla 3. Variables intraoperatorias.

	Grupo E	Grupo P (placebo)	p
Tº circulación extracorpórea (min)	143.9 +/- 29.5 (122.8-165.0)	125.3 +/- 25.6 (107.0-143.6)	NS
Tº pinzamiento aórtico (min)	116.3 +/- 27.1 (97.0-135.7)	101.3 +/- 22.9 (85.0-117.7)	NS
Tº isquemia real (min)	81.7 +/- 23.5 (64.9-98.5)	70.2 +/- 19.5 (56.3-84.1)	NS
Tº medio de isquemia real (min)	17.5 +/- 3.0 (15.4-21.3)	18.5 +/- 3.9 (15.8-21.3)	NS
Nº dosis cardioplejía	4.7 +/- 1.3 (3.8-5.6)	3.9 +/- 1.1 (3.0-4.8)	NS
Duración cirugía	292.0 +/- 50.5 (255.9-328.1)	269.5 +/- 32.0 (246.6-292.4)	NS
Nº injertos	3.5 +/- 0.9 (2.9-4.1)	3.4 +/- 0.7 (2.9-3.9)	NS
Revascularización completa	90% (9/10)	90% (9/10)	NS
Nº injertos de AMI	1.5 +/- 0.7 (1.0-2.0)	1.7 +/- 0.9 (1.0-2.4)	NS
Utilización de una AMI	100% (10/10)	100% (10/10)	NS
AMI bilateral	40% (4/10)	40% (4/10)	NS
Utilización de AR	40% (4/10)	10% (1/10)	NS

CEC: circulación extracorpórea; AMI: arteria mamaria interna; AR: arteria radial.

Ningún paciente presentó complicaciones relativas a la canulación del seno coronario o a la extracción de las muestras sanguíneas del mismo o de sangre periférica.

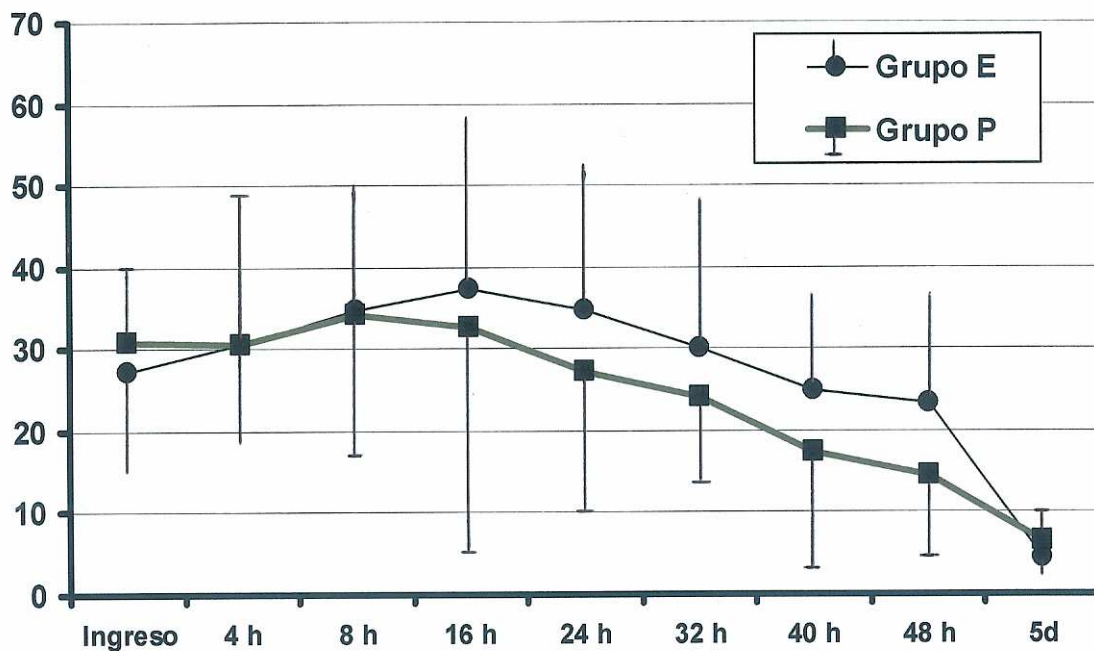
MARCADORES BIOQUÍMICOS DE DAÑO MIOCÁRDICO

Los valores medios de CPK-MB al ingreso en la UCI y a las 4, 8, 16, 24, 32, 40, 48 horas y 5 días postoperatorios en los grupos Placebo y Estudio están reflejados en la figura 15.

Como se puede observar no se evidenciaron diferencias significativas en ninguno de los momentos estudiados. Aunque los valores medios fueron superiores en prácticamente todas las determinaciones en el grupo Estudio, el cociente CPK-MB máxima/CPK total máxima fue inferior en el grupo tratado con el fármaco (grupo P 4,2 +/- 2,5% {2,4-6,0%}; grupo E 2,9 +/- 2% {1,5-4,3%}), sin que la diferencia resultara significativa.

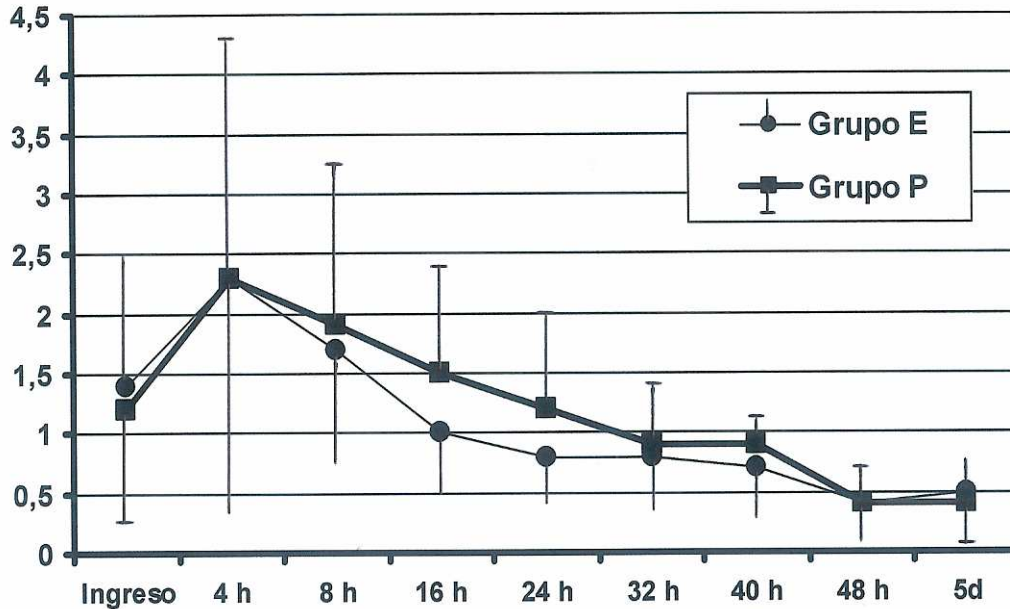
Por su parte la liberación de Tn-I está representada gráficamente en la figura 16. Aunque se observó una liberación superior en el grupo Placebo entre las 8 y las 40 horas, no se evidenciaron diferencias significativas tampoco en este caso. De igual modo, la concentración máxima de Tn-I fue mayor en el grupo Placebo (2,6 +/- 1,9 ng/ml {1,2-3,9} versus 2,2 +/- 1,8 ng/ml {1,0-3,5}) sin que la diferencia resultara estadísticamente significativa.

Figura 15. Liberación de CK-MB (UI/L)



Los valores expresan la media +/- desviación típica

Figura 16. Liberación de troponina I (ng/ml).



Los valores expresan la media +/- desviación típica

ÁCIDO LÁCTICO Y PH

Las determinaciones de ácido láctico en seno coronario y arteria periférica están reflejadas en las tablas 4 y 5. Existieron diferencias significativas en sus valores a los 2 y 30 minutos post-despinzamiento aórtico en la sangre arterial periférica, y las

Tabla 4. Liberación de ácido láctico en sangre del seno coronario (en mmol/L)

	Grupo E	Grupo P (placebo)	p
Pre-CEC	1.2 (0.4)	1.1 (0.7)	NS
2 minutos PDP	1.9 (0.6)	1.2 (0.9)	NS
30 min PDP	1.9 (0.5)	1.3 (0.6)	0.052

PDP: post-despinzamiento aórtico

Tabla 5. Liberación de ácido láctico en sangre arterial periférica (en mmol/L)

	Grupo E	Grupo P (placebo)	p
Pre-CEC	1.1 (0.5)	1.1 (0.6)	NS
2 minutos PDP	1.7 (0.8)	1.3 (0.5)	<0.05
30 min PDP	1.9 (0.8)	1.4 (0.5)	<0.05

PDP: post-despinzamiento aórtico

diferencias se aproximaron a la significación estadística en la sangre del seno coronario a los 30 minutos. Como queda reflejado en las figuras 17, 18 y 19, curiosamente la liberación de ácido láctico fue mayor en el grupo tratado con PRAV en los tres casos, aunque con una escasa significación clínica, ya que en todos los casos se mantuvieron por debajo del rango máximo de la normalidad (menores de 2,2 mmol/L) y, como se observa en las tablas 6 y 7, los valores de pH en esos momentos no presentaron diferencias entre ambos grupos de pacientes.

Tabla 6. Determinación de pH en sangre del seno coronario

	Grupo E	Grupo P (placebo)	p
2 minutos PDP	7.36 (0.04)	7.39 (0.04)	NS
30 min PDP	7.38 (0.0)	7.40 (0.0)	NS

PDP: post-despinzamiento aórtico

Tabla 7. Determinación de pH en sangre arterial periférica

	Grupo E	Grupo P (placebo)	p
2 minutos PDP	7.41 (0.05)	7.41 (0.1)	NS
30 min PDP	7.45 (0.03)	7.44 (0.1)	NS

PDP: post-despinzamiento aórtico

Cuando se comparan las cifras de ácido láctico en los diferentes momentos (2 minutos y 30 minutos post-despinzamiento aórtico) entre la sangre del seno coronario y la sangre arterial sistémica se comprueban valores prácticamente idénticos que tampoco reflejan diferencias significativas

MARCADORES INESPECÍFICOS DE INFLAMACIÓN: PCR, NFκB Y CITOQUINAS.

El estudio de la concentración sérica de PCR en el periodo postoperatorio (figura 20) reveló unos niveles superiores en el grupo Placebo en prácticamente todos los momentos de extracción, aunque la diferencia sólo llegó a ser significativa en la determinación de las 40 horas postoperatorias (grupo P, 16,7mg/dl; grupo E, 9,0mg/dl; $p < 0,05$). Además, la curva del grupo Estudio mostró una tendencia bifásica con una deflexión a las 40 horas, mientras que en el grupo al que se administró placebo la curva resultó monofásica con un pico máximo coincidente precisamente con esas 40 horas postoperatorias.

En cuanto a las concentraciones de NFκB en grupos celulares (figura 21), el grupo Placebo presentó concentraciones significativamente más elevadas que el

grupo Estudio en todas las determinaciones (seno coronario pre-CEC 110 +/- 8% δ banda) versus 101 +/- 7% δ banda, $p = 0,002$; seno coronario 30 minutos 125,5 +/- 26 % δ banda versus 98,5 +/- 14% δ banda, $p = 0,001$; sistémica 24 horas 224,5 +/- 125% δ banda versus 111,5 +/- 26% δ banda, $p < 0,001$). Como se refleja en el correspondiente diagrama de caja, en el grupo Placebo se observa un notable incremento de los niveles en sangre periférica a las 24 horas, efecto que queda totalmente amortiguado en el grupo Estudio.

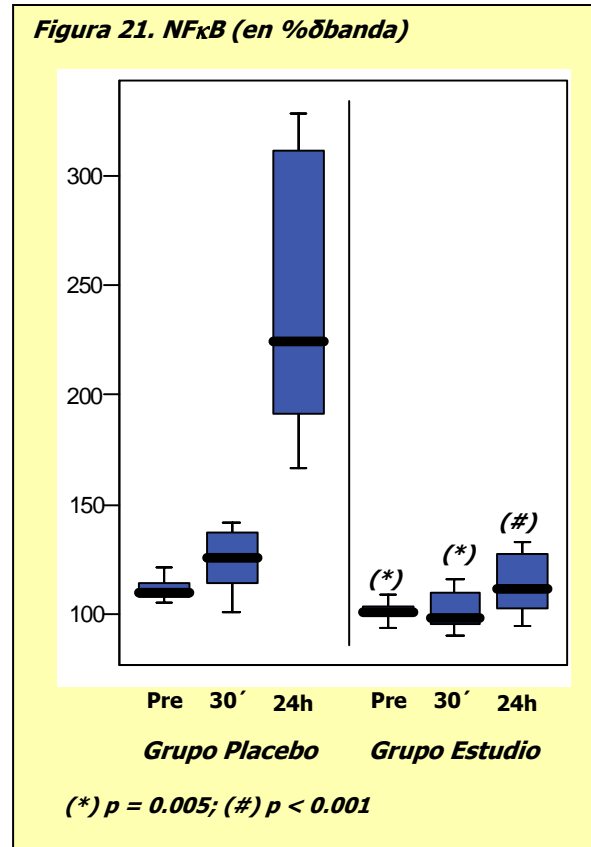
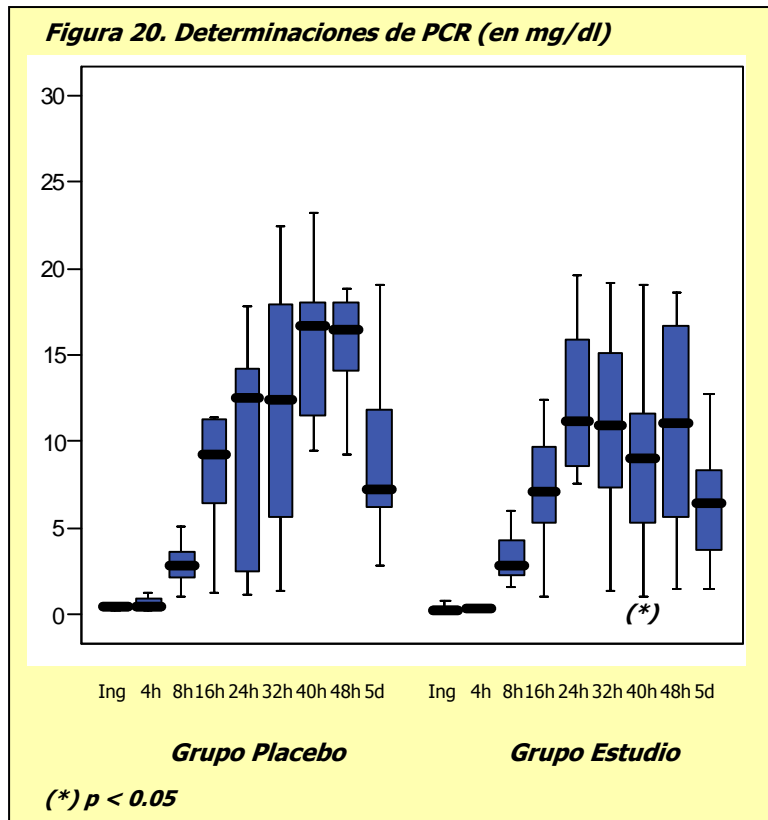
La liberación de TNF- α está representada en la figura 22. Aunque en la muestra pre-CEC tomada del seno coronario la concentración es mayor en el grupo Placebo (43,5 +/- 22 pg/ml versus 30,0 +/- 20 pg/ml) la diferencia no llegó a alcanzar la significación estadística en nuestra muestra ($p = 0,52$). En el resto de las determinaciones el TNF- α fue significativamente más abundante en el grupo Placebo respecto al grupo Estudio a los 30 minutos de la reperfusión miocárdica (62 +/- 13 pg/ml versus 33 +/- 14 pg/ml, $p < 0,001$) y a las 24 horas (116,5 +/- 35 pg/ml versus 62 +/- 41 pg/ml, $p < 0,01$), después de lo cual la diferencia se mantuvo significativa a los 5 días del procedimiento (grupo P, 89,5 +/- 28 pg/ml versus grupo E, 48 +/- 18 pg/ml, $p < 0,001$).

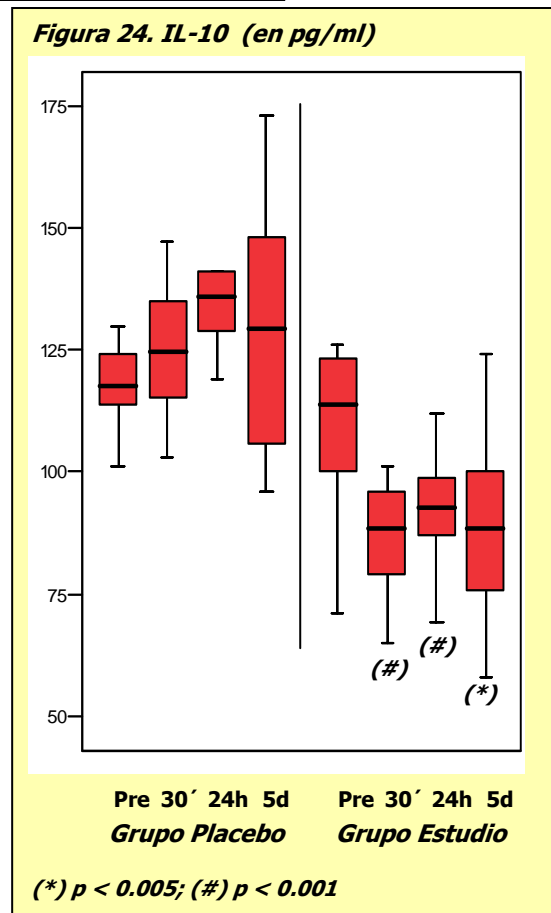
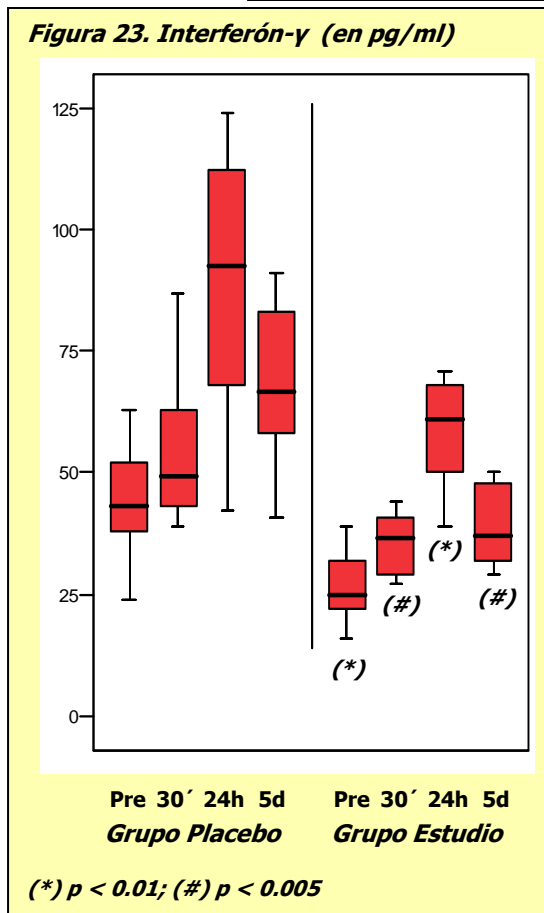
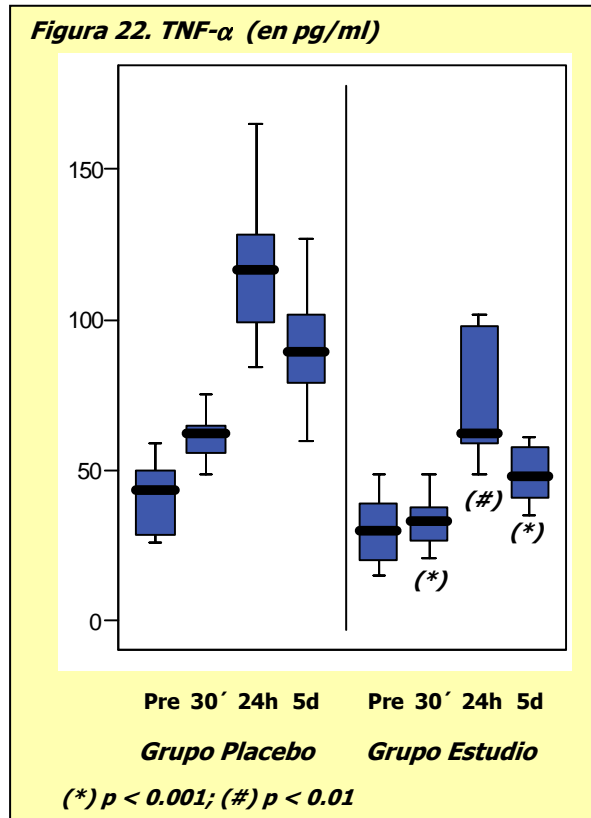
Las concentraciones de INF- γ (figura 23) se observaron disminuidas en el grupo Estudio respecto al control en todos los momentos de extracción, incluyendo la muestra pre-CEC (grupo P 43 +/- 16 pg/ml, grupo E 25 +/- 13 pg/ml, $p < 0,01$). Ambos grupos mostraron una morfología similar, con un pico a las 24 horas (grupo P 92,5 +/- 47 pg/ml, grupo E 61 +/- 19 pg/ml, $p < 0,01$) y una liberación elevada todavía al 5º día postoperatorio respecto al momento previo al inicio de la derivación cardiopulmonar (grupo P 66,5 +/- 25 pg/ml al 5º día versus 43 +/- 16 pg/ml pre-CEC, $p < 0,05$; grupo E 37 +/- 17 pg/ml al 5º día versus 25 +/- 13 pg/ml pre-CEC, $p < 0,05$).

Por fin, en cuanto a la liberación de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 (figura 24), está similarmente elevada en ambos grupos antes de la CEC (grupo P 117,5 +/- 15 pg/ml, grupo E 114 +/- 24 pg/ml, $p = 0,32$). Tras el periodo de ISQ/REP, su liberación se ve significativamente amortiguada en el grupo tratado con la estatina a los 30 minutos de reperfusión respecto al grupo Placebo (grupo P, 124,5 +/- 21 pg/ml; grupo E, 88,5 +/- 20 pg/ml; $p < 0,005$) y a las 24 horas (grupo P 136 +/- 20 pg/ml, grupo E 92,5 +/- 13 pg/ml, $p < 0,005$) y 5º día postoperatorio (grupo P 129,5 +/- 44 pg/ml, grupo E 88,5 +/- 31 pg/ml, $p < 0,001$).

LIBERACIÓN DE RADICALES LIBRES

La liberación de O₂⁻ (figura 25) está clara y llamativamente disminuida en la sangre del seno coronario ya antes del inicio de la CEC en el grupo Estudio (grupo P 15,5 +/- 14 nmol / mg-prot/minutos, grupo E 6,5 +/- 4 nmol /mg-prot/ minutos, $p <$





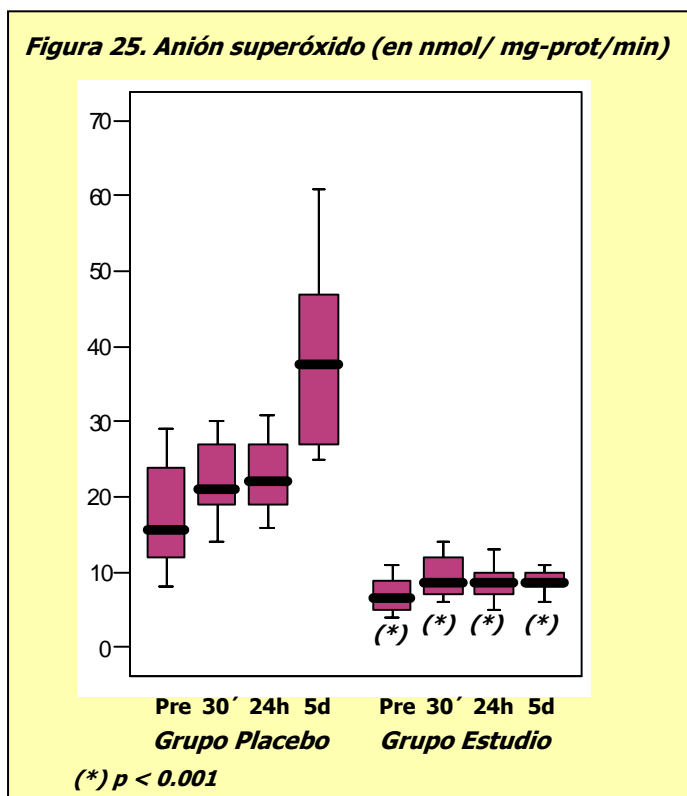
0,001) y se mantiene en menor rango a los 30 minutos del despinzamiento aórtico en la sangre del seno coronario (grupo P 21 +/- 9 nmol/mg-prot/minutos, grupo E 8,5 +/-5 nmol/mg-prot/minutos, $p < 0,001$) y a las 24 horas (grupo P 22 +/- 9 nmol/mg-prot/minutos, grupo E 8,5 +/-4 nmol/mg-prot/minutos, $p < 0,001$) y 5 días del procedimiento (grupo P 37,5 +/- 22 nmol/mg-prot/minutos, grupo E 8,5 +/-2 nmol/mg-prot/minutos, $p < 0,001$) en la sangre venosa periférica. En la determinación del 5º día se observa además una elevación significativa de la concentración del radical libre respecto a la observada a las 24 horas en el grupo Placebo, sin que se observe este efecto en el grupo tratado con PRAV.

MOLÉCULAS DE ADHESIÓN

Selectinas

Las concentraciones de selectinas solubles en plasma (L-selectina leucocitaria y P-selectina endotelial) se comportaron de manera diferente (figuras 26 y 27 respectivamente). Antes del inicio de la CEC se observó ya una elevación significativa de L-selectina en el grupo Placebo respecto al grupo tratado (115 +/-27% δ banda versus 97,5 +/- 12% δ banda respectivamente, $p = 0,001$) mientras que los niveles de P-selectina fueron similares en ambos grupos (grupo P, 114,5 +/-24% δ banda; grupo E, 106,5 +/- 14% δ banda, $p = 0,14$). A las 24 horas, la liberación de ambas selectinas fue significativamente mayor en el grupo al que se

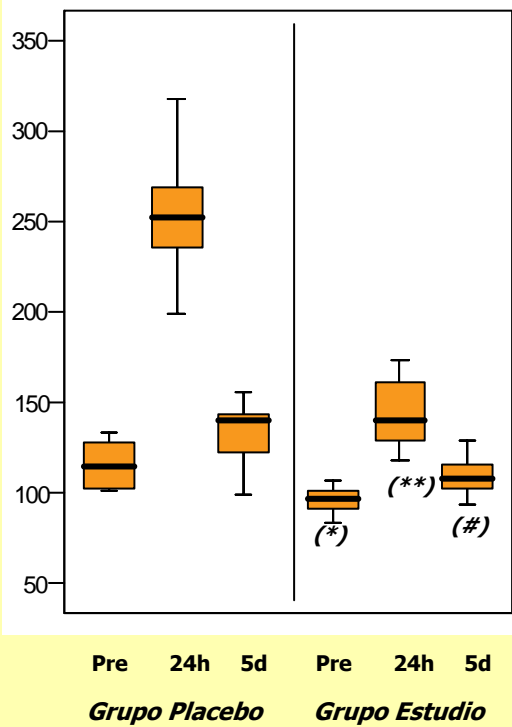
administró placebo respecto al grupo tratado con estatinas. La liberación de L-selectina se mantuvo más elevada a los 5 días en sangre venosa periférica de la cirugía en el grupo Placebo respecto al grupo Estudio (grupo P, 140 +/-30% δ banda; grupo E, 108,5 +/- 18% δ banda, $p = 0,011$).



Integrinas e ICAM

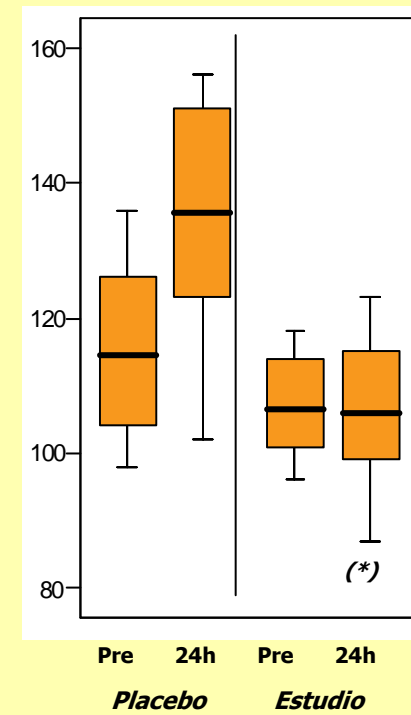
La concentración de CD18 soluble en plasma (figura 28) resultó elevada antes de la CEC respecto a los valores normales en ambos grupos, y de manera

Figura 26. sL-Selectina (en %δbanda)



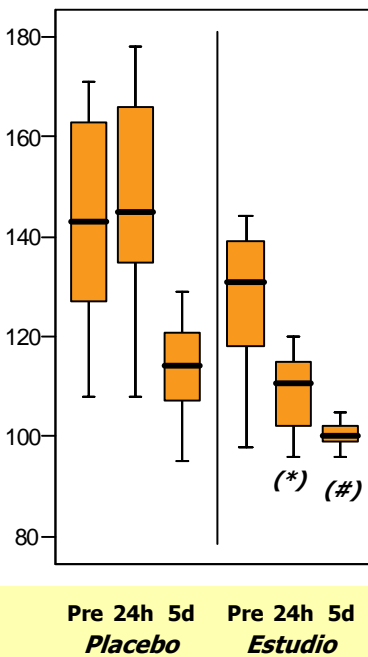
(*) $p < 0.005$; (**) $p < 0.001$; (#) $p < 0.05$

Figura 27. sP-Selectina (en %δbanda)



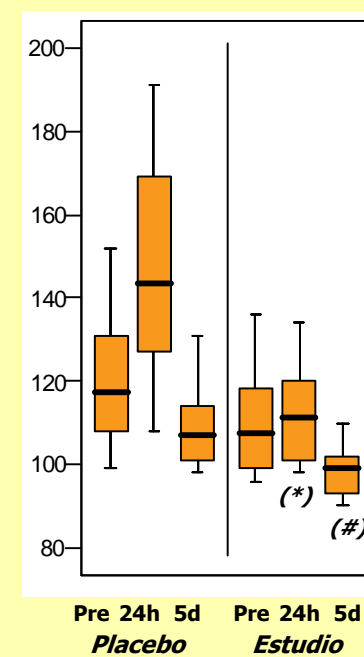
(*) $p < 0.005$

Figura 28. sCD-18 (en %δbanda)



(*) $p < 0.001$; (#) $p < 0.005$

Figura 29. sICAM (en %δbanda)



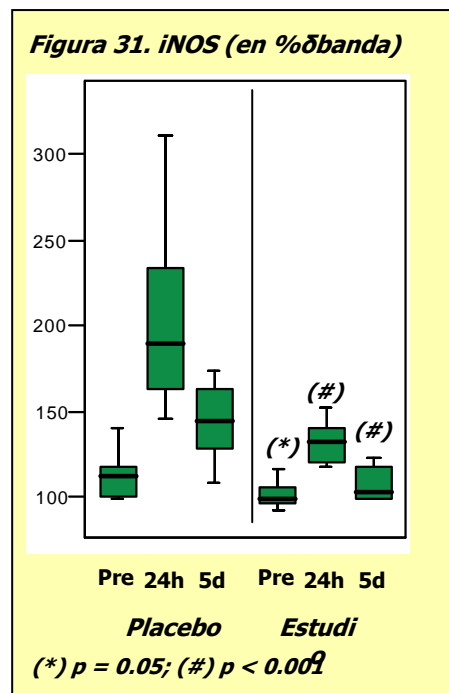
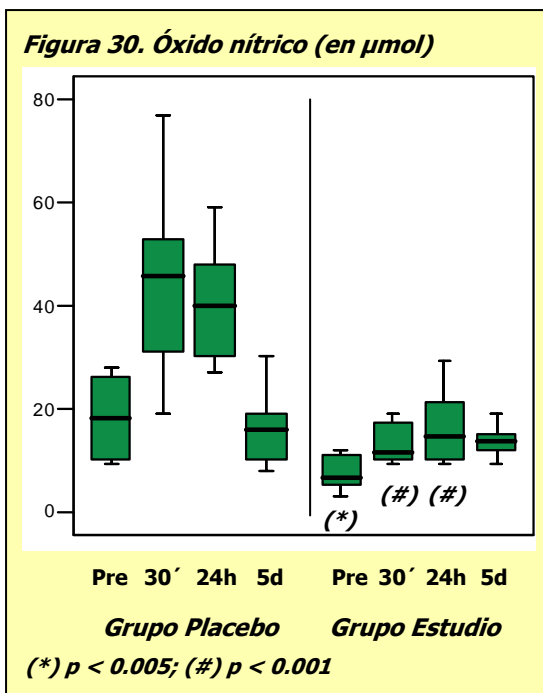
(*) $p = 0.001$; (#) $p < 0.01$

más acentuada aunque no significativamente en el grupo Placebo (grupo P, 143 +/- 41% δ banda; grupo E, 131 +/- 23% δ banda; $p = 0,19$). La cantidad de CD18 soluble detectado en sangre periférica a las 24 horas descendió significativamente sólo en el grupo tratado con PRAV (grupo E 110,5 +/- 14% δ banda versus grupo P 145 +/- 34% δ banda, $p < 0,001$) mientras que en el grupo al que se administró placebo la concentración de la integrina incluso aumentó ligeramente. La concentración disminuyó drásticamente en ambos grupos al 5º día postoperatorio, aunque en el grupo Placebo se mantuvo significativamente más elevada (grupo P, 114 +/- 15% δ banda; grupo E, 100 +/- 4% δ banda; $p < 0,005$).

En cuanto a ICAM-1 soluble (figura 29), la determinación previa a la entrada en CEC en seno coronario resultó elevada en ambos grupos aunque sin diferencias significativas entre ellos (grupo P, 117,5 +/- 29% δ banda; grupo E 107,5 +/- 21% δ banda; $p = 0,14$). En el grupo Placebo se encontró significativamente elevada su concentración a las 24 horas del procedimiento, no así en el grupo tratado (grupo P, 143,5 +/- 46% δ banda; grupo E, 111 +/- 20% δ banda; $p < 0,001$). A los 5 días, la determinación en sangre periférica reveló concentraciones persistentemente superiores en el grupo Placebo (107 +/- 16% δ banda) respecto al grupo Estudio (99 +/- 10% δ banda, $p < 0,01$ respecto al grupo P).

PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO Y NIVELES DE iNOS

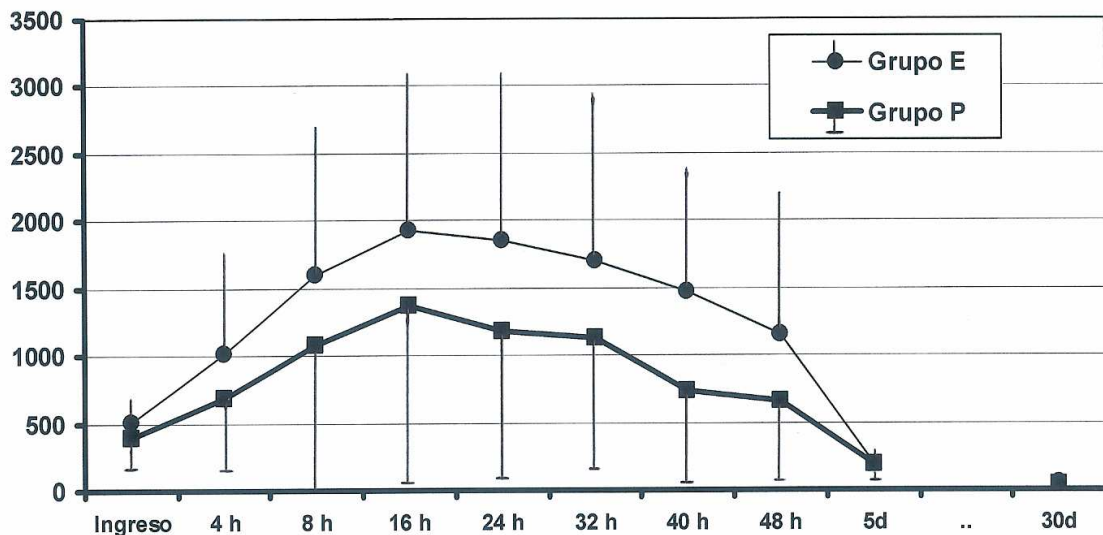
La producción de NO se encontró elevada basalmente en la determinación previa al inicio de la CEC de manera significativa en el grupo Placebo (18 +/- 17 μ mol)



respecto al grupo tratado con PRAV (grupo E, 6,5 +/- 7µmol, p < 0,005 respecto a grupo P, figura 30). En las determinaciones de los 30 minutos post-despinzamiento y 24 horas después del procedimiento se observó una sobreelevación de la concentración de la molécula también en el grupo Placebo (45,5 +/- 27 µmol a los 30 minutos y 40 +/- 20 µmol a las 24 horas), con modestas elevaciones no significativas en el grupo tratado (11,5 +/- 8 µmol a los 30 minutos y 14,5 +/- 1 µmol a las 24 horas, p < 0,001 en ambos casos). A los 5 días del procedimiento la sangre venosa presentaba similar concentración de NO en ambos grupos (grupo P 16 +/- 10 µmol, grupo E 13,5 +/- 4 µmol, p = 0,58).

Estos hallazgos se corresponden parcialmente a las concentraciones encontradas

Figura 32. Liberación de CK total (UI/L)



Valores expresados en media +/- desviación típica

	<u>Grupo E</u>	<u>Grupo P (placebo)</u>	<u>p</u>
Ingreso	511,5 +/- 179,6	390,3 +/- 139,5	NS
4 horas	1020,5 +/- 759,6	680,7 +/- 535,0	NS
8 horas	1592,6 +/- 1152,7	1075,5 +/- 1142,1	NS
16 horas	1928,8 +/- 1298,0	1374,1 +/- 1315,4	NS
24 horas	1849,6 +/- 1270,5	1184,3 +/- 1106,8	NS
32 horas	1697,2 +/- 1251,5	1128,7 +/- 1005,8	NS
40 horas	1472,8 +/- 910,3	738,6 +/- 671,9	0,077
48 horas	1158,7 +/- 1008,2	658,1 +/- 583,7	NS
5 días	190,8 +/- 145,0	185,5 +/- 128,8	NS
Máxima	2054,0 +/- 1346,4	1451,2 +/- 1364,6	NS

de iNOS en ambos grupos (figura 31). De igual manera, la concentración basal pre-CEC fue mayor en el grupo Placebo (112 +/- 18% δ banda versus 99,5 +/- 12% δ banda, $p < 0,05$), así como la concentración a las 24 horas (grupo P, 189,5 +/- 78% δ banda; grupo E, 132 +/- 22% δ banda; $p < 0,001$). Sin embargo, a los 5 días de la cirugía, la iNOS se encontró significativamente elevada sólo en el grupo Placebo (144 +/- 38% δ banda), con valores similares a los basales en el grupo al que se administró el fármaco (103,5 +/- 20% δ banda, $p < 0,001$ respecto a grupo P).

MARCADORES BIOQUÍMICOS Y CLÍNICOS DE EFECTOS SECUNDARIOS ATRIBUIBLES AL FÁRMACO

El estudio de la evolución postoperatoria de la elevación de los marcadores de daño hepático y de rabdomiólisis reveló que no se produjeron complicaciones significativas atribuibles a la administración del fármaco en el grupo E respecto al grupo P.

Las cifras máximas de las transaminasas AST (grupo P, 55,4 +/- 26,7 UI/L {36,3-74,5}; grupo E, 56,0 +/- 18,6 UI/L {42,7-69,3}) y ALT (grupo P, 29,5 +/- 13,4 UI/L {19,9-39,1}; grupo E, 26,1 +/- 12,4 UI/L {17,3-34,9}) fueron muy similares.

El análisis de la evolución postoperatoria de las cifras de CPK total está representado en la figura 32. Como se puede observar, todos los valores son mayores en el grupo tratado con PRAV, aunque sólo a las 40 horas postoperatorias la diferencia se aproximó a la significación estadística (grupo P 738,6 +/- 671,9 UI/L {222,1-1255,0}; grupo E 1472,8 +/- 910,3 UI/L {772,1-2172,5}, $p = 0,077$). Tampoco la comparación de la CPK máxima resultó significativa (grupo P 1451,2 +/- 1364,6 {475,0-2427,4}; grupo E (2054,0 +/- 1346,4 {1090,9-3017,1}, $p = 0,2$), aunque en este caso también las diferencias fueron más llamativas que para el caso de la elevación de transaminasas.

A pesar de ello, los valores medios de creatinina máxima postoperatoria fueron prácticamente idénticos (grupo P 1,1 +/- 0,2 mg/dl {1,0-1,3}; grupo E 1,1 +/- 0,2 {1,0-1,3}, $p = NS$) y tan sólo un paciente de cada grupo presentó elevaciones de creatinina postoperatoria por encima de 1,5 mg/dl (1,6 y 1,7 mg/dl respectivamente en los grupos P y E). En ambos casos la función renal regresó a la normalidad con tratamiento médico conservador en menos de 48 horas postoperatorias. A los 30 días de la cirugía, ni los valores de CPK total (grupo P 44,3 +/- 15,7 {33,1-55,5}; grupo E 49,7 +/- 32,6 UI/L {26,4-73,1}, $p = NS$) ni los de creatinina sérica (grupo P 0,9 +/- 0,1 mg/dl {0,8-1,0}; grupo E 1,0 +/- 0,2 {0,8-1,1}) difirieron en ambos grupos.

RESULTADOS CLÍNICOS POSTOPERATORIOS

No hubo mortalidad hospitalaria en ninguno de los dos grupos. Un paciente del grupo P (10%) presentó nuevas ondas Q en la cara anterior con elevación enzimática sugerente de IAM perioperatorio (Tn-I máxima de 6,3 ng/ml a las 4 horas). Ningún paciente del grupo E presentó criterios de necrosis miocárdica perioperatoria ($p = NS$).

Un paciente en el grupo P (10%) y dos en el grupo E (20%) precisaron cardioversión eléctrica interna para reasumir el ritmo sinusal tras el despinzamiento aórtico por presentar arritmias ventriculares ($p = NS$). En el postoperatorio, 3 pacientes del grupo P (30%) y 4 del grupo E (40%) presentaron fibrilación auricular de nueva aparición que precisó tratamiento con amiodarona ($p = NS$). En todos los casos revirtió a ritmo sinusal estable y por tanto ninguno de ellos precisó

	Grupo E	Grupo P (placebo)
Tiempo de IOT (hrs)	5.7 +/- 1.8 (4.4-7.0)	5.9 +/- 1.1 (5.1-6.6)
Estancia en UCI (d)	35.1 +/- 23.9 (18.0-52.2)	27.9 +/- 10.4 (20.4-35.3)
Estancia postoperatoria (d)	6.9 +/- 2.0 (5.5-8.3)	6.0 +/- 1.1 (5.3-6.8)

IOT: intubación orotraqueal; UCI: Unidad de Cuidados Intensivos $p = NS$

cardioversión eléctrica. Ningún paciente precisó implantación de marcapasos definitivo, aunque 3 pacientes del grupo P (30%) y 2 pacientes del grupo E (20%) precisaron estimulación epicárdica temporal por algún tipo de bradiarritmia ($p = NS$).

Dos pacientes del grupo P (20%) precisaron tratamiento inotrópico por bajo gasto cardiaco (21 y 24 horas respectivamente) mientras que 3 pacientes los precisaron en el grupo E (30%) durante 2, 5,5 y 26 horas respectivamente ($p = NS$). Ningún paciente precisó implantación de balón intraaórtico de contrapulsación ni tratamiento vasopresor.

Los tiempos de intubación orotraqueal, estancia en la UCI y estancia postoperatoria están reflejados en la tabla 8. No hubo diferencias significativas entre ambos grupos en ninguno de ellos.

COMPARACIÓN DE LAS DETERMINACIONES PREVIAS A LA CIRCULACIÓN EXTRACORPÓREA ENTRE LOS GRUPOS Y LOS CONTROLES SANOS

Marcadores inespecíficos de inflamación (NFκB y citoquinas) y radicales libres

Cuando se compararon los resultados obtenidos en cuanto a marcadores inflamatorios en sangre venosa periférica de grupo de personas sanas con las determinaciones extraídas del seno coronario de los pacientes del grupo Placebo antes del inicio de la CEC se evidenció que estos pacientes tenían ya en ese momento elevaciones significativas respecto a las personas sanas (figura 33) de TNF- α (controles sanos 24 +/- 8 pg/ml; grupo Placebo 43,5 +/- 22 pg/ml, $p < 0,005$), INF- γ (controles sanos 27,5 +/- 12 pg/ml; grupo Placebo 43 +/- 16 pg/ml, $p < 0,005$), IL-10 (controles sanos 60,5 +/- 19 pg/ml; grupo Placebo 117,5 +/- 15 pg/ml, $p < 0,05$), O₂⁻ (controles sanos 2,5 +/- 3 nmol/mg-prot/minutos; grupo Placebo 15,5 +/- 14 nmol/mg-prot/minutos, $p < 0,005$) y NFκB (controles sanos 100 +/- 0% δ banda; grupo Placebo, 110,0 +/- 8% δ banda, $p < 0,05$).

Por el contrario, en el grupo tratado con estatina la reacción inflamatoria se vio amortiguada notablemente con liberaciones similares a las halladas en el grupo de controles sanos en cuanto a TNF- α , INF- γ y NFκB, y con elevaciones significativas tan sólo de IL-10 (controles sanos 60,5 +/- 19 pg/ml; grupo Estudio 114,0 +/- 24 pg/ml, $p < 0,005$) y del radical libre O₂⁻ (controles sanos 2,5 +/- 3 nmol/mg-prot/minutos; grupo Estudio 6,5 +/- 4 nmol/mg-prot/minutos, $p < 0,05$, figura 34).

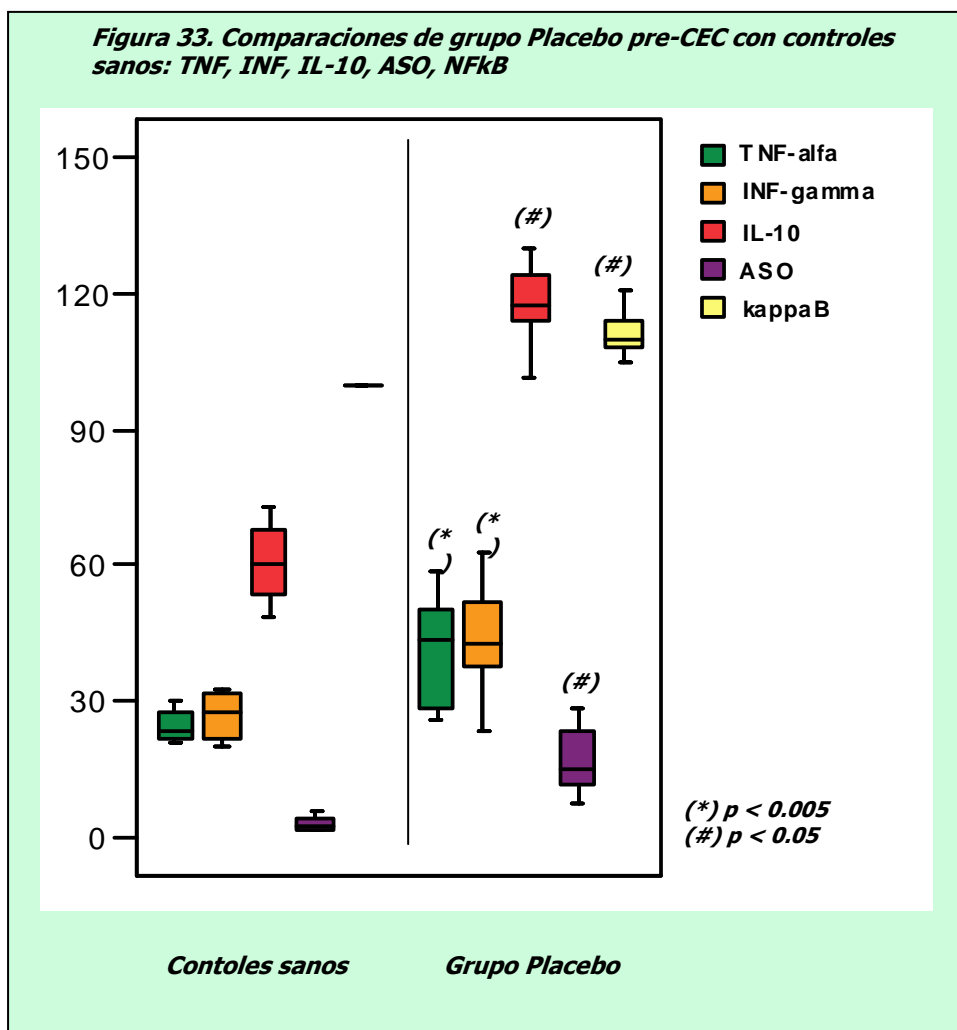
Moléculas de adhesión

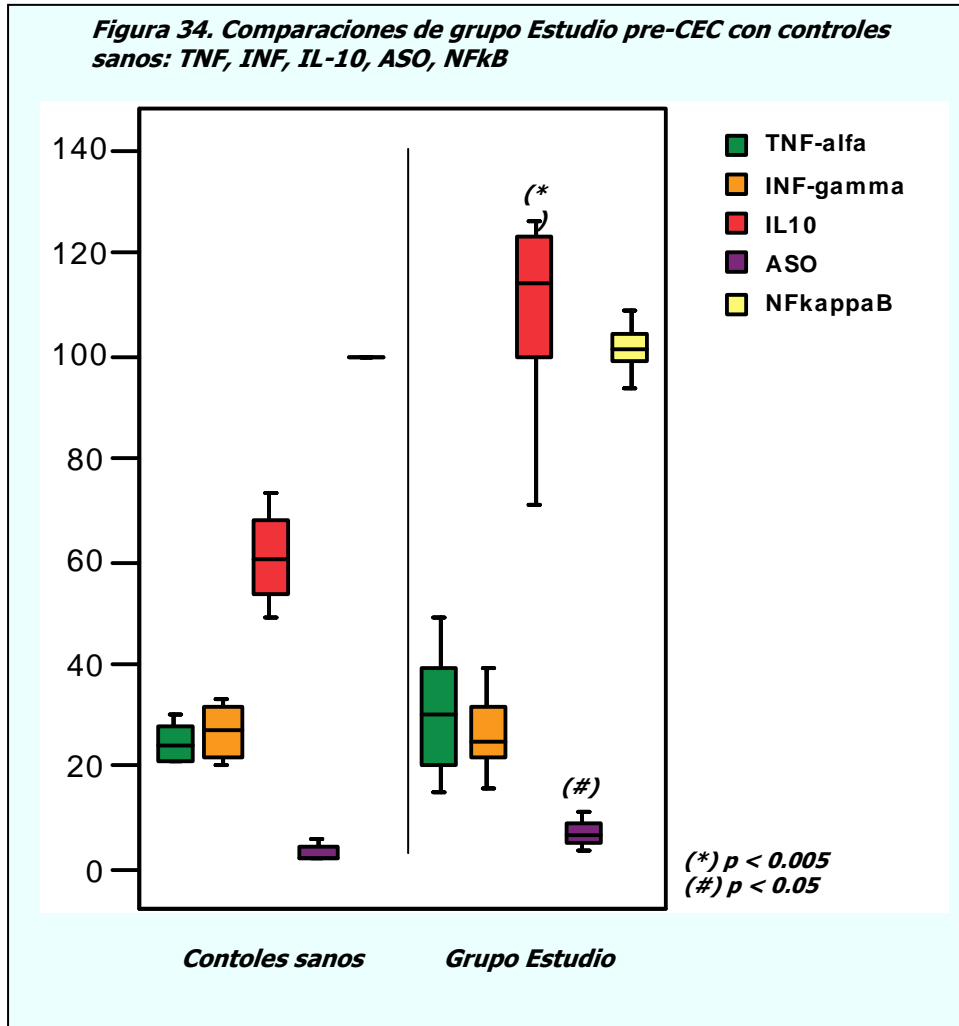
De la misma manera, los pacientes del grupo Placebo presentaron elevaciones significativas en el seno coronario antes de la CEC en las concentraciones de todas las moléculas de adhesión solubles (sP-selectina, sL-selectina, sICAM y sCD18 respecto al grupo de controles sanos (figura 35) mientras que en el grupo tratado con estatinas sólo se evidenció una elevación significativa de CD18 soluble respecto a los sanos (controles sanos 100 +/- 0% δ banda; grupo Estudio 131,0 +/- 23% δ banda, $p < 0,005$, figura 36).

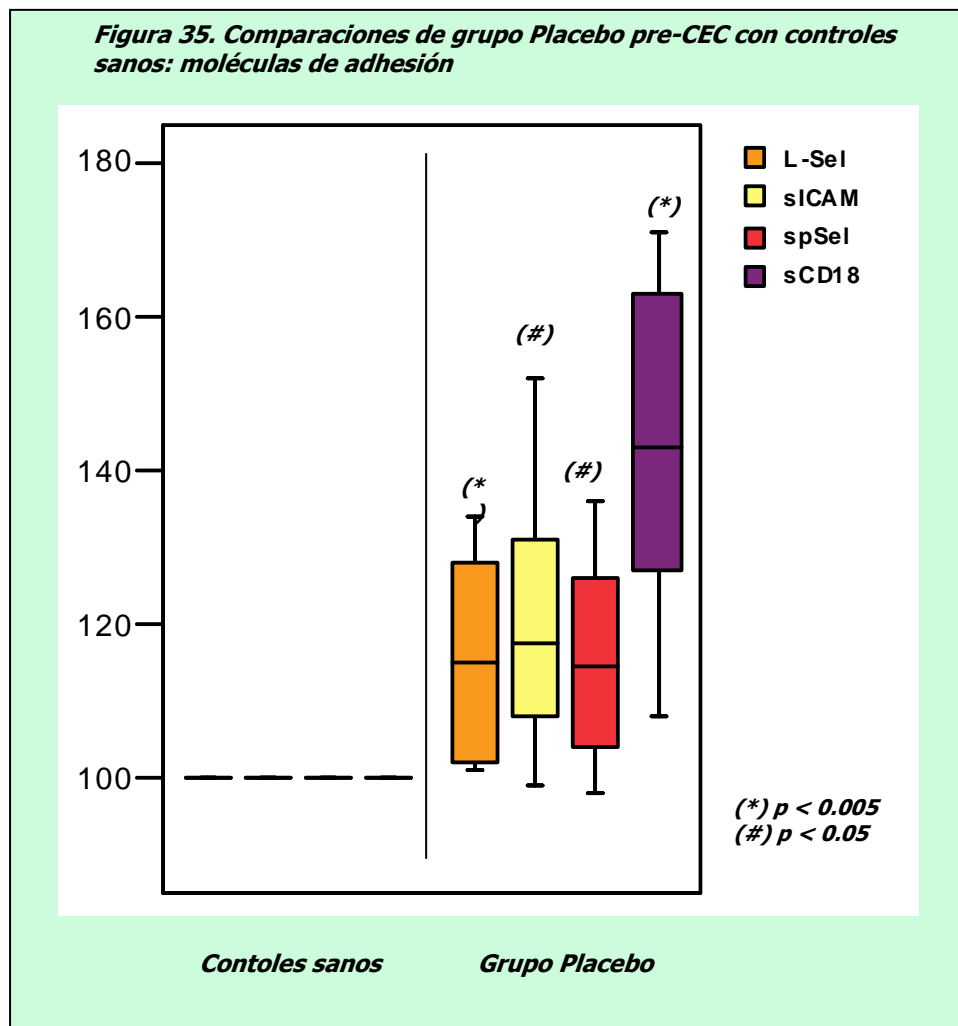
Producción de óxido nítrico y niveles de iNOS

La concentración de NO en el seno coronario antes de la CEC en el grupo Placebo fue significativamente mayor que en la sangre de las personas del grupo de controles sanos (controles sanos 7,5 +/- 3 μ mol; grupo Placebo 18 +/- 17 μ mol, $p < 0,005$, figura 37), mientras que en el grupo Estudio se mantuvo en concentraciones similares (controles sanos 7,5 +/- 3 μ mol; grupo Estudio 6,5 +/- 7 μ mol, $p < NS$, figura 38)

De manera similar, la concentración de iNOS fue significativamente mayor en los pacientes del grupo Placebo respecto a los sanos (controles sanos 100 +/- 0% δ banda; grupo Estudio 112,0 +/- 18% δ banda, $p < 0,05$, figura 37), mientras que en el grupo Estudio la concentración de iNOS se mantuvo similar (controles sanos 100 +/- 0% δ banda; grupo Estudio 99,5 +/- 12% δ banda, $p < NS$, figura 38).







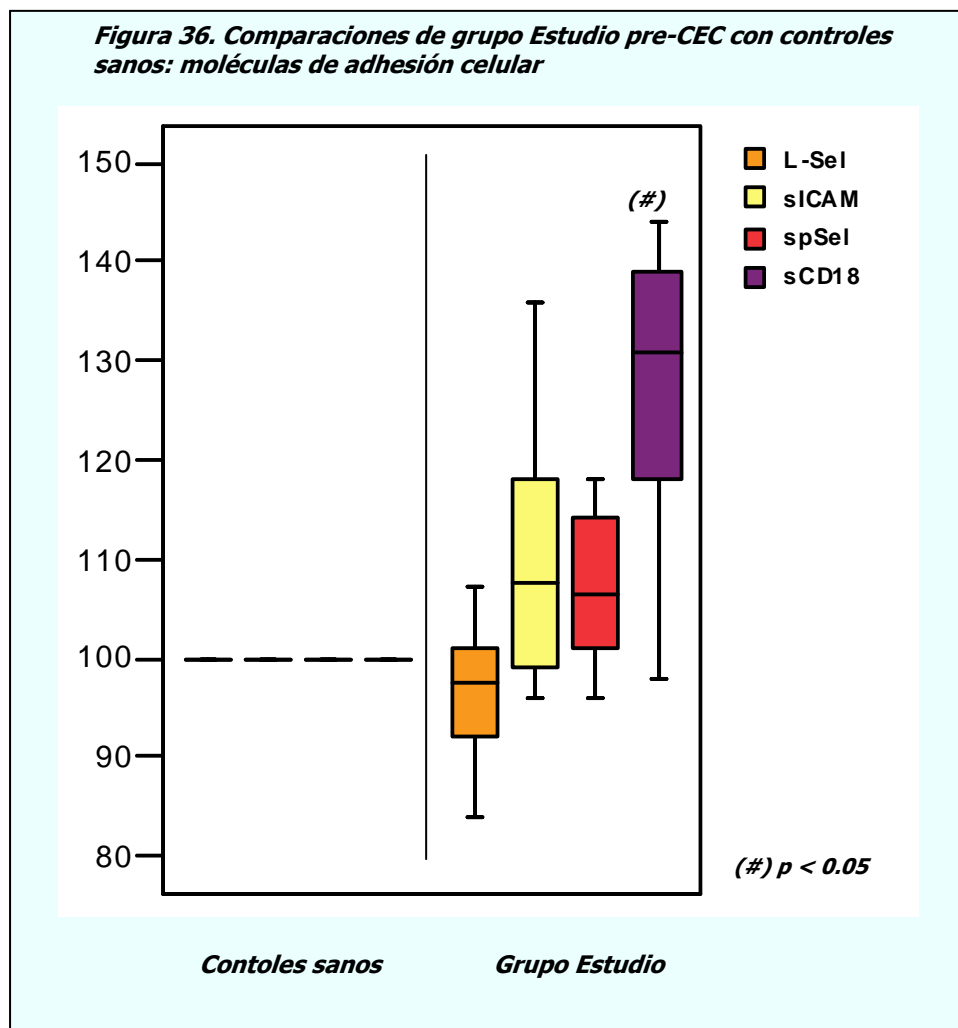


Figura 37. Comparaciones de grupo Placebo pre-CEC con controles sanos: NO e iNOS

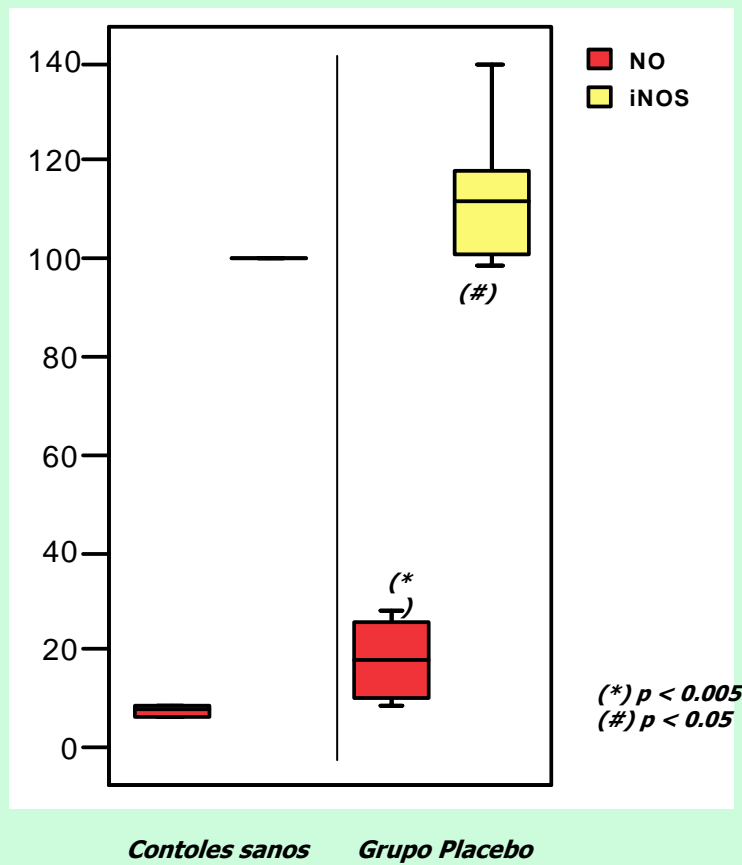
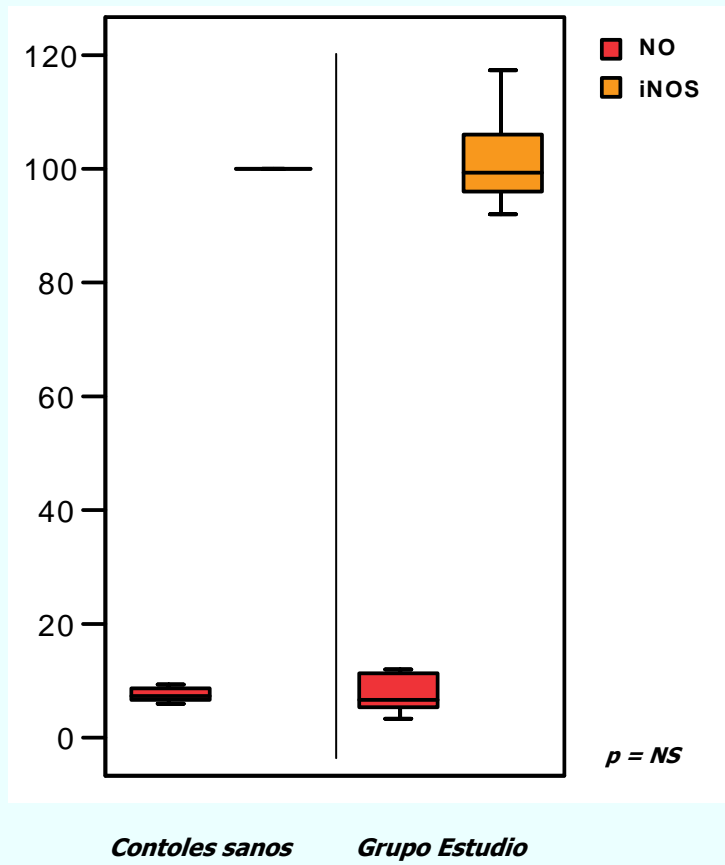


Figura 38. Comparaciones de grupo Estudio pre-CEC con controles sanos: NO e iNOS



6. DISCUSIÓN

Hasta donde conocemos este es el primer estudio aleatorizado, doble ciego y controlado por placebo que compara el efecto de la administración de una única dosis elevada de una estatina en la evolución de marcadores clínicos, de daño miocárdico e inflamatorios en pacientes sometidos a cirugía coronaria bajo tratamiento crónico con estatinas con un adecuado control preoperatorio de la hiperlipidemia y una previsible estabilización y preservación crónica de la función endotelial.

La administración de la dosis preoperatoria de PRAV pretendía potenciar el efecto de estabilización de la función endotelial que este tipo de fármaco tiene a largo plazo. Se intentaba conseguir una elevación de los niveles plasmáticos de metabolito activo en el momento del insulto isquémico e inflamatorio para conseguir una reducción de las consecuencias de ambos sin inducir efectos secundarios significativos. Aunque no se han estudiado las concentraciones plasmáticas del fármaco, los resultados inducen a pensar que la PRAV administrada por vía oral a las dosis probadas alcanza, efectivamente, la circulación sanguínea como metabolito activo en concentración suficiente para actuar sistémicamente y ejercer sus efectos pleiotrópicos.

CARACTERÍSTICAS PREOPERATORIAS E INTRAOPERATORIAS DE LOS GRUPOS

El carácter aleatorizado del estudio permitió evitar los sesgos de selección de los pacientes, de modo que las características clínicas y analíticas preoperatorias de ambos grupos fueron similares, como se refleja en la tabla 1. No obstante, hay que resaltar nuevamente que el pequeño tamaño muestral hace difícil encontrar diferencias significativas.

A pesar de la randomización, la prevalencia de hipertensión arterial preoperatoria fue superior en el grupo Estudio (70%) que en el grupo Placebo (30%). Lejos de suponer un sesgo para los resultados que se han obtenido en cuanto a reacción inflamatoria se refiere, este hecho puede indicar que la estatina es capaz de inducir esa inhibición de la reacción inflamatoria incluso en pacientes con un sustrato menos favorable para ello. Está ampliamente demostrado que la disfunción endotelial es un fenómeno primario en la hipertensión arterial esencial y que está precisamente mediado por un aumento del estrés oxidativo que reduce la disponibilidad de NO. Por tanto, favorece el desarrollo de la placa de ateroma y la trombosis intravascular²⁶⁸. Por ello, no es de extrañar que esta disfunción endotelial pueda ser revertida con la administración de estatinas. Pretnar-Oblak et al²⁶⁹ demostraron que la administración durante 3 meses de atorvastatina favorecía la vasodilatación de las arteriolas sistémicas y, sobre todo, la vasorreactividad cerebrovascular mediada por L-arginina en pacientes con hipertensión arterial. La hipertensión arterial, además, induce un sustrato basal proinflamatorio²⁷⁰ y tanto la

magnitud de la inflamación como la disfunción endotelial asociadas a esta entidad pueden ser fuente de otras complicaciones metabólicas y cardiovasculares que a su vez inducen una mayor respuesta inflamatoria. Perticone y cols.²⁷¹ demostraron estudiando a 400 pacientes diagnosticados de hipertensión arterial que tanto los niveles elevados de PCR como el grado de disfunción endotelial expresado como una significativa disminución de la vasodilatación endotelio-dependiente inducida por acetilcolina son factores de riesgo independientes para el desarrollo de diabetes tipo II. Por tanto, un mayor porcentaje de pacientes con hipertensión en el grupo Estudio refuerza la hipótesis de que la PRAV es capaz de preservar la función endotelial durante el pinzamiento aórtico y la CEC incluso en condiciones, como se ha dicho, basalmente más desfavorables.

Del mismo modo, se observó que el porcentaje de pacientes con niveles elevados de LDL, colesterol y triglicéridos y bajos de HDL fue mayor en el grupo Estudio, aunque las diferencias no fueron llamativas ni estadísticamente significativas. En cualquier caso hay que comentar que a pesar de estas diferencias cuantitativamente poco importantes en las condiciones potencialmente más proinflamatorias de los pacientes del grupo tratado con PRAV no se refleja en diferencias significativas de los niveles de PCR preoperatoria (grupo E 0,6 +/- 0,5 mg/ml (0,1-1,0); grupo P 0,5 +/- 0,3 mg/ml (0,1-1,4), p = NS).

En cuanto a las variables clínicas operatorias no existieron diferencias significativas en los tiempos de CEC o pinzamiento aórtico entre ambos grupos, requisito fundamental para la interpretación de los resultados, ya que ambos son importantes determinantes del grado de inflamación sistémica inducida²⁷², como ha quedado reflejado en la introducción, y del grado de daño miocárdico. Tanto el tiempo de pinzamiento aórtico como el de derivación cardiopulmonar están directamente relacionados con la liberación postoperatoria de Tn-I^{273,274} y la aparición de IAM perioperatorio²⁷⁵. De hecho la elevación de este marcador de daño miocárdico está directamente relacionada con la mortalidad hospitalaria en algunos estudios²⁷⁴.

Aparte del tiempo de pinzamiento aórtico global se estudió también el tiempo real de isquemia miocárdica expresado como el tiempo transcurrido entre dosis sucesivas de cardioplejia (tiempo en que el miocardio no está realmente recibiendo aporte alguno de oxígeno) y la media de esos tiempos. Hubiera podido ocurrir que un grupo de pacientes hubiese tenido similar tiempo de isquemia global que el otro pero se le hubiera administrado menos dosis de cardioplejia y, por tanto, los periodos entre dosis hubieran sido más largos. El protocolo habitual del Servicio es administrar cardioplejia hemática después de cada anastomosis coronaria, habitualmente cada 15-20 minutos. Sin embargo, puede suceder que en un paciente concreto las dosis se espacien más por complejidad técnica de las anastomosis debido a fragilidad de las paredes de los injertos o de las arterias

coronarias diana, ateromatosis y/o calcificación difusa de los lechos distales, dificultades en la exposición cardiaca por hipertrofia severa (más frecuente precisamente en pacientes hipertensos), etc. Tanto el tiempo de isquemia real absoluto como el tiempo medio de isquemia real fueron similares en ambos grupos.

Del mismo modo el grado de revascularización, expresado como número de anastomosis distales y porcentaje de pacientes con revascularización completa puede influir evidentemente en la incidencia de daño miocárdico perioperatorio²⁷⁶. En ambos grupos estos parámetros fueron similares, así como el número de anastomosis con injerto de arteria mamaria. El endotelio de la arteria mamaria interna es capaz de producir más NO que el de otras arterias del organismo, incluidos otros injertos coronarios como la arteria radial. Además, la arteria mamaria segrega menos sustancias vasoconstrictoras y otras moléculas favorecedoras de la placa de ateroma. En un estudio reciente bien diseñado, Atsungar y cols.²⁷⁷ demostraron que la arteria mamaria interna humana produce significativamente más NO que la arteria radial y menos endotelina. Ambos hechos podrían contribuir a la gran resistencia de la arteria mamaria al desarrollo de la aterosclerosis²⁷⁸ y a la excelente permeabilidad que presentan estos injertos a largo plazo²⁷⁹. En el mismo trabajo se demuestra también que, ante un evento isquémico, la arteria mamaria produce también significativamente más O_2^- que la arteria radial. El alcance de la influencia de la revascularización con injertos exclusivamente de arteria mamaria en el daño por ISQ/REP miocárdica intraoperatoria así como en el grado de reacción inflamatoria inducido por la cirugía y la CEC no ha sido estudiado hasta la fecha.

EFFECTOS SECUNDARIOS ATRIBUIBLES A LA ADMINISTRACIÓN DEL FÁRMACO

La administración de estatinas en la población general se ha demostrado segura en cuanto a la aparición de efectos secundarios (fundamentalmente rabdomiólisis, miositis y hepatitis), con una incidencia global de complicaciones musculares que ronda el 0,1-0,5% y de rabdomiólisis entre el 0,02 y 0,04% en monoterapia¹⁸⁴. Estas complicaciones son generalmente reversibles después de la suspensión del fármaco. La estatina que más efectos secundarios musculares producía era la cerivastatina (hasta 10 veces más, especialmente cuando se combinaba con gemfibrozilo)²⁸⁰, por lo que fue retirada del mercado en el año 2001. La fluvastatina es la estatina que menos efectos secundarios musculares tiene, porque se metaboliza por la vía del citocromo P450-2C9, escasamente utilizada por otros fármacos, además de sufrir un primer paso hepático muy intenso y presentar una disponibilidad sérica muy baja¹⁸⁴. Incluso en las situaciones más desfavorables, como son la administración concomitante con gemfibrozilo a largo plazo²⁶⁴ o, incluso, en pacientes trasplantados bajo tratamiento concomitante con ciclosporina²⁶², los casos de rabdomiólisis son raros. Algunos trabajos demuestran que la seguridad de la PRAV en este sentido es mayor que para otras estatinas.

Keogh et al²⁶³ siguieron durante 12 meses a 87 pacientes tratados con 40 mg diarios PRAV (n = 42) o 20 mg al día de simvastatina (n = 45). Objetivaron que aunque el control lipídico, el perfil bioquímico hepático y la tasa de complicaciones relacionadas con el tratamiento inmunosupresor (infección/rechazo) no variaron entre ambos grupos; sólo se diagnosticaron casos de rabdomiólisis en el grupo tratado con simvastatina (0% versus 13,3%, p < 0,05).

El periodo perioperatorio de cirugía cardíaca bajo CEC puede ser más problemático en este aspecto. La propia agresión quirúrgica y los periodos de hipoperfusión tisular que se producen durante la perfusión a bajo flujo o por periodos de hipotensión o bajo gasto perioperatorios pueden provocar en sí mismos hipertransaminemia, hiperamilasemia o rabdomiólisis. Sin embargo, son muy numerosos los estudios que han investigado los efectos de su administración en estas condiciones sin que se hayan reportado complicaciones significativas al respecto^{18,236,240-242,281}. De manera similar al presente estudio, Caorsi et al²⁴¹ administraron altas dosis de fármaco en el periodo perioperatorio (40 mg al día durante 48 previas al procedimiento y una dosis adicional de 40 mg una hora después de la cirugía) en 21 pacientes y los compararon de manera randomizada con otros 22 a los que no se administró el fármaco, sin que evidenciaran efectos secundarios reseñables.

En este estudio, la administración de dosis elevadas de una estatina con relativamente alta biodisponibilidad como metabolito activo sérico justo antes del procedimiento en pacientes bajo tratamiento crónico con estatinas podría haber potenciado la aparición de los efectos secundarios. Sin embargo ni los niveles de transaminasas ni de CPK o creatinina total fueron significativamente mayores en el grupo Estudio respecto al grupo control.

En el caso de la CPK total, el grupo Estudio presentó niveles máximos más elevados que el grupo Placebo (2054 +/- 1346,4 UI/L versus 1451,2 +/- 1364,5 UI/L), aunque el pequeño tamaño muestral no permitió revelar diferencias estadísticamente significativas. Tan sólo a las 40 horas postoperatorias, y sin coincidir precisamente con el pico de ninguna de las curvas, como se puede observar en la figura 9, la diferencia se aproximó a la significación estadística, con valores en el grupo Estudio que prácticamente duplicaban a los del grupo no tratado. Con alta probabilidad, la ampliación del tamaño muestral revelaría diferencias significativas en este aspecto.

En cualquier caso, la incidencia de una de las más temibles consecuencias de la rabdomiólisis en el postoperatorio cardíaco bajo CEC, la insuficiencia renal postoperatoria, no se vio aumentada por esa elevación de CPK total.

La relación entre las cifras postoperatorias de CPK total y la disfunción renal postoperatoria para este tipo de procedimientos quirúrgicos no está estudiada específicamente en la literatura. La insuficiencia renal postoperatoria es una frecuente complicación de los mismos²⁸² y las cifras de CPK se elevan de manera sistemática después de todos los tipos de cirugía mayor. Existen casos descritos de disfunción renal severa asociada a rhabdomiólisis intensas que se han relacionado con la ingesta de fibratos²⁸³.

En el contexto de la población estudiada y del tipo de cirugía a la que se le sometió, la disfunción renal suele estar muy favorecida por disminución del aporte de oxígeno por múltiples causas (periodos de hipotensión arterial y bajo gasto, reducción de las cifras de hemoglobina, etc.). El riñón es un órgano muy sensible a este tipo de insulto y se ha demostrado que basta un nivel bajo de hematocrito durante la CEC para que se inicie un fracaso renal postoperatorio²⁸⁴. Por otra parte, se ha demostrado que las estatinas protegen la función renal en el contexto de ISQ/REP en estudios animales. Gueler y cols.¹⁹⁸ administraron de manera aleatoria 0,5 mg/kg de cerivastatina o placebo 3 días antes de un episodio de pinzamiento de la arteria renal durante 45 minutos en ratas sometidas a nefrectomía contralateral. Estos autores observaron en los animales tratados una disminución significativa de las cifras de creatinina y una mejor preservación del filtrado glomerular asociado a prevención de la necrosis tubular histológica. También demostraron una disminución significativa de la infiltración tisular por monocitos y macrófagos, de la concentración de factores transcripcionales y de la actividad de la iNOS similar a lo que se ha observado en nuestro estudio. Por su parte en un estudio similar Joyce y cols.¹⁹³ demostraron en un trabajo de similares características metodológicas que la PRAV era capaz de conseguir resultados parecidos con un incremento significativo de la actividad de la eNOS. Estos efectos beneficiosos de las estatinas sobre otros factores lesivos para la función renal podrían neutralizar parcialmente su posible nefrotoxicidad por el hipotético aumento de las CPK gracias a la neutralización del fracaso renal mediado por otros factores, como son la hipoxemia, la anemia o el bajo gasto cardiaco.

RESULTADOS CLÍNICOS POSTOPERATORIOS

Desde un punto de vista puramente clínico, en diversos estudios la administración de estatinas ha demostrado una significativa eficacia en el contexto de la cirugía coronaria. Collard y cols., en un trabajo multicéntrico y prospectivo sobre 5436 pacientes intervenidos en 70 hospitales de 17 países, demostraron que el tratamiento con estatinas era capaz de reducir directa y significativamente la mortalidad hospitalaria²⁰⁴. Adicionalmente observaron que la suspensión postoperatoria del fármaco resultó deletérea incluso cuando el resultado se ajustó para la suspensión concomitante de otras medicaciones consideradas hoy en día imprescindibles para mejorar el pronóstico de este tipo de pacientes, como los

betabloqueantes, los IECAS o la aspirina. En otros trabajos el tratamiento con este grupo de fármacos igualmente se ha relacionado con una disminución de la incidencia postoperatoria de otros parámetros clínicos, como las incidencias de fibrilación auricular¹⁸ o accidente cerebrovascular²⁰⁵.

Sin embargo, en otros trabajos muy recientes con un menor número de pacientes en los que se ha comparado la evolución clínica de enfermos sometidos a cirugía coronaria, valvular o combinada según estuvieran bajo tratamiento previo con estatinas o no, no se han hallado diferencias significativas en la incidencia postoperatoria de IAM, tiempos de intubación orotraqueal o estancia en UCI, fracaso renal, mortalidad, etc²⁸⁵.

En cualquier caso, en ninguno de estos estudios se reproduce la metodología empleada en el trabajo que nos ocupa, en el que los pacientes recibieron una dosis adicional de PRAV inmediatamente antes de la cirugía tras haber estado bajo tratamiento crónico con estatinas.

Como se ha comentado, la CEC provoca una inmediata e intensa activación del sistema de complemento que condiciona una intensa infiltración leucocitaria en el tejido pulmonar²¹². La eficaz reducción de la respuesta inflamatoria provocada por la PRAV en este estudio induciría a pensar en la presencia de beneficios en la función respiratoria perioperatoria y, por ende, repercusión en los resultados clínicos derivados de ello, como una reducción en los tiempos de intubación, estancias en UCI, complicaciones pulmonares, etc.

Igualmente, se ha demostrado que la PRAV disminuye eficazmente la producción de TNF- α . Esta molécula tiene marcadas propiedades cardiodepresoras por mecanismos mediados por alteración de la funcionalidad del retículo sarcoplásmico a través de modificaciones de la homeostasis del calcio por la esfingosina¹⁰⁷. Produce además edema de la membrana alvéolo-capilar pulmonar y depósito glomerular de fibrina, infiltración celular y vasoconstricción renales, con disminución de la tasa de filtrado glomerular y disfunción renal⁵⁶. Por fin, está demostrado que el NO, encontrado en exceso en los pacientes a los que se administró placebo en este estudio, inhibe la agregación plaquetaria ante estímulos y también al endotelio sano y es capaz de alargar el tiempo de hemorragia¹⁵⁰. A pesar de todo ello y de la intensa disminución de la reacción inflamatoria encontrada, ninguno de los grupos del presente estudio ha presentado diferencias significativas en los resultados clínicos. La mortalidad hospitalaria, necrosis miocárdica clínica perioperatoria (que se comentará con más detalle en el siguiente apartado), arritmias ventriculares o auriculares, uso de inotrópicos/balón de contrapulsación o tiempos de intubación orotraqueal, estancia en la UCI o postoperatoria global han sido similares. Tampoco se han evidenciado diferencias en las tasas de reintervención por sangrado o volúmenes absolutos de sangrado postoperatorio.

Sin embargo, como ya se ha comentado, el reducido tamaño muestral analizado hace muy difícil encontrar diferencias en estos aspectos y se precisarían estudios con tamaños muestrales adecuados para analizar este punto. Adicionalmente, la importante selección de los pacientes incluidos, todos ellos de perfil bajo de riesgo para el desarrollo de las complicaciones potencialmente prevenibles con la administración del fármaco, hace muy difícil también el hallazgo de beneficios clínicos. La inclusión en esos estudios de enfermos con depresión de la contractilidad miocárdica, pacientes con riesgo de sufrir una más intensa reacción inflamatoria perioperatoria (tiempos de CEC prolongados, insuficiencia cardiaca o isquemia en evolución) o de padecer procesos en los que se observa habitualmente un exceso deletéreo de NO dependiente de la iNOS, como aquellos con cuadros infecciosos activos, podrían beneficiarse clínicamente de una manera más llamativa que nuestros pacientes estudiados.

EFFECTOS EN EL DAÑO MIOCÁRDICO POR ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN

En cuanto al efecto específico del fármaco en la atenuación del daño por ISQ/REP provocado por el pinzamiento aórtico, ya se ha demostrado previamente en múltiples trabajos basados en modelos experimentales el beneficio de la administración de estatinas en fase aguda a través de mecanismos pleiotrópicos.

En trabajos iniciales, la mejoría de la función endotelial expresada por el aumento en su capacidad de incrementar la actividad de la eNOS se demostró al cabo de varias semanas de tratamiento. A este respecto, O'Driscoll et al²⁸⁶ ya habían sugerido una mejoría de la función endotelial al mes de la administración continuada de simvastatina en sujetos con hipercolesterolemia, con un aumento de la respuesta vasodilatadora a la acetilcolina (endotelio dependiente) y una potenciación del efecto vasoconstrictor de un inhibidor de la síntesis de NO (L-NMMA) en el endotelio vascular. Sin embargo, varios años después, Wolfrum et al¹⁹¹ observaron en ratas pretratadas durante tan sólo 7 días con cerivastatina, beneficios en la reducción del área del infarto combinado con una mayor capacidad del endotelio para aumentar la actividad de la eNOS. Gueler y cols.¹⁹⁸ y Joyce y cols.¹⁹³ demostraron un efecto similar en cuanto a la preservación post-isquémica, en este caso de la función renal en ratas después de tan sólo 5 y 3 días de tratamiento con PRAV y cerivastatina respectivamente. Por fin, varios trabajos han demostrado que una dosis única previa al insulto isquémico es capaz de ofrecer efectos beneficiosos en este sentido. Lefer y cols.²⁰⁸, en un estudio aleatorizado y controlado, administraron en monodosis 25 microgramos intravenosos de simvastatina a un grupo de ratas tan sólo 18 horas antes de provocar una isquemia cardiaca global durante 20 minutos seguidas de reperfusión. Los animales tratados experimentaron significativamente menor disminución de flujo coronario y de disfunción ventricular después de la reperfusión que las ratas control, menor infiltración de leucocitos en

el tejido miocárdico sometido a ISQ/REP, menor expresión de P-selectina endotelial y un aumento de la producción de NO endotelial. En otro trabajo similar, este mismo grupo observó que la simvastatina administrada a ratas a las mismas dosis atenuó el "rolling", la adhesión y la diapédesis leucocitarias inducidas por la L-NAME, un potente inhibidor de la NOS²⁰⁹. De esta manera demostraron que la simvastatina es un potente y efectivo protector del endotelio que reduce de manera significativa las interacciones entre el endotelio y los leucocitos independientemente de sus acciones sobre los niveles de colesterol. Por su parte, Di Napoli et al²⁰⁷ administraron una única dosis de 25 micromoles de simvastatina (similar a la alcanzada con la vía oral a dosis terapéuticas en humanos) a ratas antes de someterlas a 15 minutos de isquemia cardiaca global y 180 minutos de reperfusión. Respecto al grupo control, se demostró disminución de la apoptosis miocítica, inducción del RNAm-eNOS a través de mecanismos post-transcripcionales y disminución del aumento de producción postisquémica de la iNOS. Por fin, Bell et al, en un estudio más reciente demostraron que la administración de una única dosis de atorvastatina que consigue, de nuevo, concentraciones séricas similares a las que alcanza la posología clínica oral en el ser humano disminuía el área de infarto en ratones sometidos a ISQ/REP¹⁵⁹. Este efecto fue, de nuevo, dosis dependiente. Los autores llegaron a la conclusión de que este efecto podía estar mediado por la potenciación de la cascada de la fosfatidil-inositol 3-kinasa (PI3K) y su diana, la serín-treonín kinasa Akt. Jones et al¹⁹² han demostrado que esa administración en monodosis permite, incluso, que el corazón tratado mantenga unas cualidades hemodinámicas similares al cabo de 6 meses de reperfusión a la de los corazones no sometidos a ISQ/REP.

Todos estos trabajos experimentales demostraban que no se precisa una administración prolongada para conseguir un efecto pleiotrópico beneficioso en este contexto. De hecho, el estudio que nos ocupa demuestra claramente, al menos en cuanto a la reacción inflamatoria sistémica se refiere, que la PRAV administrada según este protocolo probablemente es capaz de potenciar los efectos pleiotrópicos de la administración crónica a través del aumento de los niveles plasmáticos de fármaco en el momento de la agresión pro-inflamatoria y, probablemente, pro-isquémica. Sin embargo, hay que destacar que no se han medido dichos niveles en el estudio y que, por tanto, esta afirmación está basada en indicios extrapolables por los resultados obtenidos.

En la práctica clínica, la elevación de marcadores de daño miocárdico es prácticamente sistemática tras cirugía cardiaca con CEC y también en el contexto de cirugía coronaria sin CEC y sin pinzamiento aórtico. Además, está demostrado que su magnitud se ha asociado, en recientes trabajos, a incidencia de eventos cardiovasculares postoperatorios y que, por tanto, se debe conseguir en lo posible la máxima reducción del daño miocárdico perioperatorio. En el trabajo de Mohammed et al²⁸⁷ los niveles postoperatorios de TnT se han relacionado directamente con la

incidencia de muerte (odds ratio, 3,20; $p = 0,003$), muerte o insuficiencia cardiaca (odds ratio, 2,04; $p = 0,008$), muerte o necesidad de vasopresores (odds ratio, 2,70; $p < 0,001$), y del evento compuesto por los tres anteriores (odds ratio, 2,57; $p < 0,001$).

A este respecto se han demostrado, efectivamente, beneficios en la preservación de la función miocárdica por la administración preoperatoria de estatinas en pacientes sin hiperlipidemia. Mannacio et al²³⁶ administraron 20 mg al día de rosuvastatina a 100 pacientes de manera randomizada y controlada con la administración de placebo a otros 100 pacientes, todos ellos candidatos a cirugía de revascularización coronaria altamente seleccionados, una semana antes del procedimiento. Los autores demostraron una reducción significativa en la elevación de marcadores de daño miocárdico (Tn-I, mioglobina y CPK-MB masa), una reducción de la necesidad de inotrópicos postoperatorios y una atenuación de la reacción inflamatoria clínica expresada como una menor elevación de los niveles de PCR. Además, como ya se ha observado en otros estudios comentados¹⁸, demostraron también una reducción significativa del 44% en la incidencia de fibrilación auricular (OR, 0,46; 95% CI, 0,22–0,94; $p = .03$). Por su parte, Berkan et al²⁸¹ demostraron en otro estudio aleatorizado que los pacientes a los que se les administró fluvastatina a dosis de 80 mg al día durante 3 semanas previas a cirugía de revascularización coronaria necesitaron menos inotrópicos y precisaron menores estancias en UCI y hospitalarias que los tratados con placebo. Por su parte, Martínez-Comendador y cols. observaron que los pacientes sometidos a cirugía coronaria, valvular o combinada que estaban bajo tratamiento crónico con estatinas presentaban una menor reacción inflamatoria sistémica y una significativa reducción de los marcadores de daño miocárdico postoperatorio²⁸⁵ aunque, como ya se ha mencionado, no observaron traducción en cuanto a beneficios puramente clínicos (reducción de la incidencia de IAM, de la estancias hospitalarias, etc).

Sin embargo, de nuevo ninguno de estos estudios reproduce la metodología empleada en el presente trabajo. Los pacientes de los grupos tratados con placebo no recibieron estatinas preoperatoriamente en ningún momento y, de hecho, en la mayoría de ellos la media de LDL en los grupos comparados rondaba cifras en torno a 120mg/dl (lejos del supuesto objetivo reconocidamente beneficioso de los 100mg/dl y muy lejos de los 70mg/dl que parecen el objetivo al que se tiende recientemente²⁰¹). Como es bien conocido, los pacientes con cardiopatía isquémica presentan una disfunción endotelial²⁸⁸, más marcada en caso de hiperlipidemia¹⁸¹ que es mejorada significativamente con el tratamiento previo con estatinas²⁸⁶. Por ello estos fármacos son considerados hoy en día una indicación de primera línea en la prevención secundaria de eventos cardiológicos después de cirugía coronaria, independientemente de los niveles de LDL que tenga el paciente²⁸⁹. Los resultados de estos trabajos no son *a priori*, por tanto, extrapolables a la estrategia seguida en este estudio. En él supuestamente todos los pacientes, incluidos los del grupo

tratado con placebo, tenían su función endotelial optimizada por un tratamiento crónico con estatinas y, por tanto, se ha tratado de demostrar un beneficio con una administración adicional que aumentara los niveles séricos de fármaco activo en el momento del insulto isquémico e inflamatorio. El presente trabajo trata de reproducir, por tanto, un beneficio en el contexto más habitual del enfermo con cardiopatía isquémica sometido hoy en día a cirugía coronaria. Actualmente se tiende a una progresiva reducción de las cifras diana de LDL²⁰² e, incluso, a la expresa persecución no sólo de una reducción en los niveles de colesterol, sino también en la reacción inflamatoria clínica²⁰¹. Por todo ello actualmente existen pocos pacientes con enfermedad coronaria que no estén bajo tratamiento crónico con estatinas en el momento de la cirugía.

Por otro lado, la llamativa reducción de la reacción inflamatoria perioperatoria demostrada y que se comentará más adelante, podría tener beneficios en cuanto a la protección de la función miocárdica en el periodo postoperatorio inmediato en pacientes menos seleccionados que los incluidos en el presente estudio. Entre los criterios de exclusión del presente trabajo figuran la inestabilidad hemodinámica en el momento del procedimiento (shock o EAP de origen cardiaco), la necesidad de tratamiento inotrópico y/o BIACP preoperatorio, los procedimientos emergentes o urgentes así como la presencia de angina de reposo menos de 48 horas antes del procedimiento. Tan sólo un paciente de cada grupo presentaba una FEVI inferior al 50% y en ambos casos era mayor del 40%.

Tras un insulto isquémico se produce un periodo de aturdimiento miocárdico mediado por mecanismos aún no del todo dilucidados. La actuación de los radicales libres generados durante la ISQ/REP, un metabolismo anormal del calcio o, incluso, la oxidación de ácidos grasos libres de las membranas celulares podrían ser los generadores de este fenómeno²⁹⁰ que en muchas ocasiones provoca disfunción ventricular transitoria.

La perfusión del corazón con un medio rico en radicales libres produce disfunción ventricular y cambios bioquímicos similares a los producidos por la ISQ/REP³⁴ que, además, son neutralizados por superóxido dismutasa y catalasa⁶¹. Como se ha sugerido previamente, el TNF- α posee un significativo efecto depresor de la contractilidad miocárdica²⁹¹. Su liberación induce clínicamente hipotensión, fiebre, producción de reactantes de fase aguda e hipoalbuminemia²². En los pacientes con sepsis, el lipopolisacárido es un potente estímulo para la liberación de esta citoquina, cuyo mayor reservorio es, precisamente, el cardiomiocito. De hecho, se ha demostrado que la administración de anticuerpos anti-TNF es capaz de mejorar la función ventricular en pacientes con shock séptico²⁹². Después de una cirugía cardiaca se ha demostrado de igual manera un patrón típico de disfunción ventricular que ocurre también en los enfermos con función ventricular izquierda preoperatoria normal. Mangano et al estudiaron la función contráctil postoperatoria

y observaron que en todos los pacientes sometidos a revascularización coronaria con CEC y pinzamiento aórtico se produce una disfunción biventricular que se inicia tan precozmente como en los primeros 15 minutos después de la finalización de la derivación cardiopulmonar²⁹³. El grado y la duración de la disfunción dependen en gran manera de la FEVI preoperatoria y de la existencia de disincronías ventriculares preoperatorias. La máxima expresión se observa entre 4 y 6 horas después de la finalización de la CEC y la recuperación suele ser completa a las 24 horas postoperatorias, aunque en enfermos con alteración contráctil previa la disfunción ventricular observada es mayor y más duradera²⁹⁴. Este patrón temporal se relaciona íntimamente con las concentraciones máximas de TNF- α ¹⁴ y otras citoquinas pro-inflamatorias con propiedades cardiodepresoras como la IL-6^{14,110}.

Por su parte, los pacientes con disfunción ventricular e insuficiencia cardiaca crónicas presentan además una activación crónica del sistema adrenérgico y de los niveles de noradrenalina como mecanismo compensador inicial, objeto fundamental del tratamiento con betabloqueantes de estos pacientes. La activación betaadrenérgica crónica perpetúa a la larga efectos deletéreos. Se produce aumento del consumo de oxígeno e isquemia miocárdica por elevaciones de la postcarga y la precarga ventricular, incremento del estrés oxidativo y finalmente inducción de fibrosis y necrosis miocíticas con dilatación y remodelado ventricular que incrementan en su conjunto la disfunción contráctil²⁹⁵. Además se produce una desensibilización de los receptores betaadrenérgicos, mediada por la activación de kinasas de dichos receptores²⁹⁶ que, de hecho, se ha visto contrarrestada con la manipulación genética a través de adenovirus de la expresión de dichas enzimas, concretamente la kinasa del receptor betaadrenérgico-1²⁹⁷. Esta desensibilización crónica induce adicionalmente una menor respuesta de estos pacientes al tratamiento inotrópico postoperatorio y, por tanto, un manejo más complejo.

Por otro lado, la activación de la iNOS mediada por citoquinas o igualmente por lipopolisacárido produce depresión de la contractilidad miocárdica en pacientes con sepsis combinada a una deficiencia en la respuesta a las drogas betaadrenérgicas^{298,299}. Además, se ha demostrado una mejoría en la contractilidad miocárdica³⁰⁰ y en la supervivencia³⁰¹ de pacientes con endotoxemia tras la administración de inhibidores de la NOS. El NO producido por la iNOS en este contexto de exceso de aniones superóxido demostrado en el presente trabajo en el grupo placebo genera grandes cantidades de peroxinitrito y OH^{-45,145}.

Por todo ello, la significativa reducción de la liberación de TNF- α y de iNOS observada debería tener repercusiones positivas en la función ventricular postoperatoria y, por tanto, en la necesidad de inotrópicos, BIACP, etc. En definitiva, debería influir como ya se ha sugerido previamente en la evolución clínica de pacientes más vulnerables que los estudiados, es decir, con cuadros isquémicos en evolución o disfunción ventricular sistólica preoperatorias, máxime cuando sean

sometidos a un insulto inflamatorio más severo (tiempos de CEC o pinzamiento aórtico prolongados).

La mediación de la intensa e inevitable activación del complemento por el contacto de la sangre con las superficies no endotelizadas del sistema de derivación cardiopulmonar en el daño miocárdico por ISQ/REP se pone de manifiesto porque se ha demostrado una relación entre las concentraciones tisulares de ciertas proteínas del sistema de complemento⁷⁵, incluido el MAC⁷⁶ en el tejido miocárdico afectado con la infiltración leucocitaria y el daño tisular final. La supuesta mayor disponibilidad endotelial de NO proporcionada por la estatina explicaría una menor interacción entre el endotelio y el NEU, una menor infiltración leucocitaria y una reducción de todas las consecuencias que ello tiene para el tejido (liberación de radicales libres, proteasas, etc.). Como se justificará más adelante, este hecho podría ser la explicación de una menor reacción inflamatoria sistémica, coincidente con aparentemente paradójicos más bajos niveles de NO en sangre. Está demostrado que existe relación íntima entre el tiempo de isquemia y el tamaño del infarto con la cantidad de NEU acumulados en el miocardio¹²⁹ y que la depleción de los leucocitos circulantes o su anulación disminuye el daño por reperfusión^{129,130}.

Desafortunadamente, en el presente estudio no disponemos de muestras tisulares miocárdicas para demostrar que el tratamiento con PRAV realmente ha inducido una menor infiltración leucocitaria en el miocardio, lo cual nos podría dar luz acerca del efecto íntimo del fármaco en el miocardio.

Por otro lado, está demostrado que en enfermos con síndromes coronarios agudos (angina inestable o IAM) se suscita una reacción inflamatoria^{25,88,105} cuya magnitud puede además ser un factor predictor de nuevos eventos isquémicos futuros. En un clásico estudio, Haverkate et al³⁰² siguieron durante dos años a más de 2000 pacientes después de un episodio de angina estable o inestable y objetivaron que aquellos que presentaban las mayores elevaciones de PCR durante el evento isquémico tenían dos veces más probabilidades de padecer una recurrencia. Las consecuencias de la propia exagerada reacción inflamatoria añadida a este contexto por la CEC y el daño adicional por la ISQ/REP miocárdicas perioperatorias en la evolución de la permeabilidad de los injertos coronarios o la progresión de la enfermedad aterosclerótica postoperatoria no están estudiadas.

En el presente trabajo se demuestra que en la sangre del seno coronario de los pacientes del grupo tratado a los 30 minutos de la reperfusión existe una atenuación en la liberación de NFκB, INF-γ, O₂⁻ e IL-10, así como un aumento de la concentración de NO. En este aspecto el estudio está limitado por el hecho de que no se poseen datos simultáneos de la sangre sistémica para comprobar si existe realmente en ese momento un gradiente de las concentraciones de marcadores inflamatorios, liberación de radicales libres y NO entre la sangre arterial periférica

que está irrigando el capilar miocárdico a través de los ostia coronarios y la sangre del seno coronario que recoge los productos del metabolismo cardiaco. Los datos de los que disponemos sugerirían que esto no es así, ya que groseramente no se evidencia un gradiente en la liberación de ácido láctico en el seno coronario respecto a la sangre arterial periférica en ninguno de los grupos en los dos momentos en los que se extrajeron estas muestras (a los 2 y 30 minutos después del despinzamiento aórtico). Por otro lado, como ya se ha comentado anteriormente tampoco se evidencia traducción clínica de esa supuesta protección del miocardio frente a la ISQ/REP. Los resultados de este trabajo no consiguen demostrar un beneficio en el grupo Estudio en cuanto a la elevación postoperatoria de los marcadores de daño miocárdico (CPK-MB y Tn-I). Se produjo una liberación mayor de CPK-MB en casi todas las determinaciones en el grupo Estudio, pero las diferencias no resultaron significativas. Como es sabido, la CPK-MB no es específica para músculo cardiaco, y una fracción variable de CPK total según los grupos musculares esqueléticos de los que se trate está formada por CPK-MB. Por ello se comparó también el porcentaje de la CPK total máxima que correspondía a CPK-MB en cada grupo. Las diferencias, aunque favorables al grupo tratado con PRAV en cuanto a una menor proporción de CPK-MB, no resultaron tampoco significativas. Aunque se observó una tendencia a una liberación superior de Tn-I entre las 8 y las 40 horas y en la concentración máxima de Tn-I en el grupo Placebo respecto al grupo Estudio, no se evidenciaron diferencias significativas tampoco en este caso. Sin embargo, datos indirectos que se comentarán posteriormente ante los hallazgos obtenidos en la prevención de la respuesta inflamatoria hacen pensar que la atenuación del daño por ISQ/REP pueden estar implicados en una menor amplificación de la respuesta inflamatoria provocada por la CEC. No en vano uno de sus principales desencadenantes es, como se ha comentado, el fenómeno isquémico y la subsiguiente reperfusión. En cualquier caso, es evidente que la extracción aislada de sangre del seno coronario no discrimina entre el daño por ISQ/REP miocárdicas y la reacción inflamatoria inducida por la cirugía y la CEC. Sin embargo, las alteraciones en las concentraciones de las moléculas implicadas en ambos fenómenos se ven reflejadas en dicha muestra, por lo que es más probable que si realmente existe un gradiente magnifique aún más las diferencias que, como veremos, se producen en el contexto de la reacción inflamatoria por sí misma.

Hasta el momento actual las recomendaciones para el inicio del tratamiento con estatinas en el contexto de reperfusión clínica tras síndromes coronarios agudos no incluyen a este grupo de fármacos en la fase aguda del proceso^{289,303,304}. En el caso del síndrome coronario sin elevación del segmento ST la recomendación es comenzar con el tratamiento con estatinas entre las 24 y 96 horas del ingreso en pacientes con LDL mayor de 100mg/dl, y como recomendación tipo IIa³⁰⁴. Para el IAM y el postoperatorio se recomienda comenzar con las estatinas al alta hospitalaria, aunque en estos casos se incluyen pacientes con niveles normales de colesterol y LDL³⁰³. Tampoco existen recomendaciones al respecto en el contexto de

la reperfusión mediante procedimientos percutáneos. En caso de que se pudiera confirmar en humanos un beneficio después de dosis únicas en cuanto a la respuesta inflamatoria, las indicaciones se podrían extender a los primeros momentos tras los eventos agudos.

Finalmente se debe comentar que en este estudio la estatina que los pacientes tomaban de manera crónica preoperatoriamente no fue administrada la noche previa a la cirugía, como se ha dicho, para evitar interferencias entre otros tipos de estatinas así como niveles exageradamente elevados de fármacos que pudieran potenciar sus efectos secundarios. Existen trabajos en los que se demuestra que los efectos protectores sobre el daño por ISQ/REP pueden anularse en caso de suspensión relativamente prolongada del tratamiento. Experimentalmente, Gertz et al.³⁰⁵ han demostrado que la atorvastatina a dosis de 10 mg/kg administrada durante 14 días es capaz de reducir el tamaño del infarto cerebral en ratones sometidos a isquemia mediante ligadura de 1 hora de duración de la arteria cerebral media y reperfusión durante 23 horas. Además la suspensión de la estatina 4 días antes anula este beneficio en cuanto al tamaño del infarto. Tras 2 días sin tratamiento la expresión del RNA-m de la eNOS se reduce 2,3 veces en cerebro y 5 veces en aorta, y tras 4 días sin tratamiento sus niveles se igualan a los de los animales controles. Parece que en la rápida disminución de la síntesis de NO está implicada la transcripción del gen de la Rho-GTPasa. Precisamente la regulación al alza de la eNOS durante el tratamiento con estatinas parece deberse, como ya se ha comentado previamente, a la inhibición de la geranilgeranilación de esta pequeña G-proteína Rho¹⁸⁹. Clínicamente la retirada de la estatina en pacientes diagnosticados de síndrome coronario agudo que estaban bajo tratamiento previo aumentó la incidencia de eventos cardiovasculares desfavorables respecto a los que estaban tratados previamente con estatinas e, incluso, a los que no tomaban estos fármacos previamente. En este último caso la diferencia no alcanzó significación estadística²⁰⁶.

En este estudio la suspensión de la estatina no llegó a ser mayor de 6-8 horas. La primera dosis no administrada fue la de la noche previa a la cirugía. Por ello, es poco probable que, en pacientes bajo tratamiento crónico con el fármaco, estas horas de retirada pudieran tener un efecto deletéreo en los pacientes del grupo Placebo.

EFFECTOS EN LA REACCIÓN INFLAMATORIA PERIOPERATORIA

A pesar de que, como ya se ha comentado, no se ha podido demostrar un beneficio clínico ni analítico directo en cuanto al daño miocárdico por ISQ/REP en estos subgrupos de pacientes, en el presente estudio se ha observado una llamativa reducción de la respuesta inflamatoria en el grupo tratado, tanto antes de la CEC como después de la finalización de la misma. Dada la íntima relación entre la reacción inflamatoria sistémica y la producida por la ISQ/REP del corazón y de otros

órganos durante la derivación cardiopulmonar, ha sido necesario un exhaustivo estudio de los efectos de la estatina sobre la inflamación sistémica.

Respuesta inflamatoria quirúrgica previa a la circulación extracorpórea

MARCADORES INESPECÍFICOS DE INFLAMACIÓN

En lo que respecta a los marcadores inespecíficos de inflamación (NF κ B y citoquinas) y radicales libres medidos durante la cirugía en la sangre del seno coronario antes del inicio de la CEC, la administración de PRAV previa a la intervención amortiguó significativamente la liberación de TNF- α , INF- γ y factor transcripcional en las determinaciones realizadas. Consecuentemente no se objetivaron diferencias significativas en sus niveles entre el grupo Estudio y los voluntarios sanos. Los pacientes a los que se les administró placebo, por el contrario, presentaban en ese momento niveles de dichas moléculas significativamente más elevados que los controles sanos. Tanto los niveles de la interleuquina anti-inflamatoria IL-10 como los de O $_2^-$ resultaron elevados en grado similar en ambos grupos respecto al grupo sano.

La agresión quirúrgica en sí, independientemente de la CEC, produce una respuesta inflamatoria proporcional al grado de lesión causado, como se ha demostrado previamente en otros tipos de cirugía no cardíaca. Chaudhary et al³⁰⁶ demostraron ya en 1999 que la colecistectomía laparoscópica inducía una respuesta inflamatoria significativamente más atenuada que la realizada a través de un abordaje convencional medida a través de la liberación de TNF- α , PCR y radicales libres derivados del oxígeno. En cirugía coronaria, por el contrario, Diegeler et al²⁵ diseñaron un interesante estudio en el que se comparó la respuesta inflamatoria inducida por el procedimiento practicado por esternotomía media y por minitoracotomía izquierda. No observaron diferencias relativas al abordaje quirúrgico en la liberación de citoquinas y complemento, probablemente debido a que en este caso la diferencia de la agresión quirúrgica entre ambas técnicas no es tan llamativa como en el trabajo anterior.

En trabajos aleatorizados que han estudiado el efecto de la liberación de citoquinas en el perioperatorio de cirugía coronaria con CEC después de tratamientos más o menos prolongados con estatinas se ha observado que los niveles de estas moléculas inflamatorias previas al inicio de la inducción anestésica y, por tanto, de la agresión quirúrgica, son similares en los grupos tratados y no tratados a pesar de presentar perfiles lipídicos diferentes. Chello et al²⁴³ observaron que las concentraciones de IL-6, IL-8 y TNF- α previas a la cirugía eran similares en el grupo de pacientes tratados durante tres semanas con atorvastatina que en el tratado con placebo a pesar de que el grado de control de la hiperlipidemia en el

grupo tratado era significativamente más favorable. Estos datos hacen pensar que efectivamente, la administración aguda de la estatina previa a la cirugía es la responsable de estos hallazgos, dado que todos nuestros pacientes estaban tratados con estatinas a dosis similares y con un control similar de la dislipemia antes de dicha sobreadministración.

Por su parte, se ha observado que la activación de la respuesta inflamatoria por el trauma quirúrgico potencia la activación de la molécula anti-inflamatoria IL-10^{25,221}, a diferencia de lo que sucede en otros estados proinflamatorios como el síndrome coronario agudo, en el que se ha observado un desequilibrio entre las citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias a favor de las primeras, con elevación de INF- γ y TNF- α y disminución de IL-10¹⁰⁵. Los incrementos de su concentración son máximos a las 4 horas del trauma quirúrgico y vuelven a la normalidad a las 24-48 horas tras el mismo^{25,221}. Como se ha dicho, esta molécula modula la respuesta inflamatoria a través de la inhibición de la síntesis de múltiples citoquinas en diversas situaciones. En pacientes con insuficiencia cardíaca, donde existe un desbalance ente la actividad de los linfocitos Th1 y Th2 y el subsiguiente sustrato proinflamatorio, se observa que la IL-10 está disminuida, lo cual contribuye a la preponderancia de la actividad proinflamatoria respecto a la antiinflamatoria³⁰⁷. De igual modo, se ha demostrado que los pacientes con angina inestable presentan niveles de IL-10 más bajos que aquellos diagnosticados de angina estable³⁰⁸. Sin embargo, el comportamiento de los niveles de IL-10 ante diversas situaciones inductoras de reacción inflamatoria en respuesta a la administración de estatinas (aparte de la originada por la CEC de la que se hablará más adelante) es todavía muy contradictorio. Se ha demostrado que las estatinas potencian la síntesis de IL-10 en el contexto del IAM³⁰⁹ y que ello podría tener que ver con los efectos favorables de estos fármacos en cuanto al remodelado y la función ventricular. Li et al administraron durante 4 semanas atorvastatina a dosis bajas (20 mg/día) versus placebo a pacientes después de un episodio de angina inestable y observaron una significativa reducción de los niveles de PCR y un incremento de los de IL-10 al final de ese periodo³⁰⁸, aunque es cierto que en el grupo tratado con placebo el control de la hiperlipidemia fue menos favorable, como era de esperar, que en el grupo tratado. En recientes modelos experimentales de miocarditis inducida por inyección de Coxsackievirus B3 en ratas se ha observado igualmente que la PRAV a dosis elevadas consigue aumentar los niveles de IL-10 y mejorar el balance INF- γ /IL-10³¹⁰. Sin embargo, en modelos de ISQ/REP cardíaca en ratas se ha demostrado que la atorvastatina es capaz de disminuir el tamaño del infarto y de disminuir la expresión del RNA-m del TNF- α pero con una reducción concomitante de la concentración de IL-10. Los autores concluyen que esta IL antiinflamatoria no está implicada en los mecanismos protectores del miocardio por los cuales actúa la estatina³¹¹. De manera similar, en un modelo experimental Almeida et al administraron de manera randomizada y controlada por placebo simvastatina a ratas a las que se provocó experimentalmente pancreatitis aguda. El fármaco

consiguió reducir los niveles de mieloperoxidasa pulmonar y una tendencia hacia una mayor supervivencia de las ratas tratadas. Sin embargo no se objetivaron cambios en otros parámetros monitorizados (permeabilidad vascular pancreática, contenido tisular de agua, niveles de amilasa e IL-6 en suero y niveles de TNF- α en líquido ascítico). Todo ello se acompañó, de nuevo, de una reducción de los niveles de IL-10 plasmáticos⁹⁹.

Por otro lado, hasta donde conocemos, no se ha estudiado si las estatinas son capaces de potenciar o atenuar la síntesis de esta citoquina en el contexto de la reacción inflamatoria inducida por el trauma quirúrgico *per se*. En nuestro caso, a pesar de una respuesta inflamatoria pre-extracorpórea atenuada por el fármaco, se ha observado una similar concentración en sangre de esta molécula en el grupo tratado y en el grupo Placebo y significativamente superior en ambas a la detectada en la sangre de los controles sanos. Posteriormente se analizará el comportamiento en ambos grupos tras el inicio de la CEC, lo cual, como se comentará más adelante, arroja si cabe aún más confusión al análisis de la evolución temporal de las concentraciones de esta molécula.

En cuanto al estrés oxidativo y la liberación de radicales libres, se ha observado en diferentes estudios experimentales³¹² y clínicos^{313,314} que durante el trauma quirúrgico y en el periodo postoperatorio inmediato, la producción de O_2^- está disminuida. Ello probablemente es debido a la disfunción de la actividad de los NEU generada por el acto quirúrgico. Coincidiendo con ello, Kudou et al³¹⁵ demostraron en varios tipos de cirugía que la actividad de la superóxido dismutasa estaba disminuida durante todos los procedimientos quirúrgicos. En el presente estudio se observa, sin embargo, una elevación de la producción de O_2^- después de la esternotomía y la disección de los injertos coronarios antes de la CEC en ambos grupos. En el trabajo de Orhan et al se observó de manera similar que la capacidad de producción de radicales libres tras cirugía coronaria sin CEC estaba aumentada¹⁷. En este caso el 70 y 80% de pacientes de cada grupo eran hiperlipidémicos y, aunque en el estudio no queda expresamente reflejado, al menos ese porcentaje de pacientes, si no todos, estarían presumiblemente en tratamiento preoperatorio con estatinas.

La elevación de las concentraciones del radical libre antes del inicio de la CEC en cirugía coronaria, a diferencia de lo que ocurre en otros tipos de cirugía, puede sugerir que en pacientes dislipémicos y ateroscleróticos la hiperlipidemia disminuye la liberación de NO por parte del endotelio al aumentar su catabolismo por radicales superóxido¹⁸². Además los niveles elevados de LDL pueden interferir con el transporte activo de la L-arginina en la célula endotelial, rompiendo la cadena L-arginina-eNOS y disminuyendo así la síntesis de NO, con lo que a su vez aumentan la producción de radicales superóxido¹⁸³. Aunque en este trabajo los pacientes tenían controlados los niveles de lípidos mediante el tratamiento crónico con

estatinas, los niveles de LDL no estaban por debajo de 100 mg/dl de manera rutinaria, tal y como se recomienda hoy en día. Los resultados de este estudio demuestran que la administración de la estatina en dosis única, inmediatamente antes del inicio de la cirugía, reduce efectivamente esa liberación de radicales libres en el grupo tratado respecto al placebo y que este efecto se mantiene durante todas las mediciones realizadas posteriormente.

MOLÉCULAS DE ADHESIÓN

En cuanto a las moléculas de adhesión, los pacientes del grupo Placebo presentaron elevaciones significativas en el seno coronario antes de la CEC en las concentraciones de todas las moléculas de adhesión solubles estudiadas (sP-selectina, sL-selectina, sICAM y sCD18) respecto al grupo de controles sanos mientras que en el grupo tratado con estatinas sólo se evidenció una elevación significativa de CD18 soluble.

Como se ha descrito, la inflamación puede regular a la baja la expresión de L-selectina en la superficie de los leucocitos por desprendimiento de su membrana, con el consiguiente aumento de sus niveles plasmáticos como formas solubles¹¹⁵. La elevación de las moléculas de adhesión es normal durante la cirugía coronaria antes de la CEC. Berkan et al²⁸¹ estudiaron los niveles de sP-selectina en pacientes candidatos a cirugía de revascularización después de la administraron de fluvastatina a dosis elevadas durante las 3 semanas previas y observaron que los niveles de la molécula estaban significativamente elevados ya antes del pinzamiento aórtico, que se suele realizar a los pocos minutos del inicio de la derivación cardiopulmonar. Sin embargo no se encontraron diferencias significativas en ese momento entre ambas concentraciones y sí en todas las determinaciones posteriores a la CEC. Curiosamente en este caso, los pacientes pretratados presentaban antes de la cirugía niveles superiores de la molécula que los no tratados. De nuevo, en este estudio no se administró una dosis de carga inmediatamente a la cirugía como fue nuestro caso, por lo cual los resultados pueden no ser superponibles.

PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO Y NIVELES DE iNOS

La concentración de NO y de iNOS en el seno coronario antes de la CEC en el grupo Placebo fue significativamente mayor que en la sangre de las personas del grupo de controles sanos mientras que en el grupo Estudio ambas se mantuvieron en concentraciones similares. No se determinaron los valores preoperatorios de ambas moléculas en nuestros pacientes, por lo que no sabemos si las concentraciones basales antes de la derivación cardiopulmonar eran ya diferentes en ambos grupos ni su relación con los valores de los voluntarios sanos.

Existen muy pocos estudios en los que se hayan determinado los valores normales de NO en personas sanas. Elli y cols.³¹⁶ estudiaron en 2005 a 296 niños sanos y observaron que sus niveles varían con la edad, de manera que son máximos en los primeros 36 meses de vida y alcanzan niveles estables a partir de entonces. De la misma manera, Ghasemi et al han determinado recientemente los valores de referencia en una población adulta sana no fumadora y han observado valores de nitratos/nitritos muy variables, con el 95% de las muestras entre 11,5 y 76,4 micromol/L en varones y entre 10,1 y 65,6 micromol/L en mujeres³¹⁷. Estos valores son similares para ambos sexos cuando se ajustan por edad y alcanzan de nuevo un pico en la edad adulta a los 50-60 años³¹⁸. Por otro lado, en el contexto de la cirugía cardíaca, existen numerosos estudios que han comparado los valores de NO^{149,231} y de iNOS²²⁸ antes y después de iniciada la CEC. Sin embargo, en ninguno de ellos se han comparado los valores previos a la cirugía con los previos a la derivación cardiopulmonar y después de un periodo más o menos prolongado de procedimiento quirúrgico. En cambio, se ha demostrado que en los procedimientos de cirugía coronaria sin CEC los valores plasmáticos de NO se mantienen estables durante todo el procedimiento y permanece en dichos niveles y sin modificaciones significativas hasta 120 horas tras la cirugía²¹⁰.

Estos datos aparentemente difieren de lo hallado en el presente estudio, en el cual los pacientes del grupo Placebo que no recibieron estatina preoperatoria presentaban valores de NO e iNOS superiores a los del grupo Estudio y al de los controles sanos. Sin embargo, los valores basales preoperatorios medios de ambos grupos en el trabajo de Schulze y cols. superaban los 20 micromol, muy por encima de los observados en nuestro grupo Estudio y de los controles sanos y similares a los del grupo Placebo. En dicho trabajo no se menciona el grado de control de la hiperlipidemia que presentaban los pacientes ni el porcentaje de ellos que estaban preoperatoriamente tratados con estatinas. El motivo por el cual los pacientes del grupo Placebo presentaron una elevación de los valores de estas moléculas entre el inicio del procedimiento quirúrgico y el inicio de la CEC no está claro. Por otro lado, el efecto de la administración de estatinas en su liberación en el contexto de procedimientos quirúrgicos sin CEC no ha sido estudiado previamente.

Respuesta inflamatoria inducida por la circulación extracorpórea

De manera llamativa, y como hallazgo más significativo del estudio, la administración de PRAV en dosis única preoperatoria en pacientes bajo tratamiento crónico con estatinas de su hiperlipidemia consigue atenuar de manera intensa y relativamente duradera la reacción inflamatoria inducida por la CEC.

En líneas generales, la respuesta inflamatoria sistémica post-CEC se caracteriza precisamente por una liberación exagerada de factores proinflamatorios como la IL-1, IL-6 e IL-8, así como de TNF- α , y la magnitud de sus concentraciones se ha correlacionado con el desarrollo de complicaciones postoperatorias^{319,320}.

MARCADORES INESPECÍFICOS DE INFLAMACIÓN

1. Proteína C-reactiva

La PCR es un marcador inespecífico de inflamación que ha sido ampliamente utilizado para cuantificar la reacción inflamatoria en múltiples contextos clínicos. Además, cada vez es mayor la evidencia que relaciona la PCR con la aparición de eventos cardiovasculares, muy especialmente para el caso de la cardiopatía isquémica. No en vano es sobradamente conocido desde hace años que el proceso aterosclerótico está íntimamente ligado a la inflamación. A los hallazgos del clásico estudio de Haverkate et al sobre el seguimiento de pacientes después de un evento isquémico agudo³⁰² se añaden los datos proporcionados por un muy reciente análisis de más de 15.000 pacientes originariamente incluidos en el estudio aleatorizado JUPITER. En él se demostró que reducir las cifras de LDL por debajo de 1,8 mmol/L (70 mg/dl) mediante tratamiento con estatinas reducía un 55% (RR 0,45, IC al 95% 0,34-0,60, $p < 0,0001$) la aparición de eventos cardiovasculares (muerte de origen cardiovascular, IAM o accidente cerebrovascular no fatales, angina inestable o revascularización coronaria) al cabo de un seguimiento medio de tan sólo 1,9 años. Adicionalmente se objetivó que mantener concentraciones de PCR de alta sensibilidad menores de 2 mg/dl se asociaba a un 62% de reducción de dichos eventos (RR 0,38, IC al 95% CI 0,26-0,56, $p < 0,0001$) y un 65% en los enfermos que conseguían ambos objetivos, en comparación con un 33% en aquellos que sólo conseguían uno o ningún objetivo. Cuando se conseguía mantener LDL menor de 70 mg/dl y PCR menor de 1 mg/dl el beneficio se incrementaba aún más (79%, RR 0,21, IC al 95% 0,09-0,52)²⁰¹. De manera todavía más sorprendente, el beneficio de la reducción de la PCR se mantenía independientemente de los rangos de reducción de LDL conseguidos. La relación entre el incremento de los niveles de PCR y el riesgo cardiovascular se observa incluso en grupos poblacionales orientales en los que las concentraciones basales de PCR en la población sana son significativamente más bajas que en la población occidental³²¹. La capacidad de predicción de eventos cardiovasculares se ha extendido también a otras áreas, de manera que se ha demostrado que los valores de PCR preoperatorios en cirugías no cardíacas son predictores de mortalidad y morbilidad cardiovascular a largo plazo³²².

En el contexto del trauma quirúrgico, como es lógico la PCR se incrementa postoperatoriamente de manera significativa debido a la reacción inflamatoria provocada por el trauma operatorio en sí. El aumento de sus concentraciones, además, se ve efectivamente potenciado por la CEC. En el trabajo de Schulze y cols.²¹⁰ se determinaron las curvas de liberación de PCR en el postoperatorio de cirugía coronaria con y sin derivación cardiopulmonar y se demostró que en ambos casos la concentración de PCR era superior a los valores preoperatorios en las determinaciones de las 6 y las 120 horas. Sin embargo, los pacientes sometidos a

CEC presentaban un incremento significativamente superior y además mucho más duradero, persistente en la muestra de las 120 horas. A diferencia de ello los pacientes sin derivación cardiopulmonar las cifras de PCR se normalizaban a las 72 horas de la finalización de la cirugía. Hallazgos similares se observaron en el estudio de Chowdhury et al, en el que después de cirugía coronaria la concentración de PCR fue significativamente mayor a las 4 y 8 horas postoperatorias en el grupo intervenido con CEC³²³.

Cuando se ha estudiado el efecto de la administración de estatinas en este contexto los resultados son contradictorios. Dereli y cols.²⁴⁰ observaron reducción de la PCR postoperatoria después de administración de atorvastatina a pacientes hiperlipidémicos al menos durante los 15 días previos a la intervención respecto a la administración de placebo a pacientes con cifras de LDL menores de 100mg/dl. Caorsi et al²⁴¹ demostraron que la administración de PRAV tan sólo 48 horas antes y 7 días después de la cirugía, con una dosis adicional de 40 mg una hora tras la finalización de la CEC, reducía significativamente la concentración de PCR frente a la administración de placebo. Además, como se ha comentado previamente, la reducción de las cifras de PCR se ha relacionado con disminución de eventos cardiovasculares postoperatorios (elevación de marcadores de daño miocárdico y reducción de la necesidad de inotrópicos postoperatorios)²³⁶. En otros trabajos, sin embargo, la administración de estatinas no ha demostrado una reducción de este marcador inflamatorio. El estudio aleatorizado ARMYDA demostró que la administración de estatinas preoperatoriamente a pacientes sin tratamiento previo con ellas reduce la prevalencia de fibrilación auricular postoperatoria y que los pacientes que desarrollan la arritmia presentan niveles de PCR más elevados que los que no lo hacen. Aunque en este estudio la administración de estatinas no disminuyó los niveles de PCR postoperatoria, el 20% de pacientes de cada grupo presentaban hiperlipidemia sin tratamiento con estatinas y además se incluyeron también pacientes sometidos a cirugía valvular¹⁸. Por su parte, Mathew et al²⁴², en un estudio prospectivo observacional en más de 400 pacientes sometidos a cirugía coronaria aislada objetivaron que el tratamiento preoperatorio con estatinas no redujo las cifras de PCR postoperatoria a pesar de que el grupo no tratado presentaba valores de LDL mayores que el tratado. Sin embargo, el carácter no aleatorizado del estudio y otras diferencias demográficas preoperatorias (fundamentalmente el sexo) entre ambos grupos hacen poco valorables estos resultados, dado que es bien sabido que las mujeres presentan más riesgo cardiovascular con similares niveles de PCR³²⁴. Por otro lado, en todos estos trabajos se ha comparado la administración de estatinas frente a placebo pero, a diferencia de este estudio, el grupo Placebo no ha sido tratado con estatinas crónicamente en ninguno de ellos.

En el presente estudio las concentraciones de PCR postoperatoria del grupo Placebo siguieron una curva superponible a las descritas en los estudios

mencionados, con valores similares a los basales hasta la determinación de las 8 horas postoperatorias. A partir de ese momento se observa un progresivo incremento que es máximo a las 40-48 horas postoperatorias. Estos valores fueron, efectivamente, superiores de manera permanente respecto a los del grupo Estudio, aunque no alcanzaron significación estadística salvo en la extracción de las 40 horas. La curva de liberación presentó una morfología bifásica con la mayor deflexión precisamente en ese momento. Probablemente la pequeña muestra ha impedido demostrar diferencias significativas en el resto de las determinaciones, dada la potente reducción del resto de los parámetros inflamatorios objetivados en el estudio y que se comentarán posteriormente. Esta morfología aparentemente bifásica de la curva no está descrita previamente aunque, evidentemente, el escaso tamaño muestral no permite extraer ninguna conclusión contundente al respecto y debería ser confirmada en estudios con mayor número de pacientes. En el trabajo de Mathew et al²⁴² los niveles postoperatorios de PCR en ambos grupos presentaron un ascenso a partir de las 6 horas postoperatorias que se mantuvo constante hasta la finalización de la extracción de muestras a las 48 horas, aunque entre las 24 y las 48 horas no medió ninguna muestra adicional. Las curvas de liberación de PCR en el estudio de Schulze y cols.²¹⁰ igualmente comprendieron muestras a las 6, 24, 48, 72, 96 y 120 horas, pero entre 24 y 48 horas tampoco se realizó ninguna determinación. Meng et al determinaron la PCR postoperatoria en pacientes coronarios pero la última extracción se realizó a las 24 horas postoperatorias³²⁵. Chowdhury et al no realizaron tampoco determinaciones analíticas entre las 24 y las 48 horas³²³.

Como se ha comentado, hasta donde conocemos este es el primer trabajo en el que se observa el efecto de una dosis adicional preoperatoria a pacientes en tratamiento crónico con estatinas y, por tanto, con una atenuación de la respuesta inflamatoria crónica estable en ambos grupos. El control crónico de la reacción inflamatoria se demuestra por los valores de PCR preoperatorios (0,6 +/- 0,5 {0,1-1,0}) en el grupo Estudio y 0,5 +/- 0,3 {0,1-1,4} en el Placebo), muy inferiores a los valores considerados de alto riesgo previamente comentado a pesar de ser pacientes con cardiopatía isquémica establecida. Esta situación ha podido influir definitivamente en la liberación de PCR postoperatoria en nuestro estudio.

2. Citoquinas, NFκB y radicales libres

En lo que respecta a los otros marcadores inespecíficos de inflamación (NFκB y citoquinas) y el estrés oxidativo expresado como concentración de O₂⁻, la PRAV redujo su concentración en el grupo Estudio de manera significativa. De manera general, este hallazgo no se ha encontrado de manera constante en todos los estudios que han investigado el efecto de la administración de estatinas en la reacción inflamatoria postoperatoria. La mayor biodisponibilidad de la PRAV respecto a otras estatinas que presentan un primer paso hepático más importante

(y por tanto unas menores concentraciones séricas de metabolito activo) pueden explicar las discrepancias de estos hallazgos encontradas en otros estudios de diseño parecido a este. Así, en el de Florens et al¹⁶ la administración de atorvastatina a dosis terapéuticas la tarde previa y la mañana de la cirugía no produjo alteraciones significativas en los niveles séricos de IL o moléculas de adhesión ni de NFκB en los miocitos auriculares. Por otro lado, en este estudio no se administró la estatina de manera prolongada, por lo que los posibles beneficios a largo plazo de este tipo de fármacos sobre la mejoría de la función endotelial basal en el contexto del paciente aterosclerótico no estarían presentes.

Los radicales libres son generados por las células endoteliales⁴² y leucocitos⁴⁴ en grandes cantidades durante la reperfusión de cualquier órgano o tejido. El trauma quirúrgico en sí y la subsecuente reacción inflamatoria también es fuente de producción de estrés oxidativo, como se ha demostrado en procedimientos quirúrgicos no cardíacos y no susceptibles de provocar fenómenos de ISQ/REP³²⁶. Por supuesto, también la intensa reacción inflamatoria provocada por la CEC es capaz de generar grandes cantidades de radicales libres. Cuando al procedimiento quirúrgico y la derivación cardiopulmonar se añade un insulto isquémico, la generación de radicales libres se potencia. Durante la cirugía con derivación cardiopulmonar y pinzamiento aórtico, la producción de radicales libres se incrementa en los primeros 30 minutos tras éste último, como consecuencia de la isquemia miocárdica y también de la CEC. A los tres minutos del inicio de la reperfusión miocárdica ya se puede observar un repunte de la concentración de radicales libres en la sangre del seno coronario respecto a la sangre periférica, por tanto en clara relación con la reperfusión¹⁵. Tanto la liberación de radicales libres⁴³ como la de TNF-α⁸¹, se inicia de manera precoz por el endotelio y los mastocitos cardíacos respectivamente a los pocos minutos de esa reperfusión miocárdica. Sin embargo, esa elevación suele verse enmascarada y sobrepasada por la elevada cantidad de radicales libres en sangre periférica producida por la CEC y que llega a la arteria coronaria antes de transitar por el capilar miocárdico¹⁵. Estos hallazgos han sido confirmados por otros estudios en los que el pico de concentración de O₂⁻ durante la cirugía se observa también en relación con la reperfusión¹⁴, aunque también se ha observado que la capacidad de los leucocitos para generar radicales libres cuando son estimulados por TNF-α es máxima a las 12 horas de la cirugía²¹³.

En el presente estudio, la concentración de radicales libres fue significativamente inferior en el grupo Estudio respecto al grupo Placebo en todas las muestras extraídas, incluida la previa a la CEC. Este hecho demuestra la eficacia de la PRAV en la disminución de la respuesta inflamatoria y, posiblemente, de sus efectos deletéreos mediados por la acción tisular de estas moléculas. La curva de concentración de radicales libres después de la cirugía evidenciada en el estudio presentó, además, un pico a los 5 días de la cirugía en el grupo Placebo, no observado en los pacientes del grupo tratado. En otros estudios en los que se ha

estudiado este parámetro la concentración de radicales libres tras cirugía con CEC vuelve a los valores preoperatorios a las 24 horas¹⁴. Así, en el trabajo de Kawahito et al, la producción de O_2^- a los 7 días de la cirugía fue similar a la preoperatoria²¹³. Esta persistencia tan tardía de estrés oxidativo no ha sido descrita previamente y es difícil de explicar, salvo por el mantenimiento de la inflamación en el contexto de la reparación del trauma quirúrgico una vez finalizado el impacto del estrés oxidativo generado por la ISQ/REP y la CEC. De nuevo, el escaso tamaño muestral, unido a la gran dispersión de la determinación en esa extracción (tal y como queda reflejado gráficamente el diagrama de caja de la figura 25) hace difícil sacar conclusiones definitivas al respecto.

El NF κ B juega un papel fundamental en el daño por ISQ/REP y en el proceso inflamatorio en general. En el trabajo de Li y cols. se demostró ya en 1999 que esta molécula se activa rápidamente en los primeros 5 minutos del inicio del daño isquémico aislado y que por tanto puede ser una de las señales intracelulares más precoces para la posterior regulación y control de la expresión genética durante el proceso de ISQ/REP⁵⁹. Parece que su liberación sérica en este contexto se podría producir en dos picos a los 30 minutos y a las 3 horas de la reperfusión. El primero de ellos estaría en relación con los radicales libres del oxígeno liberados en los 2-3 minutos iniciales y el pico tardío con la liberación de citoquinas que promueve el propio factor transcripcional⁵⁴. Adicionalmente, su activación es también promovida por múltiples moléculas relacionadas con el proceso inflamatorio, como son los propios radicales libres (elevados en el grupo Placebo respecto al grupo Estudio ya durante la cirugía pero antes del inicio de la CEC), citoquinas, iNOS y el complemento. Como se ha comentado, precisamente el complemento es la fuente primordial de reacción inflamatoria masiva en los minutos iniciales de la derivación cardiopulmonar.

Este papel central en el inicio y mantenimiento del daño por ISQ/REP y en la reacción inflamatoria, procesos ambos intensos durante el tipo de cirugía a que se refiere este estudio, explica la exagerada elevación en su concentración que presentan los enfermos del grupo Placebo. Sus concentraciones se encuentran elevadas ya a los 30 minutos del despinzamiento aórtico por esa activación inicial originada por el complemento activado masiva y precozmente por la CEC, el proceso de isquemia miocárdica inducido por el pinzamiento aórtico, etc. Posteriormente alcanza unos niveles marcadamente elevados a las 24 horas como consecuencia de la amplificación que sufre su activación después de la transcripción por él mismo de los genes de citoquinas. La expresión de las moléculas de adhesión y la liberación de las citoquinas requiere un cierto periodo de tiempo (4-8 horas, según la molécula) debido a que precisan de esa transcripción genética y síntesis proteica "de novo". Este hecho explica esa amplificación más tardía tanto de las concentraciones de factor transcripcional como de todas las moléculas cuya expresión él mismo induce.

La intensa atenuación en su activación inducida por la PRAV en el grupo Estudio puede ser fundamental para la reducción observada de la respuesta inflamatoria. Al bloquear su activación se inhibe también la transcripción de los genes de activación de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1, IL-6, IL-8 y TNF- α ⁵⁴) y sus receptores, PAF⁴⁹, moléculas de adhesión (ICAM-1 y E-selectina)⁵⁵ e iNOS⁵⁶.

De manera similar a lo que ocurre con el factor transcripcional, también el TNF- α , es considerado un desencadenante de la respuesta inflamatoria. Es segregado por leucocitos activados y también por el músculo isquémico^{82,83}, grupos celulares ambos frecuentes en el contexto que nos ocupa. Induce la expresión de los genes de otras citoquinas, incluido el de sí mismo, moléculas de adhesión, la quimiotaxis y el metabolismo oxidativo de los leucocitos⁸²⁻⁸⁴.

Su liberación se inicia en cuestión de minutos después de la reperfusión⁸¹. La CEC es un estímulo que aumenta sus niveles también de manera precoz, lo que puede apreciarse ya a los pocos minutos de su inicio¹⁴. En el presente estudio se observó de nuevo una reducción significativa en su liberación con la administración de la dosis única de PRAV. Este efecto se objetivó ya a los 30 minutos del despinzamiento aórtico en la sangre del seno coronario, como corresponde al patrón de liberación precoz que presenta, y fue máxima a las 24 horas en sangre periférica. Sin embargo, las curvas de liberación en ambos grupos fueron morfológicamente similares, a diferencia de lo que ocurrió con el NF κ B cuya reducción proporcional en el grupo Estudio fue más marcada. Este hecho se puede deber a que se ha demostrado que el pico de liberación de la molécula se observa a las 4 horas de la finalización de la derivación cardiopulmonar¹⁴ y en nuestro estudio no se realizó ninguna determinación en ese momento.

Nuestros hallazgos difieren de los encontrados por Caorsi et al²⁴¹. En su estudio la administración de 40 mg diarios de PRAV durante las 48 horas previas a la cirugía no produjo ningún efecto en la concentración de TNF- α ni de IL-1 a las 24 y 48 horas ni a los 7 días tras cirugía coronaria. Sin embargo produjo variación en la de otros marcadores proinflamatorios (IL-6 y PCR), a pesar de que los pacientes del grupo placebo no recibió en ningún momento estatinas. La explicación de estas diferencias radica, muy probablemente, en que en su estudio el tratamiento preoperatorio fue más corto, con pocas probabilidades de estabilizar la función endotelial de los pacientes tratados en un grado similar al de los pacientes tratados crónicamente con la estatina. Adicionalmente no se administró ninguna dosis inmediatamente antes del insulto inflamatorio, por lo que los niveles de metabolito activo en el momento de la cirugía probablemente fueron menores que los alcanzados en el presente trabajo. Sin embargo, es poco explicable que en su caso sí se demostrara una reducción de la concentración de IL-6, dado que esta molécula

es segregada precisamente ante el estímulo fundamentalmente del TNF- α y de la IL-1.

En el estudio que nos ocupa, la liberación de TNF- α se mantiene elevada a los 5 días de la cirugía y en ese momento existen todavía diferencias significativas entre ambos grupos. Dado que la vida media del TNF- α es corta (aproximadamente 6 minutos)³²⁷, ello demuestra un mantenimiento del proceso inflamatorio en ambos grupos durante ese tiempo, más marcado en el grupo Placebo que en el grupo Estudio. En el estudio de Franke et al³²⁸, realizado en un contexto clínico similar al de este estudio, los niveles séricos de TNF- α regresaron a los basales a los 3 días postoperatorios. Sin embargo, la media de injertos coronarios fue de 2,5+/- 0,2 a diferencia de los 3,5 injertos realizados en el presente estudio y, por tanto, los tiempos de pinzamiento aórtico y CEC rondaron los 50 y 80 minutos respectivamente, llamativamente menores que los precisados por nuestros pacientes. Ello puede justificar su menor respuesta inflamatoria.

El INF- γ es uno de los marcadores más específicos de activación linfocitaria⁸⁸ y juega un papel fundamental en la inmunidad a través de sus conocidas acciones de colaboración con el sistema ubiquitona-proteasoma en la activación de los sistemas inmunes proteolíticos frente a infecciones virales⁸⁹ y en la activación de los macrófagos⁸⁸. En nuestro estudio se observó un incremento de sus niveles séricos en ambos grupos respecto al estado basal preoperatorio así como un incremento significativamente mayor en el grupo Placebo respecto al grupo tratado con estatina. Steppich y cols. han demostrado que en los pacientes con angina inestable se produce un incremento notable de la liberación de esta citoquina por células CD4(+)/CD28(-) que segregan grandes cantidades de la misma y presentan un alto poder proinflamatorio⁸⁸. Sin embargo, de nuevo Franke et al no observaron modificaciones temporales en la concentración de esta molécula en determinaciones realizadas en los días 1º, 3º y 5º del postoperatorio³²⁸. En consecuencia, la diferencia de la magnitud del insulto inflamatorio y el tiempo de isquemia miocárdica/reperfusión puede resultar definitivamente decisiva en la activación de la respuesta sistémica. Por ende, la prevención de dicha respuesta inflamatoria por la dosis de PRAV en nuestros pacientes puede ser potencialmente más beneficiosa en enfermos que precisen tiempos de CEC o tiempos de isquemia prolongados.

Resultan también extremadamente interesantes los hallazgos encontrados con la variación de las concentraciones de la molécula antiinflamatoria IL-10, sobre todo cuando se comparan con los encontrados en otros estudios. La síntesis de esta citoquina es estimulada por la IL-12, IL-6 y el TNF- α ⁹⁸. Ejerce sus efectos antiinflamatorios a través de la inhibición de la síntesis de otras citoquinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8)²², del factor transcripcional⁵⁶ y de proteinasas así como estimulando directamente la producción del inhibidor tisular de metaloproteinasas en los macrófagos¹⁰⁰. Los individuos con deficiencia genética de IL-10 presentan mayor

reacción inflamatoria local y mayor tamaño del infarto después de un periodo de ISQ/REP^{101,102}, así como un aumento de la capacidad adhesiva del endotelio frente a los granulocitos activados¹⁰³.

Existen trabajos en los que se ha demostrado que el proceso inflamatorio podría estar en relación con el desbalance entre la concentración de las moléculas anti-inflamatorias y las proinflamatorias. El tratamiento con esteroides preoperatorio induce un incremento de la producción de IL-10 al igual que las estatinas. Liakopoulos et al²⁴⁷ midieron la concentración de IL-10 en pacientes sometidos a revascularización coronaria electiva con derivación cardiopulmonar y pinzamiento aórtico. Observaron que el tratamiento previo con dosis variables, aunque en general bajas, de estatinas (atorvastatina, PRAV y simvastatina) inducía un aumento en la concentración sérica de la molécula con un pico a los 60 minutos e incrementos aún significativos a las 4 y 10 horas tras la finalización de la CEC. Los valores se igualaban en ambos grupos a las 24 horas de la cirugía.

Paradójicamente, en el presente estudio, se produjo el efecto contrario en el grupo tratado por la estatina. En el grupo Estudio la concentración de IL-10 fue significativamente menor que en el grupo al que se administró placebo a los 30 minutos del despinzamiento aórtico en la sangre del seno coronario, a las 24 horas de la cirugía y también a los 5 días de la misma. Este efecto duradero coincide con los hallazgos de Kubala y cols., en cuyo trabajo los valores de IL-10 estaban normalizados en la muestra extraída a los 7 días de la cirugía¹¹⁰ y no a las 24 horas de la misma.

Estas diferencias entre nuestros hallazgos y los de otros estudios se pueden explicar fácilmente y, a diferencia de lo que parece, no son contradictorias sino concordantes. La IL-10 ve estimulada su síntesis por moléculas proinflamatorias tales como el TNF- α . El tratamiento con PRAV atenúa de manera importante la respuesta inflamatoria gracias probablemente a la estabilidad endotelial proporcionada por el tratamiento crónico con estatinas y la alta dosis preoperatoria adicional inhibe significativamente la expresión de ese TNF- α . Por todo ello es lógico pensar que la síntesis de IL-10 también se vea inhibida respecto a los pacientes del grupo Placebo. Por otra parte en éstos, y de manera similar a lo observado por Liakopoulos y cols., el tratamiento crónico con la estatina permite un importante incremento de la IL-10 ante el intenso estímulo inflamatorio inducido por la ISQ/REP y la CEC.

Finalmente, un hallazgo difícil de explicar del presente trabajo es la disminución en las concentraciones de IL-10 observadas en el grupo Estudio después del inicio de la derivación cardiopulmonar respecto a los valores previos a su inicio y que creemos que tampoco ha sido descrito previamente.

MOLÉCULAS DE ADHESIÓN

Tras observar el efecto que ejerce la administración de PRAV preoperatoria en todas las moléculas proinflamatorias implicadas en el inicio y mantenimiento de la reacción inflamatoria, es lógico pensar que los efectores de la acción de dichas moléculas, como son la célula endotelial y el leucocito, también resulten menos activados por el efecto del fármaco.

Previamente se ha demostrado que las estatinas disminuyen la adhesividad leucocitaria al reducir la expresión de CD11b monocítico²⁰⁰ y de ICAM-1 endotelial¹⁹⁸. Y, efectivamente, en el presente trabajo la activación de ambos grupos celulares se vio significativamente atenuada en el grupo tratado. Ello quedó demostrado por la significativa reducción de las fracciones solubles de ambas selectinas estudiadas (L-selectina leucocitaria y P-selectina del endotelio), implicadas en el fenómeno de "rolling" leucocitario, así como de la ICAM-1 endotelial y la integrina CD-18 leucocitaria, ambas implicadas en los procesos de adhesión firme. En relación con la P-selectina es interesante destacar que no se encuentra en la superficie de las células endoteliales inactivas¹¹⁶, a diferencia de lo que ocurre con la L-selectina, que se puede encontrar en la superficie de los leucocitos quiescentes. Por tanto, su hallazgo en concentraciones atenuadas en su forma soluble en suero refleja una eficaz inhibición de la activación de la célula endotelial por la administración del fármaco.

Igualmente, ya se había demostrado que los niveles de las moléculas de adhesión estaban significativamente aumentados en pacientes con hipercolesterolemia^{244,329} y que las estatinas reducían los niveles plasmáticos de las moléculas de adhesión solubles en pacientes con hiperlipidemia o cardiopatía isquémica³³⁰. Es sabido que estos subgrupos de enfermos presentan una marcada activación y disfunción endotelial mediada por la disminución de la secreción de NO. Sin embargo, el grupo de Chello y cols. demostraron en dos trabajos sucesivos^{244,245} que la reducción de la expresión de moléculas de adhesión en el contexto perioperatorio es un efecto, de nuevo, puramente pleiotrópico e independiente del efecto que la hipercolesterolemia tiene sobre la función endotelial. Los niveles de ICAM-1 y E-selectina resultaron atenuados después de la cirugía de revascularización coronaria en pacientes que estaban tomando simvastatina, tanto en el grupo de los respondedores (con cifras de colesterol medias preoperatorias de 183,3 +/- 24,3mg/dl) como en los no respondedores (colesterol medio preoperatorio de 275 +/- 32 mg/dl). Los hallazgos del presente estudio reflejan por tanto, de nuevo, que la dosis elevada adicional de PRAV es capaz de reducir la respuesta inflamatoria postoperatoria. Ello se refleja en la reducción de la expresión de moléculas de adhesión, tanto dependientes del endotelio como de grupos leucocitarios, a pesar de presentar niveles de colesterol similares en ambos grupos y, lo que es más llamativo, tratamiento crónico preoperatorio con estatinas.

PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO Y NIVELES DE iNOS

Por fin, uno de los hallazgos más impactantes del presente estudio es la atenuación de la liberación de NO y de iNOS tras la administración de la estatina preoperatoria. Uno de los mecanismos más conocidos de estos fármacos para ejercer sus efectos pleiotrópicos es, precisamente, la mejoría de la función endotelial y el incremento de su capacidad de producción de esta molécula. A pesar de ello, hasta el momento por lo que conocemos no existen otros trabajos que hayan analizado en la práctica clínica el efecto de la administración de estatinas en la liberación de NO durante la CEC.

En el presente trabajo, la concentración de NO estaba significativamente más elevada basalmente (antes del inicio de la CEC) y a los 30 minutos del despinzamiento aórtico en la sangre del seno coronario y a las 24 horas postoperatorias en sangre venosa en el grupo Placebo. Estas diferencias se encontraban neutralizadas a los 5 días del procedimiento. El comportamiento de la liberación de iNOS fue superponible, con una reducción significativa de su producción a las 24 horas postoperatorias en el grupo Estudio respecto al grupo no tratado.

Como se ha dicho, la producción de NO está aumentada en los procedimientos con CEC. Ruvolo et al observaron que la producción de NO comienza ya a los 30 minutos del inicio de la derivación cardiopulmonar¹⁴⁹, aunque en el momento de la reperfusión estos niveles pueden descender. Schulze et al²¹⁰ analizaron la concentración sistémica de esta molécula preoperatoriamente y en diversos momentos tras el inicio de la reperfusión en pacientes sometidos a revascularización coronaria. Estos autores observaron que los pacientes intervenidos con CEC presentaron una liberación significativamente menor de la molécula en los momentos inmediatamente posteriores a la reperfusión cardiaca (considerada como tal el despinzamiento aórtico o la finalización de la última anastomosis en los enfermos intervenidos sin CEC) y un significativo incremento, mantenido posteriormente, entre las 24 y las 120 horas.

Aunque se ha observado que tanto la eNOS²²⁹ como la iNOS²²⁸ están implicadas en este aumento de concentración por los mecanismos previamente comentados, la CEC puede producir disfunción endotelial progresiva. Por este motivo, se ha sugerido que la fuente primordial de NO en la fase finales de la derivación cardiopulmonar es la iNOS, cuya activación depende, como se ha dicho, precisamente de la propia activación de la cascada inflamatoria. La administración preoperatoria de una estatina con relativamente elevada biodisponibilidad como la PRAV permitiría que una cantidad suficiente del fármaco alcance el endotelio vascular y contribuya a preservar la función endotelial y, por tanto, al aumento

inicial de la actividad de la eNOS y de la producción local de NO. La mayor disponibilidad de NO por el endotelio en un momento de intensa activación de la respuesta inflamatoria induciría una secuencia de acontecimientos beneficiosos para reducir la magnitud de la reacción inflamatoria final. Estos fenómenos están inducidos por los mecanismos de actuación de la molécula en las caras luminal e intramural vasculares, como son:

- La elevación del cGMP en las plaquetas que inhibe la agregación plaquetaria y su adhesión al endotelio sano.
- La inactivación de radicales superóxido^{45,145} generados durante la propia isquemia y la agresión quirúrgica, probablemente inductores iniciales y muy precoces de la reacción inflamatoria y de su amplificación por moléculas "trigge" o desencadenantes como el factor transcripcional o el TNF- α .
- La inhibición de la secreción de esos radicales por los leucocitos activados¹⁴⁴.
- La modulación de la permeabilidad endotelial¹⁵¹, con todo lo que ello conlleva en cuanto a homeostasis e infiltración leucocitaria y
- La inhibición de la interacción entre el endotelio y el leucocito a través de la inhibición del "rolling" leucocitario^{45,152} por regulación a la baja de la expresión de la P-selectina en la membrana endotelial vascular, de la adhesión firme¹⁵² por inhibición de la expresión de las moléculas de adhesión, ICAM-1, VCAM-1 y CD18 y finalmente la diapédesis y el secuestro tisular de los leucocitos por alteración de la F-actina por ribosilación del ADP o inhibición del ensamblamiento de los filamentos de la molécula.

En definitiva, la reducción de la reacción inflamatoria podría radicar en una optimización de la disponibilidad endotelial de NO por estímulo de la eNOS que inactivaría los radicales superóxido generados durante la isquemia miocárdica y de otros tejidos. Ello reduciría de manera significativa la producción de radicales libres por los leucocitos activados y disminuiría la interacción entre el endotelio y el leucocito a través de la inhibición del "rolling" leucocitario, la adhesión firme y de la diapédesis por los mecanismos mencionados propios de esta molécula. La inhibición masiva de la reacción inflamatoria provocaría una significativa reducción de la activación de la iNOS y, por tanto, de la concentración total final de NO plasmático.

Algunos de estos efectos son marcadamente dosis dependiente, como la inhibición de la adhesión leucocitaria CD18-dependiente, cuyo margen in vitro se da sólo entre concentraciones de 10 y 50 nmol¹⁶⁵. Probablemente las estatinas pueden ser fármacos que por su mecanismo de acción en la célula endotelial estén "biológicamente dotadas" para generar cantidades fisiológicas endoteliales de NO. De hecho se ha demostrado que la simvastatina y la lovastatina mejoran la

estabilidad del RNA-m de la eNOS e incrementan su vida media, por lo que efectivamente se mejora la producción de NO por el endotelio¹⁹⁶.

Dados los efectos deletéreos de la producción excesiva de NO mediado por esta isoforma de la NOS (inhibición del metabolismo celular²³², hipotensión arterial por su efecto vasodilatador¹⁴⁹, depresión miocárdica²² o lesión tisular pulmonar²²) la disminución de su concentración podría ser extremadamente beneficiosa en pacientes en los que la reacción inflamatoria perioperatoria pueda tener efectos marcadamente deletéreos. Entre ellos están los pacientes con procesos isquémicos en evolución, disfunción sistólica ventricular izquierda significativa, cirugías complejas con tiempos de CEC y pinzamiento aórtico prolongados o cuadros infecciosos con alteraciones vasomotoras basales preoperatorias como los pacientes sometidos a cirugía de endocarditis infecciosa.

Los resultados del estudio permiten confirmar parcialmente la hipótesis inicial y afirmar que la administración oral en humanos de la estatina hidrofílica PRAV a dosis elevadas en rango terapéutico en monodosis previamente a la realización de un procedimiento quirúrgico con circulación extracorpórea es capaz de potenciar la estabilización de la función endotelial del tratamiento crónico y reducir los marcadores analíticos de respuesta inflamatoria sistémica producidas por la cirugía con circulación extracorpórea y pinzamiento aórtico en pacientes con hiperlipidemia tratada crónicamente con estatinas.

Por su parte, nuestros resultados sugieren que el fármaco administrado según dicho protocolo podría reducir el daño miocárdico por ISQ/REP, aunque los datos clínicos y analíticos estudiados no permiten demostrarlo de manera contundente.

PERSPECTIVAS FUTURAS

El presente trabajo demuestra la eficacia de la dosis elevada única de PRAV en el preoperatorio inmediato de cirugía coronaria con CEC en la reducción de la reacción inflamatoria sistémica y, muy probablemente, en el daño por ISQ/REP provocado por el pinzamiento aórtico. A partir de este punto de partida se debería plantear el diseño de nuevos estudios para confirmar este último aspecto, la disminución de la reacción inflamatoria en el ámbito tisular y los potenciales beneficios clínicos que nuestro trabajo no ha tenido la potencia suficiente de demostrar, con estos objetivos:

- Confirmación anatomopatológica de una menor actividad inflamatoria (infiltración leucocitaria, actividad de enzimas proteolíticas o radicales libres, etc.) en los tejidos más vulnerables, como son el corazón y el pulmón. De este modo se podría demostrar que los hallazgos analíticos objetivados presentan traducción en el metabolismo tisular.

- Demostración de un efecto beneficioso de los parámetros clínicos valorados en el trabajo y en otros parámetros clínicos no estudiados en el mismo (función pulmonar, función ventricular, respuesta vasomotora circulatoria, etc.) en la población de bajo riesgo estudiada pero en un tamaño muestral adecuado para ello. La confirmación de nuestros resultados permitiría generalizar el uso de la estatina en estos subgrupos mayoritarios de pacientes.
- Estudio de los efectos de la administración del fármaco en subgrupos más reducidos de pacientes excluidos de este estudio en los cuales el beneficio podría magnificarse de manera significativa. La marcada reducción de la reacción inflamatoria post-extracorpórea en los pacientes electivos, con buena función ventricular y con tiempos quirúrgicos convencionales debería traducirse en un efecto muy beneficioso en pacientes de alto riesgo como son:
 - Pacientes con disfunción ventricular preoperatoria, más vulnerables al daño por ISQ/REP durante el pinzamiento aórtico y a la depresión postoperatoria de la contractilidad inducido por las moléculas proinflamatorias cardiodepresoras liberadas.
 - Pacientes con un sustrato proinflamatorio más intenso, como aquellos con tiempos de CEC más prolongados, isquemia/necrosis miocárdica en evolución, insuficiencia cardíaca congestiva, procesos infecciosos activos/sepsis (endocarditis bacteriana fundamentalmente, en los que además el exceso de NO postoperatorio puede contribuir a una elevada necesidad de vasoconstrictores por síndromes de respuesta inflamatoria sistémica intensos), etc.

En estos subgrupos estarían incluidos los pacientes candidatos a trasplante cardíaco. En estos enfermos la disfunción primaria del injerto es la causa más frecuente de mortalidad hospitalaria precoz en la que tiene mucha influencia el daño por ISQ/REP miocárdicas.

- El comportamiento del fármaco en todos los subgrupos de pacientes mencionados administrado de manera intravenosa, para garantizar y homogeneizar los niveles plasmáticos del mismo. En estos estudios se podrían incluir trabajos en los que se adjuntara el fármaco, finalmente, como componente de las soluciones cardiopléjicas.

7. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

1) La variabilidad interindividual de concentración sérica de fármaco activo y las evidencias de que la protección sobre el endotelio son dosis-dependiente aconsejaría la administración del fármaco de forma intravenosa con el fin de conseguir concentraciones plasmáticas uniformes. Este tipo de vía se ha empleado en humanos a dosis diversas, de hasta 20 mg y se ha demostrado que la $t_{1/2}$ es menor que para la administración oral, de 0,8 a 1,8h, con ausencia de efectos secundarios significativos. Sin embargo la disponibilidad de PRAV intravenosa es limitada y costosa, por lo que se anularía la utilidad clínica de los hallazgos que pudieran derivarse del estudio.

2) El elevado coste de las determinaciones analíticas específicas ha hecho necesaria la reducción al máximo del tamaño muestral. El número de pacientes elegido ha sido adecuado para comparar con suficiente potencia estadística las variables cuantitativas que se analizan dado el valor medio de cada parámetro en el grupo control, el grado de dispersión y una estimación de la reducción esperada y confirman que existe una disminución de la reacción inflamatoria sistémica y posiblemente una reducción del daño miocárdico por ISQ/REP. Sin embargo, el volumen de la muestra es claramente insuficiente para comparar proporciones y ello afecta a todas las variables clínicas que se han analizado, que deberán ser estudiadas en estudios adicionales con mayor tamaño muestral una vez que el beneficio analítico ha sido demostrado.

3) La no disponibilidad de muestras simultáneas de sangre arterial periférica y seno coronario a los 30 minutos del despinzamiento aórtico ha impedido comparar los marcadores inflamatorios entre ellas, por lo que no sabemos si existe un gradiente en su concentración entre ambas circulaciones. Por tanto, la repercusión de la administración del fármaco en el daño miocárdico por ISQ/REP es más difícil de asegurar.

4) Las alteraciones de la contractilidad miocárdica provocadas por el daño inducido por la isquemia propia del pinzamiento aórtico o por el aumento de la intensidad y duración de la liberación de moléculas proinflamatorias cardiodepresoras podría haberse objetivado mediante pruebas sensibles en la medición de la función ventricular sistólica y diastólica, como la ecocardiografía transesofágica, la resonancia magnética nuclear o la ventriculografía isotópica. Sin embargo, el estado postoperatorio del paciente y la complejidad técnica y logística derivada de la necesidad de su realización precoz y seriada hacen imposible su realización.

8. CONCLUSIONES

En cuanto a los **objetivos principales** del estudio se puede concluir que:

- 1) La administración preoperatoria de una dosis única de PRAV no reduce el daño miocárdico debido a la ISQ/REP cuando se cuantifica mediante los marcadores enzimáticos habitualmente utilizados en la práctica clínica (CPK-MB y Tn-I).
- 2) La estatina reduce de manera significativa la reacción inflamatoria provocada por la agresión quirúrgica antes del inicio de la CEC, como se refleja por una disminución significativa de la concentración de NFκB y citoquinas proinflamatorias (TNF-α e INF-γ).
- 3) La PRAV disminuye de manera significativa, intensa y duradera la respuesta inflamatoria inducida por la CEC y la ISQ/REP, reflejado como:
 - Reducción de la concentración de NFκB y citoquinas proinflamatorias (TNF-α e INF-γ). La inhibición del estado proinflamatorio induce una reducción del estímulo de la síntesis de la IL anti-inflamatoria IL-10 y una subsecuente disminución significativa de su concentración plasmática.
 - Reducción del estrés oxidativo, puesto de manifiesto por la disminución de la concentración de aniones superóxido.
 - Reducción de la concentración de moléculas de adhesión solubles estudiadas (sP-selectina, sL-selectina, sICAM-1 y sCD18).
- 4) La PRAV reduce de manera significativa la concentración perioperatoria de NO plasmático, probablemente inducida por una marcada disminución de la actividad de la isoforma inducible de la NOS.

En cuanto a los **objetivos secundarios** las conclusiones son las siguientes:

- 1) La administración de la PRAV según este protocolo es segura y no se asocia a los efectos secundarios potenciales de este tipo de fármacos.

- 2) No se ha observado una mayor incidencia de complicaciones en el grupo tratado con PRAV en términos de mortalidad hospitalaria (a 30 días), IAM perioperatorio, arritmias postoperatorias, necesidad de inotrópicos y balón de contrapulsación o tiempos de estancia postoperatoria en UCI y hospitalización, aunque tampoco se han demostrado beneficios en el grupo tratado a ese respecto.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Buckberg GD, Brazier JR, Nelson RL, Goldstein SM, McConnell DH, Cooper N. Studies of the effects of hypothermia on regional myocardial blood flow and metabolism during cardiopulmonary bypass. I. The adequately perfused beating, fibrillating, and arrested heart. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1977;**73**(1):87-94.
2. Lichtenstein SV, Abel JG, Panos A, Slutsky AS, Salerno TA. Warm heart surgery: experience with long cross-clamp times. *Ann Thorac Surg* 1991;**52**(4):1009-13.
3. Catinella FP, Cunningham JN, Jr., Adams PX, Snively SL, Gross RI, Spencer FC. Myocardial protection with cold blood potassium cardioplegia during prolonged aortic cross-clamping. *Ann Thorac Surg* 1982;**33**(3):228-33.
4. Gundry SR, Kirsh MM. A comparison of retrograde cardioplegia versus antegrade cardioplegia in the presence of coronary artery obstruction. *Ann Thorac Surg* 1984;**38**(2):124-7.
5. Menasche P, Subayi JB, Piwnica A. Retrograde coronary sinus cardioplegia for aortic valve operations: a clinical report on 500 patients. *Ann Thorac Surg* 1990;**49**(4):556-63.
6. Menasche P, Subayi JB, Veyssie L, le Dref O, Chevret S, Piwnica A. Efficacy of coronary sinus cardioplegia in patients with complete coronary artery occlusions. *Ann Thorac Surg* 1991;**51**(3):418-23.
7. Louagie YA, Jamart J, Gonzalez M, et al. Continuous cold blood cardioplegia improves myocardial protection: a prospective randomized study. *Ann Thorac Surg* 2004;**77**(2):664-71.
8. Yeh CH, Wang YC, Wu YC, Chu JJ, Lin PJ. Continuous tepid blood cardioplegia can preserve coronary endothelium and ameliorate the occurrence of cardiomyocyte apoptosis. *Chest* 2003;**123**(5):1647-54.
9. Tofukuji M, Stamler A, Li J, Hariawala MD, Franklin A, Sellke FW. Comparative effects of continuous warm blood and intermittent cold blood cardioplegia on coronary reactivity. *Ann Thorac Surg* 1997;**64**(5):1360-7.
10. Baretti R, Mizuno A, Buckberg GD, Young HH, Baumann-Baretti B, Hetzer R. Continuous antegrade blood cardioplegia: cold vs. tepid. *Thorac Cardiovasc Surg* 2002;**50**(1):25-30.
11. Hayashida N, Weisel RD, Shirai T, et al. Tepid antegrade and retrograde cardioplegia. *Ann Thorac Surg* 1995;**59**(3):723-9.
12. Hayashida N, Ikonomidis JS, Weisel RD, et al. The optimal cardioplegic temperature. *Ann Thorac Surg* 1994;**58**(4):961-71.
13. Wendel HP, Ziemer G. Coating-techniques to improve the hemocompatibility of artificial devices used for extracorporeal circulation. *Eur J Cardiothorac Surg* 1999;**16**(3):342-50.
14. Bourbon A, Vionnet M, Leprince P, et al. The effect of methylprednisolone treatment on the cardiopulmonary bypass-induced systemic inflammatory response. *Eur J Cardiothorac Surg* 2004;**26**(5):932-8.
15. Clermont G, Vergely C, Jazayeri S, et al. Systemic free radical activation is a major event involved in myocardial oxidative stress related to cardiopulmonary bypass. *Anesthesiology* 2002;**96**(1):80-7.
16. Florens E, Salvi S, Peynet J, et al. Can statins reduce the inflammatory response to cardiopulmonary bypass? A clinical study. *J Card Surg* 2001;**16**(3):232-9.

17. Orhan G, Sargin M, Senay S, et al. Systemic and myocardial inflammation in traditional and off-pump cardiac surgery. *Tex Heart Inst J* 2007;**34**(2):160-5.
18. Patti G, Chello M, Candura D, et al. Randomized trial of atorvastatin for reduction of postoperative atrial fibrillation in patients undergoing cardiac surgery: results of the ARMYDA-3 (Atorvastatin for Reduction of MYocardial Dysrhythmia After cardiac surgery) study. *Circulation* 2006;**114**(14):1455-61.
19. Liakopoulos OJ, Schmitto JD, Kazmaier S, et al. Cardiopulmonary and systemic effects of methylprednisolone in patients undergoing cardiac surgery. *Ann Thorac Surg* 2007;**84**(1):110-8.
20. Ramlawi B, Rudolph JL, Mieno S, et al. C-Reactive protein and inflammatory response associated to neurocognitive decline following cardiac surgery. *Surgery* 2006;**140**(2):221-6.
21. Verrier ED, Morgan EN. Endothelial response to cardiopulmonary bypass surgery. *Ann Thorac Surg* 1998;**66**(5 Suppl):S17-9.
22. Hall RI, Smith MS, Rocker G. The systemic inflammatory response to cardiopulmonary bypass: pathophysiological, therapeutic, and pharmacological considerations. *Anesth Analg* 1997;**85**(4):766-82.
23. Biglioli P, Cannata A, Alamanni F, et al. Biological effects of off-pump vs. on-pump coronary artery surgery: focus on inflammation, hemostasis and oxidative stress. *Eur J Cardiothorac Surg* 2003;**24**(2):260-9.
24. Ben-Abraham R, Weinbroum AA, Dekel B, Paret G. Chemokines and the inflammatory response following cardiopulmonary bypass--a new target for therapeutic intervention?--A review. *Paediatr Anaesth* 2003;**13**(8):655-61.
25. Diegeler A, Doll N, Rauch T, et al. Humoral immune response during coronary artery bypass grafting: A comparison of limited approach, "off-pump" technique, and conventional cardiopulmonary bypass. *Circulation* 2000;**102**(19 Suppl 3):III95-100.
26. Cain BS, Harken AH, Meldrum DR. Therapeutic strategies to reduce TNF-alpha mediated cardiac contractile depression following ischemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 1999;**31**(5):931-47.
27. Parums D. The pathology of ischemic-reperfusion injury. In: Grace P, Mathie R, eds. Ischemia-reperfusion injury. Oxford: Oxford Blackwell Science Ltd, 1999: 3-19.
28. Byrne A. Lipid peroxidation. In: Grace P, Mathie R, eds. Ischemia-reperfusion injury. Oxford: Oxford Blackwell Science Ltd, 1999: 148-56.
29. Umanski S. Apoptosis in ischemia-reperfusion injury. In: Grace P, Mathie R, eds. Ischemia-reperfusion injury. Oxford: Oxford Blackwell Science Ltd, 1999: 281-90.
30. Braunwald E, Sobel B. Coronary blood flow and myocardial ischemia. In: Braunwald E, ed. Heart Disease. Philadelphia: Saunders, 1992: 1161-999.
31. Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation* 1977;**56**(5):786-94.
32. Weisel RD. Myocardial stunning after coronary bypass surgery. *J Card Surg* 1993;**8**(2 Suppl):242-4.
33. Olafsson B, Forman MB, Puett DW, et al. Reduction of reperfusion injury in the canine preparation by intracoronary adenosine: importance of the

- endothelium and the no-reflow phenomenon. *Circulation* 1987;**76**(5):1135-45.
34. Park JL, Lucchesi BR. Mechanisms of myocardial reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 1999;**68**(5):1905-12.
 35. Rosenkranz ER, Buckberg GD, Reimer KA, et al. Myocardial protection during surgical coronary reperfusion. *J Am Coll Cardiol* 1983;**1**(5):1235-46.
 36. Reimer KA, Tanaka M, Murry CE, Richard VJ, Jennings RB. Evaluation of free radical injury in myocardium. *Toxicol Pathol* 1990;**18**(4 Pt 1):470-80.
 37. Hearse DJ. Reperfusion of the ischemic myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 1977;**9**(8):605-16.
 38. Schaper J, Schaper W. Time course of myocardial necrosis. *Cardiovasc Drugs Ther* 1988;**2**(1):17-25.
 39. Tsao PS, Aoki N, Lefer DJ, Johnson G, 3rd, Lefer AM. Time course of endothelial dysfunction and myocardial injury during myocardial ischemia and reperfusion in the cat. *Circulation* 1990;**82**(4):1402-12.
 40. Viehman GE, Ma XL, Lefer DJ, Lefer AM. Time course of endothelial dysfunction and myocardial injury during coronary arterial occlusion. *Am J Physiol* 1991;**261**(3 Pt 2):H874-81.
 41. Hess ML, Manson NH. Molecular oxygen: friend and foe. The role of the oxygen free radical system in the calcium paradox, the oxygen paradox and ischemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 1984;**16**(11):969-85.
 42. Schachter M, Foulds S. Free radicals and the xantine-oxidase pathway. In: Grace P, Mathie R, eds. Ischemia-reperfusion injury. Oxford: Oxford Blackwell Science Ltd, 1999: 137-47.
 43. Parks DA, Williams TK, Beckman JS. Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation. *Am J Physiol* 1988;**254**(5 Pt 1):G768-74.
 44. Badwey JA, Karnovsky ML. Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes. *Annu Rev Biochem* 1980;**49**:695-726.
 45. Jordan JE, Zhao ZQ, Vinten-Johansen J. The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1999;**43**(4):860-78.
 46. Bouriche H, Salavei P, Lessig J, Arnhold J. Differential effects of flavonols on inactivation of alpha1-antitrypsin induced by hypohalous acids and the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-halide system. *Arch Biochem Biophys* 2007;**459**(1):137-42.
 47. Prutz WA. Interactions of hypochlorous acid with pyrimidine nucleotides, and secondary reactions of chlorinated pyrimidines with GSH, NADH, and other substrates. *Arch Biochem Biophys* 1998;**349**(1):183-91.
 48. Suzuki M, Inauen W, Kvietys PR, et al. Superoxide mediates reperfusion-induced leukocyte-endothelial cell interactions. *Am J Physiol* 1989;**257**(5 Pt 2):H1740-5.
 49. Ambrosio G, Tritto I. Reperfusion injury: experimental evidence and clinical implications. *Am Heart J* 1999;**138**(2 Pt 2):S69-75.
 50. Valer G, Khoschorur GA, Almdahl SM, Esterbauer H, Vaage J. Lipid peroxidation in open-heart surgery. *Perfusion* 1994;**9**(4):277-83.
 51. Yavuz T, Altuntas I, Odabasi D, et al. Beneficial effect of the addition of nitroglycerin to the cardioplegic solution on lipid peroxidation during coronary artery bypass surgery. *Int Heart J* 2005;**46**(1):45-55.

52. Malis CD, Bonventre JV. Mechanism of calcium potentiation of oxygen free radical injury to renal mitochondria. A model for post-ischemic and toxic mitochondrial damage. *J Biol Chem* 1986;**261**(30):14201-8.
53. Zhilyaev SY, Moskvina AN, Platonova TF, Gutsaeva DR, Churilina IV, Demchenko IT. Hyperoxic vasoconstriction in the brain is mediated by inactivation of nitric oxide by superoxide anions. *Neurosci Behav Physiol* 2003;**33**(8):783-7.
54. Liu X, Shen J, Jin Y, Duan M, Xu J. Recombinant human erythropoietin (rhEPO) preconditioning on nuclear factor-kappa B (NF-kB) activation & proinflammatory cytokines induced by myocardial ischaemia-reperfusion. *Indian J Med Res* 2006;**124**(3):343-54.
55. Ferran C, Millan MT, Csizmadia V, et al. Inhibition of NF-kappa B by pyrrolidine dithiocarbamate blocks endothelial cell activation. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;**214**(1):212-23.
56. Paparella D, Yau TM, Young E. Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. An update. *Eur J Cardiothorac Surg* 2002;**21**(2):232-44.
57. Serhan CN, Radin A, Smolen JE, Korchak H, Samuelsson B, Weissmann G. Leukotriene B4 is a complete secretagogue in human neutrophils: a kinetic analysis. *Biochem Biophys Res Commun* 1982;**107**(3):1006-12.
58. Kubes P, Ibbotson G, Russell J, Wallace JL, Granger DN. Role of platelet-activating factor in ischemia/reperfusion-induced leukocyte adherence. *Am J Physiol* 1990;**259**(2 Pt 1):G300-5.
59. Li C, Browder W, Kao RL. Early activation of transcription factor NF-kappaB during ischemia in perfused rat heart. *Am J Physiol* 1999;**276**(2 Pt 2):H543-52.
60. Jolly SR, Kane WJ, Bailie MB, Abrams GD, Lucchesi BR. Canine myocardial reperfusion injury. Its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and catalase. *Circ Res* 1984;**54**(3):277-85.
61. Johnson WD, Kayser KL, Brenowitz JB, Saedi SF. A randomized controlled trial of allopurinol in coronary bypass surgery. *Am Heart J* 1991;**121**(1 Pt 1):20-4.
62. Gallagher KP, Buda AJ, Pace D, Gerren RA, Schlafer M. Failure of superoxide dismutase and catalase to alter size of infarction in conscious dogs after 3 hours of occlusion followed by reperfusion. *Circulation* 1986;**73**(5):1065-76.
63. Kehrer JP, Starnes JW. Models and markers used to study cardiac reperfusion injury. *Pharmacol Ther* 1989;**44**(1):123-45.
64. Takemura G, Onodera T, Ashraf M. Quantification of hydroxyl radical and its lack of relevance to myocardial injury during early reperfusion after graded ischemia in rat hearts. *Circ Res* 1992;**71**(1):96-105.
65. Morishita R, Sugimoto T, Aoki M, et al. In vivo transfection of cis element "decoy" against nuclear factor-kappaB binding site prevents myocardial infarction. *Nat Med* 1997;**3**(8):894-9.
66. Morgan EN, Boyle EM, Jr., Yun W, et al. An essential role for NF-kappaB in the cardioadaptive response to ischemia. *Ann Thorac Surg* 1999;**68**(2):377-82.
67. Maulik N, Sasaki H, Addya S, Das DK. Regulation of cardiomyocyte apoptosis by redox-sensitive transcription factors. *FEBS Lett* 2000;**485**(1):7-12.
68. Hoerter JA, Miceli MV, Renlund DG, Jacobus WE, Gerstenblith G, Lakatta EG. A phosphorus-31 nuclear magnetic resonance study of the metabolic, contractile, and ionic consequences of induced calcium alterations in the isovolumic rat heart. *Circ Res* 1986;**58**(4):539-51.

69. Piper HM, Abdallah Y, Schafer C. The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovasc Res* 2004;**61**(3):365-71.
70. Eggleton P, Reid KB, Tenner AJ. C1q--how many functions? How many receptors? *Trends Cell Biol* 1998;**8**(11):428-31.
71. Friedl HP, Till GO, Ryan US, Ward PA. Mediator-induced activation of xanthine oxidase in endothelial cells. *Faseb J* 1989;**3**(13):2512-8.
72. Foreman KE, Vaporciyan AA, Bonish BK, et al. C5a-induced expression of P-selectin in endothelial cells. *J Clin Invest* 1994;**94**(3):1147-55.
73. Makrides S, Ryan U. Complement activation and inhibition in ischemia-reperfusion injury. In: Grace P, Mathie R, eds. Ischemia-reperfusion injury. Oxford: Oxford Blackwell Science Ltd, 1999.
74. Hill JH, Ward PA. C3 leukotactic factors produced by a tissue protease. *J Exp Med* 1969;**130**(3):505-18.
75. Rossen RD, Swain JL, Michael LH, Weakley S, Giannini E, Entman ML. Selective accumulation of the first component of complement and leukocytes in ischemic canine heart muscle. A possible initiator of an extra myocardial mechanism of ischemic injury. *Circ Res* 1985;**57**(1):119-30.
76. Vakeva A, Laurila P, Meri S. Loss of expression of protectin (CD59) is associated with complement membrane attack complex deposition in myocardial infarction. *Lab Invest* 1992;**67**(5):608-16.
77. Ito W, Schafer HJ, Bhakdi S, et al. Influence of the terminal complement-complex on reperfusion injury, no-reflow and arrhythmias: a comparison between C6-competent and C6-deficient rabbits. *Cardiovasc Res* 1996;**32**(2):294-305.
78. Rossen RD, Michael LH, Kagiya A, et al. Mechanism of complement activation after coronary artery occlusion: evidence that myocardial ischemia in dogs causes release of constituents of myocardial subcellular origin that complex with human C1q in vivo. *Circ Res* 1988;**62**(3):572-84.
79. Kagiya A, Savage HE, Michael LH, Hanson G, Entman ML, Rossen RD. Molecular basis of complement activation in ischemic myocardium: identification of specific molecules of mitochondrial origin that bind human C1q and fix complement. *Circ Res* 1989;**64**(3):607-15.
80. Kelly C. Cytokines. In: Grace P, Mathie R, eds. Ischemia-reperfusion injury. Oxford: Oxford Blackwell Science Ltd, 1999: 236-46.
81. Schulz R, Aker S, Belosjorow S, Heusch G. TNFalpha in ischemia/reperfusion injury and heart failure. *Basic Res Cardiol* 2004;**99**(1):8-11.
82. Lin J, Ziring D, Desai S, et al. TNFalpha blockade in human diseases: an overview of efficacy and safety. *Clin Immunol* 2008;**126**(1):13-30.
83. Ryden M, Arner P. Tumour necrosis factor-alpha in human adipose tissue -- from signalling mechanisms to clinical implications. *J Intern Med* 2007;**262**(4):431-8.
84. Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2002;**53**(1):31-47.
85. Brown SL, Jala VR, Raghuvanshi SK, Nasser MW, Haribabu B, Richardson RM. Activation and regulation of platelet-activating factor receptor: role of G(i) and G(q) in receptor-mediated chemotactic, cytotoxic, and cross-regulatory signals. *J Immunol* 2006;**177**(5):3242-9.
86. Kulkarni S, Woollard KJ, Thomas S, Oxley D, Jackson SP. Conversion of platelets from a proaggregatory to a proinflammatory adhesive phenotype: role of

- PAF in spatially regulating neutrophil adhesion and spreading. *Blood* 2007;**110**(6):1879-86.
87. Franke A, Lante W, Kurig E, Zoller LG, Weinhold C, Markewitz A. Is interferon gamma suppression after cardiac surgery caused by a decreased interleukin-12 synthesis? *Ann Thorac Surg* 2006;**82**(1):103-9.
88. Steppich BA, Moog P, Matissek C, et al. Cytokine profiles and T cell function in acute coronary syndromes. *Atherosclerosis* 2007;**190**(2):443-51.
89. Strehl B, Seifert U, Kruger E, Heink S, Kuckelkorn U, Kloetzel PM. Interferon-gamma, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing. *Immunol Rev* 2005;**207**:19-30.
90. Wang Y, Bai Y, Qin L, et al. Interferon-gamma induces human vascular smooth muscle cell proliferation and intimal expansion by phosphatidylinositol 3-kinase dependent mammalian target of rapamycin raptor complex 1 activation. *Circ Res* 2007;**101**(6):560-9.
91. Furuichi K, Wada T, Iwata Y, et al. Interleukin-1-dependent sequential chemokine expression and inflammatory cell infiltration in ischemia-reperfusion injury. *Crit Care Med* 2006;**34**(9):2447-55.
92. Wahl SM. Transforming growth factor beta (TGF-beta) in inflammation: a cause and a cure. *J Clin Immunol* 1992;**12**(2):61-74.
93. Grad I, Picard D. The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones. *Mol Cell Endocrinol* 2007;**275**(1-2):2-12.
94. Kapiotis S, Besemer J, Bevec D, et al. Interleukin-4 counteracts pyrogen-induced downregulation of thrombomodulin in cultured human vascular endothelial cells. *Blood* 1991;**78**(2):410-5.
95. Eppihimer MJ, Sushkova N, Lavigne MC. Relative contributions of alpha4 and alphaL integrins to IL-4-induced leukocyte rolling and adhesion. *Microcirculation* 2004;**11**(8):655-68.
96. Frangogiannis NG, Mendoza LH, Lindsey ML, et al. IL-10 is induced in the reperfused myocardium and may modulate the reaction to injury. *J Immunol* 2000;**165**(5):2798-808.
97. Yang Z, Szabo C. Production of interleukin-12 is under the control of endogenous interleukin-10 in myocardial ischemia-reperfusion. *Shock* 2001;**15**(1):77-9.
98. Daftarian PM, Kumar A, Kryworuchko M, Diaz-Mitoma F. IL-10 production is enhanced in human T cells by IL-12 and IL-6 and in monocytes by tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 1996;**157**(1):12-20.
99. Almeida JL, Sampietre SN, Mendonca Coelho AM, et al. Statin pretreatment in experimental acute pancreatitis. *Jop* 2008;**9**(4):431-9.
100. Lacraz S, Nicod LP, Chicheportiche R, Welgus HG, Dayer JM. IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. *J Clin Invest* 1995;**96**(5):2304-10.
101. Jones SP, Trocha SD, Lefer DJ. Cardioprotective actions of endogenous IL-10 are independent of iNOS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;**281**(1):H48-52.
102. Yang Z, Zingarelli B, Szabo C. Crucial role of endogenous interleukin-10 production in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 2000;**101**(9):1019-26.

103. Hayward R, Nossuli TO, Scalia R, Lefer AM. Cardioprotective effect of interleukin-10 in murine myocardial ischemia-reperfusion. *Eur J Pharmacol* 1997;**334**(2-3):157-63.
104. Howard M, O'Garra A, Ishida H, de Waal Malefyt R, de Vries J. Biological properties of interleukin 10. *J Clin Immunol* 1992;**12**(4):239-47.
105. Pasqui AL, Di Renzo M, Auteri A, Puccetti L. Cytokines in acute coronary syndromes. *Int J Cardiol* 2005;**105**(3):355-6.
106. Wan S, DeSmet JM, Barvais L, Goldstein M, Vincent JL, LeClerc JL. Myocardium is a major source of proinflammatory cytokines in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996;**112**(3):806-11.
107. Duncan DJ, Hopkins PM, Harrison SM. Negative inotropic effects of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1beta are ameliorated by alfentanil in rat ventricular myocytes. *Br J Pharmacol* 2007;**150**(6):720-6.
108. Belosjorow S, Bolle I, Duschin A, Heusch G, Schulz R. TNF-alpha antibodies are as effective as ischemic preconditioning in reducing infarct size in rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;**284**(3):H927-30.
109. Gao X, Xu X, Belmadani S, et al. TNF-alpha contributes to endothelial dysfunction by upregulating arginase in ischemia/reperfusion injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;**27**(6):1269-75.
110. Kubala L, Ciz M, Vondracek J, et al. Perioperative and postoperative course of cytokines and the metabolic activity of neutrophils in human cardiac operations and heart transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002;**124**(6):1122-9.
111. Vinten-Johansen J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2004;**61**(3):481-97.
112. Bevilacqua MP, Nelson RM. Selectins. *J Clin Invest* 1993;**91**(2):379-87.
113. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994;**84**(7):2068-101.
114. Lefer AM. Role of selectins in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 1995;**60**(3):773-7.
115. Kishimoto TK, Jutila MA, Berg EL, Butcher EC. Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science* 1989;**245**(4923):1238-41.
116. Panes J, Granger D. Neutrophils and adhesion molecules. In: Grace P, Mathie R, eds. Ischemia-reperfusion injury. Oxford: Oxford Blackwell Science Ltd, 1999: 262-80.
117. Boyle EM, Jr., Pohlman TH, Johnson MC, Verrier ED. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: the systemic inflammatory response. *Ann Thorac Surg* 1997;**63**(1):277-84.
118. Nagata K, Tsuji T, Todoroki N, et al. Activated platelets induce superoxide anion release by monocytes and neutrophils through P-selectin (CD62). *J Immunol* 1993;**151**(6):3267-73.
119. Kassirer M, Zeltser D, Prochorov V, et al. Increased expression of the CD11b/CD18 antigen on the surface of peripheral white blood cells in patients with ischemic heart disease: further evidence for smoldering inflammation in patients with atherosclerosis. *Am Heart J* 1999;**138**(3 Pt 1):555-9.
120. Kroshus TJ, Salerno CT, Yeh CG, Higgins PJ, Bolman RM, 3rd, Dalmaso AP. A recombinant soluble chimeric complement inhibitor composed of human

- CD46 and CD55 reduces acute cardiac tissue injury in models of pig-to-human heart transplantation. *Transplantation* 2000;**69**(11):2282-9.
121. Mileski WJ, Sikes P, Atilas L, Lightfoot E, Lipsky P, Baxter C. Inhibition of leukocyte adherence and susceptibility to infection. *J Surg Res* 1993;**54**(4):349-54.
 122. Entman ML, Smith CW. Postreperfusion inflammation: a model for reaction to injury in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 1994;**28**(9):1301-11.
 123. Panes J, Perry MA, Anderson DC, et al. Regional differences in constitutive and induced ICAM-1 expression in vivo. *Am J Physiol* 1995;**269**(6 Pt 2):H1955-64.
 124. Albelda SM, Smith CW, Ward PA. Adhesion molecules and inflammatory injury. *Faseb J* 1994;**8**(8):504-12.
 125. Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med* 1993;**178**(2):449-60.
 126. Smith CW, Entman ML, Lane CL, et al. Adherence of neutrophils to canine cardiac myocytes in vitro is dependent on intercellular adhesion molecule-1. *J Clin Invest* 1991;**88**(4):1216-23.
 127. Dreyer WJ, Michael LH, West MS, et al. Neutrophil accumulation in ischemic canine myocardium. Insights into time course, distribution, and mechanism of localization during early reperfusion. *Circulation* 1991;**84**(1):400-11.
 128. Engler RL, Dahlgren MD, Peterson MA, Dobbs A, Schmid-Schonbein GW. Accumulation of polymorphonuclear leukocytes during 3-h experimental myocardial ischemia. *Am J Physiol* 1986;**251**(1 Pt 2):H93-100.
 129. Romson JL, Hook BG, Kunkel SL, Abrams GD, Schork MA, Lucchesi BR. Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. *Circulation* 1983;**67**(5):1016-23.
 130. Tsao PS, Ma XL, Lefer AM. Activated neutrophils aggravate endothelial dysfunction after reperfusion of the ischemic feline myocardium. *Am Heart J* 1992;**123**(6):1464-71.
 131. Smith EF, 3rd, Egan JW, Bugelski PJ, Hillegass LM, Hill DE, Griswold DE. Temporal relation between neutrophil accumulation and myocardial reperfusion injury. *Am J Physiol* 1988;**255**(5 Pt 2):H1060-8.
 132. Byrne JG, Smith WJ, Murphy MP, Couper GS, Appleyard RF, Cohn LH. Complete prevention of myocardial stunning, contracture, low-reflow, and edema after heart transplantation by blocking neutrophil adhesion molecules during reperfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992;**104**(6):1589-96.
 133. Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB. The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest* 1974;**54**(6):1496-508.
 134. Ma XL, Weyrich AS, Lefer DJ, et al. Monoclonal antibody to L-selectin attenuates neutrophil accumulation and protects ischemic reperfused cat myocardium. *Circulation* 1993;**88**(2):649-58.
 135. Buerke M, Weyrich AS, Murohara T, et al. Humanized monoclonal antibody DREG-200 directed against I-selectin protects in feline myocardial reperfusion injury. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;**271**(1):134-42.
 136. DeLano FA, Forrest MJ, Schmid-Schonbein GW. Attenuation of oxygen free radical formation and tissue injury during experimental inflammation by P-selectin blockade. *Microcirculation* 1997;**4**(3):349-57.

137. Ma XL, Tsao PS, Lefer AM. Antibody to CD-18 exerts endothelial and cardiac protective effects in myocardial ischemia and reperfusion. *J Clin Invest* 1991;**88**(4):1237-43.
138. Winquist R, Frei P, Harrison P, et al. An anti-CD-18 MAb limits infarct size in primates following ischemia and reperfusion. *Circulation* 1990;**82**(III):701A.
139. Simpson PJ, Todd RF, 3rd, Fantone JC, Mickelson JK, Griffin JD, Lucchesi BR. Reduction of experimental canine myocardial reperfusion injury by a monoclonal antibody (anti-Mo1, anti-CD11b) that inhibits leukocyte adhesion. *J Clin Invest* 1988;**81**(2):624-9.
140. Ma XL, Lefer DJ, Lefer AM, Rothlein R. Coronary endothelial and cardiac protective effects of a monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule-1 in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation* 1992;**86**(3):937-46.
141. Vaporciyan AA, DeLisser HM, Yan HC, et al. Involvement of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 in neutrophil recruitment in vivo. *Science* 1993;**262**(5139):1580-2.
142. Murohara T, Delyani JA, Albelda SM, Lefer AM. Blockade of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 protects against myocardial ischemia and reperfusion injury in cats. *J Immunol* 1996;**156**(9):3550-7.
143. Furchgott R, Zawadzki J. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;**288**:373.
144. Lefer AM. Nitric oxide: nature's naturally occurring leukocyte inhibitor. *Circulation* 1997;**95**(3):553-4.
145. Morita K, Sherman MP, Buckberg GD, et al. Studies of hypoxemic/reoxygenation injury: without aortic clamping. V. Role of the L-arginine-nitric oxide pathway: the nitric oxide paradox. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995;**110**(4 Pt 2):1200-11.
146. Takimoto Y, Aoyama T, Keyamura R, et al. Differential expression of three types of nitric oxide synthase in both infarcted and non-infarcted left ventricles after myocardial infarction in the rat. *Int J Cardiol* 2000;**76**(2-3):135-45.
147. Balligand JL, Cannon PJ. Nitric oxide synthases and cardiac muscle. Autocrine and paracrine influences. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;**17**(10):1846-58.
148. Sato Y, Walley KR, Klut ME, et al. Nitric oxide reduces the sequestration of polymorphonuclear leukocytes in lung by changing deformability and CD18 expression. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;**159**(5 Pt 1):1469-76.
149. Ruvolo G, Speziale G, Greco E, et al. Nitric oxide release during hypothermic versus normothermic cardiopulmonary bypass. *Eur J Cardiothorac Surg* 1995;**9**(11):651-4.
150. Lowson SM, Hassan HM, Rich GF. The effect of nitric oxide on platelets when delivered to the cardiopulmonary bypass circuit. *Anesth Analg* 1999;**89**(6):1360-5.
151. Liu SM, Sundqvist T. Involvement of nitric oxide in permeability alteration and F-actin redistribution induced by phorbol myristate acetate in endothelial cells. *Exp Cell Res* 1995;**221**(2):289-93.
152. Gauthier TW, Davenpeck KL, Lefer AM. Nitric oxide attenuates leukocyte-endothelial interaction via P-selectin in splanchnic ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 1994;**267**(4 Pt 1):G562-8.

153. De Caterina R, Libby P, Peng HB, et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1995;**96**(1):60-8.
154. Clancy R, Leszczynska J, Amin A, Levartovsky D, Abramson SB. Nitric oxide stimulates ADP ribosylation of actin in association with the inhibition of actin polymerization in human neutrophils. *J Leukoc Biol* 1995;**58**(2):196-202.
155. Tsao PS, Lefer AM. Time course and mechanism of endothelial dysfunction in isolated ischemic- and hypoxic-perfused rat hearts. *Am J Physiol* 1990;**259**(6 Pt 2):H1660-6.
156. Fox-Robichaud A, Payne D, Hasan SU, et al. Inhaled NO as a viable antiadhesive therapy for ischemia/reperfusion injury of distal microvascular beds. *J Clin Invest* 1998;**101**(11):2497-505.
157. Kubes P, Payne D, Grisham MB, Jourd-Heuil D, Fox-Robichaud A. Inhaled NO impacts vascular but not extravascular compartments in postischemic peripheral organs. *Am J Physiol* 1999;**277**(2 Pt 2):H676-82.
158. Lefer AM, Lefer DJ. The role of nitric oxide and cell adhesion molecules on the microcirculation in ischaemia-reperfusion. *Cardiovasc Res* 1996;**32**(4):743-51.
159. Bell RM, Yellon DM. Atorvastatin, administered at the onset of reperfusion, and independent of lipid lowering, protects the myocardium by up-regulating a pro-survival pathway. *J Am Coll Cardiol* 2003;**41**(3):508-15.
160. Hayward CS, Kelly RP, Macdonald PS. Inhaled nitric oxide in cardiology practice. *Cardiovasc Res* 1999;**43**(3):628-38.
161. Fox-Robichaud A, Payne D, Kubes P. Inhaled NO reaches distal vasculatures to inhibit endothelium- but not leukocyte-dependent cell adhesion. *Am J Physiol* 1999;**277**(6 Pt 1):L1224-31.
162. Stamler JS, Simon DI, Jaraki O, et al. S-nitrosylation of tissue-type plasminogen activator confers vasodilatory and antiplatelet properties on the enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;**89**(17):8087-91.
163. Keaney JF, Jr., Simon DI, Stamler JS, et al. NO forms an adduct with serum albumin that has endothelium-derived relaxing factor-like properties. *J Clin Invest* 1993;**91**(4):1582-9.
164. Gaboury JP, Niu XF, Kubes P. Nitric oxide inhibits numerous features of mast cell-induced inflammation. *Circulation* 1996;**93**(2):318-26.
165. Banick PD, Chen Q, Xu YA, Thom SR. Nitric oxide inhibits neutrophil beta 2 integrin function by inhibiting membrane-associated cyclic GMP synthesis. *J Cell Physiol* 1997;**172**(1):12-24.
166. Kubes P. Ischemia-reperfusion in feline small intestine: a role for nitric oxide. *Am J Physiol* 1993;**264**(1 Pt 1):G143-9.
167. Payne D, Kubes P. Nitric oxide donors reduce the rise in reperfusion-induced intestinal mucosal permeability. *Am J Physiol* 1993;**265**(1 Pt 1):G189-95.
168. Konishi R, Shimizu R, Firestone L, et al. Nitric oxide prevents human platelet adhesion to fiber membranes in whole blood. *Asaio J* 1996;**42**(5):M850-3.
169. Mellgren K, Mellgren G, Lundin S, Wennmalm A, Wadenvik H. Effect of nitric oxide gas on platelets during open heart operations. *Ann Thorac Surg* 1998;**65**(5):1335-41.

170. Chello M, Mastroroberto P, Marchese AR, Maltese G, Santangelo E, Amantea B. Nitric oxide inhibits neutrophil adhesion during experimental extracorporeal circulation. *Anesthesiology* 1998;**89**(2):443-8.
171. Hayashi Y, Sawa Y, Hirata N, et al. Improvement of bypass circuit biocompatibility: comparison and combination of heparin-coated circuit and nitric oxide gas infusion. *J Card Surg* 2002;**17**(6):477-84.
172. Lefer AM. Attenuation of myocardial ischemia-reperfusion injury with nitric oxide replacement therapy. *Ann Thorac Surg* 1995;**60**(3):847-51.
173. Kuroki I, Miyazaki T, Mizukami I, Matsumoto N, Matsumoto I. Effect of sodium nitroprusside on ischemia-reperfusion injuries of the rat liver. *Hepatogastroenterology* 2004;**51**(59):1404-7.
174. Siegfried MR, Erhardt J, Rider T, Ma XL, Lefer AM. Cardioprotection and attenuation of endothelial dysfunction by organic nitric oxide donors in myocardial ischemia-reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther* 1992;**260**(2):668-75.
175. Adams MR, Jessup W, Hailstones D, Celermajer DS. L-arginine reduces human monocyte adhesion to vascular endothelium and endothelial expression of cell adhesion molecules. *Circulation* 1997;**95**(3):662-8.
176. Carrier M, Pellerin M, Page PL, et al. Can L-arginine improve myocardial protection during cardioplegic arrest? Results of a phase I pilot study. *Ann Thorac Surg* 1998;**66**(1):108-12.
177. Carrier M, Pellerin M, Perrault LP, et al. Cardioplegic arrest with L-arginine improves myocardial protection: results of a prospective randomized clinical trial. *Ann Thorac Surg* 2002;**73**(3):837-41.
178. Nakanishi K, Vinten-Johansen J, Lefer DJ, et al. Intracoronary L-arginine during reperfusion improves endothelial function and reduces infarct size. *Am J Physiol* 1992;**263**(6 Pt 2):H1650-8.
179. Engelman DT, Watanabe M, Maulik N, et al. Critical timing of nitric oxide supplementation in cardioplegic arrest and reperfusion. *Circulation* 1996;**94**(9 Suppl):II407-11.
180. Koter M, Franiak I, Strychalska K, Broncel M, Chojnowska-Jeziarska J. Damage to the structure of erythrocyte plasma membranes in patients with type-2 hypercholesterolemia. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;**36**(2):205-15.
181. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis. In: Braunwald E, ed. *Heart Disease*. Philadelphia: Saunders, 1992: 1106-24.
182. Minor RL, Jr., Myers PR, Guerra R, Jr., Bates JN, Harrison DG. Diet-induced atherosclerosis increases the release of nitrogen oxides from rabbit aorta. *J Clin Invest* 1990;**86**(6):2109-16.
183. Pritchard KA, Jr., Groszek L, Smalley DM, et al. Native low-density lipoprotein increases endothelial cell nitric oxide synthase generation of superoxide anion. *Circ Res* 1995;**77**(3):510-8.
184. Mukhtar RY, Reckless JP. Statin-induced myositis: a commonly encountered or rare side effect? *Curr Opin Lipidol* 2005;**16**(6):640-7.
185. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 1990;**343**(6257):425-30.
186. Pedersen TR, Wilhelmsen L, Faergeman O, et al. Follow-up study of patients randomized in the Scandinavian simvastatin survival study (4S) of cholesterol lowering. *Am J Cardiol* 2000;**86**(3):257-62.

187. Vaughan CJ, Murphy MB, Buckley BM. Statins do more than just lower cholesterol. *Lancet* 1996;**348**(9034):1079-82.
188. Dobrucki LW, Kalinowski L, Dobrucki IT, Malinski T. Statin-stimulated nitric oxide release from endothelium. *Med Sci Monit* 2001;**7**(4):622-7.
189. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 1998;**97**(12):1129-35.
190. Kaesemeyer WH, Caldwell RB, Huang J, Caldwell RW. Pravastatin sodium activates endothelial nitric oxide synthase independent of its cholesterol-lowering actions. *J Am Coll Cardiol* 1999;**33**(1):234-41.
191. Wolfrum S, Grimm M, Heidbreder M, et al. Acute reduction of myocardial infarct size by a hydroxymethyl glutaryl coenzyme a reductase inhibitor is mediated by endothelial nitric oxide synthase. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003;**41**(3):474-80.
192. Jones SP, Trocha SD, Lefer DJ. Pretreatment with simvastatin attenuates myocardial dysfunction after ischemia and chronic reperfusion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;**21**(12):2059-64.
193. Joyce M, Kelly C, Winter D, Chen G, Leahy A, Bouchier-Hayes D. Pravastatin, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, attenuates renal injury in an experimental model of ischemia-reperfusion. *J Surg Res* 2001;**101**(1):79-84.
194. Feron O, Dessy C, Desager JP, Balligand JL. Hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibition promotes endothelial nitric oxide synthase activation through a decrease in caveolin abundance. *Circulation* 2001;**103**(1):113-8.
195. Egashira K, Ni W, Inoue S, et al. Pravastatin attenuates cardiovascular inflammatory and proliferative changes in a rat model of chronic inhibition of nitric oxide synthesis by its cholesterol-lowering independent actions. *Hypertens Res* 2000;**23**(4):353-8.
196. Laufs U, Fata VL, Liao JK. Inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase blocks hypoxia-mediated down-regulation of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1997;**272**(50):31725-9.
197. Vaughan CJ, Delanty N. Neuroprotective properties of statins in cerebral ischemia and stroke. *Stroke* 1999;**30**(9):1969-73.
198. Gueler F, Rong S, Park JK, et al. Postischemic acute renal failure is reduced by short-term statin treatment in a rat model. *J Am Soc Nephrol* 2002;**13**(9):2288-98.
199. Dunzendorfer S, Rothbacher D, Schratzberger P, Reinisch N, Kahler CM, Wiedermann CJ. Mevalonate-dependent inhibition of transendothelial migration and chemotaxis of human peripheral blood neutrophils by pravastatin. *Circ Res* 1997;**81**(6):963-9.
200. Weber C, Erl W, Weber KS, Weber PC. HMG-CoA reductase inhibitors decrease CD11b expression and CD11b-dependent adhesion of monocytes to endothelium and reduce increased adhesiveness of monocytes isolated from patients with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 1997;**30**(5):1212-7.
201. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, et al. Reduction in C-reactive protein and LDL cholesterol and cardiovascular event rates after initiation of rosuvastatin: a prospective study of the JUPITER trial. *Lancet* 2009;**373**(9670):1175-82.

202. Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, et al. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N Engl J Med* 1996;**335**(14):1001-9.
203. Flaker GC, Warnica JW, Sacks FM, et al. Pravastatin prevents clinical events in revascularized patients with average cholesterol concentrations. Cholesterol and Recurrent Events CARE Investigators. *J Am Coll Cardiol* 1999;**34**(1):106-12.
204. Collard CD, Body SC, Shernan SK, Wang S, Mangano DT. Preoperative statin therapy is associated with reduced cardiac mortality after coronary artery bypass graft surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006;**132**(2):392-400.
205. Aboyans V, Labrousse L, Lacroix P, et al. Predictive factors of stroke in patients undergoing coronary bypass grafting: statins are protective. *Eur J Cardiothorac Surg* 2006;**30**(2):300-4.
206. Heeschen C, Hamm CW, Laufs U, Bohm M, Snapinn S, White HD. Withdrawal of statins in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2003;**107**(3):e27.
207. Di Napoli P, Maggi A, Spina R, et al. [Simvastatin and ischemia-reperfusion damage: its effects on apoptotic myocyte death and on the endothelial expression of nitric-oxide synthetase in an experimental model of the isolated rat heart]. *Cardiologia* 1999;**44**(1):69-74.
208. Lefer AM, Campbell B, Shin YK, Scalia R, Hayward R, Lefer DJ. Simvastatin preserves the ischemic-reperfused myocardium in normocholesterolemic rat hearts. *Circulation* 1999;**100**(2):178-84.
209. Pruefer D, Scalia R, Lefer AM. Simvastatin inhibits leukocyte-endothelial cell interactions and protects against inflammatory processes in normocholesterolemic rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;**19**(12):2894-900.
210. Schulze C, Conrad N, Schutz A, et al. Reduced expression of systemic proinflammatory cytokines after off-pump versus conventional coronary artery bypass grafting. *Thorac Cardiovasc Surg* 2000;**48**(6):364-9.
211. Cho PW, Gillinov AM, Zehr KJ, Burch RM, Winkelstein JA, Cameron DE. Neutrophil activation mediates protamine-induced pulmonary hypertension. *J Surg Res* 1993;**54**(5):486-93.
212. Chenoweth DE, Cooper SW, Hugli TE, Stewart RW, Blackstone EH, Kirklin JW. Complement activation during cardiopulmonary bypass: evidence for generation of C3a and C5a anaphylatoxins. *N Engl J Med* 1981;**304**(9):497-503.
213. Kawahito K, Kobayashi E, Ohmori M, et al. Enhanced responsiveness of circulatory neutrophils after cardiopulmonary bypass: increased aggregability and superoxide producing capacity. *Artif Organs* 2000;**24**(1):37-42.
214. Prasad K, Kalra J, Bharadwaj B, Chaudhary AK. Increased oxygen free radical activity in patients on cardiopulmonary bypass undergoing aortocoronary bypass surgery. *Am Heart J* 1992;**123**(1):37-45.
215. Das DK, Engelman RM, Liu X, et al. Oxygen-derived free radicals and hemolysis during open heart surgery. *Mol Cell Biochem* 1992;**111**(1-2):77-86.
216. Hayashi Y, Sawa Y, Nishimura M, et al. Peroxynitrite, a product between nitric oxide and superoxide anion, plays a cytotoxic role in the development of

- post-bypass systemic inflammatory response. *Eur J Cardiothorac Surg* 2004;**26**(2):276-80.
217. Sayin MM, Ozatamer O, Tasoz R, Kilinc K, Unal N. Propofol attenuates myocardial lipid peroxidation during coronary artery bypass grafting surgery. *Br J Anaesth* 2002;**89**(2):242-6.
218. Tanita T, Song C, Kubo H, et al. Superoxide anion mediates pulmonary vascular permeability caused by neutrophils in cardiopulmonary bypass. *Surg Today* 1999;**29**(8):755-61.
219. Prasad K, Chan WP, Bharadwaj B. Superoxide dismutase and catalase in protection of cardiopulmonary bypass-induced cardiac dysfunction and cellular injury. *Can J Cardiol* 1996;**12**(10):1083-91.
220. Rocke DA, Gaffin SL, Wells MT, Koen Y, Brock-Utine JG. Endotoxemia associated with cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1987;**93**(6):832-7.
221. Wan IY, Arifi AA, Wan S, et al. Beating heart revascularization with or without cardiopulmonary bypass: evaluation of inflammatory response in a prospective randomized study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004;**127**(6):1624-31.
222. Birdi I, Caputo M, Underwood M, Bryan AJ, Angelini GD. The effects of cardiopulmonary bypass temperature on inflammatory response following cardiopulmonary bypass. *Eur J Cardiothorac Surg* 1999;**16**(5):540-5.
223. Rossi M, Sganga G, Mazzone M, et al. Cardiopulmonary bypass in man: role of the intestine in a self-limiting inflammatory response with demonstrable bacterial translocation. *Ann Thorac Surg* 2004;**77**(2):612-8.
224. Wei M, Laurikka J, Kuukasjarvi P, Pehkonen E, Tarkka M. Soluble adhesion molecules in coronary artery bypass surgery. *Asian Cardiovasc Thorac Ann* 2003;**11**(3):198-202.
225. Haeffner-Cavaillon N, Rousselier N, Ponzio O, et al. Induction of interleukin-1 production in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1989;**98**(6):1100-6.
226. Menasche P, Haydar S, Peynet J, et al. A potential mechanism of vasodilation after warm heart surgery. The temperature-dependent release of cytokines. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994;**107**(1):293-9.
227. Chello M, Mastroberto P, Romano R, Ascione R, Pantaleo D, De Amicis V. Complement and neutrophil activation during cardiopulmonary bypass: a randomized comparison of hypothermic and normothermic circulation. *Eur J Cardiothorac Surg* 1997;**11**(1):162-8.
228. Hayashi Y, Sawa Y, Fukuyama N, Nakazawa H, Matsuda H. Inducible nitric oxide production is an adaptation to cardiopulmonary bypass-induced inflammatory response. *Ann Thorac Surg* 2001;**72**(1):149-55.
229. Ruvolo G, Greco E, Speziale G, et al. Nitric oxide formation during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1994;**57**(4):1055-7.
230. Nagaoka H, Katori M. Inhibition of kinin formation by a kallikrein inhibitor during extracorporeal circulation in open-heart surgery. *Circulation* 1975;**52**(2):325-32.
231. Tavares-Murta BM, Cordeiro AO, Murta EF, Cunha FD, Bisinotto FM. Effect of myocardial protection and perfusion temperature on production of cytokines and nitric oxide during cardiopulmonary bypass. *Acta Cir Bras* 2007;**22**(4):243-9.

232. Stadler J, Schmalix WA, Doehmer J. Inhibition of biotransformation by nitric oxide (NO) overproduction and toxic consequences. *Toxicol Lett* 1995;**82-83**:215-9.
233. Schurr UP, Zund G, Hoerstrup SP, et al. Preoperative administration of steroids: influence on adhesion molecules and cytokines after cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 2001;**72**(4):1316-20.
234. Chaney MA. Corticosteroids and cardiopulmonary bypass : a review of clinical investigations. *Chest* 2002;**121**(3):921-31.
235. Shao H, Shen Y, Liu H, Dong G, Qiang J, Jing H. Simvastatin suppresses lung inflammatory response in a rat cardiopulmonary bypass model. *Ann Thorac Surg* 2007;**84**(6):2011-8.
236. Mannacio VA, Iorio D, De Amicis V, Di Lello F, Musumeci F. Effect of rosuvastatin pretreatment on myocardial damage after coronary surgery: a randomized trial. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008;**136**(6):1541-8.
237. Katznelson R, Djaiani GN, Borger MA, et al. Preoperative use of statins is associated with reduced early delirium rates after cardiac surgery. *Anesthesiology* 2009;**110**(1):67-73.
238. Coleman CI, Lucek DM, Hammond J, White CM. Preoperative statins and infectious complications following cardiac surgery. *Curr Med Res Opin* 2007;**23**(8):1783-90.
239. Mohamed R, McAlister FA, Pretorius V, et al. Preoperative statin use and infection after cardiac surgery: a cohort study. *Clin Infect Dis* 2009;**48**(7):e66-72.
240. Dereli Y, Ege E, Kurban S, Narin C, Sarigul A, Yeniterzi M. Pre-operative atorvastatin therapy to decrease the systemic inflammatory response after coronary artery bypass grafting. *J Int Med Res* 2008;**36**(6):1248-54.
241. Caorsi C, Pineda F, Munoz C. Pravastatin immunomodulates IL-6 and C-reactive protein, but not IL-1 and TNF-alpha, in cardio-pulmonary bypass. *Eur Cytokine Netw* 2008;**19**(2):99-103.
242. Mathew JP, Grocott HP, McCurdy JR, et al. Preoperative statin therapy does not reduce cognitive dysfunction after cardiopulmonary bypass. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2005;**19**(3):294-9.
243. Chello M, Patti G, Candura D, et al. Effects of atorvastatin on systemic inflammatory response after coronary bypass surgery. *Crit Care Med* 2006;**34**(3):660-7.
244. Chello M, Carassiti M, Agro F, et al. Simvastatin blunts the increase of circulating adhesion molecules after coronary artery bypass surgery with cardiopulmonary bypass. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2004;**18**(5):605-9.
245. Chello M, Mastroberto P, Patti G, et al. Simvastatin attenuates leucocyte-endothelial interactions after coronary revascularisation with cardiopulmonary bypass. *Heart* 2003;**89**(5):538-43.
246. Chello M, Mastroberto P, Quirino A, et al. Inhibition of neutrophil apoptosis after coronary bypass operation with cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 2002;**73**(1):123-9.
247. Liakopoulos OJ, Dorge H, Schmitto JD, Nagorsnik U, Grabedunkel J, Schoendube FA. Effects of preoperative statin therapy on cytokines after cardiac surgery. *Thorac Cardiovasc Surg* 2006;**54**(4):250-4.
248. Tsunooka N, Nakagawa H, Doi T, et al. Pitavastatin prevents bacterial translocation after nonpulsatile/low-pressure blood flow in early

- atherosclerotic rat: inhibition of small intestine inducible nitric oxide synthase. *Eur Surg Res* 2005;**37**(5):302-11.
249. Pentikainen PJ, Saraheimo M, Schwartz JI, et al. Comparative pharmacokinetics of lovastatin, simvastatin and pravastatin in humans. *J Clin Pharmacol* 1992;**32**(2):136-40.
250. Germershausen JI, Hunt VM, Bostedor RG, Bailey PJ, Karkas JD, Alberts AW. Tissue selectivity of the cholesterol-lowering agents lovastatin, simvastatin and pravastatin in rats in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;**158**(3):667-75.
251. Todd PA, Goa KL. Simvastatin. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in hypercholesterolaemia. *Drugs* 1990;**40**(4):583-607.
252. Mauro VF. Clinical pharmacokinetics and practical applications of simvastatin. *Clin Pharmacokinet* 1993;**24**(3):195-202.
253. Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, et al. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med* 1995;**333**(20):1301-7.
254. Singhvi SM, Pan HY, Morrison RA, Willard DA. Disposition of pravastatin sodium, a tissue-selective HMG-CoA reductase inhibitor, in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol* 1990;**29**(2):239-43.
255. Sigurbjornsson S, Kjartansdottir T, Johannsson M, Kristinsson J, Sigurdsson G. A pharmacokinetic evaluation of pravastatin in middle-aged and elderly volunteers. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1998;**23**(1):13-8.
256. Siekmeier R, Gross W, Marz W. Determination of pravastatin by high performance liquid chromatography. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2000;**38**(9):419-25.
257. Otter K, Mignat C. Determination of pravastatin in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1998;**708**(1-2):235-41.
258. Everett DW, Chando TJ, Didonato GC, Singhvi SM, Pan HY, Weinstein SH. Biotransformation of pravastatin sodium in humans. *Drug Metab Dispos* 1991;**19**(4):740-8.
259. Gehr TW, Sica DA, Slugg PH, Hammett JL, Raymond R, Ford NF. The pharmacokinetics of pravastatin in patients on chronic hemodialysis. *Eur J Clin Pharmacol* 1997;**53**(2):117-21.
260. Corsini A, Bellosta S, Baetta R, Fumagalli R, Paoletti R, Bernini F. New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. *Pharmacol Ther* 1999;**84**(3):413-28.
261. Olbricht C, Wanner C, Eisenhauer T, et al. Accumulation of lovastatin, but not pravastatin, in the blood of cyclosporine-treated kidney graft patients after multiple doses. *Clin Pharmacol Ther* 1997;**62**(3):311-21.
262. Penson MG, Fricker FJ, Thompson JR, et al. Safety and efficacy of pravastatin therapy for the prevention of hyperlipidemia in pediatric and adolescent cardiac transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2001;**20**(6):611-8.
263. Keogh A, Macdonald P, Kaan A, Aboyoum C, Spratt P, Mundy J. Efficacy and safety of pravastatin vs simvastatin after cardiac transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2000;**19**(6):529-37.
264. Iliadis EA, Rosenson RS. Long-term safety of pravastatin-gemfibrozil therapy in mixed hyperlipidemia. *Clin Cardiol* 1999;**22**(1):25-8.

265. Ichihara K, Satoh K, Abiko Y. Influences of pravastatin and simvastatin, HMG-CoA reductase inhibitors, on myocardial stunning in dogs. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993;**22**(6):852-6.
266. Satoh K, Ichihara K. Lipophilic HMG-CoA reductase inhibitors increase myocardial stunning in dogs. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000;**35**(2):256-62.
267. Aronson S, Lee BK, Liddicoat JR, et al. Assessment of retrograde cardioplegia distribution using contrast echocardiography. *Ann Thorac Surg* 1991;**52**(4):810-4.
268. Taddei S, Viridis A, Ghiadoni L, Salvetti G, Salvetti A. Endothelial dysfunction in hypertension. *J Nephrol* 2000;**13**(3):205-10.
269. Pretnar-Oblak J, Sebestjen M, Sabovic M. Statin treatment improves cerebral more than systemic endothelial dysfunction in patients with arterial hypertension. *Am J Hypertens* 2008;**21**(6):674-8.
270. Zoccali C, Maio R, Tripepi G, Mallamaci F, Perticone F. Inflammation as a mediator of the link between mild to moderate renal insufficiency and endothelial dysfunction in essential hypertension. *J Am Soc Nephrol* 2006;**17**(4 Suppl 2):S64-8.
271. Perticone F, Maio R, Sciacqua A, et al. Endothelial dysfunction and C-reactive protein are risk factors for diabetes in essential hypertension. *Diabetes* 2008;**57**(1):167-71.
272. Jensen E, Bengtsson A, Berggren H, Ekroth R, Andreasson S. Clinical variables and pro-inflammatory activation in paediatric heart surgery. *Scand Cardiovasc J* 2001;**35**(3):201-6.
273. Cosgrave J, Foley B, Ho E, et al. Troponin T elevation after coronary bypass surgery: clinical relevance and correlation with perioperative variables. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* 2006;**7**(9):669-74.
274. Paparella D, Cappabianca G, Visicchio G, et al. Cardiac troponin I release after coronary artery bypass grafting operation: effects on operative and midterm survival. *Ann Thorac Surg* 2005;**80**(5):1758-64.
275. Oysel N, Bonnet J, Vergnes C, et al. Risk factors for myocardial infarction during coronary artery bypass graft surgery. *Eur Heart J* 1989;**10**(9):806-15.
276. Alamanni F, Dainese L, Naliato M, et al. On- and off-pump coronary surgery and perioperative myocardial infarction: an issue between incomplete and extensive revascularization. *Eur J Cardiothorac Surg* 2008;**34**(1):118-26.
277. Aksungar FB, Moini H, Unal M, Yilmaz O, Sonmez B, Bilsel S. Nitric oxide, endothelin-1, and superoxide production in arterial bypass grafts. *Tex Heart Inst J* 2006;**33**(3):294-9.
278. Castano M, Silva J, Fortuny R, Lopez J, Vallejo JL. Internal thoracic artery atherosclerosis after coarctation repair in an adult. *Ann Thorac Surg* 1998;**66**(4):1424-6.
279. Lytle BW, Cosgrove DM, Saltus GL, Taylor PC, Loop FD. Multivessel coronary revascularization without saphenous vein: long-term results of bilateral internal mammary artery grafting. *Ann Thorac Surg* 1983;**36**(5):540-7.
280. Graham DJ, Staffa JA, Shatin D, et al. Incidence of hospitalized rhabdomyolysis in patients treated with lipid-lowering drugs. *Jama* 2004;**292**(21):2585-90.
281. Berkan O, Katrancioğlu N, Ozker E, Ozerdem G, Bakici Z, Yilmaz MB. Reduced P-selectin in Hearts Pretreated with Fluvastatin: A Novel Benefit for Patients Undergoing Open Heart Surgery. *Thorac Cardiovasc Surg* 2009;**57**(2):91-5.

282. Garwood S. Renal insufficiency after cardiac surgery. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth* 2004;**8**(3):227-41.
283. Sharobeem KM, Madden BP, Millner R, Rolfe LM, Seymour CA, Parker J. Acute renal failure after cardiopulmonary bypass: a possible association with drugs of the fibrate group. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2000;**5**(1):33-9.
284. Ranucci M, Biagioli B, Scolletta S, et al. Lowest hematocrit on cardiopulmonary bypass impairs the outcome in coronary surgery: An Italian Multicenter Study from the National Cardioanesthesia Database. *Tex Heart Inst J* 2006;**33**(3):300-5.
285. Martinez-Comendador JM, Alvarez JR, Mosquera I, et al. Preoperative statin treatment reduces systemic inflammatory response and myocardial damage in cardiac surgery. *Eur J Cardiothorac Surg* 2009;**36**(6):998-1005 Epub 2009 Jul 5.
286. O'Driscoll G, Green D, Taylor RR. Simvastatin, an HMG-coenzyme A reductase inhibitor, improves endothelial function within 1 month. *Circulation* 1997;**95**(5):1126-31.
287. Mohammed AA, Agnihotri AK, van Kimmenade RR, et al. Prospective, comprehensive assessment of cardiac troponin T testing after coronary artery bypass graft surgery. *Circulation* 2009;**120**(10):843-50.
288. Sposito AC, Chapman MJ. Statin therapy in acute coronary syndromes: mechanistic insight into clinical benefit. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;**22**(10):1524-34.
289. Eagle K, Guyton R, Davidoff R, et al. ACC/AHA 2004 guideline update for coronary artery bypass graft surgery: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association TaskForce on Practice Guidelines (Committee to Update the 1999 Guidelines for Coronary Artery Bypass Graft Surgery).
290. Van de Velde M, DeWolff M, Leather HA, Wouters PF. Effects of lipids on the functional and metabolic recovery from global myocardial stunning in isolated rabbit hearts. *Cardiovasc Res* 2000;**48**(1):129-37.
291. Peng T, Lu X, Feng Q. Pivotal role of gp91phox-containing NADH oxidase in lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha expression and myocardial depression. *Circulation* 2005;**111**(13):1637-44.
292. Vincent JL, Bakker J, Marecaux G, Schandene L, Kahn RJ, Dupont E. Administration of anti-TNF antibody improves left ventricular function in septic shock patients. Results of a pilot study. *Chest* 1992;**101**(3):810-5.
293. Mangano DT. Biventricular function after myocardial revascularization in humans: deterioration and recovery patterns during the first 24 hours. *Anesthesiology* 1985;**62**(5):571-7.
294. Royster RL. Myocardial dysfunction following cardiopulmonary bypass: recovery patterns, predictors of inotropic need, theoretical concepts of inotropic administration. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1993;**7**(4 Suppl 2):19-25.
295. Foody JM, Farrell MH, Krumholz HM. beta-Blocker therapy in heart failure: scientific review. *Jama* 2002;**287**(7):883-9.
296. Ungerer M, Parruti G, Bohm M, et al. Expression of beta-arrestins and beta-adrenergic receptor kinases in the failing human heart. *Circ Res* 1994;**74**(2):206-13.

297. Williams ML, Hata JA, Schroder J, et al. Targeted beta-adrenergic receptor kinase (betaARK1) inhibition by gene transfer in failing human hearts. *Circulation* 2004;**109**(13):1590-3.
298. Ungureanu-Longrois D, Balligand JL, Kelly RA, Smith TW. Myocardial contractile dysfunction in the systemic inflammatory response syndrome: role of a cytokine-inducible nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1995;**27**(1):155-67.
299. Brady AJ, Poole-Wilson PA, Harding SE, Warren JB. Nitric oxide production within cardiac myocytes reduces their contractility in endotoxemia. *Am J Physiol* 1992;**263**(6 Pt 2):H1963-6.
300. Herbertson MJ, Werner HA, Walley KR. Nitric oxide synthase inhibition partially prevents decreased LV contractility during endotoxemia. *Am J Physiol* 1996;**270**(6 Pt 2):H1979-84.
301. Szabo C, Southan GJ, Thiemermann C. Beneficial effects and improved survival in rodent models of septic shock with S-methylisothiourrea sulfate, a potent and selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;**91**(26):12472-6.
302. Haverkate F, Thompson SG, Pyke SD, Gallimore JR, Pepys MB. Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *Lancet* 1997;**349**(9050):462-6.
303. Antman E, Anbe D, Armstrong P, et al. ACC/AHA guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to Revise the 1999 Guidelines for the Management of Patients With Acute Myocardial Infarction). 2004.
304. Braunwald E, Antman E, Beasley J, et al. ACC/AHA, 2002, guideline, update for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction: 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). 2002.
305. Gertz K, Laufs U, Lindauer U, et al. Withdrawal of statin treatment abrogates stroke protection in mice. *Stroke* 2003;**34**(2):551-7.
306. Chaudhary D, Verma GR, Gupta R, Bose SM, Ganguly NK. Comparative evaluation of the inflammatory mediators in patients undergoing laparoscopic versus conventional cholecystectomy. *Aust N Z J Surg* 1999;**69**(5):369-72.
307. Cheng X, Ding Y, Xia C, et al. Atorvastatin modulates Th1/Th2 response in patients with chronic heart failure. *J Card Fail* 2009;**15**(2):158-62.
308. Li JJ, Fang CH. Effects of 4 weeks of atorvastatin administration on the antiinflammatory cytokine interleukin-10 in patients with unstable angina. *Clin Chem* 2005;**51**(9):1735-8.
309. Stumpf C, Petzi S, Seybold K, et al. Atorvastatin enhances interleukin-10 levels and improves cardiac function in rats after acute myocardial infarction. *Clin Sci (Lond)* 2009;**116**(1):45-52.
310. Wu SY, Fang HY. [Effects of pravastatin on myocardial connexin 43, IFN-gamma and IL-10 expressions in a murine model of viral myocarditis induced by Coxsackievirus B3]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi* 2008;**36**(1):72-6.

311. Sun YM, Tian Y, Li X, et al. Effect of atorvastatin on expression of IL-10 and TNF-alpha mRNA in myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;**382**(2):336-40.
312. Redmond HP, Hofmann K, Shou J, Leon P, Kelly CJ, Daly JM. Effects of laparotomy on systemic macrophage function. *Surgery* 1992;**111**(6):647-55.
313. Mikawa K, Nishina K, Maekawa N, et al. Perioperative changes in superoxide production in neonates and infants. *Can J Anaesth* 1993;**40**(12):1162-70.
314. Utoh J, Yamamoto T, Utsunomiya T, Kambara T, Goto H, Miyauchi Y. Effect of surgery on neutrophil functions, superoxide and leukotriene production. *Br J Surg* 1988;**75**(7):682-5.
315. Kudou M, Kudou T, Matsuki A. [Changes in plasma superoxide dismutase like activity during general anesthesia and surgery in man]. *Masui* 1990;**39**(9):1172-7.
316. Elli M, Soylemezoglu O, Erbas D, et al. Plasma and urine nitric oxide levels in healthy Turkish children. *Pediatr Nephrol* 2005;**20**(11):1605-9.
317. Ghasemi A, Zahediasl S, Azizi F. Reference values for serum nitric oxide metabolites in an adult population. *Clin Biochem* 2009.
318. Ghasemi A, Zahedi Asl S, Mehrabi Y, Saadat N, Azizi F. Serum nitric oxide metabolite levels in a general healthy population: relation to sex and age. *Life Sci* 2008;**83**(9-10):326-31.
319. Hennein HA, Ebba H, Rodriguez JL, et al. Relationship of the proinflammatory cytokines to myocardial ischemia and dysfunction after uncomplicated coronary revascularization. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994;**108**(4):626-35.
320. Casey LC. Role of cytokines in the pathogenesis of cardiopulmonary-induced multisystem organ failure. *Ann Thorac Surg* 1993;**56**(5 Suppl):S92-6.
321. Iso H, Cui R, Date C, Kikuchi S, Tamakoshi A. C-reactive protein levels and risk of mortality from cardiovascular disease in Japanese: the JACC Study. *Atherosclerosis* 2009;**207**(1):291-7.
322. Padayachee L, Rodseth RN, Biccard BM. A meta-analysis of the utility of C-reactive protein in predicting early, intermediate-term and long term mortality and major adverse cardiac events in vascular surgical patients. *Anaesthesia* 2009;**64**(4):416-24.
323. Chowdhury UK, Malik V, Yadav R, et al. Myocardial injury in coronary artery bypass grafting: on-pump versus off-pump comparison by measuring high-sensitivity C-reactive protein, cardiac troponin I, heart-type fatty acid-binding protein, creatine kinase-MB, and myoglobin release. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008;**135**(5):1110-9, 1119 e1-10.
324. Cushman M, McClure LA, Howard VJ, Jenny NS, Lakoski SG, Howard G. Implications of increased C-reactive protein for cardiovascular risk stratification in black and white men and women in the US. *Clin Chem* 2009;**55**(9):1627-36.
325. Meng QH, Zhu S, Sohn N, et al. Release of cardiac biochemical and inflammatory markers in patients on cardiopulmonary bypass undergoing coronary artery bypass grafting. *J Card Surg* 2008;**23**(6):681-7.
326. Mittal A, Phillips AR, Loveday B, Windsor JA. The potential role for xanthine oxidase inhibition in major intra-abdominal surgery. *World J Surg* 2008;**32**(2):288-95.
327. Aderka D, Sorkine P, Abu-Abid S, et al. Shedding kinetics of soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors after systemic TNF leaking during isolated

- limb perfusion. Relevance to the pathophysiology of septic shock. *J Clin Invest* 1998;**101**(3):650-9.
328. Franke A, Lante W, Fackeldey V, et al. Proinflammatory and antiinflammatory cytokines after cardiac operation: different cellular sources at different times. *Ann Thorac Surg* 2002;**74**(2):363-70.
329. Hackman A, Abe Y, Insull W, Jr., et al. Levels of soluble cell adhesion molecules in patients with dyslipidemia. *Circulation* 1996;**93**(7):1334-8.
330. Lefer AM, Scalia R, Lefer DJ. Vascular effects of HMG CoA-reductase inhibitors (statins) unrelated to cholesterol lowering: new concepts for cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 2001;**49**(2):281-7.

Salamanca, 3 de marzo de 2010

El **PROF. CLEMENTE MURIEL VILLORIA**, Director del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA

que **D. MARIO CASTAÑO RUIZ** ha elaborado en el Departamento el trabajo titulado "**PAPEL DE LA PRAVASTATINA EN EL DAÑO MIOCÁRDICO POR ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN**", y que autoriza y lo considera apto para ser presentado como tesis doctoral en la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca.

Para que conste a todos los efectos oportunos,

Fdo.: Prof. C. Muriel Villoria