

## UNIVERSIDAD DR. JOSÉ MATÍAS DELGADO

### RED BIBLIOTECARIA MATÍAS

### DERECHOS DE PUBLICACIÓN

Basados en

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

Capítulo VI, Art. 46

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

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



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

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

05-1028429



**UNIVERSIDAD DR. JOSÉ MATÍAS DELGADO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**  
**"DR. LUIS EDMUNDO VÁSQUEZ"**  
**ESCUELA DE MEDICINA**

UJMD  
07 MED  
A 385e  
s. f.  
Ej. 1

**TESIS DOCTORAL**



**"Evaluación del Período de Ventana en la Terapia Antitrombótica,  
Utilizando un Inhibidor de la Glicoproteína IIb/IIIa en un  
Modelo Experimental de Evento Cerebro Vascular  
Isquémico Embólico en Conejos"**

**PARA OPTAR AL GRADO DE:**  
**DOCTOR EN MEDICINA**

U. J.M.D. BIBLIOTECA



1028429

**PRESENTADO POR:**

Br. Rodrigo José Alfaro Ponce  
Br. Jorge Alejandro Castellanos González  
Br. Rodrigo Tenze Epperson

**ASESOR:**

Dr. Víctor Edgardo Segura Lemus

**COLABORADORES:**

Dr. Francisco Sansivirini Valle, PhD  
Dr. José Nicolás Astacio Soria

## **AGRADECIMIENTOS:**

El Equipo de investigación de esta tesis doctoral desea agradecer en primer lugar a Dios Todopoderoso, a nuestros familiares, maestros y amigos que contribuyeron a la realización de este estudio experimental.

Agradecimientos especiales para nuestros asesores, Dr. Víctor Edgardo Segura Lemus, Dr. Francisco Sansivirini y Dr. José Nicolás Astacio por su invaluable aporte a la realización de este estudio.

Deseamos reconocer a las instituciones que nos brindaron su apoyo en la realización de este estudio: Universidad Doctor José Matías Delgado, Laboratorios PAILL, Laboratorios VIJOSA y Hospital Central.

Expresamos nuestra gratitud a la Br. Gloria González Iraheta, quien colaboró durante las sesiones de trabajo experimental en Laboratorio.

A todos aquellos que mostraron desde el inicio su confianza y apoyaron nuestro estudio.

Rodrigo José Alfaro Ponce, Jorge Alejandro Castellanos González, Rodrigo Tenze Epperson

## TABLA DE CONTENIDOS

6

Agradecimientos .....	i
Tabla de Contenidos.....	ii
I. Planteamiento del problema .....	1
II. Delimitación del problema .....	4
III. Justificación .....	5
IV. Antecedentes .....	7
V. Marco Teórico .....	10
VI. Objetivos.....	20
a. Objetivos Generales .....	20
b. Objetivos Específicos.....	20
VII. Sistema de Hipótesis.....	22
VIII. Diseño Metodológico.....	24
a. Tipo de Estudio.....	24
b. Muestra .....	24
c. Criterios de Inclusión y Exclusión .....	25
d. Operacionalización de Variables.....	25
e. Consideraciones Éticas .....	27
e. Procedimiento Experimental .....	27
f. Análisis de Datos .....	31
IX. Resultados .....	32
a. Análisis Descriptivo .....	32

b. Procedimiento Experimental .....	38
X. Discusión .....	50
XI . Conclusiones .....	57
XI . Recomendaciones .....	58
XII. Anexos .....	60
XIII. Bibliografía .....	64

## I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El Evento Cerebro Vascular (ECV) es definido, por la Organización Mundial de la Salud (OMS), como un cuadro clínico de desarrollo rápido de signos focales o globales de alteración cerebral con una duración mayor de 24 horas, a menos que sobrevenga la muerte, sin otra causa aparente aparte de trastornos vasculares<sup>1</sup>. Esta definición excluye tumores cerebrales primarios y metastáticos, hematomas subdurales, estados convulsivos, trauma y ataques isquémicos transitorios.

Los ECV, según su etiología, pueden dividirse en isquémicos (85%) y hemorrágicos (15%). Los ECV isquémicos se subdividen en trombóticos (25%) y embólicos (75%)<sup>2</sup>. Debido a su gran incidencia es de importancia la prevención, diagnóstico y tratamiento del ECV isquémico de tipo embólico.

El ECV se encuentra entre las tres primeras causas de muerte en Estados Unidos<sup>3,4</sup> y la primera causa de discapacidad a nivel mundial<sup>1</sup>. Su incidencia ha aumentado debido a múltiples factores, entre ellos el envejecimiento de la población<sup>5</sup>, la pandemia mundial de obesidad, el sedentarismo, la hipertensión arterial, la diabetes mellitus y el tabaquismo<sup>6</sup>. Varios estudios realizados en países desarrollados indican que la carga económica y social de esta enfermedad, así como las discapacidades que generan son, para los sistemas de salud, enormes<sup>7</sup>.

En El Salvador en el año 2002 se reportaron 1561 casos de ECV, de los cuales se presentaron 92 muertes<sup>8</sup>, sin embargo no se puede descartar la presencia de un fenómeno de sub-registro de casos. En nuestro país existen pocas investigaciones sobre el tema, haciendo difícil un análisis preciso del comportamiento socio epidemiológico del problema. Entre estas se cuenta con estudios que, a nivel hospitalario, estiman una mortalidad de ECV isquémico de 15 a 26%, en los cuales se han evaluado factores de riesgo asociados a mortalidad<sup>9, 10</sup>.

Debido a las repercusiones del ECV sobre la morbilidad y mortalidad mundial, es de vital importancia tomar medidas de prevención, modificando factores de riesgo para reducir su incidencia<sup>11</sup>. Sin embargo, una vez establecido el ECV existen pocas opciones terapéuticas efectivas para mejorar la sobrevida y disminuir las posibles secuelas. Entre estas se encuentra la pro-urokinasa recombinante la cual administrada por vía intraarterial, en las primeras 6 horas del ECV agudo, demostró una mejoría clínica significativa a los 90 días; aunque también produjo un incremento de la incidencia de la HIC (Hemorragia Intracerebral)<sup>12</sup>. No obstante en la actualidad el único fármaco aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*)<sup>13</sup> como tratamiento para el ECV isquémico de tipo embólico es la Alteplasa, un Activador del Plasminógeno Tisular Recombinante (rt-PA), el cual por sus criterios de elegibilidad limita su uso a un grupo reducido de pacientes<sup>14,15</sup>.

En vista de esto, se buscan nuevas alternativas efectivas para el tratamiento de ECV isquémico de tipo embólico. Una de estas es el Tirofiban, una molécula no peptídica que produce una inhibición competitiva del receptor de la glicoproteína

IIb/IIIa (GP IIb/IIIa)<sup>16,17</sup>. El Tirofiban ha sido ampliamente utilizado en casos de isquemia coronaria aguda; siendo efectivo para mejorar el pronóstico de estos pacientes<sup>18</sup>. Al mismo tiempo existen estudios preclínicos que apoyan su uso para el tratamiento de ECV isquémico de tipo embólico<sup>19</sup>.

Si bien se ha documentado su uso en el tratamiento de la patología en cuestión, es necesario establecer de forma categórica, la ventana terapéutica para el Tirofiban ante el ECV isquémico de tipo embólico<sup>20</sup>.

Debido a todo lo expuesto anteriormente surgió la siguiente pregunta:

¿Como es la eficacia del Tirofiban al administrarlo a las 3, 6 y 9 horas de iniciado un ECV isquémico embólico en un modelo experimental en conejos, para reducir el volumen del infarto cerebral?

## II. DELIMITACION DEL PROBLEMA

Recientes estudios han demostrado la efectividad del Tirofiban en el manejo agudo del ECV isquémico embólico tanto en conejos<sup>19</sup>, como en series de casos en humanos<sup>21</sup>.

A nivel experimental se ha demostrado su efectividad en la reducción del volumen del infarto a las dos horas de provocado el embolismo cerebral<sup>19</sup>, sin embargo se desconoce el período de ventana terapéutica, es decir, no se ha establecido el momento en el cual todavía se puede administrar este medicamento para que continúe siendo efectivo.

Al mismo tiempo no se ha comprobado, en modelos experimentales, si al administrar a distintas horas el Tirofiban existirá un mayor riesgo de hemorragia intracerebral. Además, se ignora si el Tirofiban tiene una ventana terapéutica clínica lo que significaría que administrado a distintas horas después un ECV, podría presentarse una mejoría clínica, evaluada con una escala neurológica.

Es por ello que esta investigación tenía el propósito de determinar la ventana terapéutica del Tirofiban administrado a las 3, 6 y 9 horas después de producido el evento cerebrovascular isquémico, comparado con placebo.

### III. JUSTIFICACIÓN

El ECV isquémico embólico representa una de las primeras causas de discapacidad a nivel mundial<sup>1</sup> y la tercera causa de muerte en Estados Unidos<sup>3</sup>. El ECV constituye una carga considerable tanto en costos humanos como económicos, no sólo para el paciente que lo sufre, sino también para la sociedad y los sistemas de salud.

En 1997 en Australia, se evaluaron los costos, para el sistema de salud, posteriores a un ECV isquémico, los cuales representaron cerca de 985 millones de dólares<sup>7</sup>. Después de la presentación de un ECV, las opciones terapéuticas son pocas y solamente una pequeña proporción de la población es elegible para estas <sup>22,23</sup>.

El estudio de Kleindorfer et al demostró que en una población en Cincinnati únicamente el 8% de los pacientes con ECV isquémico son elegibles para la terapia trombolítica con rt-PA, siendo la ventana terapéutica, menor de 3 horas, el criterio de elegibilidad más difícil de cumplir<sup>23</sup>, puesto que se estima en un promedio de 5.5 horas el momento de arribo a los centros de emergencia desde iniciados los síntomas, habiendo solamente un 28.9% de pacientes que consultan durante las primeras 3 horas<sup>22</sup>. Si bien, la terapia trombolítica esta aprobada en varios países para el manejo de ECV isquémico, solamente un pequeño número de pacientes es elegible para el tratamiento.

En El Salvador, el estudio de Palacios M et al, realizado en el Hospital Médico Quirúrgico (HMQ) del Instituto Salvadoreño del Seguro Social (ISSS), demostró en una serie de 106 pacientes con diagnóstico de ECV isquémico, que aproximadamente 62% de estos tenían un TAC (Tomografía Axial Computarizada) negativa a su ingreso. Sin embargo, es importante recalcar que las limitaciones metodológicas de este estudio no permiten determinar el tiempo de evolución del ictus al momento del ingreso<sup>10</sup>.

Por lo tanto existe la necesidad de buscar y desarrollar nuevas opciones de tratamientos y a la vez ampliar la cobertura de los ya establecidos. La búsqueda de agentes adicionales que puedan restablecer el flujo sanguíneo cerebral es entonces necesaria.

Existen estudios preclínicos experimentales que demuestran la efectividad del Tirofiban en ECV isquémico embólico administrado 2 horas después de establecida la isquemia<sup>19</sup>. Además se conoce un estudio clínico el cual describe un caso de ECV isquémico embólico de la Arteria Basilar, en el que se logró una reperusión total luego de la administración de Tirofiban Intra arterial<sup>21</sup>. Sin embargo, no se conoce la ventana terapéutica de este medicamento para el ECV. Incluso las combinaciones con rt-PA no se han utilizado después de 3 horas debido a la falta de estudios en fase 1 y 2 que indiquen la ventana terapéutica del Tirofiban<sup>24</sup>.

#### IV. ANTECEDENTES

Actualmente el único medicamento aceptado por la FDA para el tratamiento de ECV isquémico embólico es la Alteplasa (rt-PA)<sup>13</sup>. Se están evaluando otros activadores del plasminógeno tisular recombinante, entre ellos se encuentra la Tenecteplasa. Recientes estudios indican que la Tenecteplasa podría tener una mayor efectividad que la Alteplasa, además de un período de ventana terapéutica más amplio sin incrementar el riesgo de producir HIC<sup>25</sup>. Recientemente se han realizado estudios para tratar de ofrecer diferentes alternativas de tratamiento, entre ellas se encuentran los inhibidores de la GP IIb/IIIa. Estos fármacos se encuentran aprobados por la FDA para el manejo de síndromes coronarios agudos desde noviembre de 1997<sup>26</sup>

Algunos de estos inhibidores han sido investigados para el tratamiento del ECV isquémico embólico. En el año 2000 fueron publicados los resultados del estudio realizado por *The Abciximab in Acute Ischemic Stroke Investigators* en el cual se estableció que el Abciximab, utilizado a dosis estándar, puede ser seguro en el tratamiento de ECV isquémico produciendo una mejoría clínica a los 90 días comparado a los controles, incluso administrado a las 24 horas de iniciados los síntomas<sup>27</sup>.

Posteriormente en un estudio de P. Lapchak et al en 2001, se estableció que el SM-20302, un inhibidor de la GP IIb/IIIa, en combinación con el rt-PA disminuye el

riesgo de HIC. Así mismo este autor sugiere que existe un período de ventana terapéutica específica de los inhibidores de la GP IIb/IIIa en ECV isquémico<sup>28</sup>.

Algunos autores sugieren que los inhibidores de la GP IIb/IIIa pueden sobrepasar las 3 horas de ventana terapéutica que posee la Alteplasa (rt-PA)<sup>29</sup>.

Junghans et al en 2002 utilizó Tirofiban en ECV isquémico embólico estableciendo, por medio de resonancia magnética, una disminución del área de infarto cerebral, sugiriendo que el Tirofiban previene la transición del tejido isquémico a tejido infartado<sup>20</sup>.

En el estudio de Rudiger J. Seitz et al en 2003, se utilizó rt-PA, a dosis bajas, combinado con Tirofiban. Se estableció, en este grupo de pacientes, un margen de seguridad aceptable para su uso, junto con un potencial para reducir el déficit neurológico similar al del grupo de pacientes que reciben rt-PA a dosis estándar. Los datos también revelaron la necesidad de realizar estudios en fases 1 y 2 en la ventana de 3 a 6 horas después de establecido el ECV isquémico embólico para establecer la eficacia y seguridad de esta combinación<sup>24</sup>.

Agregado a estos resultados, en 2004 Junghans et al publicó un estudio, con la combinación antes mencionada, obteniendo un 68% de recanalización de la arteria cerebral media y una mejoría neurológica de los pacientes<sup>30</sup>.

En 2004 Haerten K. et al evaluaron el uso de Tirofiban y Eptifibatide, ambos inhibidores de la GP IIb/IIIa, combinados con Heparina, Ácido Acetil Salicílico y Clopidogrel, monitorizando la escala de Ranking modificada, observando una mejoría impresionante durante las primeras 24 horas de iniciado el tratamiento<sup>31</sup>.

En El Salvador se cuenta con pocos estudios que muestren resultados relacionados con el tema, sin embargo en 2004, el estudio de Segura V et al<sup>19</sup> evaluó el uso de Tirofiban sólo y en combinación con Enoxaparina, en un modelo experimental en conejos, obteniendo resultados aparentemente favorables para su uso<sup>19</sup>, mostrando una disminución del volumen del infarto cerebral a nivel experimental. Todas estas referencias aportan evidencia presuntiva de la utilidad de los inhibidores de la GP IIb/IIIa aunque todavía este por definirse si existe un período de ventana para su indicación.

La determinación del período de ventana a nivel experimental, es el primer paso para estudiar el Tirofiban en ensayos clínicos para la posterior aprobación de este fármaco como parte del tratamiento del ECV isquémico. Al mismo tiempo si esta ventana terapéutica es amplia, representaría una alternativa en el manejo de aquellos pacientes que no tiene acceso al rt-PA o que no cumplen los criterios de su administración.

## V. MARCO TEORICO

La AHA (*American Heart Association*) estima que cada 45 segundos un estadounidense sufre un evento cerebrovascular. Los costos directos e indirectos de esta patología ascendieron a 53 billones de dólares en el año 2001. En el mismo año se reportan 700 000 casos nuevos de ECV en los Estados Unidos<sup>32</sup>.

Debido a que la mayoría de los ECV se deben a una oclusión tromboembólica de una arteria intracerebral, la restauración de la perfusión es un punto clave en la estrategia terapéutica. En toda área isquémica se presenta una zona central en la cual el daño es irreversible, rodeada de una zona de penumbra isquémica la cual puede ser revertida mediante la restauración del flujo sanguíneo a dicha área<sup>33</sup>.

En cuanto al tratamiento, se han establecido varias estrategias para tratar de restaurar el flujo sanguíneo tras una oclusión tromboembólica. En la actualidad la Alteplasa es el único medicamento aprobado por la FDA para el tratamiento con una efectividad demostrada. Sin embargo el rt-PA debe de ser administrado en las 3 primeras horas de iniciados los síntomas ya que después de este período aumenta el riesgo de HIC<sup>14</sup>. Además, reoclusiones transitorias y permanentes asociadas con un incremento de la mortalidad continúan ocurriendo después de la trombolisis con rt-PA<sup>34</sup>. A pesar de estos resultados, el rt-PA sigue siendo el *estándar de oro* en el tratamiento de un ECV isquémico embólico en las primeras 3 horas<sup>35</sup>.

Se han estudiado otros agentes trombolíticos como la Streptokinasa, mostrando tener un alto riesgo de HIC sintomáticas, que supera por mucho los efectos beneficiosos producidos en pacientes con ECV isquémico embólico<sup>36,37</sup>.

Actualmente, no se recomienda el uso sistemático de heparinoides (Heparina, Heparina de bajo peso molecular, etc.) para el tratamiento de pacientes con ECV isquémico embólico agudo debido al alto riesgo de hemorragia<sup>33, 35, 37</sup>. Sin embargo, existen estudios en animales que han mostrado que la Enoxaparina, utilizada en las primeras 6 horas del ECV, puede producir mejoría clínica y disminuir el volumen del infarto, sin un aumento significativo del riesgo de HIC<sup>19,38</sup>.

Por otro lado, se han estudiado agentes antiplaquetarios para el tratamiento agudo del ECV isquémico tromboembólico, siendo la Aspirina el más investigado. En el IST (*International Stroke Trial*)<sup>39</sup> y en el CAST (*Chinesse Acute Stroke Trial*)<sup>40</sup> se demostró la seguridad de la Aspirina en el tratamiento del ECV isquémico tromboembólico, observándose un leve beneficio neto. La AHA recomienda el uso de Aspirina después de 24 a 48 horas de iniciado el ictus. Sin embargo, no recomienda el uso de ningún otro antiplaquetario<sup>33</sup>.

Se han investigado en diversos ensayos clínicos la utilidad de sustancias neuroprotectoras para aumentar la tolerancia del tejido cerebral a la isquemia. Sin embargo, la mayoría de estos estudios no han demostrado la eficacia de los neuroprotectores en el ictus isquémico y muchos debieron ser suspendidos debido

a la alta tasa de efectos adversos producidos<sup>41, 42, 43</sup>. Así mismo, ninguno de estos agentes es recomendado por la AHA o la EUSI<sup>o</sup> (*European Stroke Initiative*) para el tratamiento del ictus isquémico agudo<sup>33,37</sup>.

La obstrucción aguda de una de las arterias cerebrales mayores, produce una inmediata reducción del flujo sanguíneo cerebral en el área de irrigación correspondiente (isquemia focal). La reducción del flujo sanguíneo no es homogénea en el sector afectado, pudiendo variar en minutos u horas, especialmente cuando se instaura la reperfusión. La isquemia se torna grave en determinado foco isquémico (área de necrosis), mientras que en la periferia se establece un anillo denominado área de penumbra, en la cual la disminución del flujo es menos severa, gracias a los aportes sanguíneos de las arterias colaterales del tejido adyacente no isquémico. Los infartos cerebrales se definen como áreas de necrosis que se desarrollan en sitios donde se ha producido una isquemia grave. La isquemia cerebral desencadena una secuencia de fenómenos moleculares a corto y largo plazo, que se inician con el fracaso de la producción de ATP<sup>44</sup>.

A partir de este punto se establece una cascada de eventos isquémicos. Después de un evento isquémico, la pared vascular se modifica de un estado antitrombótico antiadhesivo a un estado, en el cual promueve la adhesión leucocitaria y la trombosis, potenciando la hipoperfusión post-isquémica. Estudios en ratas develan la existencia de mecanismos adicionales, responsables del no reflujo cerebrovascular post isquémico, especialmente la posibilidad de que trombosis

locales ocurren a nivel de la microvasculatura. (distal al sitio de la oclusión primaria en ECV). Estudios recientes en modelos de ECV en ratas implican a los receptores de la GP IIb/IIIa en el reclutamiento dependiente de plaquetas, como un mecanismo amplificador de la trombosis en la microvasculatura post isquémica<sup>44</sup>. Estas observaciones proveen la necesidad de identificar nuevas estrategias para limitar selectivamente la trombosis en ECV sin incrementar la HIC.

La cascada de eventos isquémicos continúa con una interrupción de los gradientes iónicos transmembranales, debido a fallos en la bomba Na/K ATPasa y otras bombas iónicas dependientes de energía. Las neuronas de las células gliales se despolarizan excesivamente por la entrada de sodio, cloro, calcio y agua al citoplasma. Además se produce una salida masiva de potasio, incrementando los niveles de potasio extracelular, causando edema citotóxico de la célula. El fracaso energético y los cambios iónicos asociados, ocasionan un incremento de la secreción de Glutamato, superexcitación de los receptores glutamatergicos de n-metil-d-aspartato (NMDA) y de ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionico (AMPA), lo que confluye a un incremento, aún mayor de la concentración de calcio intracelular. La hiperexcitación ocasiona el fenómeno de despolarización peri-infarto la cual incrementa el gasto energético, especialmente cuando la membrana intenta repolarizarse. La gran cantidad de calcio intracelular activa enzimas proteolíticas, que degradan proteínas del citoesqueleto y de la matriz intracelular. El calcio activa la fosfolipasa A2 y la ciclooxigenasa produciendo radicales libres de oxígeno, entre los que se incluye el óxido nítrico

(NO)<sup>45</sup>. Estas moléculas altamente reactivas se producen en los estados iniciales y tardíos de la isquemia cerebral. Los radicales libres promueven daños a la membrana y disfunción mitocondrial subsecuentes.

La isquemia cerebral desencadena una serie compleja de fenómenos moleculares, como la activación y expresión de genes proinflamatorios inducidos por la síntesis de factores de transcripción, y la liberación de mediadores de inflamación como factores de activación de la plaquetas, factor de necrosis tumoral (TNF) e interleuquina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). Consecuentemente se produce la expresión de moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1, selectinas p y e). Después de unirse a las moléculas de adhesión, los neutrófilos se adhieren al endotelio causando obstrucción microvascular. La activación de células inflamatorias y la injuria en las neuronas produce un número de mediadores tóxicos que empeoran la isquemia.

Otro mecanismo que contribuye a la injuria isquémica es la apoptosis. La cual es desencadenada por un número de fenómenos patológicos, incluidos la excitotoxicidad, la formación de radicales libres, la reacción inflamatoria, el daño mitocondrial y del DNA. La apoptosis ocurre después de una leve lesión isquémica particularmente dentro de la penumbra isquémica. La apoptosis es mediada por una cascada de expresión de genes incluyendo las caspasas. Las cuales son una familia de proteasas de cisteína, aspartato específicas, existentes como precursores latentes, que al activarse inician la programación de la muerte celular al destruir componentes claves de la infraestructura celular y activando factores

que median el daño a la célula. El ECV isquémico fue la primera enfermedad neurológica en la cual la activación de las caspasas fue documentada<sup>46</sup>. Además miembros de la familia de las caspasas pueden influenciar el balance entre señales proapoptóticas y antiapoptóticas de la familia Bcl-2<sup>44, 45, 46, 47</sup>.

Cada vez se cuenta con más evidencia de mecanismos apoptóticos de aparición subaguda y otros más tardíos que permiten explicar la muerte celular días o meses después de la lesión. La liberación del citocromo C de la mitocondria como respuesta a la despolarización isquémica y la acumulación de calcio intramitocondrial hace posible la formación del complejo citocromo C- proteína apoptótica BAD-APAF (factor asociado a la apoptosis). Este complejo produce el apoptosoma capaz de activar las caspasas y otras proteasas de cisteína responsables directas de la muerte neuronal por su capacidad de digerir proteínas vitales para la célula, como proteínas de reparación del ADN, proteínas reguladoras de la apoptosis y proteínas estructurales del citoesqueleto.

Existen muchos modelos experimentales que hacen referencia al papel de la activación plaquetaria en la fisiopatología del ECV isquémico. Abumiya et al<sup>48</sup> refieren que la activación plaquetaria contribuye significativamente a la oclusión de la microvasculatura cerebral. La unión de la GP IIb/IIIa con el fibrinógeno, es el proceso culminante de la agregación y adhesión plaquetaria. La GP IIb/IIIa tiene una baja afinidad con sus ligandos solubles (fibrinógeno y factor de Von Willebrand) en las plaquetas no activadas. Cuando ocurre la injuria vascular, la activación plaquetaria ocurre luego de la unión del receptor de glicoproteína Ib-IX-

V con el factor de Von Willebrand en la matriz extracelular; y la unión de agonistas solubles con receptores de membrana específicos de las plaquetas. Todos estos fenómenos activan una secuencia de eventos que aumentan la afinidad de la GP IIb/IIIa con sus ligandos causando contracción microesquelética y retracción plaquetaria permitiendo la organización del coágulo<sup>49</sup>.

Debido a la cascada de eventos fisiopatológicos expuesta anteriormente, los inhibidores de los receptores de las GP IIb/IIIa fueron desarrollados tras la premisa que estos agentes disminuirían la agregación plaquetaria<sup>20</sup>.

La FDA ha aprobado tres de estos inhibidores de las GP IIb/IIIa: el Abciximab<sup>26</sup> (fragmento Fab de un anticuerpo quimérico humano-ratón), el Eptifibatide<sup>50</sup> (heptapéptido cíclico) y el Tirofiban<sup>16</sup> (una molécula no peptídica derivada de la tirosina). El principal impacto clínico de estos agentes parenterales ha sido la prevención de complicaciones isquémicas luego de intervenciones coronarias percutáneas<sup>18</sup>.

De acuerdo con estudios preclínicos los antagonistas de receptor de la GP IIb/IIIa pueden actuar por los siguientes mecanismos:

- Previene la expansión de la lesión isquémica mejorando la microcirculación y la circulación colateral en modelos experimentales<sup>20</sup>.
- Promueve y potencia la trombolísis regulando la agregación plaquetaria y la generación de trombina (impide la re-trombosis)<sup>51</sup>.

- Atenúan la inflamación a través de la inhibición de la injuria por reperfusión y el fenómeno de reoclusión<sup>52</sup>.

Se han desarrollado varios ensayos clínicos con Abciximab (ReoPro™) entre ellos el *Abciximab in Acute Ischemic Stroke: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Dose-Escalation Study*<sup>27</sup>; un estudio piloto en fase IIa, en el cual se administró Abciximab hasta las 24 horas del inicio del ECV isquémico comparado con un placebo. En este estudio se demostró la seguridad del medicamento, al igual que su efectividad sobre la mejoría funcional de los pacientes. Otro ensayo clínico fase IIb es el AbESTT (*Abciximab in Emergent Stroke Treatment Trial*)<sup>53</sup>, se evaluaron 400 pacientes en las primeras 6 horas del inicio de un ECV isquémico, a los cuales se le administró Abciximab. El Abciximab disminuyó la incidencia de HIC y la mortalidad frente al placebo. Además los pacientes que recibieron Abciximab tuvieron una mejor evolución a los 90 días de presentar el ECV.

Heo et al estudiaron 29 pacientes con ECV embólico, tras una reperfusión exitosa con rt-PA. En 4 de estos pacientes se demostró angiográficamente un fenómeno de reoclusión arterial. Se utilizó Abciximab endovenoso en este subgrupo logrando disolver el trombo, obteniendo reperfusión completa de la arteria en 2 de ellos, esto sugiere una posible acción trombolítica del Abciximab<sup>34</sup>.

Por otro lado Eckert et al establecieron en una serie de 3 pacientes que el Abciximab endovenoso en combinación con rt-PA intraarterial, administrado a las

6 horas de un ECV embólico de la Arteria Basilar (con una mortalidad del 90%), logró una recanalización completa en 2 casos, sin un aumentar el riesgo de HIC<sup>54</sup>.

Actualmente están en desarrollo estudios en fase III<sup>55</sup> para el uso de Abxicimab en ECV isquémico.

El Eptifibatide es el inhibidor de la GP IIb/IIIa más recientemente desarrollado. Actualmente se está realizando un estudio multicéntrico el *Combined Approach to Lysis Utilizing Eptifibatide and rt-PA in Acute Ischemic Stroke (CLEAR Stroke Trial)*, en el cual se evaluará la seguridad del Eptifibatide combinado con rt-PA durante las primeras tres horas de iniciado el ictus<sup>56</sup>. Este estudio se encuentra reclutando pacientes al momento.

Otro inhibidor de la GP IIb/IIIa de uso parenteral es el Tirofiban, el cual al ser administrado de acuerdo a la dosis de carga recomendada, produce una inhibición de la agregación plaquetaria mayor al 90% después de 30 minutos de infusión. Esta inhibición es reversible al momento de suspendida la infusión<sup>57</sup>. Entre sus características farmacológicas, el Tirofiban posee una vida media de aproximadamente 2 horas. Su excreción es mayormente renal con un 65% de la dosis encontrada en la orina y 25% en heces. Su metabolismo parece ser limitado. El Tirofiban se une débilmente a proteínas plasmáticas y esta unión es independiente al superar concentraciones de 0.01 a 25 µg/mL. La fracción libre en plasma humano es de 35%<sup>57</sup>.

Existen diversos estudios clínicos y preclínicos que respaldan el uso de Tirofiban en ECV isquémico, entre los hallazgos de estos estudios tenemos que:

- El Tirofiban solo o combinado con rt-PA tiene un bajo riesgo de HIC<sup>58</sup>
- El Tirofiban disminuye el volumen del infarto en estudios preclínicos<sup>19</sup>.
- El Tirofiban endovenoso parece tener propiedades trombolíticas. En el estudio de Liebeskind et al se documentó angiográficamente la recanalización temprana con trombolisis vertebrobasilar, en un paciente de un infarto cerebelar y pontino extenso, sin embargo se observó retrombosis 11 horas después de finalizada la infusión de Tirofiban<sup>21</sup>.

## **VI. OBJETIVOS**

### **Objetivos Generales**

- Determinar la ventana terapéutica del Tirofiban en el uso de ECV isquémico embólico en conejos.
- Determinar si el uso de Tirofiban, comparado con placebo, aumenta la incidencia de HIC después del ECV isquémico embólico en conejos, administrado 3, 6 y 9 horas de iniciada la isquemia.

### **Objetivos Específicos**

- Evaluar la eficacia del Tirofiban, comparado con Placebo, en la disminución del volumen del infarto cerebral después del ECV isquémico embólico en conejos administrado a las 3, 6 y 9 horas de iniciada la isquemia.
- Evaluar el déficit neurológico después del ECV isquémico embólico en conejos 24 y 48 horas iniciado la isquemia.

- Comparar la frecuencia de aparición de HIC después del ECV isquémico entre los grupos Placebo y Tirofiban, administrados a las 3, 6 y 9 horas de iniciada la isquemia.

## **VII. SISTEMA DE HIPÓTESIS**

### **Hipótesis Generales**

- El Tirofiban tiene una ventana terapéutica de por lo menos 9 horas en el tratamiento de ECV isquémico embólico en conejos.
- El Tirofiban no aumenta la incidencia de HIC después del ECV isquémico embólico en conejos, administrado a las 3, 6 y 9 horas de iniciada la isquemia.

### **Hipótesis Específicas**

- El Tirofiban, a diferencia del Placebo, produce una disminución del volumen del infarto cerebral, administrado a las 3, 6 y 9 horas de iniciada la isquemia.
- El Tirofiban, a diferencia del Placebo, mejora el déficit neurológico evaluado a las 24 y 48 horas de iniciada la isquemia.

- La frecuencia de aparición de HIC después de un ECV isquémico en conejos es similar en los grupos control y° Tirofiban a las 3, 6 y 9 horas después de iniciada la isquemia.

## **VIII. METODOLOGÍA**

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

Ensayo experimental, aleatorio estratificado, a doble ciego, placebo controlado en conejos<sup>59</sup>

### **b. Universo**

Se utilizó una N de 150 conejos que fueron distribuidos aleatoriamente en tres grupos de investigación de la siguiente manera:

- Grupo 1: Inicio a las 3 horas de realizada la embolización.
- Grupo 2: Inicio a las 6 horas de realizada la embolización.
- Grupo 3: Inicio a las 9 horas de realizada la embolización.

Cada grupo fue subdividido aleatoriamente a su vez en 2 subgrupos:

- A. Subgrupo Placebo.
- B. Subgrupo Tirofiban.

Fueron incluidos en el estudio todos aquellos conejos que cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión.



### **c. Criterios de inclusión**

1. Conejos blancos neozelandeses machos, con un peso entre 700 y 1100 gramos.

### **d. Criterios de exclusión**

1. Conejos embolizados que murio antes de finalizada la infusión.

2. Todo aquel conejo que tras el análisis patológico no presentó evidencia de infarto cerebral o hemorragia intracerebral.

### **e. Operacionalización de las variables**

#### **a. Variables independientes:**

- Vehículo: Solución salina al 0.9% fue administrada como placebo al subgrupo control y diluyente al subgrupo de Tirofiban a dosis de 5 mL/kg/dosis.
- Tirofiban: fue administrado a dosis de  $0.4 \mu\text{g}/\text{Kg}/\text{min}^{60}$  diluido en el vehículo en una concentración de 6000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

- Duración de la administración del medicamento: todos los sujetos recibieron una infusión por un período de 30 minutos, independientemente del subgrupo al que pertenecían.
- Tiempo de isquemia previo a la infusión: Los sujetos fueron divididos en 3 grupos dependiendo del tiempo de isquemia, periodo comprendido entre la embolización y el inicio de la infusión. Los 3 grupos, de 50 sujetos cada uno, fueron 3 horas, 6 horas y 9 horas.
- Momento de la eutanasia: todos los sujetos de estudio que sobrevivieron a la infusión fueron sistemáticamente sacrificados al cumplir 48 horas.

### 3. Variables dependientes:

- Volumen del infarto cerebral: se calculó el volumen del infarto mediante el análisis patológico utilizando a la siguiente formula:  

$$V_{inf} = R_{ap} * R_{lat} * R_{axial} * \pi * 1.3^{19}$$
- Hemorragia intracerebral: se determinó mediante análisis patológico tomando en cuenta cualquier evidencia de extravasación de sangre en el tejido encefálico.
- Escala neurológica: herramienta con la que se determinó la presencia o ausencia de déficit neurológico basado en un grupo de reflejos que fueron evaluados en los sujetos por el mismo examinador (anexo 2).

#### **f. Consideraciones éticas.**

Para la realización de esta tesis se buscaron normas éticas para experimentación en animales en El Salvador pero no se encontró normativa alguna. Por lo cual se hizo uso a las normas establecidas por el "*National Institute of Health*" de los Estados Unidos a través de "*Office of Laboratory Animal Welfare*" actualizado en Agosto de 2002<sup>61</sup>.

También se trabajó de acuerdo a lo establecido por el "*Animal Welfare Act*" secciones 13(a)(3)<sup>62</sup>.

#### **g. Procedimiento experimental**

- *Preparación del coágulo:*

Se extrajo sangre del animal de experimentación, la cual se incubó por lo menos 22 horas a 37°C<sup>63</sup>. Se formaron coágulos de más o menos 0.15 mL de sangre, los cuales eran fraccionados y suspendidos en 0.45 mL de solución salina al 0.9% previo a la embolización.

- *Modelo animal:*

Se utilizaron conejos blancos, machos, de tipo Nueva Zelanda; con un peso entre 700 y 1100 gr.

Se procedía a pesarlos, tras lo cual se les administraba la anestesia con éter puro por inhalación, luego se les administraba Atropina (0.1 mg/Kg), Midazolam (2 mg/Kg) y Ketamina (20 mg/Kg)<sup>64</sup>, Los cuales eran repetidos cada hora según respuesta mientras duró la manipulación del animal de experimentación.

Se procedía a cateterizar la Arteria Carótida Común Derecha con un catéter 22G x 2/3", introducido de 0.5 a 1 cm dentro de la Arteria Carótida Común Derecha, el cual se fijaba con Nylon 3-0.

Se inyectaba un coágulo autólogo, de 0.15 mL suspendido en 0.45 mL de solución salina al 0.9%, a través del catéter situado en la Arteria Carótida Común Derecha, seguido de una inyección de 0.20 mL de solución salina al 0.9%.

A los sujetos de experimentación se les administró un bolo de 10 mL de solución salina al 0.9%, por vía intraperitoneal, cada 3 horas hasta la finalización de la infusión. Esto con el propósito de reponer las pérdidas hídricas de los sujetos de experimentación.

Después de producida la embolización se distribuyeron de forma aleatoria los conejos en los subgrupos tirofiban y placebo. Los investigadores en ningún momento de la fase experimental sabían a cual subgrupo se le infundió Placebo o Tirofiban.

Se infundía el medicamento durante 30 minutos utilizando bomba de infusión Sigma Abbot 6000 de la siguiente forma:

- 3 horas: - Subgrupo control: Vehículo<sup>o</sup> (Solución Salina 0.9%) (5 mL/Kg/dosis)
  - Subgrupo Tirofiban: tirofiban (0.4 µg/Kg/min) + vehículo (5 mL/Kg/dosis).
- 6 horas: - Subgrupo control: Vehículo (Solución Salina 0.9%) (5 mL/Kg/dosis)
  - Subgrupo Tirofiban: tirofiban (0.4 µg/Kg/min) + vehículo (5 mL/Kg/dosis).
- 9 horas: - Subgrupo control: Vehículo (Solución Salina 0.9%) (5 mL/Kg/min.)
  - Subgrupo Tirofiban: tirofiban (0.4 µg/Kg/min) + vehículo (5 mL/Kg/dosis).

Después del final de la infusión se retiraba el catéter y se ligaba la arteria carótida común derecha. Luego se procedía a suturar el sitio de disección. Se observaban los animales de experimentación por 48 horas de producida la embolización.

Se evaluaba el estado neurológico de cada conejo utilizando una escala neurológica a las 24 y 48 horas después de la embolización para determinar y comparar el déficit neurológico obtenido. Este era realizado por el mismo investigador.

Después de 48 horas tras la embolización se procedía a sedar nuevamente a los conejos. Se les cateterizaba la Arteria Carótida C<sup>o</sup>mún Izquierda según la técnica descrita anteriormente y se les practicaba la eutanasia inyectando 10 mL de formaldehído al 10%, fijando a su vez el cerebro del conejo.

Posterior a la eutanasia se procedía a realizar una encefalectomía a través de una craniectomía. El cerebro se almacenaba en frascos con Formalina al 10% por un periodo no menor a 10 días.

- Estudio anatomopatológico:

Después del período de impregnación en formalina, se realizaban cortes transversales utilizando un micrótopo "American Optical" de 3  $\mu$ m de grosor. Se coloreaban con tinción de Hematoxilina-Eosina. Luego se realizaba el análisis microscópico determinando la presencia HIC y cuantificando el volumen del infarto ( $V_{\text{Infarto}}$ ) con la siguiente fórmula:

$$V_{\text{infarto}} = R_{\text{AP}} \times R_{\text{lateral}} \times R_{\text{axial}} \times \pi \times 1.3$$

El análisis microscópico fue realizado por el mismo patólogo. Durante este estudio se utilizó un doble ciego, ni los investigadores ni el patólogo conocían que animal de investigación fue asignado al subgrupo Placebo o Tirofiban.

La distribución aleatoria de los subgrupos tirofiban y control fue realizada por un asesor que no participó en la fase de laboratorio ni en el análisis patológico.

#### **h. Análisis de datos**

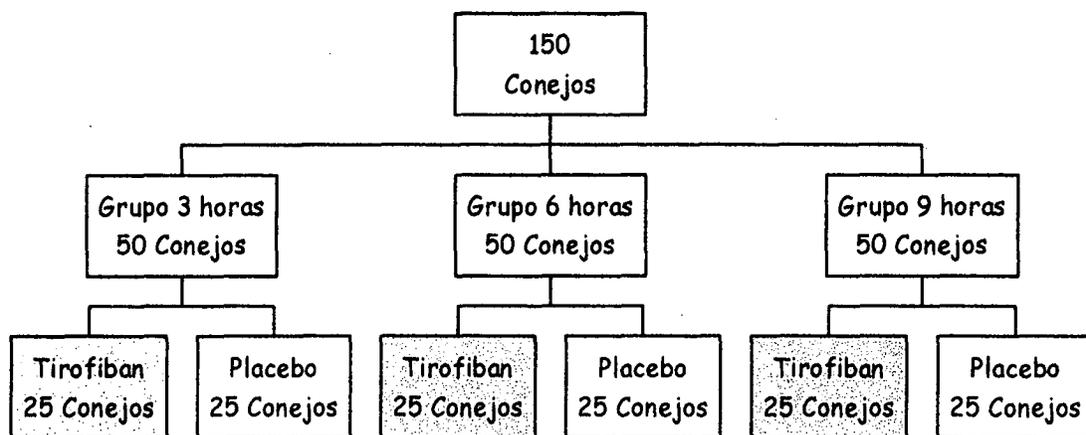
Se realizó un análisis mediante estadística descriptiva utilizando medidas de tendencia central en las distintas variables numéricas, expresándolas en tablas y gráficos. Además se realizó un análisis de varianza entre grupos (ANOVA), utilizando SPSS versión 11.0.

## IX. RESULTADOS

### a. Análisis Descriptivo

Se tomaron 150 sujetos para el estudio, los cuales fueron divididos en tres grupos de 50 individuos cada uno, que corresponden al tiempo de isquemia previo a la infusión (3, 6 y 9 horas). Estos a su vez fueron subdivididos en dos subgrupos, de 25 sujetos cada uno, de acuerdo al tipo de tratamiento recibido (Tirofiban o Placebo) (figura 1).

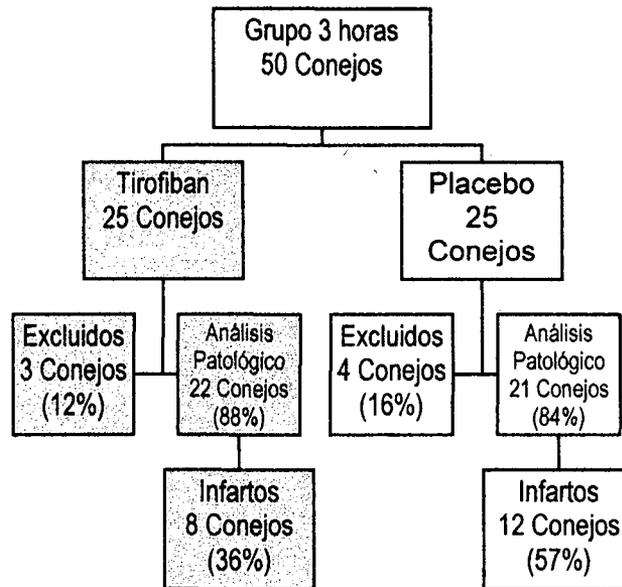
**Figura 1. Distribucion de la muestra**



En el grupo de 3 horas de isquemia, en el subgrupo Tirofiban 3 sujetos (12%) fueron excluidos del estudio por fallecer después de embolización y antes de la infusión. De los 22 conejos que cumplieron criterios de inclusión, 8 (36%) presentaron infarto. En este mismo grupo, el subgrupo Placebo reportó 4

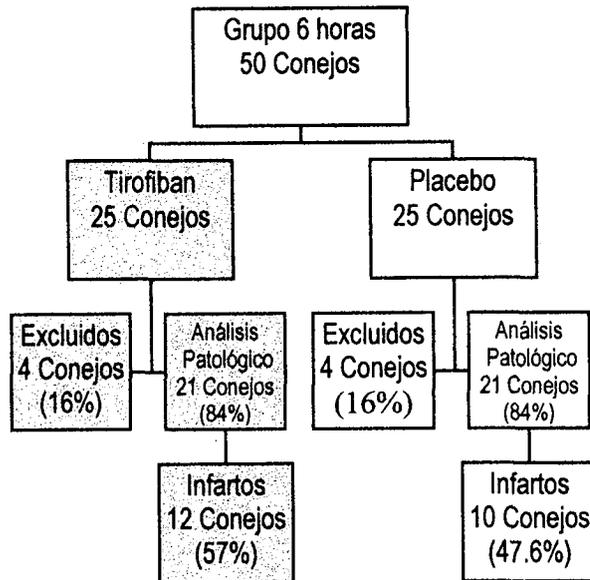
exclusiones (16%) por fallecimiento antes de la infusión. De los 21 sujetos restantes, 12 (57%) presentaron infarto (figura 2):

**Figura 2. Distribución de la muestra en el grupo de 3 horas**



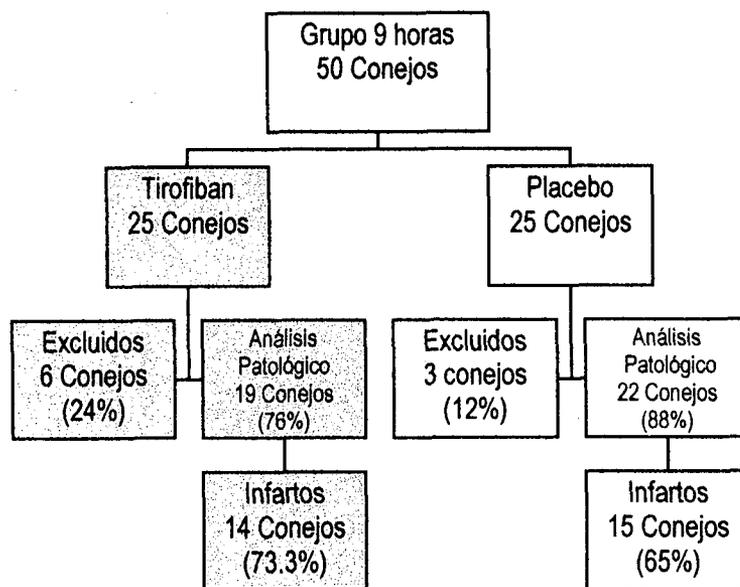
En el subgrupo Tirofiban del grupo de 6 horas, 4 sujetos (16%) fueron excluidos del estudio por fallecer previo a la infusión. De los 21 conejos que cumplieron criterios de inclusión, 12 (57%) presentaron infarto. Así mismo, en el subgrupo Placebo este grupo (6 horas), se excluyeron 4 sujetos (16%) por morir antes de la infusión. De los 21 sujetos restantes 10 (47.6%) presentaron infarto (figura 3)

**Figura 3. Distribución de la muestra en el grupo de 6 horas**



En el subgrupo Tirofiban del grupo de 9 horas, 6 sujetos (24%) fueron excluidos del estudio por fallecer previo a la infusión. De los 19 conejos restantes, 14 (73.3%) presentaron infarto. Del subgrupo placebo del grupo de 9 horas, 3 sujetos (12%) murieron antes de la infusión. De los 22 sujetos sobrevivientes, 15 (68%) presentaron infarto (figura 4).

**Figura 4 Distribución de la muestra en el grupo de 9 horas**



El número de casos, que fueron incluidos en el análisis, para las distintas combinaciones **grupo\*subgrupo** se presenta en la tabla 1 de doble entrada:

**Tabla 1. Distribución de sujetos en los grupos de investigación**

		TIPO DE TRATAMIENTO		Total
		PLACEBO	TIROFIBAN	
Hora tratamiento después del infarto	3 HORAS	12	8	20
	6 HORAS	12	10	22
	9 HORAS	15	14	29
Total		39	32	71

La mortalidad encontrada se detalla en la siguiente tabla:

Mortalidad	Grupo de 3 horas		Grupo de 6 horas		Grupo de 9 horas		Total	
	Tirofiban	Placebo	Tirofiban	Placebo	Tirofiban	Placebo	Tirofiban	Placebo
Antes de 24 horas	3(13.6%)	2(9.5%)	4(19%)	2(9.5%)	5(26.3%)	3(13.6%)	12(19.4%)	7(10.9%)
Entre 24 y 48 horas	0	1(4.8%)	1(4.8%)	1(4.8%)	1(5.3%)	2(9%)	2(3.2%)	4(6.2%)
Total	3(13.6%)	3(14.3%)	5(23.8%)	3(14.3%)	6(31.6%)	5(22.6%)	14(22.6%)	11(17.1%)

**Tabla 2. Distribución del número de muertes antes de la eutanasia entre todos los grupos.**

De los sujetos que mueren antes de la eutanasia, el 85 % y 90% presentaron infarto evidenciado en el análisis patológico, en los subgrupos Tirofiban y Placebo respectivamente.

El volumen promedio de los infartos cerebrales de los sujetos que murieron antes de las 24 horas en el subgrupo Tirofiban fue de 9.19 mL, mientras que la media del volumen de los infartos de sujetos del subgrupo Placebo, que murieron en el mismo periodo, fue de 16.35 mL.

**Tabla 3. Comparación del volumen del infarto de los sujetos que mueren antes de las 24 horas entre subgrupo Tirofiban y Placebo.**

tipo de tratamiento		N	Media	Desviación típ.	Error típ.de la media
VOLUMEN DE INFARTO	PLACEBO	6	16.35293	21.4542313	8.7586533
	TIROFIBAN	11	9.197064	13.7975389	4.1601145

En el periodo de observación comprendido entre las 24 y 48 horas, se presentaron 3 infartos en el subgrupo Placebo contra uno en el subgrupo Tirofiban. Siendo los primeros de un volumen promedio de 24.5 mL y el segundo de 0.018 mL.

**Tabla 4. Comparación entre el volumen del infarto de los sujetos que mueren antes de las 48 horas entre subgrupo Tirofiban y Placebo.**

tipo de tratamiento		N	Media	Desviación típ.	Error típ.de la media
VOLUMEN DE INFARTO	PLACEBO	3	24.50446	40.0131872	23.101624
	TIROFIBAN	1	0.018400	.	.

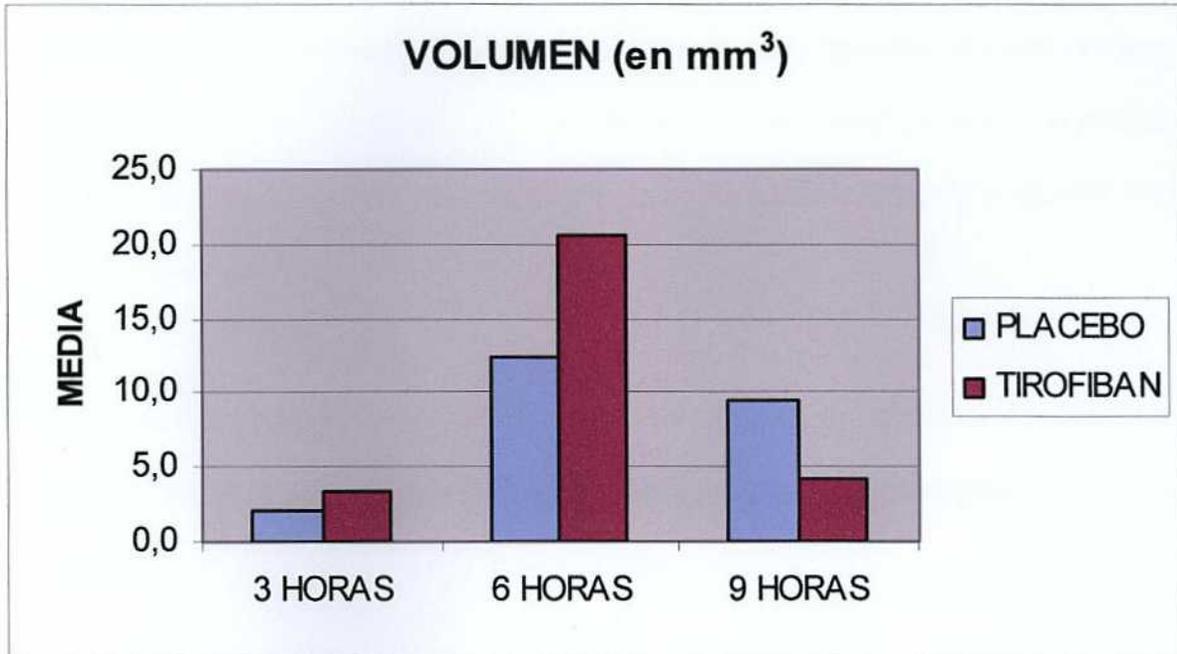
## b. Análisis estadístico

### Volumen de Infarto

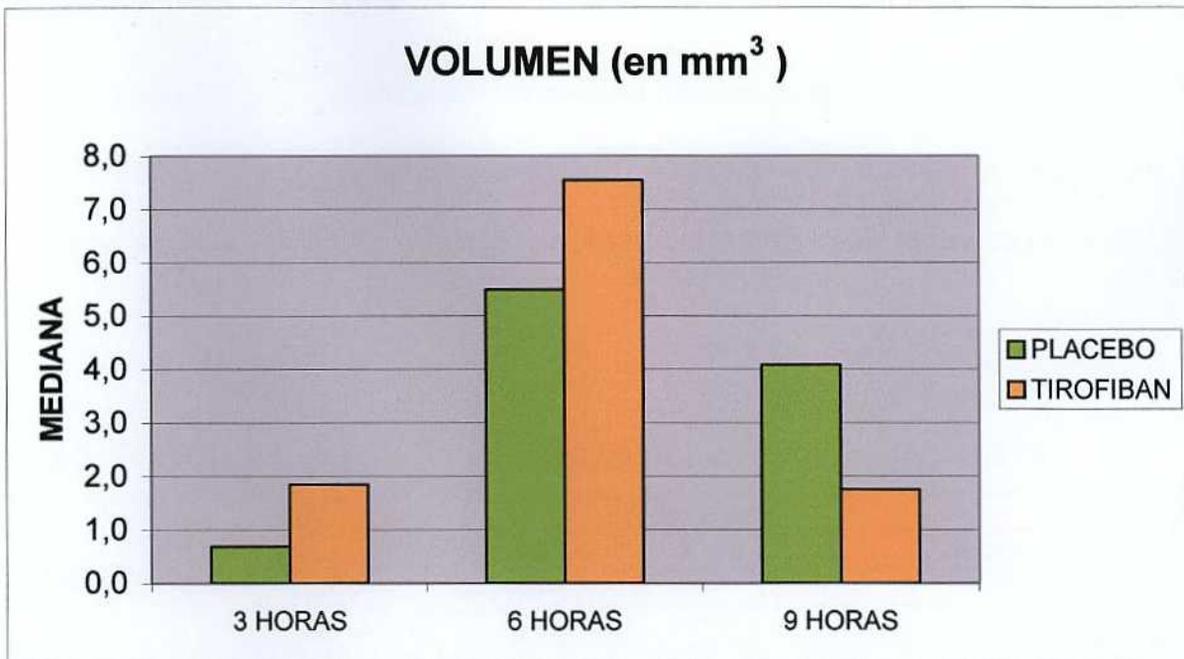
Al realizar medidas de tendencia central (medianas y medias) se observa un volumen del infarto mayor en el grupo de 6 horas para ambos subgrupos en relación a los grupos de 3 y 9 horas (Tabla 5 y Grafico 1 y 2).

VOLUMEN mm <sup>3</sup> (medianas)			VOLUMEN mm <sup>3</sup> (medias)		
	PLACEBO	TIROFIBAN		PLACEBO	TIROFIBAN
3HORAS	0.6892	1.8481	3HORAS	2.0790	3.4118
6HORAS	5.4880	7.5492	6HORAS	12.4033	20.6835
9HORAS	4.0841	1.7549	9HORAS	9.5000	4.1375

**Tabla 5. Medianas y medias del volumen del infarto en grupos y subgrupos.**



**Grafico 1. Medias del volumen del infarto en grupos y subgrupos.**



**Grafico 2. Medianas del volumen del infarto en grupos y subgrupos.**

Hay dos factores principales en el estudio: El factor **grupo** (Hora tratamiento después del infarto) dividido en tres niveles: (1) 3 Horas, (2) 6 Horas y (3) 9 Horas. Y el factor **subgrupo** (Tipo de tratamiento), dividido en dos niveles: (0) P placebo y (1) Tirofiban. El Tirofiban es el medicamento sometido a experimentación. La variable dependiente es **vol\_infa** (VOLUMEN DE INFARTO), medido en mm<sup>3</sup>.

La prueba estadística que se utilizó fue el análisis de varianza de dos factores (ANOVA), ya mencionados anteriormente, y la variable a contrastar es el volumen de infarto.

Dos de los requisitos teóricos para que la prueba sea confiable son la normalidad y la igualdad de varianza de la variable dependiente.

Con respecto a la prueba de normalidad, utilizando el estadístico de Kolmogorov-Smirnov, sólo el grupo P placebo de 6 Horas puede aceptarse (sig. 0.08) con tendencia normal, los demás grupos tienen significaciones menores de 0.05.

**Tabla 6. Pruebas de normalidad de la variable volumen de infarto (PLACEBO)**

	Hora tratamiento después del infarto	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
VOLUMEN DE INFARTO	3 HORAS	0.339	12	0.000	0.760	12	0.003
	6 HORAS	0.230	12	0.080	0.731	12	0.002
	9 HORAS	0.321	15	0.000	0.530	15	0.000

a. Corrección de la significación de Lilliefors

**Tabla 7. Pruebas de normalidad de la variable volumen de infarto (TIROFIBAN)**

	Hora tratamiento despues del infarto	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
VOLUMEN DE INFARTO	3 HORAS	0.304	8	0.029	0.747	8	0.007
	6 HORAS	0.335	10	0.002	0.673	10	0.000
	9 HORAS	0.366	14	0.000	0.665	14	0.000

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Con respecto a la prueba de homogeneidad de la varianza, los datos de volumen del grupo control (Placebo) sí se consideran con varianzas homogéneas (sig. 0.095), mientras que los datos del grupo experimental (Tirofiban) no se consideran con varianzas homogéneas (sig. 0.001).

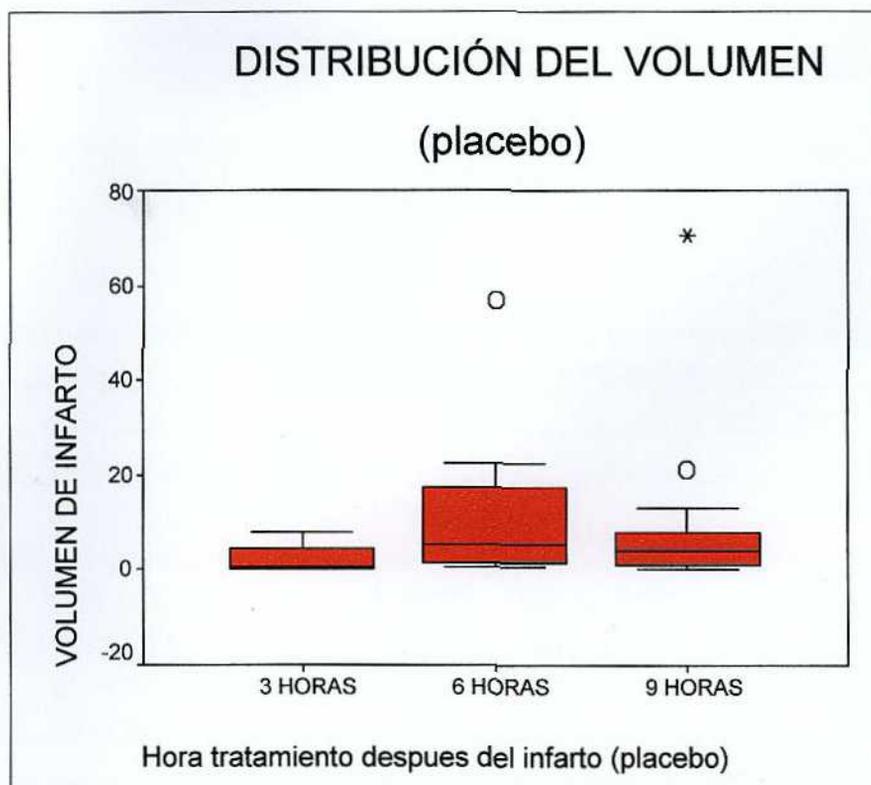
**Tabla 8. Prueba de homogeneidad de la varianza del volumen de infarto (PLACEBO)**

		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
VOLUMEN DE INFARTO	Basándose en la media	2.515	2	36	0.095
	Basándose en la mediana.	1.350	2	36	0.272
	Basándose en la mediana y con gl corregido	1.350	2	24.748	0.278
	Basándose en la media recortada	1.850	2	36	0.172

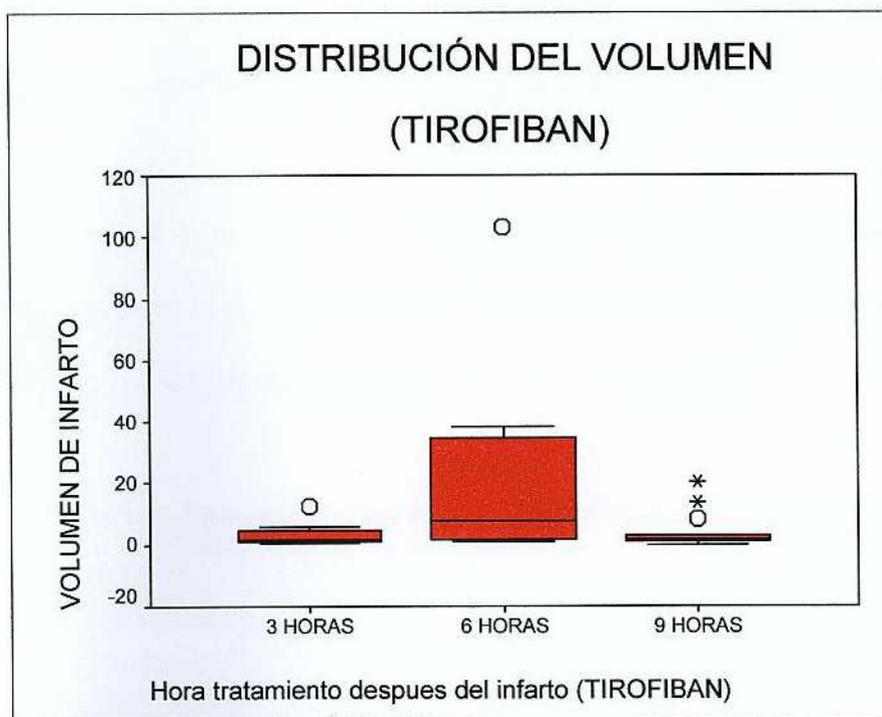
**Tabla 9. Prueba de homogeneidad de la varianza del volumen de infarto (TIROFIBAN)**

		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
VOLUMEN DE INFARTO	Basándose en la media	8.479	2	29	0.001
	Basándose en la mediana.	2.905	2	29	0.071
	Basándose en la mediana y con gl corregido	2.905	2	10.130	0.101
	Basándose en la media recortada	6.349	2	29	0.005

Las distribuciones del volumen para las distintas combinaciones **grupo\*subgrupo** se muestran en los siguientes gráficos de cajas:



**Gráfico 3. Diagrama de cajas de distribución del volumen del subgrupo placebo.**



**Gráfico 4. Diagrama de cajas de distribución del volumen del subgrupo Tirofiban.**

**Tabla 10. Distribución por cuartiles de los volúmenes de infarto entre los diferentes grupos y subgrupos.**

			VOLUMEN (mm <sup>3</sup> )						
Grupo	tipo tratamiento	número conejos	mínimo	cuartil 1	mediana	cuartil 3	máximo	media	desv. tip.
3 HORAS	PLACEBO	12	0.0230	0.0894	0.6892	4.5946	8.0405	2.0790	2.6814
	TIROFIBAN	8	0.5105	0.8679	1.8481	5.3125	12.2522	3.4118	3.9937
6 HORAS	PLACEBO	12	0.5105	1.5953	5.4880	18.3784	56.9219	12.4033	16.0253
	TIROFIBAN	10	1.0210	1.3692	7.5492	35.6081	103.3783	20.6835	32.1436
9 HORAS	PLACEBO	15	0.1072	1.0210	4.0841	8.5766	70.7056	9.5000	17.8475
	TIROFIBAN	14	0.0184	1.0210	1.7549	4.2028	20.1651	4.1375	5.8971

Usando una transformación logarítmica del volumen se logra que los datos sigan una tendencia normal y homogeneidad de varianzas. Usaremos la transformación  $\ln\_vol$  que se define como  $\ln(vol\_infa)$  (logaritmo natural del volumen de infarto).

Las pruebas de normalidad y de igualdad de varianza para la nueva variable dan los siguientes resultados:

Con respecto a la prueba de normalidad, utilizando el estadístico de Kolmogorov-Smirnov, sólo el grupo TIROFIBAN de 9 HORAS no pasó la prueba (sig. 0.005), los demás grupos tienen significaciones mayores de 0.05.

**Tabla 11. Pruebas de normalidad para el logaritmo del volumen del infarto (PLACEBO)**

	Hora tratamiento despues del infarto	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
LN_VOL	3 HORAS	0.179	12	0.200 *	0.910	12	0.212
	6 HORAS	0.176	12	0.200 *	0.967	12	0.877
	9 HORAS	0.141	15	0.200 *	0.973	15	0.896

\*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de la significación de Lilliefors

**Tabla 12. Pruebas de normalidad para el logaritmo del volumen del infarto (TIROFIBAN)**

	Hora tratamiento despues del infarto	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
LN_VOL	3 HORAS	0.126	8	0.200 *	0.969	8	0.893
	6 HORAS	0.155	10	0.200 *	0.925	10	0.402
	9 HORAS	0.276	14	0.005	0.865	14	0.035

\*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

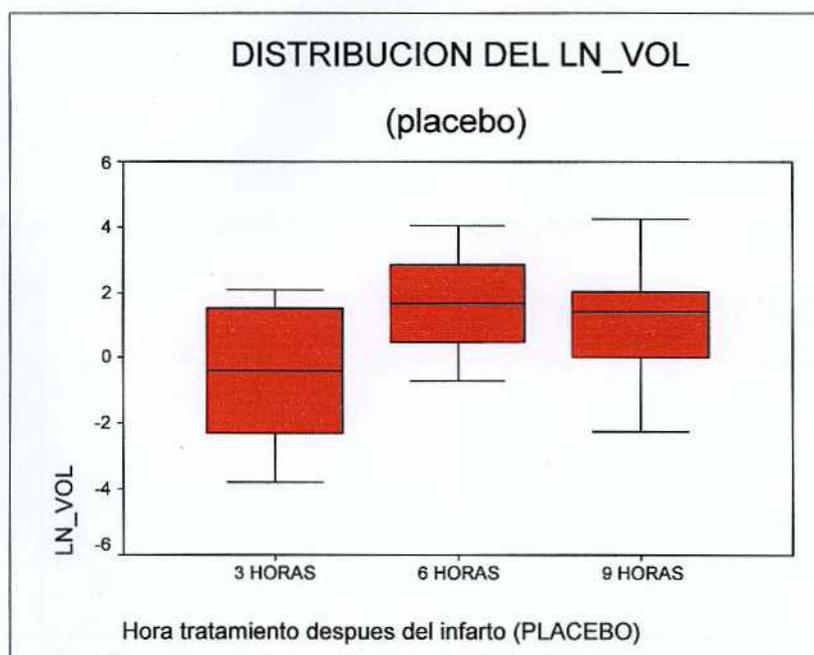
a. Corrección de la significación de Lilliefors

Con respecto a la prueba de homogeneidad de la varianza, tanto los grupos de control (Placebo) como los grupos experimentales (Tirofiban) tienen varianzas homogéneas (sig. Mayores de 0.38).

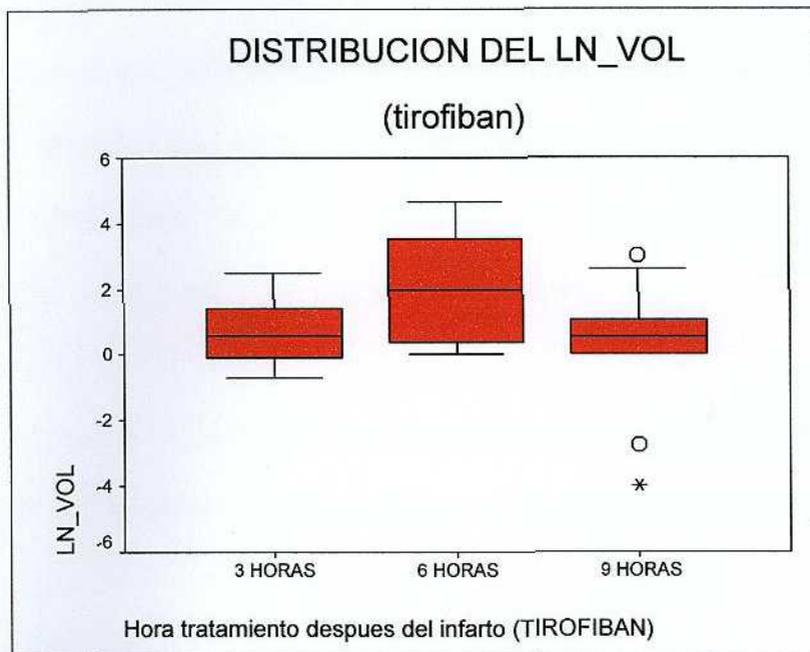
**Tabla 13. Prueba de homogeneidad de la varianza del logaritmo del volumen infarto (TIROFIBAN)**

		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
LN_VOL	Basándose en la media	0.527	2	29	0.596
	Basándose en la mediana.	0.503	2	29	0.610
	Basándose en la mediana y con gl corregido	0.503	2	21.494	0.611
	Basándose en la media recortada	0.508	2	29	0.607

Las distribuciones del logaritmo del volumen de infarto para las distintas combinaciones **grupo\*subgrupo** se muestran en los siguientes gráficos de cajas:



**Gráfico 5. Diagrama de cajas de distribución del logaritmo natural del volumen del subgrupo placebo.**



**Gráfico 6. Diagrama de cajas de distribución del logaritmo natural del volumen del subgrupo Tirofiban.**

La prueba de análisis de varianza de dos factores proporcionó los siguientes resultados:

**Tabla 14. Pruebas de los efectos inter-sujetos (ANOVA)**

Variable dependiente: LN VOL

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación	Parámetro de no centralidad	Potencia observada
Modelo corregido	50.406 <sup>a</sup>	5	10.081	3.628	0.006	18.13	0.904
Intersección	54.618	1	54.618	19.655	0.000	19.65	0.992
GRUPO	32.547	2	16.273	5.856	0.005	11.71	0.859
SUBGRUPO	.992	1	.992	.357	0.552	.357	0.091
GRUPO * SUBGRUPO	12.774	2	6.387	2.299	0.109	4.59	0.451
Error	180.622	65	2.779				
Total	285.483	71					
Total corregida	231.028	70					

a. Calculado con alfa = .05

b. R cuadrado = .218 (R cuadrado corregida = .158)

La prueba **descubre** diferencias significativas ( $\text{sig.} = 0.005$ ) entre los niveles del factor **Grupo**, con una potencia del 85.9%; mientras que **no descubre** diferencias significativas entre los dos niveles del factor **Subgrupo** ( $\text{sig.} = 0.552$ ) y esto con una potencia, bastante baja, del 9.1%. Tampoco descubre interacción entre los dos factores ( $\text{sig.} = 0.109$ ), y esto con una potencia del 45.1%.

Se pidió una prueba de **DUNCAN** de comparaciones múltiples entre las medias de los niveles del factor **Grupo**. Los resultados se muestran a continuación:

LN_VOL			
Duncan <sup>a,b,c</sup>			
Hora tratamiento después del infarto	N	Subconjunto	
		1	2
3 HORAS	20	-0.065481	
9 HORAS	29	0.808529	
6 HORAS	22		1.820096
Significación		0.080	1.000

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.  
 Basado en la suma de cuadrados tipo III  
 El término error es la Media cuadrática (Error) = 2.779.

- a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 23.088
- b. Los tamaños de los grupos son distintos. Se empleará la media armónica de los tamaños de los grupos. No se garantizan los niveles de error tipo I.
- c. Alfa = 0.05.

**Tabla 15. Prueba de DUNCAN para comparación de las medias de los volúmenes de los infartos entre los grupos.**

La prueba de Duncan no descubre diferencias significativas (sig.=0.080) entre los niveles 3 Horas y 9 Horas; mientras que al nivel de 6 Horas, lo considera diferente a los otros dos niveles y además es el grupo con los volúmenes de infarto más altos.

### **Puntaje Neurológico y Hemorragia Intracraneana**

En cuanto al puntaje neurológico se observa que las medianas son iguales entre Tirofiban y placebo al comparar todos los grupos, excepto a las 48 horas del grupo de 9 horas. En la cual se presenta una diferencia mínima de 0.5 puntos.

Se encontró una prevalencia de HIC de 6.67% que correspondió al subgrupo placebo del grupo de 9 horas.

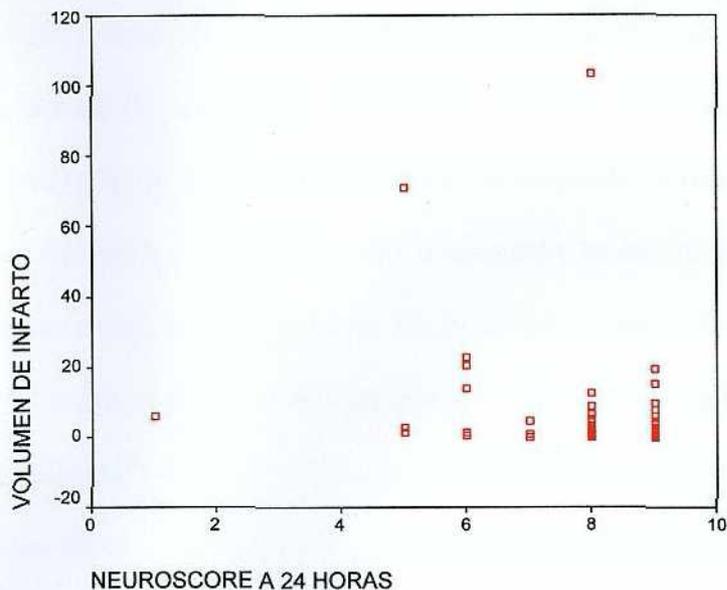
Grupo	Subgrupo	N	Puntaje Neurológico 24h	Puntaje Neurológico 48h	HIC
3 Horas	PLACEBO	12	8	8	0%
	TIROFIBAN	8	8	8	0%
6 Horas	PLACEBO	12	9	9	0%
	TIROFIBAN	10	9	9	0%
9 Horas	PLACEBO	15	8	9	6.67% (1)
	TIROFIBAN	14	8.5	9	0%

**Tabla 16. Medianas del Puntaje Neurológico e prevalencia de Hemorragia Intracraneana (HIC) en los distintos grupos**

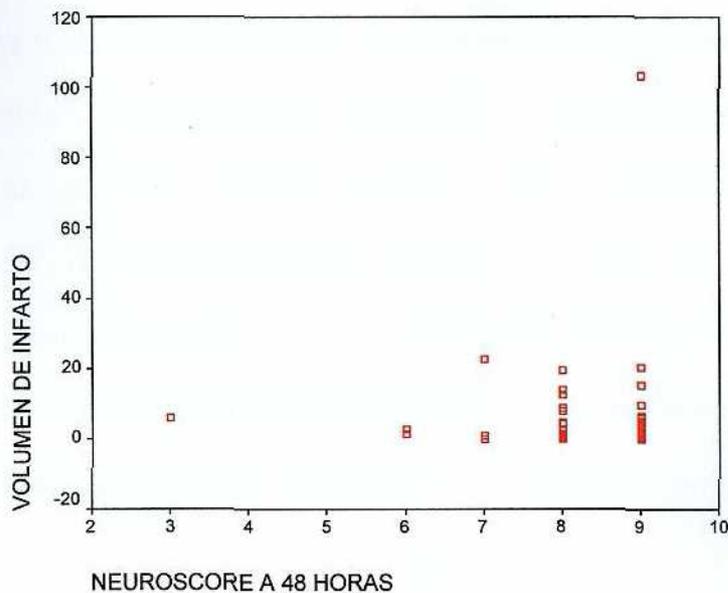
Al realizar la correlación entre puntaje neurológico a las 24 en todos los grupos, contra el volumen de infarto, utilizando un modelo de regresión lineal, se

obtuvieron los siguientes resultados: se encontró una  $R = 0.174$ . Mientras que a las 48 horas la  $R$  fue de  $0.72$ . Esto significa que el puntaje neurológico no predice el tamaño del infarto.

**Grafica 7. Diagrama de dispersión de la correlación entre volumen del infarto y puntaje neurológico a las 24 horas.**



**Grafica 8. Diagrama de dispersión de la correlación entre volumen del infarto y puntaje neurológico a las 48 horas.**



## X. DISCUSION

Muchos modelos experimentales en animales, que fueron utilizados inicialmente para probar fármacos para tratamiento de ECV han diferido mucho, en cuanto a resultados, con respecto a los ensayos clínicos. Esto se cree que es debido a deficiencias de diseño de modelos animales, en cuanto a la preparación del coágulo, muestras de animales pequeñas, períodos de ventana cortos, entre otros. En la mayoría de estudios preclínicos, el inicio de la terapia neuroprotectora se realiza en las primeras 3 horas de instaurada la isquemia, mientras que en nuestro modelo se expandió el inicio de la terapia, hasta 9 horas de iniciado el insulto. Por lo tanto, este modelo experimental trata de recrear una situación más acorde a la realidad<sup>65</sup> y mayoría de ensayos clínicos, en los cuales la mediana de inicio del tratamiento es de 14 horas, con rangos de 5 hasta 48 horas<sup>66,67</sup>.

Respecto al modelo experimental desarrollado por nuestro equipo de investigación, se observó una efectividad total del 56% para producir infarto, utilizando un coagulo de 22 horas de incubación, embolizado vía catéter en la Arteria Carótida Común Derecha. Esto refleja un incremento de la tasa de infartos, con respecto a otros estudios similares que utilizan la misma vía de embolización<sup>19</sup>. Esto podría estar asociado a que un coagulo de estas características podría contener mayor cantidad de fibrina y ser mas difícil de lisar por el sistema fibrinolítico del conejo y fármacos. Esto se ha observado incluso con rt-PA una reducción de su efectividad, al evaluarse en modelos animales,

utilizando este tipo de coágulos<sup>68</sup>. También se encontró que la prevalencia de infartos aumenta a medida que existe un mayor periodo de isquemia previo al inicio del tratamiento, independientemente del tipo. Esto podría explicarse a un aumento del volumen de tejido cerebral que pasa de zona de isquemia a zona de infarto, en la zona de penumbra, a través de los fenómenos de microtrombosis distales a la obstrucción primaria del flujo<sup>52,69</sup>.

La mortalidad en los periodos de observación, 1) antes de las 24 horas, 2) entre las 24 y 48 horas, y 3) la mortalidad total, presenta un incremento progresivo relacionado con periodos de isquemia más prolongados al momento del inicio del tratamiento. Esto probablemente se deba a múltiples factores, asociados a un mayor grado de estrés, como alteraciones del estado de hidratación, la glicemia, la temperatura, la ventilación, la presión arterial entre otros. La razón para no controlar estas posibles variables confusionales se debe a que el modelo experimental debe simular lo más posible a la realidad y para el caso de un paciente que sufre un ECV, entre el periodo del evento y el de la atención médica, ninguna de estas variables es controlada. Por otra parte es necesario aclarar que dentro de un modelo experimental doble ciego aleatorizado el efecto de dichas variables tiende a anularse ya que se distribuyen uniformemente tanto para el grupo control como el placebo gracias a la aleatorización.

El subgrupo Tirofiban presentó un mayor número de muertes, antes de las 24 horas, comparado con el subgrupo Placebo en el mismo periodo de observación (relación 1.7:1), sin embargo este aumento de la mortalidad no guarda relación

con un aumento del volumen del infarto. Esto se ve reflejado en el hecho que la media de los volúmenes encontrados fue menor en el subgrupo Tirofiban que en el Placebo. La mortalidad entre las 24 y 48 horas presentó una inversión de la relación, siendo el Placebo el subgrupo con mas muertes (1:3), pero se mantuvo una media del volumen del infarto menor en los sujetos tratados con Tirofiban.

Por lo tanto dichos resultados respaldan nuestra teoría sobre la existencia de diversos factores involucrados en la mortalidad de los sujetos, distintos al tamaño del infarto.

De manera descriptiva se puede observar que las relaciones entre el volumen de los infartos en los subgrupos Tirofiban y Placebo, es mayor para Tirofiban en los grupos de 3 y 6 horas de isquemia. Esta relación se invierte en el grupo de 9 horas de isquemia. Dando la impresión que el medicamento (Tirofiban) para tiempos más largos (9 horas) de isquemia, empieza a tener un efecto en la disminución del volumen de infarto. Esto podría deberse a que desde el punto de vista fisiopatológico, existe una cascada de eventos complejos que se presentan en distintos momentos del desarrollo de la isquemia. Si el Tirofiban actúa en eventos relacionados con períodos fisiopatológicos tardíos de isquemia: 1) previniendo la expansión de la lesión isquémica al mejorar la microcirculación, evitando la transformación de la zona de penumbra en zona infartada, 2) disminuyendo la agregación plaquetaria y la retrombosis, 3) atenuando la inflamación; si además tomamos en cuenta que la vida media del Tirofiban es de 2 horas, el cual fue administrado a los sujetos de experimentación en una dosis de carga por infusión de 30 minutos de duración; entonces podríamos suponer que la aparición del

efecto del Tirofiban, observada de forma descriptiva, es reflejo de su actividad en la limitación de estos mecanismos fisiopatológicos que actúan en el ECV a las 9 horas de instaurada la obstrucción del flujo. Por el contrario, los principales mecanismos fisiopatológicos relacionados con la lesión celular a las 3 y 6 horas de isquemia podrían no relacionarse, en forma importante, con el mecanismo de acción de Tirofiban. Lo cual pondría explicar porque el Tirofiban aparentemente no presenta efecto en las fases iniciales de evento.

Al realizar el análisis de varianza se logra encontrar una diferencia significativa ( $p=0.005$ ) entre los volúmenes de infarto de los grupos de 3, 6 y 9 horas. La prueba de Duncan determino que el grupo de 6 horas es diferente a los otros. Esto significa que el comportamiento de los datos observados de forma descriptiva con medias y medianas de los volúmenes de los infartos es verdadero. Es decir, que los volúmenes de infarto son mayores en el grupo de 6 Horas comparado a los hallados en los grupos de 3 y 9 Horas, independientemente del subgrupo tratamiento. El aumento de los volúmenes de infarto de las 3 a 6 horas podría ser debido a un mayor periodo de estrés, al que están sometidos los sujetos del grupo de 6 Horas, que podría aumentar las áreas con hipoperfusión tisular severa. El descenso del volumen del infarto de las 6 a 9 Horas pondría estar asociado a la disminución del área de hipoperfusión severa, debido al efecto neuroprotector de la Ketamina, anestésico general utilizado en ambos subgrupos. El cual tiene un mecanismo de acción en neuroprotección, bloqueando los receptores del n-metil D-aspartato (NMDA), reduciendo el metabolismo cerebral y aumentando la

perfusión cerebral cortical<sup>70</sup>, propiedades descritas desde 1987<sup>71</sup>, con un probable efecto global mas marcado en las horas tardías de la injuria aguda.

Sin embargo, el análisis de varianzas no demuestra una diferencia significativa ( $p=0.552$ ) entre los volúmenes del infarto en los subgrupos; aunque la muestra tiene una potencia baja (potencia=9.1%). Esto implica que existe una alta posibilidad de error  $\beta$ <sup>72</sup> (es decir que la probabilidad de error al afirmar que no existe diferencia entre ambos es de 90%). Además si atribuimos la acción principal de Tirofiban en evitar el paso de zona de penumbra a zona de infarto; y si también tomamos en cuenta que en distintos estudios utilizando PET y Tomografía Computarizada con Xenón<sup>73</sup>, refieren que la zona de penumbra es un área pequeña que en promedio puede variar entre el 18% y el 32% del área infartada final<sup>74,75</sup>, entonces utilizar la reducción del volumen del infarto como marcador de efectividad de la terapia, podría ocultar la evidencia de efectividad significativa, sin poder ser detectado por el análisis estadístico. Por lo tanto, es necesario recordar que “La falta de evidencia de eficacia no necesariamente significa evidencia de falta de eficacia”.

El ANOVA tampoco descubre interacción entre los grupos y subgrupos (sig.=0.109), y esto con una potencia del 45.1%.

La gran variabilidad entre los datos contribuye a disminuir la potencia que tiene la prueba (9.1%) para descubrir diferencias significativas entre grupo de control (Placebo) y experimental (Tirofiban). Para elevar la potencia de la prueba habría

que incrementar la muestra. Incrementar el tamaño de la muestra con el único propósito de encontrar una potencia de por lo menos 80%, no va acorde con las normas de ética en estudios experimentales. Esto a pesar que la muestra de nuestro estudio se acerca a la cantidad de sujetos utilizados por otras investigaciones.

En cuanto a la valoración del estado neurológico a las 24 horas y 48 horas de observación de los sujetos, se utilizó la mediana como medida de tendencia central debido a que los valores de la evaluación neurológica no presentaron una distribución normal. Al comparar las medianas del puntaje neurológico a las 24 y 48 horas, en los distintos subgrupos, se observó que eran exactamente iguales en todos los subgrupos, a excepción del subgrupo placebo y Tirofiban en la evaluación de 24 horas del grupo de 9 horas en las que los puntajes fueron de 8 y 8.5 respectivamente. Estos resultados nos podrían hacer pensar que el estado neurológico de los sujetos de investigación es el mismo independientemente del tratamiento recibido. Pero cabe preguntarse que tan sensible es la escala modificada de Walh<sup>76</sup> para predecir el tamaño del infarto. Para tal efecto, comparamos las variables puntaje neurológico a las 24 horas y 48 horas con la variable volumen de infarto, encontrando una R de 0.174 y 0.72 respectivamente para cada hora de evaluación neurológica. Esto nos lleva a la conclusión que el puntaje neurológico, evaluado a las 24 y 48 horas, no predice el tamaño del infarto. Esto puede ser debido a un sesgo del observador o a una muy baja sensibilidad de la escala por sí misma en períodos tan cortos de isquemia.



En este estudio, el Tirofiban no aumentó la incidencia de HIC, sin embargo, esta fue similar en entre grupos y subgrupos, presentándose un solo caso en el grupo 9 horas placebo. Esto apoya la teoría que Tirofiban protege del riesgo de HIC, demostrada en otros estudios experimentales.

## **XI. CONCLUSIONES**

1. Tirofiban parece no disminuir el volumen del infarto cerebral al ser administrado a las 6 y 9 horas de iniciada la isquemia.
2. Tirofiban podría disminuir el volumen del infarto cerebral al ser administrado en periodos tardíos de isquemia (>9 horas).
3. Tirofiban no tiene ninguna influencia sobre la evolución neurológica a corto plazo.
4. Tirofiban no incrementa el riesgo de hemorragia intracerebral.

## X. RECOMENDACIONES

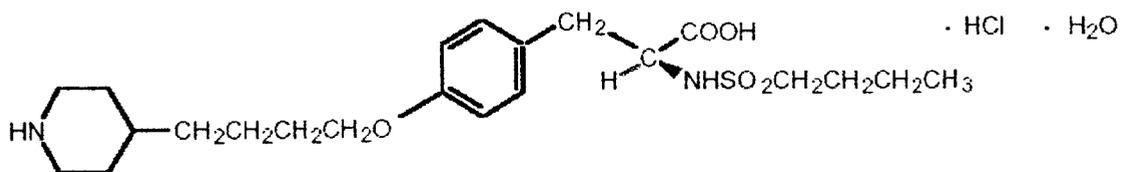
- 1- En base a los resultados y a otros estudios, recomendamos la evaluación del período de ventana de la acción del Tirofiban, evaluando su efectividad con Tomografía por Emisión de Positrones (PET), para poder medir el flujo sanguíneo de las distintas zonas de isquemia y así conocer con certeza sobre cual de ellas tiene una acción principal.
- 2- Utilizar en estudios subsecuentes, Tirofiban a dosis de carga, seguido de dosis de mantenimiento en infusiones de mayor duración. Para mantener concentraciones adecuadas en plasma.
- 3- Prolongar la evaluación neurológica y la eutanasia de los sujetos de experimentación en estudios posteriores, con el fin de evaluar los efectos en el volumen de infarto y en el estado neurológico de los sujetos, de los procesos tardíos del ECV, como la apoptosis.
- 4- Evaluar en futuros estudios la cantidad de fibrina que posee el coagulo utilizado para la embolización, por medio de análisis histopatológico, con el objetivo de tipificar la calidad del coagulo.



- 5- Controlar de manera más estricta las distintas variables que podrían influir en la evolución y el tamaño del infarto (estado de hidratación, glicemia, temperatura, ventilación, presión arterial).
- 6- Perfeccionar la técnica de embolización procurando colocar el coagulo en la arterial carótida interna o de ser posible directamente en la arteria cerebral media, con el propósito de elevar la tasa de infartos sin aumentar significativamente la muestra.
- 7- Es necesario evaluar el riesgo de HIC en ensayos clínicos y/o en otros estudios experimentales, que presenten una mayor incidencia de HIC, ya que en nuestro modelo solo se presento 1 caso de HIC en el grupo placebo de 9 horas, lo que hace difícil asegurar que Tirofiban protege la transformación hemorrágica de ECV.
- 8- Utilizar herramientas más sensibles para evaluar el estado neurológico de los sujetos de experimentación. Al mismo tiempo prolongar el periodo de observación de los mismos.
- 9- Evaluar el efecto de Tirofiban sobre el grado de apoptosis en modelos animales de ECV isquémico de tipo embolico.

## XII. ANEXOS

Anexo1: Molécula de N-(butil sulfoni)-O-[4-(4-piperidinil)butil]-L-tirosina monohidroclorido monohidrato. (Tirofiban)

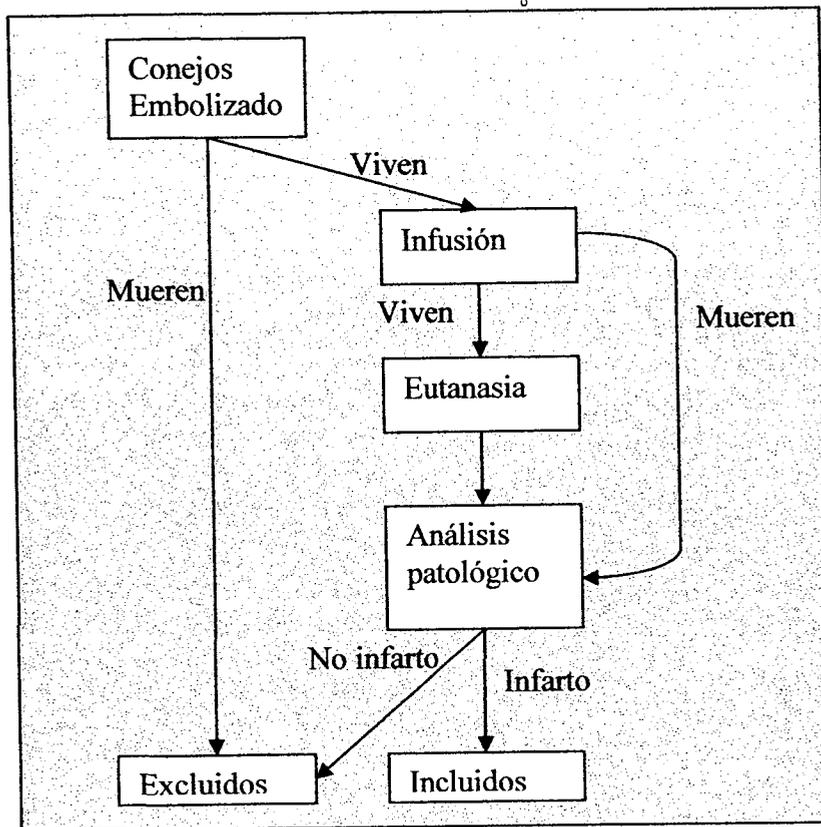


**Anexo 2: Neuroscore adaptado de Wahl et al.**

<b>Parámetro</b>	<b>Normal</b>	<b>Déficit</b>
<b>Reflejo de aprensión</b>		
Extremidad anterior		
Derecha	1	0
Izquierda	1	0
<b>Fuerza de miembros posteriores</b>		
Derecho	1	0
Izquierdo	1	0
<b>Reflejo de retorno de la cabeza</b>		
Al inclinar la cabeza hacia		
Derecha	1	0
Izquierda	1	0
<b>Postura anormal</b>	Ausente	Presente
Flexión de miembro anterior	1	0
Cuerpo enrollado	1	0
Posición anormal de orejas	1	0
<b>Puntaje Neurológico</b>	9	0



Anexo 3: Flujograma de la selección de los animales de experimentación



**Anexo 4: Hoja de recolección de datos**

0

N°	Grupo	Peso	Coagulo	Anestesia						Embolización	Infusión		Puntaje Neurológico		Eutanasia
											inicio	fin	24 h	48 h	



### XIII. BIBLIOGRAFIA<sup>77</sup>

- <sup>1</sup> Organización Mundial de la Salud (OMS). *Surveillance in brief Update of Noncommunicable Diseases and Mental Health Surveillance activities*, Genova 5ª edición. 2003. Organización mundial de la salud.
- <sup>2</sup> Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL et al. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 15th edition, Part 14, Section 2, Chapter 361, Cerebrovascular Diseases. 2001, The Mc Graw Hill Companies Inc.
- <sup>3</sup> Center of Disease Control (CDC). Complete report as released October 2003. Online en <http://www.cdc.gov/nchs/data/hus/hus03.pdf>. Fecha de búsqueda 12 Abril 2004.
- <sup>4</sup> Michaud C, Muray C, Bloom B. Burden of Disease – Implications for Future Research. *JAMA*. 2001; 285 (5): 535-539.
- <sup>5</sup> Organización Mundial de la Salud (OMS). *Men Ageing and Health, Non communicable Diseases and Mental Health*, Genova. 2002. Organización mundial de la salud
- <sup>6</sup> Grau, J, Weimar C, Buggle F, Heinrich A, Goertler M, Neumaier M et al. Risk Factors, Outcome, and Treatment in Subtypes of Ischemic Stroke. *Stroke*. 2001;32:2559.
- <sup>7</sup> Dewey HM, Thrift AG, Mihalopoulos C et al. Cost of Stroke in Australia from a Societal Perspective: Results from the North East Melbourne Stroke Incidence Study (NEMESIS). *Stroke*. 2001: 32: 2409-2416.
- <sup>8</sup> Enfermedades Crónicas Degenerativas, Accidente Cerebrovascular Agudo, Reporte Epidemiológico Semanal, Semanas 1-52, 2002, Dirección General de Salud, Unidad de Epidemiología, Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, El Salvador.
- <sup>9</sup> Corvera JR, Delgado F, Fonseca I, Núñez JC. Morbimortalidad del ACV: julio 15, 1998 – julio 15, 1999. Departamento de Docencia e Investigación Científica ISSS. Tomo II-M 1999.
- <sup>10</sup> Palacios M, Morales E, Segura V, Delgado F. Risk factors related to death in patients with ischemic stroke. *Critical Care* 2003, 7(Suppl 2):P085 (3 March 2003).
- <sup>11</sup> Bronner L. L., Kanter D. S., Manson J. E. Primary Prevention of Stroke. *N Engl J Med* 1995; 333:1392-1400.
- <sup>12</sup> Furlan A, Higashida R, Wechsler L, Gent M, Rowley H, Kase C, Pessin M, Ahuja A, Callahan F, Clark WM, Silver F, Rivera F. Intra-arterial prourokinase for acute ischemic stroke: the PROACT II study: a randomized controlled trial: Prolyse in Acute Cerebral Thromboembolism. *JAMA*. 1999; 282: 2003–2011.
- <sup>13</sup> Food and Drug Administration (FDA). Product Approval Information - Licensing Actino. Online en <http://www.fda.gov/cder/foi/appletter/2002/altegen051502L.htm> . Fecha de búsqueda. 12 de abril 2004.

- 
- <sup>14</sup> The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rTPA Stroke Study Group. Tissue Plasminogen Activator for Acute Ischemic Stroke. *N Engl J Med*. 1995; 333 (24):1581-1588
- <sup>15</sup> Brott T, Bogousslavsky J. Treatment of Acute Ischemic Stroke. *N Engl J Med* 2000; 343:710-722.
- <sup>16</sup> Food and Drug Administration (FDA) Drug Approvals for May 1998. Online en <http://www.fda.gov/cder/da/da0598.htm>. Fecha de búsqueda. 12 de abril 2004.
- <sup>17</sup> Schror K, Weber AA. Comparative pharmacology of GP IIb/IIIa antagonists. *J Thromb Thrombolysis*. 2003;15(2):71-80
- <sup>18</sup> The Platelet Receptor Inhibition in Ischemic Syndrome Management in Patients Limited by Unstable Signs and Symptoms (PRISM-PLUS) Study Investigators. Inhibition of the Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Receptor with Tirofiban in Unstable Angina and Non-Q-Wave Myocardial Infarction. *N Engl J Med* 1998; 338:1488-1497.
- <sup>19</sup> V Segura, C Huang, E Martín, E Martínez, F Sansivirini and N Astacio. Antithrombotic therapy in an experimental model of acute ischemic stroke in rabbits. *Critical Care* 2004, 8(1):P318
- <sup>20</sup> Junghans U, Seitz RJ, Ritzl A, Wittsack HJ, Fink GR, Freund HJ, Siebler M. Ischemic brain tissue salvaged from infarction by the GP IIb/IIIa platelet antagonist tirofiban. *Neurology*. 2002 12;58(3):474-6
- <sup>21</sup> Liebeskind DS, Pollard JR, Schwartz ED, Cucchiara BL, McGarvey ML, Hurst RW. Vertebrobasilar thrombolysis with intravenous tirofiban: case report. *J Thromb Thrombolysis*. 2002;13:81-84.
- <sup>22</sup> Maze L, Bakas T. Factors Associated with Hospital Arrival Time for Stroke Patients. *J Neurosci Nurs* 2004: 36(3):136 -141.
- <sup>23</sup> Kleindorfer D, Kissela B, Schneider A, Woo D, Khoury J, Miller R, et al. Eligibility for recombinant tissue plasminogen activator in acute ischemic stroke: a population-based study. *Stroke*. 2004;35(2):e27-9.
- <sup>24</sup> Seitz RJ, Hamzavi M, Junghans U, Ringleb PA, Schranz C, Siebler M. Thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator and tirofiban in stroke: preliminary observations. *Stroke*. 2003;34(8):1932-5.
- <sup>25</sup> Lapchak P, Araujo D, Zivin J. Comparison of Tenecteplase with Alteplase on clinical rating scores following small clot embolic strokes in rabbits. *Exp Neu*.2004;185 (1): 154-159.
- <sup>26</sup> Food and Drug Administration (FDA) Drug Approvals for May 1997. Online en <http://www.fda.gov/cder/foi/appletter/1997/abcicen110597L.htm>. Fecha de búsqueda. 12 de abril 2004



- 
- <sup>27</sup> The Abciximab in Ischemic Stroke Investigators. Abciximab in Acute Ischemic Stroke: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Dose-Escalation Study. *Stroke*. 2000; 31: 601-609.
- <sup>28</sup> Lapchak PA, Araujo DM, Song S et al. The Nonpeptide Glycoprotein IIb/IIIa Platelet Receptor Antagonist SM-20302 Reduces Tissue Plasminogen Activator-Induced Intracerebral Hemorrhage after Thromboembolic Stroke. *Stroke*. 2002; 33: 147-152.
- <sup>29</sup> Bogousslavsky J, Leclerc JR. Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Antagonists for Acute Ischemic Stroke. *Neurology*. 2001; 57: S53-S57.
- <sup>30</sup> Straub S, Junghans U, Jovanovic V, Wittsack H, Seitz RJ, Siebler M. Systemic thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator and tirofiban in acute middle cerebral artery occlusion. *Stroke*. 2004; 35(3):705-709.
- <sup>31</sup> Haerten K, Krabbe C, Raiber M. Efficacy and safety of treatment of acute ischemic stroke with glycoprotein IIb/IIIa receptor blocker in routine clinical practice. *Dtsch Med Wochenschr*. 2004; 29 (12): 607-610.
- <sup>32</sup> American Heart Association. Heart Disease and Stroke Statistics — 2004 Update. Dallas, Tex.: American Heart Association; 2003.
- <sup>33</sup> American Heart Association. Guidelines for the Early Management of Patients with Ischemic Stroke. *Stroke* 2003;34:1056
- <sup>34</sup> Heo JH, Lee KY, Kim SH, Kim DI. Immediate reocclusion following a successful thrombolysis in acute stroke: a pilot study. *Neurology*. 2003 ;60(10):1684-7.
- <sup>35</sup> The Intercollegiate Working Party for Stroke. National Clinical Guideline for Stroke, Londres, Inglaterra. Royal College of Physicians. 2002
- <sup>36</sup> Jaillard A ; Cornu C; Durieux A; Moulin T; Boutitie F; Lees K; Hommel M. Hemorrhagic Transformation in Acute Ischemic Stroke. The MAST-E Study. *Stroke*. 1999;30:1326-1332
- <sup>37</sup> European Stroke Initiative. Ischaemic Stroke, Prophylaxis and Treatment, Alemania: Sonja Kulkens, Heidelberg 2003.
- <sup>38</sup> Mary V, Wahi F, Uzan A et al. Enoxaparin in Experimental Stroke: Neuroprotection and Therapeutic Window of Opportunity. *Stroke*. 2001; 32: 993-999
- <sup>39</sup> International Stroke Trial Collaborative Group. The International Stroke Trial (IST): A Randomized Trial of Aspirin, Subcutaneous Heparin, Both, or Neither among 19,435 Patients with Acute Ischemic Stroke. *Lancet*. 1997; 349: 1569-1581.
- <sup>40</sup> CAST (Chinese Acute Stroke Trial) Collaboration Group. CAST: Randomized Placebo-Controlled Trial of Early Aspirin Use in 20,000 Patients with Acute Ischaemic Stroke. *Lancet*. 1997; 349: 1641-1649.
- <sup>41</sup> The American Nimodipine Study Group. Clinical trial of nimodipine in acute ischemic stroke. *Stroke*. 1992; 23: 3-8

- 
- <sup>42</sup> Infeld B, Davis SM, Donnan GA, et al. Nimodipine and perfusion changes after stroke. *Stroke*. 1999; 30: 1417–1423.
- <sup>43</sup> Kaste M, Fogelholm R, Erila T, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of nimodipine in acute ischemic hemispheric stroke. *Stroke*. 1994; 25: 1348–1353.
- <sup>44</sup> Arango C, Escobar M, Cardona G, Pimienta H. Fisiopatología de la isquemia cerebral focal: aspectos básicos y proyección a la clínica. *Rev Neurol*. 2004;39:156-165.
- <sup>45</sup> Fisher M, Schaebitz W. An overview of acute stroke therapy: past, present, and future. *Arch Intern Med*. 2000; 160: 3196–3206.
- <sup>46</sup> Friedlander R. Apoptosis in Caspases Neurodegenerative Diseases. *N Engl J Med*. 2003;348:1368-75.
- <sup>47</sup> Choudhri T, Hoh B, Prestigiacomo C, Huang J, Kim L, Schmidt A, Kiesel W, Sander E, Pinsky D. Targeted inhibition of Intrinsic coagulation limits cerebral injury in Stroke without increasing intracerebral hemorrhage. *J Exp Med*. 1999;190 (1):91-99.
- <sup>48</sup> Abumiya T, Fitridge R, Mazur C, et al. Integrin alpha(IIb)beta(3) inhibitor preserves microvascular patency in experimental acute focal cerebral ischemia. *Stroke*. 2000;31:1402-1409.
- <sup>49</sup> Leclerc JR. Platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonists: lessons learned from clinical trials and future directions. *Crit Care Med*. 2002;30:S332-S340
- <sup>50</sup> Food and Drug Administration (FDA) Drug Approvals for May 1998. Online en <http://www.fda.gov/cder/foi/applletter/1998/20718ltr.pdf>. Fecha de búsqueda. 13 de abril 2004
- <sup>51</sup> Hoffmann P, Bernat A, Savi P, Herbert JM. Prevention of thrombosis and enhancement of thrombolysis in rabbits by SR 121787, a glycoprotein IIb/IIIa antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998;286:670-675.
- <sup>52</sup> Choudhri TF, Hoh BL, Zerwes HG, et al. Reduced microvascular thrombosis and improved outcome in acute murine stroke by inhibiting GP IIb/IIIa receptor-mediated platelet aggregation. *J Clin Invest*. 1998;102:1301-1310.
- <sup>53</sup> The Abciximab in Ischemic Stroke Investigators. Abciximab in Emergent Stroke Treatment Trial (AbESTT) 28th International Stroke Conference (February 2003). *Stroke*. 2003;34:252.
- <sup>54</sup> Eckert B, Koch C, Thomalla G, Roether J, Zeumer H. Acute Basilar Artery Occlusion treated with Combined Intravenous Abciximab and Intra-arterial Tissue Plasminogen Activator Report of 3 cases. *Stroke*. 2002; 33:1424 -1427.
- <sup>55</sup> Centocor, Inc & Eli Lilly and Co. Abciximab (ReoPro) in Acute Ischemic Stroke. Online en <http://clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00073372?order=2>. Fecha de acceso 15 de abril de 2004.

- <sup>56</sup> CLEAR Stroke Trial. Combined Approach to Lysis Utilizing Eptifibatide and rt-PA in Acute Ischemic Stroke. Online en [www.strokecenter.org/trials/TrialDetail.asp?ref=478&browse=C](http://www.strokecenter.org/trials/TrialDetail.asp?ref=478&browse=C). Fecha de búsqueda el 24 de Abril de 2004.
- <sup>57</sup> Food and Drug Administration (FDA) Center for drug evaluation and research (CDER). Online en <http://www.fda.gov/cder/foi/label/1998/20912lbl.pdf> Fecha de búsqueda. 17 de Diciembre 2004
- <sup>58</sup> Junghans U, Seitz RJ, Aulich A, Freund HJ, Siebler M. Bleeding risk of tirofiban, a nonpeptide GPIIb/IIIa platelet receptor antagonist in progressive stroke: an open pilot study. *Cerebrovasc Dis.* 2001;12:308-312.
- <sup>59</sup> Hernández Sampieri R, Fernández Collado C, Baptista Lucio P. Metodología de la Investigación. México D. F., México 1998, Mc Graw-Hill Interamericana Editores S. A. de C. V.
- <sup>60</sup> The Platelet Receptor Inhibition in Ischemic Syndrome Management (PRISM) Study Investigators. A Comparison of Aspirin plus Tirofiban with Aspirin plus Heparin for Unstable Angina. *N Engl J Med* 1998; 338:1498-1505.
- <sup>61</sup> Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals. Office of Laboratory Animal Welfare (OLAW). U.S. Government Principles for the Utilization and Care of Vertebrate Animals Used in Testing, Research, and Training. Online en <http://grants2.nih.gov/grants/olaw/references/phspol.htm#USGovPrinciples>. Fecha de acceso 12 de abril 2004.
- <sup>62</sup> Animal Welfare Act as Amended (7 USC, 2131-2156). Online en la webpage de "United States Department of Agriculture" (USDA) y "National Agricultural Library" (NAL) en [www.nal.usda.gov/awic/legislat/awa.htm](http://www.nal.usda.gov/awic/legislat/awa.htm). Fecha de búsqueda 12 de abril de 2004.
- <sup>63</sup> Kirchhof K, Welzel T, Zoubaa S, Lichy C, Sikinger M, Lobacher H et al. New Method of Embolus Preparation for Standardized Embolic Stroke in Rabbits. *Stroke* Sept 2002;33:2329-2333
- <sup>64</sup> Unit for Laboratory Animal Medicine. University of Michigan. Anesthesia and Analgesia Guidelines: Rabbit. Online en [www.ucuca.umich.edu/Anes%20Rabbit.doc](http://www.ucuca.umich.edu/Anes%20Rabbit.doc). Fecha de búsqueda. 13 de abril 2004.
- <sup>65</sup> Gladstone D, Black S, Hakim A. Toward Wisdom From Failure. Lessons From Neuroprotective Stroke Trials and New Therapeutic Directions. *Stroke.* 2002; 33: 2123 - 2136.
- <sup>66</sup> Jonas S, Aiyagari V, Vieira D, Figueroa M. The failure of neuronal protective agents versus the success of thrombolysis in the treatment of ischemic stroke. The predictive value of animal models. *Ann N Y Acad Sci* 2001.
- <sup>67</sup> Grotta J. Acute Stroke Therapy at the Millennium: Consummating the Marriage Between the Laboratory and Bedside. The Feinberg Lecture. *Stroke.* 1999;30:1722-1728.



- 
- <sup>68</sup> Kirchhof K, Sikinger M, Welzel T, Zouba S, Sartor K. Does the result of thrombolysis with recombinant tissue-type plasminogen activator (rt-PA) in rabbits depend on the erythrocyte – and fibrin – content of a thrombus? *Rofo*. 2004 ;176 (1):98-105
- <sup>69</sup> Junghans U, Siebler M. Cerebral microembolism is blocked by Tirofiban, a selective nonpeptide platelet glycoprotein lib/IIIa receptor antagonist. *Circulation*. 2003;107:2717-2721.
- <sup>70</sup> Oren RE, Raool NA Rubinstein EH. Effect of ketamine on cerebral cortical blood flow and metabolism in rabbits. *Stroke* 1987;18:441-444.
- <sup>71</sup> Choi DW, Maulucci-Gedde M, Kreigstein AR. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci*. 1987;317:1505-1516.
- <sup>72</sup> Norman G, Streiner D. *Bioestadística*. 1ª edición. Madrid: Mosby/Doyma Libros; 1996.
- <sup>73</sup> Kaufmann A, Firlík A, Fukui M, Wechsler L, Jungries C, Yonas H. Ischemic core and penumbra in human stroke. *Stroke*. 1999;30:93-99.
- <sup>74</sup> Heiss WD, Thiel A, Grond M, Graft R, Which targets are relevant for therapy of acute ischemic stroke. *Stroke*. 1999;30:1486-1489.
- <sup>75</sup> Marchal G, Beaudouin V, Rioux P, Sayette V, Le Doze F, Viader F, Derlon J, Baron J. Prolonged persistence of substantial volumes of potentially viable brain tissue after stroke. *Stroke*. 1996;27:599-606.
- <sup>76</sup> Wahl F, Gros Jean-Piot O, Barriere F, Uzan A, Stutzmann JM. Enoxaparin reduce cerebral edema after phototrombotic injury in the rat. *Haemostasis*. 1998;28:75-85
- <sup>77</sup> Estilo Vancouver 2000. Online en el sitio web de fisterra en [www.fisterra.com/recursos\\_web/mbe/vancouver.htm](http://www.fisterra.com/recursos_web/mbe/vancouver.htm). Fecha de búsqueda 12 de Abril de 2004.